



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES  
UNIVERSITAIRES**

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)  
*(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)*

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE

BioSE



ECOLE DOCTORALE BioSE  
BIOLOGIE, SANTÉ et son ENVIRONNEMENT  
ED 266

**Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

## **Thèse**

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »**

**par Manon DOUYERE**

**Implication de la neuropiline-1  
dans la progression du médulloblastome**

**Le 10 février 2023**

### **Membres du jury :**

|                       |                            |  |
|-----------------------|----------------------------|--|
| Directeurs de thèse : | M. Pascal CHASTAGNER       | PU-PH, Service de pédiatrie Brabois, UMR 7039<br>CNRS, Vandœuvre-lès-Nancy |
|                       | M. Cédric BOURA            | MCF HDR, CRAN UMR 7039 CNRS,<br>Vandœuvre-lès-Nancy                        |
| Président du Jury :   | M. Célio POUPONNOT         | DR, Institut Curie UMR 3347 CNRS/U1021<br>INSERM, Paris                    |
| Rapporteur :          | M. François DOZ            | PU-PH, Service de pédiatrie Institut Curie, Paris                          |
| Examineurs :          | Mme Hélène BURCKEL         | HDR, ICANS, laboratoire ICube, UMR 7357,<br>Strasbourg                     |
|                       | Mme Nadia PELLEGRINI-MOÏSE | MCF, HDR, L2CM UMR 7053 CNRS,<br>Vandœuvre-lès-Nancy                       |

---

**CRAN - UMR 7039 CNRS, Université de Lorraine**

**Département Biologie, Signaux et Systèmes en Cancérologie et Neurosciences**

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'assister à ma soutenance de thèse et de m'accorder de leur temps pour évaluer mon travail : mes rapporteurs Pr **François Doz** et le Dr **Célio Pouponnot**, ainsi que mes examinatrices le Dr **Nadia Pelligrini** et le Dr **Hélène Burkel**.

Je voudrais également remercier mes directeurs de thèse sans qui tout cela n'aurait pas été possible : **Pascal**, merci à vous pour vos précieux conseils et votre expertise en clinique qui m'a apportée une perspective supplémentaire à mes travaux. **Cédric**, je ne vous remercierais jamais assez pour votre disponibilité, votre gentillesse et votre optimisme à toute épreuve. Vous avez réussi à faire grandir mon esprit scientifique, à me faire comprendre que chaque résultat est une mine d'informations qu'il faut apprendre à interpréter même si ce ne sont pas les résultats attendus, qu'il faut toujours rebondir et persévérer.

Je tenais à adresser mes remerciements à l'équipe de direction du CRAN et plus particulièrement aux Pr **Didier Wolf** et **Muriel Barberi-Heyob**. Je les remercie sincèrement pour leur soutien et leur accueil au sein du laboratoire.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe qui a contribué à mon évolution tout au long de ces années de thèse, que ce soit sur le plan professionnel mais aussi personnel (**Hervé**, les deux **Hélène**, **Sophie**, **Noémie**). Je voudrais remercier tout particulièrement : **Julien**, mon papoune du labo, merci pour ta bienveillance et ta gentillesse sans lesquelles je n'aurais jamais pu progresser autant en vivo. Mais je tiens particulièrement à te remercier parce que tu as toujours cru en moi, merci pour ton humour et ta bonne humeur au quotidien, travailler avec toi fut vraiment un plaisir. **Alicia**, toi qui m'as formée sur diverses techniques *in vitro* et qui m'a été d'un grand soutien moral tout au long de ma thèse, merci aussi pour ton franc parler qui te caractérise et sache que tes ragots vont beaucoup me manquer. **Justine**, je ne peux que te remercier, d'abord pour ton aide pour les manip, mais surtout pour être comme tu es, une personne sincère et pleine de vie avec qui il est tellement stimulant et agréable de travailler. **Joël**, merci pour tes conseils et ton esprit critique qui m'ont aidée à prendre du recul sur beaucoup de choses et je ne te remercierais jamais assez pour toutes ces blagues sorties de nulle part qui m'ont toujours bien fait rire. **Valérie**, mon alliée Normande, je voulais te remercier

pour ta bienveillance et tes conseils, il n'y aura que toi parmi tous ces Lorrains qui auras compris mon amour pour la crème et le fromage.

Une mention spéciale pour les Amigos du CRAN, c'est grâce à vous si j'ai pu traverser les moments un peu plus difficiles au cours de ces trois dernières années, je vous en remercie. En particulier, **Yann**, je te remercie pour toutes ces soirées jeux, malgré mon incapacité à bluffer au Time Bomb, j'ai adoré ces moments en dehors du travail. **Alex**, malgré ton melon tu sais te faire apprécier, et le fait de m'avoir supportée durant ces années au bureau fait de toi, une fois de plus, le boss. Ce fut un plaisir d'être ton témoin négatif, merci pour tout. **Lucie**, la petite dernière de la bande, tu complètes à merveille cette fine équipe et les debriefs de nos journées en rentrant le soir dans ma voiture vont me manquer. **Victor**, merci d'avoir pris à chaque fois le temps de m'expliquer ton travail (où tes histoires de fantômes restent très obscures pour moi) et pour toutes ces sorties en dehors du labo. Et **Maxime**, tu n'auras pas réussi à me faire aimer le thé mais tu m'auras fait apprécier tous ces moments au labo (mon meilleur souvenir restera le sauna dans le labo d'à côté...).

Je tenais également à remercier mes autres collègues, partis en cours de route, ainsi que les stagiaires de M2, avec qui j'ai également passé de bons moments au labo et en dehors : **Neyla, Perrine, Cyril, Eddy et Mickaël**.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner le plus important pour moi : **ma famille**.

Tout d'abord, **Fanny**, bien plus que ma meilleure amie, tu sais que tu fais partie de la famille pour moi. Tu ne liras sûrement jamais ces lignes, mais tu sais déjà à quel point tu comptes pour moi, ton soutien et ton amitié sans faille, depuis nos trois ans, sont indispensables à ma vie.

A mes **grands-parents, Gégé, Stéphane et Léa**, vous avez toujours été là pour moi, vous êtes tous et resterez des exemples pour moi, vous m'avez fait grandir et devenir la personne que je suis aujourd'hui et je vous en remercie.

**Flo**, toi qui me connais mieux que personne, tu m'as toujours soutenue et tu es là quand j'ai besoin de toi, je ne te remercierais jamais assez pour tout ça. Petit frère, je serais aussi toujours là pour toi.

Un remerciement tout particulier pour **mes parents**, vous m'avez toujours tout donné pour que je puisse réaliser ce dont j'avais envie, toujours guidée et soutenue dans mes choix, vous m'avez aussi supportée pendant toutes ces années (qu'on se le dise, je ne suis pas aussi facile à vivre que j'en ai l'air...). Aujourd'hui si j'en suis arrivée là, si je suis la femme que je

suis maintenant, c'est essentiellement grâce à vous. Je ne vous remercierais jamais assez pour tout ce que vous m'avez apporté.

Et pour finir, **Alexis** (Boubou pour les intimes), si je suis allée au bout de ces années de thèse c'est en grande partie grâce à toi. Je te serais toujours reconnaissante de m'avoir soutenue et encouragée comme tu l'as fait et de croire autant en moi. Malgré la distance, on a tenu bon et je pense même que nous en sommes ressortis plus forts, avec pleins de bons souvenirs de nos escapades en amoureux en cadeaux.

A toutes les personnes citées et à celles que j'ai oubliées, merci d'avoir été là et sachez que si c'était à refaire, je le referais, juste pour avoir la chance de vous rencontrer dans ma  
vie.

# Table des matières

|   |           |
|---|-----------|
| Remerciements.....  | 2         |
| Table des matières .....  | 5         |
| Liste des abréviations.....   | 11        |
| Liste des figures .....   | 14        |
| Liste des tableaux.....   | 17        |
| <b>Introduction générale .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>I. Le médulloblastome .....</b>  | <b>19</b> |
| 1.    Epidémiologie .....   | 19        |
| 2.    Classification du médulloblastome .....   | 20        |
| 2.1. Classification histologique du médulloblastome .....   | 20        |
| 2.2. Classification moléculaire du médulloblastome .....  | 21        |
| 2.2.1. Le sous-groupe WNT.....  | 23        |
| 2.2.2. Le sous-groupe SHH.....  | 24        |
| 2.2.3. Le sous-groupe 3 .....   | 25        |
| 2.2.4. Le sous-groupe 4 .....   | 25        |
| 2.2.5. Une hétérogénéité au sein même des différents sous-groupes.....  | 26        |
| 3.    Les traitements .....   | 28        |
| 3.1. Les traitements conventionnels .....   | 28        |
| 3.2. Les thérapies ciblées .....  | 30        |
| 3.2.1. Thérapies ciblées des médulloblastomes de sous-groupe WNT ....   | 30        |
| 3.2.2. Thérapies ciblées des médulloblastomes de sous-groupe SHH .....  | 30        |
| 3.2.3. Thérapies ciblées de médulloblastome de sous-groupe 3 et 4 .....   | 32        |
| 4.    Le médulloblastome comme un écosystème : une hétérogénéité cellulaire<br>inter-tumorale et intra-tumorale ..... | 33        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.1. Une hétérogénéité inter-tumorale liée à l'origine cellulaire du médulloblastome .....                    | 33        |
| 4.2. Une hétérogénéité cellulaire intra-tumorale.....   | 34        |
| 4.2.1. Une hétérogénéité au niveau des cellules tumorales.....  | 34        |
| 4.2.1.1. Le concept de cellules souches cancéreuses .....   | 34        |
| 4.2.1.2. Identification des cellules souches cancéreuses dans les tumeurs cérébrales                          | 36        |
| 4.2.1.3. Les voies de signalisation impliquées dans les cellules souches cancéreuses de médulloblastome ..... | 37        |
| 4.2.1.3.1. La voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine.....   | 37        |
| 4.2.1.3.2. La voie de signalisation SHH.....  | 39        |
| 4.2.1.3.3. La voie de signalisation Notch.....  | 40        |
| 4.2.1.3.4. La voie de signalisation Pi3K/AKT/mTOR.....  | 42        |
| 4.2.2. Une hétérogénéité au niveau des cellules du microenvironnement tumoral                                 | 43        |
| 4.2.2.1. Les cellules immunitaires.....   | 43        |
| 4.2.2.2. Les astrocytes .....   | 46        |
| 4.2.2.3. Les cellules endothéliales.....  | 49        |
| <b>II. La Neuropiline-1 et le cancer .....</b>  | <b>53</b> |
| 1. Découverte et structure des neuropilines .....   | 53        |
| 2. Voies de signalisation des NRPs et rôles biologiques.....  | 54        |
| 2.1. Récepteurs des Sémaphorines de classe 3.....   | 54        |
| 2.2. Récepteurs de la famille des VEGF .....  | 56        |
| 2.3. Autres ligands des NRPs.....   | 57        |
| 2.4. Une signalisation intracellulaire via GIPC1 .....  | 58        |
| 2.5. Rôle dans l'immunité .....   | 59        |
| 3. Rôle de NRP1 dans la carcinogénèse .....   | 62        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.1. Surexpression NRP1 : facteur de mauvais pronostic et progression tumorale  | 62        |
| 3.2. NRP1 et angiogenèse .....  | 63        |
| 3.3. NRP1 et cellules souches cancéreuses .....   | 65        |
| 3.4. NRP1 et immunité antitumorale.....   | 67        |
| 3.5. NRP1 et résistance aux traitements.....  | 69        |
| 3.5.1. Résistance à la radiothérapie .....  | 69        |
| 3.5.2. Résistance aux chimiothérapies .....   | 70        |
| 3.5.3. Résistance aux thérapies ciblées .....   | 70        |
| 4. NRP1 : une cible thérapeutique à envisager dans le Médulloblastome ?.  | 71        |
| 4.1. Ciblage de NRP1 dans le cadre du cancer.....   | 71        |
| 4.1.1. Les formes solubles de NRP1 .....  | 72        |
| 4.1.2. Les microARNs ciblant NRP1 .....   | 72        |
| 4.1.3. Les anticorps monoclonaux anti-NRP1 .....  | 72        |
| 4.1.4. Les peptides et les peptidomimétiques ciblant NRP1 .....   | 73        |
| 4.2. Rôle de NRP1 dans le médulloblastome.....  | 75        |
| <b>III. Objectifs de la thèse.....</b>  | <b>78</b> |
| <b>Résultats.....</b>   | <b>80</b> |
| <b>I. Mise en place d'un modèle cellulaire bioluminescent et d'un suivi de croissance tumorale par imagerie de bioluminescence <i>in vivo</i> .....</b> | <b>81</b> |
| 1. Contexte .....   | 81        |
| 2. Matériels et Méthodes .....  | 83        |
| 2.1. Culture cellulaire .....   | 83        |
| 2.2. Infection des cellules de médulloblastome par un lentivirus contenant le gène de la luciférase .....   | 83        |
| 2.3. Visualisation de la bioluminescence <i>in vitro</i> .....  | 84        |
| 2.4. Culture des médullosphères .....   | 84        |
| 2.5. Etude de la viabilité cellulaire.....  | 85        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.6.       | Migration cellulaire 2D .....  | 85        |
| 2.7.       | Analyse de l'expression des protéines par Western blot .....   | 85        |
| 2.8.       | Xénotransplantes orthotopiques de médulloblastome.....   | 86        |
| 2.9.       | Suivi de la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence .....  | 87        |
| 2.10.      | Statistiques .....   | 87        |
| <b>3.</b>  | <b>Résultats .....</b>   | <b>88</b> |
| 3.1.       | Mise en place d'un modèle cellulaire de médulloblastome exprimant la luciférase  | 88        |
| 3.1.1.     | Validation de l'expression de la luciférase dans les lignées DAOY  | 88        |
| 3.1.2.     | Caractérisation de l'expression de la luciférase sur le comportement des cellules de médulloblastome .....   | 89        |
| 3.1.3.     | Caractérisation de l'expression de la luciférase sur le comportement « souche » des cellules de médulloblastome .....  | 90        |
| 3.1.4.     | Effets de la transduction sur l'expression de notre protéine d'intérêt, la neuropiline-1 .....   | 91        |
| 3.2.       | Mise en place d'un modèle de suivi de croissance tumorale par imagerie de bioluminescence dans un modèle <i>in vivo</i> de xénotransplantes orthotopiques de médulloblastome ..... | 92        |
| <b>4.</b>  | <b>Bilan des études préliminaires.....</b>   | <b>94</b> |
| <b>II.</b> | <b>Effets de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie dans un modèle de xénotransplantes orthotopiques de médulloblastome .....</b>  | <b>95</b> |
| 1.         | Contexte .....   | 95        |
| 2.         | Matériels et Méthodes .....  | 97        |
| 2.1.       | Culture cellulaire .....   | 97        |
| 2.2.       | Xénotransplantes orthotopiques de médulloblastome.....   | 97        |
| 2.3.       | Traitement des animaux et suivi de la croissance tumorale .....  | 98        |
| 2.4.       | Histologie .....   | 99        |
| 2.4.1.     | Préparation des coupes de tumeurs .....  | 99        |

|   |  |            |
|---|--|------------|
| 2.4.2.  | Coloration Hématoxyline et Eosine (HE) .....   | 99         |
| 2.4.3.  | Immunohistochimie.....   | 100        |
| 2.5.  | Statistiques .....   | 100        |
| 3.  | <b>Résultats</b> .....   | <b>102</b> |
| 3.1.  | Effets du MR438 associé à la RT sur la croissance tumorale et la survie des souris après une semaine de traitement (5 jours) .....                                       | 102        |
| 3.2.  | Analyses immunohistochimiques du modèle de xénogreffes orthotopiques DAOY-LUC après une semaine de traitement (5 jours) .....  | 103        |
| 3.3.  | Effets de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie pendant une semaine de traitement (5 jours) sur la vascularisation des tumeurs intracérébrales DAOY-LUC ..... | 105        |
| 3.4.  | Effets de l'inhibition de NRP1 associée à la RT sur la croissance tumorale et la survie des souris après deux semaines de traitement (10 jours) .....                    | 106        |
| 3.5.  | Analyses immunohistochimiques du modèle de xénogreffes orthotopiques DAOY-LUC après deux semaines de traitement (10 jours).....  | 107        |
| 3.6.  | Effets de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie pendant deux semaines de traitement (10 jours) sur la vascularisation des tumeurs intracérébrales             | 110        |
| 4.  | <b>Discussion et conclusion</b> .....  | <b>111</b> |
| <b>III. Effets de l'inhibition de NRP1 sur le microenvironnement tumoral du médulloblastome</b> ..... |  | <b>117</b> |
| 1.  | <b>Contexte</b> .....  | <b>117</b> |
| 2.  | <b>Matériels et Méthodes</b> .....   | <b>119</b> |
| 2.1.  | Culture cellulaire .....   | 119        |
| 2.2.  | Infection des cellules de médulloblastome et de microglie par lentivirus   | 120        |
| 2.3.  | Culture des médullosphères, traitements et récupération des milieux conditionnés .....   | 121        |
| 2.4.  | Etude de la viabilité cellulaire.....  | 122        |

|  |            |
|--|------------|
| 2.5. Analyse de l'expression des protéines par Western blot .....  | 122        |
| 2.6. Coculture et mesure de la croissance tumorale <i>in vitro</i> par bioluminescence .....   | 123        |
| 2.7. Analyse de la prolifération cellulaire après culture dans les milieux conditionnés.....   | 123        |
| 2.8. Analyse de l'invasion cellulaire après culture dans les milieux conditionnés.....   | 123        |
| 2.9. Test de recrutement de la microglie sur les médullosphères.....   | 124        |
| 2.10. Statistiques .....   | 125        |
| <b>3. Résultats .....</b>  | <b>126</b> |
| 3.1. Impact d'une coculture 2D <i>in vitro</i> avec des cellules de microglie et d'astrocytes sur la croissance tumorale du médulloblastome .....  | 126        |
| 3.2. Evaluation de la cytotoxicité de l'inhibition de NRP1 par le MR438 associé ou non à la radiothérapie sur les cellules du microenvironnement du médulloblastome .....                      | 128        |
| 3.3. Effets de l'inhibition de NRP1 et/ou de la RT sur la croissance tumorale en présence des différentes populations du microenvironnement tumoral .....                                      | 130        |
| 3.4. Evaluation des effets directs du traitement au MR438 associé à la radiothérapie sur le recrutement de la microglie par les CSC de médulloblastome dans un modèle 3D <i>in vitro</i> ..... | 132        |
| 3.5. Evaluation des effets indirects du MR438 associé à la radiothérapie sur le recrutement de la microglie par les CSC dans un modèle 3D <i>in vitro</i> .....                                | 134        |
| 3.6. Impact des milieux conditionnés des cellules souches de médulloblastome sur les cellules microgliales .....   | 136        |
| <b>4. Discussion et conclusion .....</b>   | <b>138</b> |
| <b>Discussion et conclusion générale.....</b>  | <b>143</b> |
| <b>Bibliographie .....</b>   | <b>149</b> |
| <b>Annexes .....</b>   | <b>187</b> |

## Liste des abréviations

APC : Adenomatous Polyposis Coli  
ARNm : ARN messenger  
ATO : Arsenic trioxyde  
BHE : Barrière hématoencéphalique  
BTSC : Cellules souches cancéreuses de tumeurs cérébrales  
CCL2 : Chimiokine ligand 2  
CD : Cellule dendritique  
CDK : Cyclines-kinases-dépendantes  
CE : Cellule endothéliale  
Col IV : Collagène de type IV  
Cox43 : Connexine 43  
CPA : Cellule présentatrice de l'antigène  
CCPs : Peptides pénétrant dans les cellules  
CendR : Règle « C-end » de liaison à NRP1  
CSC : Cellules souches cancéreuses  
DLL : Delta-like protein  
EAE : Encéphalomyélite auto-immune  
ECS : Cellules souches cancéreuses de l'épiderme  
EGF : Facteur de croissance épidermique  
EGF-R : Récepteur du facteur de croissance épidermique  
ET-1: Endothéline-1  
FGF : Facteur de croissance des fibroblastes  
Fz : Frizzled  
G-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes  
GFP : Green fluorescent protein  
GIPC1 : GAIP interacting protein C terminus 1  
GPCRs : Récepteurs couplés aux protéines G  
HDAC : Histones désacétylases  
HGF : Facteur de croissance des hépatocytes  
HLA : Antigènes des leucocytes humains  
IL4 : Interleukine 4  
IL6 : Interleukine 6

i17q : Isochromosome 17q  
INF $\gamma$  : Interféron  $\gamma$   
IP : Intrapéritonéale  
IPS : Induced Pluripotent Stem cells  
IRM : Imagerie par résonance magnétique  
IV : Intraveineux  
JAK2 : Janus kinase 2  
LB : Lymphocyte B  
LCA : Large anaplastic cell  
LT : Lymphocyte T  
LTreg : Lymphocyte T régulateur  
mAb : Anticorps monoclonal  
MB : Médulloblastome  
miRs : MicroARNs  
MMPs : Métalloprotéinases matricielles  
MS : Médullosphère  
NICD : Notch Intra Cellular Domain  
NK : Natural killer  
NO : Oxyde nitrique  
NRP1 : Neuropiline-1  
NRP2 : Neuropiline-2  
NRPs : Neuropilines  
NS : Neurosphère  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
PAF : Paraformaldéhyde  
PDE4D : Phosphodiesterase 4D  
PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes  
PDGFR : Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes  
PDX : Patient derived xenograft  
PDZ : PSD-95 / Dlg / ZO-1  
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase  
PIGF : Facteur de croissance placentaire  
PLK : Polo-like-kinase  
RFP : Red fluorescent protein

ROS : Espèces réactives de l'oxygène  
RT : Radiothérapie  
RTKs : Récepteurs tyrosine kinase  
SEMA 3 : Sémaphorines de classe 3  
SF : Scatter factor  
SHH : Sonic Hedgehog  
siARN : ARN interférents  
SNC : Système nerveux central  
sNRP1 : NRP1 soluble  
STAT3 : Signal transductor and activator of transcription 3  
SVF : Sérum de veau foetal  
T $\beta$ R : Récepteur du TGF $\beta$   
TAA : Astrocyte associé à la tumeur  
TAMs : Macrophages infiltrants la tumeur  
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse  
TEP : Tomographie d'émission de positons  
TGF $\beta$  : Facteur de croissance transformant  $\beta$   
TMZ : Témazolomide  
Tu : Transducting units  
VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire  
VEGFR : Récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire  
WNT : Wingless

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 1 : Caractéristiques histologiques et morphologiques des différents types de médulloblastome .....  | 20 |
| Figure 2 : Comparaison des quatre sous-groupes moléculaires de médulloblastome.....  | 22 |
| Figure 3 : La voie de signalisation WNT .....  | 23 |
| Figure 4 : La voie de signalisation SHH .....  | 24 |
| Figure 5 : Représentation des modèles théoriques concernant la formation des tumeurs et la présence des cellules souches cancéreuses.....  | 35 |
| Figure 6 : La voie de signalisation WNT au sein des cellules souches cancéreuses.....  | 38 |
| Figure 7 : La voie de signalisation SHH dans les cellules souches cancéreuses.....   | 40 |
| Figure 8 : La voie de signalisation Notch impliquée dans les CSC .....   | 41 |
| Figure 9 : La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR et son rôle dans les CSC .....   | 42 |
| Figure 10 : Différentes populations de cellules du microenvironnement et de l'expression de PD-L1 selon les sous-groupes moléculaires de médulloblastome. ....                       | 43 |
| Figure 11 : Répartition des TAMs au sein des tumeurs cérébrales pédiatriques .....   | 45 |
| Figure 12 : Contribution des astrocytes associés à la tumeur aux cellules souches cancéreuses et inversement .....   | 48 |
| Figure 13 : Mécanismes et médiateurs moléculaires impliqués dans la formation de nouveaux vaisseaux qui favorisent la poursuite de la tumorigenèse dans les tumeurs du cerveau ..... | 50 |
| Figure 14 : Différents niveaux d'interaction entre les cellules endothéliales et les cellules tumorales. ....  | 52 |
| Figure 15 : Structure générale des Neuropilines .....  | 54 |
| Figure 16 : Récepteurs des sémaphorines de classe 3 (SEMA 3) .....   | 55 |
| Figure 17 : Ligands des NRPs et leurs fonctions .....  | 57 |
| Figure 18 : Rôles anti-inflammatoires et immunorégulateurs de NRP1 dans le système immunitaire .....   | 61 |
| Figure 19 : Implication de NRP1 dans les cellules souches cancéreuses.....   | 66 |
| Figure 20 : Différentes stratégies pour cibler NRP1 .....  | 71 |
| Figure 21 : Structure du MR438 .....   | 75 |
| Figure 22 : Pourcentage de survie de patients atteints de médulloblastome corrélée à l'expression de NRP1 .....  | 75 |
| Figure 23 : Corrélation entre l'expression NRP1 et du CD15 (FUT4) au sein du médulloblastome .....   | 77 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 24 : Effets du MR438 associé à la radiothérapie dans un modèle de xéno greffes orthotopiques de MB.....  | 77  |
| Figure 25 : Cartographie génétique du lentivirus Lentivirus-LV-CMV-Firefly luciferase.....  | 84  |
| Figure 26 : Réaction de bioluminescence par la luciférase en présence de son substrat, la luciférine.....   | 84  |
| Figure 27 : Transplantation en orthotopique avec un instrument de stéréotaxie .....   | 87  |
| Figure 28 : Mise en évidence de l'expression de la luciférase dans les lignées infectées par imagerie de bioluminescence .....  | 89  |
| Figure 29 : Effets de l'infection lentivirale sur le comportement cellulaire de la lignée DAOY .....  | 90  |
| Figure 30 : Effets de l'expression de la luciférase sur la capacité des lignées DAOY à former des médullosphères .....  | 91  |
| Figure 31 : Effet du lentivirus contenant le gène de la luciférase sur l'expression de NRP1 ..  | 92  |
| Figure 32 : Etude d'un modèle <i>in vivo</i> de suivi de croissance tumorale par imagerie de bioluminescence .....  | 93  |
| Figure 33 : Schéma expérimental et thérapeutique du modèle de xéno greffes orthotopiques de MB.....   | 98  |
| Figure 34 : Effets de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie dans un modèle de xéno greffes orthotopiques de médulloblastome pendant une semaine de traitement .....  | 103 |
| Figure 35 : Evaluation de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie par des analyses immunohistochimiques sur l'expression de NRP1, KI67 et CD15 après une semaine de traitement.....                          | 104 |
| Figure 36 : Evaluation de l'effet du MR438 associée à la radiothérapie, après une semaine de traitement, sur la vascularisation par des analyses immunohistochimiques sur l'expression du collagène de type IV.....   | 105 |
| Figure 37 : Effets de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie dans un modèle de xéno greffes orthotopiques de médulloblastome pendant deux semaines de traitement.....                                       | 107 |
| Figure 38 : Evaluation de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie par des analyses immunohistochimiques sur l'expression de NRP1, KI67 et CD15 après deux semaines de traitement.....                        | 109 |
| Figure 39 : Evaluation de l'effet du MR438 associée à la radiothérapie, après deux semaines de traitement, sur la vascularisation par des analyses immunohistochimiques sur l'expression du collagène de type IV..... | 110 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 40 : Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées pour l'étude du microenvironnement tumoral du médulloblastome.....                            | 119 |
| Figure 41 : Cartographie du lentivirus pLV-EF1A-RFP.....   | 120 |
| Figure 42 : Cartographie génétique du lentivirus pLV-EF1A-GFP-PGK-Puro.....  | 121 |
| Figure 43 : Mesure du recrutement de la microglie sur les médullosphères.....  | 124 |
| Figure 44 : Etude de la prolifération des cellules de médulloblastome en coculture avec la microglie et/ou les astrocytes .....                              | 127 |
| Figure 45 : Etude de la cytotoxicité du MR438 associé ou non à la RT sur les cellules du microenvironnement tumoral du médulloblastome.....                  | 129 |
| Figure 46 : Effets du MR438 associé à la RT sur la prolifération des cellules de MB mises en coculture avec les cellules du microenvironnement tumoral ..... | 131 |
| Figure 47 : Effets directs de l'inhibition de NRP1 et/ou RT sur le recrutement de la microglie au niveau des CSC de médulloblastome .....                    | 133 |
| Figure 48 : Effets indirects de l'inhibition de NRP1 et/ou RT sur le recrutement de la microglie au niveau des CSC de médulloblastome .....                  | 135 |
| Figure 49 : Etude de l'effet des milieux conditionnés des CSC de médulloblastome sur les cellules microgliales.....  | 137 |

## Liste des tableaux

|   |     |
|---|-----|
| Tableau 1 : Caractéristiques de chaque sous-groupe de médulloblastome .....   | 27  |
| Tableau 2 : Les stratifications des risques pour les sous-groupes de médulloblastome .....  | 28  |
| Tableau 3 : Résumé de l'implication de NRP1 dans le système immunitaire (D'après Douyère <i>et al.</i> , 2021).....   | 67  |
| Tableau 4 : Caractéristiques de la lignée de médulloblastome, DAOY, provenant de l'ATCC .....   | 83  |
| Tableau 5 : Bilan des résultats de l'effet de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie dans un modèle de xénogreffes orthoptiques de médulloblastome.....                                       | 116 |
| Tableau 6 : Bilan des effets directs et indirects de l'inhibition de NRP1 associée ou non à la radiothérapie sur des modèles de coculture 2D et 3D du médulloblastome et de son microenvironnement..... | 142 |

# Introduction générale

# **I. Le médulloblastome**

## **1. Epidémiologie**

Le médulloblastome (MB) est la tumeur cérébrale maligne pédiatrique la plus répandue chez l'enfant, représentant 15 à 20% des tumeurs cérébrales. Actuellement, les tumeurs cérébrales sont la première cause de décès par cancer chez l'enfant. Le taux de survie à 5 ans pour les patients atteints de tumeurs embryonnaires du système nerveux central (SNC), comme le MB, est de 54%. Le pronostic de ces tumeurs pédiatriques est par ailleurs nettement plus sombre avant l'âge d'un an : 62 % de survie à 5 ans contre 81 % pour les 10-14 ans (Millard & De Braganca, 2016; Pollack et al., 2019). Du fait de son origine embryonnaire, le MB affecte plus communément les enfants que les adultes, le MB ne représente que seulement 1% des tumeurs cérébrales chez l'adulte.

En France, 150 nouveaux cas de MB sont diagnostiqués par an. L'incidence du MB est de 5 à 10 cas pour 1 000 000 d'enfants par an en France. Cette incidence annuelle est estimée à 0,5 pour 100 000 enfants de moins de 15 ans (Desandes et al., 2014). La survie à 5 ans des enfants atteints de MB est estimée à 75-85% en absence de métastases. Malheureusement, malgré les traitements, la fréquence des récurrences reste élevée, en particulier en cas de métastases dès le diagnostic, et ceci dans 30% des cas.

Cette tumeur embryonnaire du SNC se développe au niveau de la fosse postérieure du SNC, dans le cervelet qui est le centre organisationnel du contrôle moteur et des fonctions cognitives motrices. Certaines de ces tumeurs vont métastaser et disséminer principalement au niveau de la surface leptoméningée du cerveau et au niveau de la moelle épinière, ainsi qu'exceptionnellement en dehors du SNC. Dans la plupart des cas, le MB est une tumeur qui apparaît de manière sporadique, seulement 5% des cas sont dus à une prédisposition héréditaire, associés à certaines pathologies comme le syndrome de Turcot, le syndrome de Gorlin, le syndrome de Li-Fraumeni. De plus, le MB est plus fréquent chez les garçons que chez les filles avec un sex ratio de 1,5 : 1 et ne présente aucune prédisposition raciale ou ethnique (Millard & De Braganca, 2016).

Sur le plan clinique, cette tumeur cérébrale se caractérise par une augmentation de la pression intracrânienne et une dysfonction cérébelleuse avec pour symptômes les plus fréquents : des vomissements et une ataxie. Des dysfonctionnements moteurs apparaissent plus tardivement dans le développement de la maladie. Le diagnostic de la pathologie se fait grâce à la réalisation d'une imagerie par résonance magnétique (IRM) crâniocervicale et par l'analyse biopathologique de la biopsie.

## 2. Classification du médulloblastome

### 2.1. Classification histologique du médulloblastome

La classification histologique du MB repose sur l'évaluation morphologique des échantillons tumoraux. La classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) de 2007 détermine quatre formes de MB (Louis et al., 2007) (Figure 1) :

- La forme **classique** : elle représente environ 70% des cas de MB. Elle se caractérise par des cellules aux noyaux hyperchromatiques ainsi que par la présence de pseudo-rosettes de Homer-Wright.
- La forme **desmoplasique/nodulaire** : elle représente 15% des cas et est caractérisée par la présence de fibres de collagène ou de réticuline ainsi que de nodules correspondant à des zones de maturation neuronale.
- La forme à **nodularité extensive** : On la retrouve principalement chez les plus jeunes enfants et se caractérise par une forte présence de nodules.
- La forme à **grandes cellules/anaplasique** : elle représente 4% des cas de MB. Au microscope, les cellules tumorales sont de forme ronde de grandes dimensions, elles possèdent des noyaux pléomorphes avec des nucléoles proéminents. On peut aussi observer de grandes zones de nécroses et une activité mitotique et apoptotique élevée.

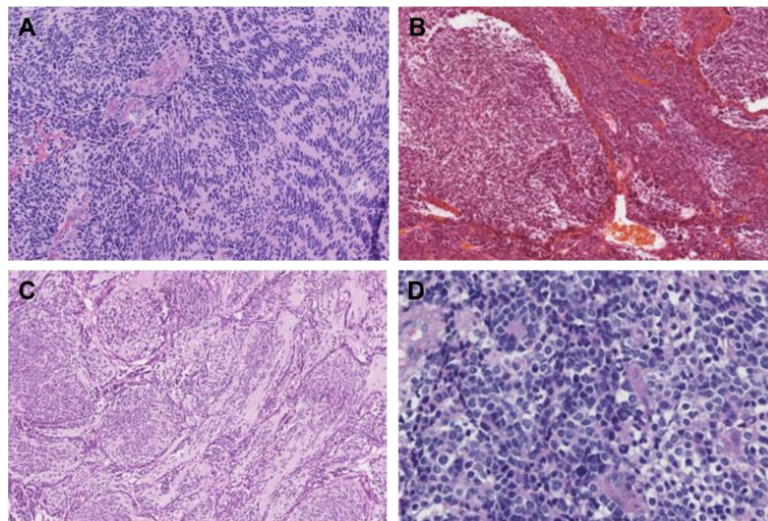


Figure 1 : Caractéristiques histologiques et morphologiques des différents types de médulloblastome

(A) Médulloblastome classique avec des arrangements palissadiques, (B) médulloblastome desmoplasique/nodulaire défini par des zones nodulaires claires cerclées par la réticuline et des zones de desmoplasie marquées par la coloration argentique, (C) médulloblastome à nodularité extensive avec nodules clairs (D) médulloblastome anaplasique caractérisé par un pléomorphisme nucléaire après coloration hématoxyline/éosine. (Figure adaptée de l'article de Siegfried A *et al.*, 2018)

Cependant, même si 70% des patients ont une forme classique, leur réponse aux traitements reste très variable et leur pronostic incertain. Ceci sous-entend qu'il existe une hétérogénéité au sein des MB et que la classification histologique n'est pas suffisante pour déterminer le pronostic et le choix des traitements des patients.

## 2.2. Classification moléculaire du médulloblastome

Plus récemment, plusieurs études moléculaires ont identifié quatre sous-groupes de MB : le sous-groupe WNT (Wingless), le sous-groupe Sonic Hedgehog (SHH), le sous-groupe 3 et 4 (non-WNT/non-SHH) (Figure 2). Cette nouvelle classification moléculaire fût ajoutée à la classification de l'OMS concernant les tumeurs cérébrales (Louis et al., 2021). Chaque sous-groupe possède des drivers moléculaires spécifiques, des caractéristiques cliniques et pronostiques propres à chacun. En effet, le sous-groupe WNT et le sous-groupe SHH (TP53 non muté), nommés par le nom de la voie de signalisation impliquée dans la pathologie (Wingless et Sonic Hedgehog, respectivement), sont associés à un meilleur pronostic, contrairement au sous-groupe SHH (TP53 muté), ainsi que les sous-groupes 3 et 4, qui eux sont plus agressifs et se caractérisent par un risque important de récurrences liées à un potentiel de dissémination métastatique élevé. Les voies de signalisation impliquées dans les sous-groupes 3 et 4 des MB ne sont pas encore clairement définies, mais récemment les travaux de Hendrikse *et al.*, ont mis en avant l'implication de la dysfonction du complexe CBFA (core binding factor alpha) dans ces sous-groupes (Hendrikse et al., 2022).



















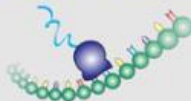
| Molecular Subgroups of Medulloblastoma   |   |   |  |   |
|--|---|---|--|---|
| CONSENSUS  | WNT   | SHH   | Group 3  | Group 4   |
| Cho (2010)   | C6  | C3  | C1/C5  | C2/C4   |
| Northcott (2010)   | WNT   | SHH   | Group C  | Group D   |
| Kool (2008)  | A   | B   | E  | C/D   |
| Thompson (2006)  | B   | C', D   | E, A   | A, C  |
| <b>DEMOGRAPHICS</b>  |   |   |  |   |
| Age Group:    |   |    |   |    |
| Gender: ♀ ♂  | ♂♂ : ♀♀   | ♂♂ : ♀♀   | ♂♂ : ♀   | ♂♂ : ♀  |
| <b>CLINICAL FEATURES</b>   |   |   |  |   |
| Histology  | classic, rarely LCA   | desmoplastic/nodular, classic, LCA  | classic, LCA   | classic, LCA  |
| Metastasis   | rarely M+   | uncommonly M+   | very frequently M+   | frequently M+   |
| Prognosis  | very good   | infants good, others intermediate   | poor   | intermediate  |
| <b>GENETICS</b>  |   |   |  |   |
|   | <br>CTNNB1 mutation  | <br>PTCH1/SMO/SUFU mutation<br>GLI2 amplification<br>MYCN amplification  | <br>i17q<br>MYC amplification  | <br>i17q<br>CDK6 amplification<br>MYCN amplification   |
| <b>GENE EXPRESSION</b>   |   |   |  |   |
|   | WNT signaling<br>MYC+   | SHH signaling<br>MYCN+  | Photoreceptor/GABAergic<br>MYC+++  | Neuronal/Glutamatergic<br>minimal MYC/MYCN  |

Figure 2 : Comparaison des quatre sous-groupes moléculaires de médulloblastome

Le médulloblastome est composé de quatre sous-groupes moléculaires distincts : le sous-groupe WNT, le sous-groupe SHH, le sous-groupe 3 et le sous-groupe 4. Ces quatre sous-groupes correspondent à différentes caractéristiques moléculaires et cliniques. WNT : Wingless, SHH : Sonic Hedgehog ; LCA : large anaplastic cell. (D'après Taylor et al., 2012)

### 2.2.1. Le sous-groupe WNT

Le sous-groupe WNT ne représente que 10% des MB et a un meilleur pronostic que les autres sous-groupes. Les patients du sous-groupe WNT ont un taux de survie d'environ 90% (Zou et al., 2020). Le sex ratio est équivalent pour les hommes et les femmes (1 :1). Les MB de sous-groupe WNT peuvent survenir à tout âge mais sont plus rares chez les nourrissons (M. D. Taylor et al., 2012). Ce sous-groupe se caractérise par de fréquentes mutations touchant la voie de signalisation WNT (Figure 3). Cette voie de signalisation joue un rôle important dans le développement embryonnaire et l'homéostasie tissulaire chez l'adulte et elle est impliquée dans de nombreux cancers (Duchartre et al., 2016). L'élément clé de cette voie de signalisation est la  $\beta$ -caténine qui lorsqu'elle s'accumule dans le noyau va activer la transcription des gènes cibles de la voie WNT (MacDonald et al., 2009). Dans le cas du MB, on retrouve certaines mutations germinales, touchant l'inhibiteur de la voie WNT par exemple : l'Adenomatous Polyposis Coli (APC), qui prédisposent au syndrome de Turcot, mais aussi des mutations somatiques comme sur le gène *CTNNB1*, codant la  $\beta$ -caténine, présent dans 75% des tumeurs WNT.

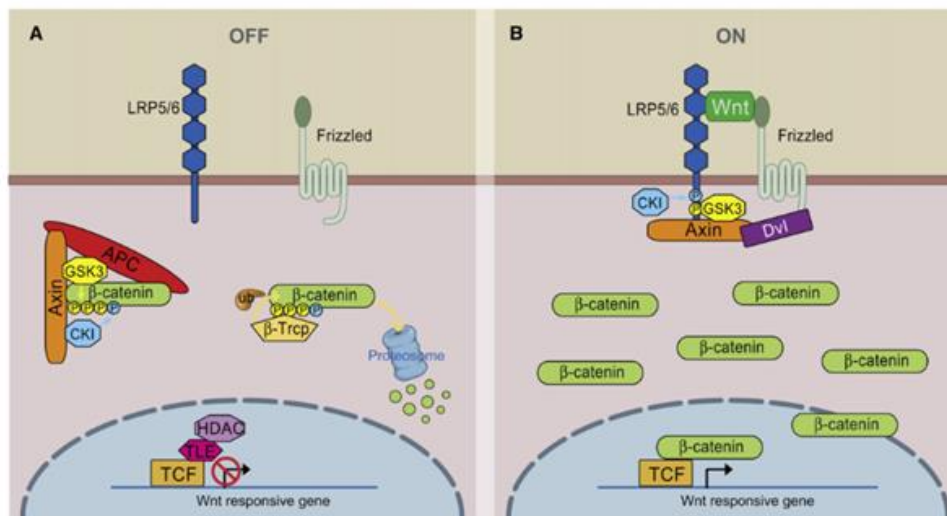


Figure 3 : La voie de signalisation WNT

(A) Schéma représentant la voie de signalisation WNT sous sa forme non-activée. En l'absence de Wnt, la  $\beta$ -caténine cytoplasmique forme un complexe avec l'Axine, l'APC, la GSK3 et la CK1, et est phosphorylée par la CK1 puis par la GSK3. La  $\beta$ -caténine phosphorylée est reconnue par l'ubiquitine ligase E3  $\beta$ -Trcp ce qui entraîne sa dégradation via le protéasome. Les gènes cibles Wnt sont réprimés par le TCF-TLE et les histones désacétylases (HDAC). (B) Schéma représentant la voie de signalisation WNT sous sa forme activée. En présence du ligand Wnt, un complexe récepteur se forme entre Fz et LRP5/6. Le recrutement de la protéine Dvl, par le récepteur Frizzled (Fz), conduit à la phosphorylation du LRP5/6 et au recrutement de l'Axine, ce qui perturbe la phosphorylation/dégradation de la  $\beta$ -caténine par l'Axine. Cela permet à la  $\beta$ -caténine de s'accumuler dans le noyau où elle sert de co-activateur pour le complexe TCF afin d'activer les gènes cibles de la voie WNT. (Figure tirée de la revue de MacDonald et al., 2009)

### 2.2.2. Le sous-groupe SHH

Le sous-groupe SHH est présent chez 30% des patients atteints de MB. Ces tumeurs sont plus fréquentes chez les jeunes enfants (< 4 ans) ainsi que chez les adultes (>16 ans) et touchent autant les femmes que les hommes (sex ratio 1 :1) (Sengupta et al., 2017). Le sous-groupe SHH se caractérise par une activation anormale de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Sigafos et al., 2021) (Figure 4), impliquée dans le développement embryonnaire et la réparation tissulaire (Skoda et al., 2018). Ceci est causé par des mutations somatiques ou germinales touchant les membres de la voie SHH, comme PTCH1, SMO, SUFU, ou encore par l'amplification du facteur de transcription GLI2 (Shih et al., 2014). Le pronostic des tumeurs SHH est plus sombre que celui des tumeurs WNT. En effet, les MB de sous-groupe SHH ont une barrière hématoencéphalique (BHE) intacte, ce qui les rend moins sensibles aux chimiothérapies que les MB de sous-groupes WNT (Phoenix et al., 2016). De plus, le pronostic des patients atteints d'un MB de sous-groupe SHH va être variable selon la présence ou non de la mutation TP53. Il a été démontré que la mutation TP53 jouait un rôle dans le pronostic. Ainsi, un patient ayant une mutation TP53 a un taux de survie drastiquement plus faible qu'un patient atteint d'un MB SHH de type TP53 non-muté (Zhukova et al., 2013).

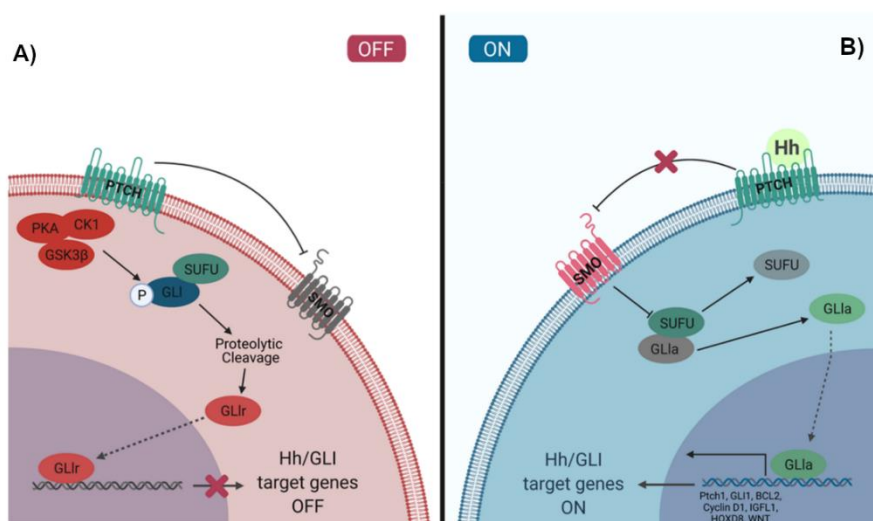


Figure 4 : La voie de signalisation SHH

A) En l'absence de liaison au ligand SHH (Hh), PTCH inhibe SMO. Les facteurs de transcription GLI sont séquestrés par SUFU et phosphorylés par PKA, CK1, et GSK3 $\beta$ , entraînant le clivage de GLI. Le clivage du domaine C-terminal crée GLI<sub>r</sub>, la forme répressive du facteur de transcription. GLI<sub>r</sub> se transloque ensuite dans le noyau et réprime la transcription des gènes cibles de la voie SHH. B) Le ligand SHH se lie au domaine extracellulaire de PTCH ce qui l'inhibe et stoppe les effets répressifs de PTCH sur SMO. SMO inhibe alors la séquestration par SUFU de GLI et la phosphorylation par PKA, CK1, et GSK3 $\beta$ , épargnant GLI du clivage protéolytique. La forme complète de GLI est un activateur transcriptionnel qui se transloque dans le noyau et favorise la transcription des gènes cibles de la voie SHH. (Figure tirée de la revue de Sigafos et al., 2021)

### 2.2.3. Le sous-groupe 3

Les MB de sous-groupe 3 représentent 15%-25% de l'ensemble des MB et se retrouvent plus communément chez les garçons. Le sous-groupe 3 a le pronostic le plus sombre. En effet, le taux de survie des patients atteints de ce type de tumeurs varie de 39 à 58% et va dépendre de l'âge du patient ainsi que de la stratégie thérapeutique utilisée. Ce mauvais pronostic est dû à la présence de métastases chez 50% des patients au moment du diagnostic (Menyhárt et al., 2019). L'évènement cytogénétique le plus courant de ce type de tumeur est l'isochromosome 17q (i17q) présent dans 50% des cas. D'autres évènements sont aussi fréquemment retrouvés comme la perte des chromosomes 8, 10q et 16q, ainsi que le gain des chromosomes 1q, 7 et 18 (Shih et al., 2014; Zou et al., 2020). Les MB de sous-groupe 3, contrairement aux sous-groupes WNT et SHH, ne sont pas liés à l'activation anormale d'une voie de signalisation en particulier. En revanche, ce sous-groupe se caractérise par une amplification récurrente de MYC, d'une surexpression de GABRA5, d'une duplication de SNCAIP ainsi que des mutations touchant SMARCA4 (Menyhárt et al., 2019).

### 2.2.4. Le sous-groupe 4

Le MB de sous-groupe 4 est le plus courant de tous les MB (35-45%) et reste le sous-groupe le moins bien caractérisé dans la littérature. Tout comme les MB de sous-groupe 3, son pronostic reste sombre à cause d'une forte dissémination métastatique chez les patients, de 35% à 45% au moment du diagnostic (Zou et al., 2020). Récemment, il a été démontré que les tumeurs des sous-groupes non-WNT/non-SHH sont entraînées par une fonction perturbée du complexe CBFA. Notamment, les altérations touchant les membres de ce complexe, CBFA2T2 et CBFA2T3, sont fortement présentes dans les tumeurs du sous-groupes 4 (Hendrikse et al., 2022). Concernant la cytogénétique, le sous-groupe 4 présente des aberrations fréquentes sur l'i17q dans 80% des cas. Les autres modifications, moins fréquentes, sont le gain du chromosome 7 et 18q et la perte des chromosomes 8q, 8p, 11p et X (Shih et al., 2014). Ce type de tumeurs se caractérise au niveau moléculaire par une surexpression de certains gènes, comme le gène PRDM6 (17% des cas) et GFI1/GFI1B (5 à 10% des cas), des mutations somatiques, impliquant par exemple le gène KDM6A (9%) ou KMT2C (6%), ou encore des amplifications de gènes avec MYCN (6%), OTX2 (6%) et CDK6 (6%) (Shih et al., 2014; Zou et al., 2020).

### 2.2.5. Une hétérogénéité au sein même des différents sous-groupes

Il existe également une hétérogénéité au sein même des différents sous-groupes de MB. En effet, des études antérieures ont reconnu l'existence de sous-divisions supplémentaires, en particulier au sein des groupes 3 et 4 (Cho et al., 2011), étiquetées  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (M. D. Taylor et al., 2012) (Tableau 1).

L'équipe de Cavalli a permis d'identifier ces différents sous-types en étudiant une cohorte de 763 échantillons de tumeurs primaires de MB. En se basant sur les mutations somatiques, les aberrations du nombre de copies et les caractéristiques cliniques de chaque échantillon, ils ont identifié 12 sous-types de MB (Cavalli et al., 2017). Concernant le sous-groupe WNT, deux sous-types ont été caractérisés : WNT $\alpha$  et WNT $\beta$ . Les patients de ces deux sous-types ont le même pourcentage de survie mais les tumeurs WNT $\alpha$  se retrouvent principalement chez les enfants avec une monosomie du chromosome 6 ubiquitaire contrairement aux tumeurs WNT $\beta$  qui touchent des patients plus âgés qui ont une diploïdie pour le chromosome 6.

Pour le sous-groupe SHH, quatre sous-types ont été mis en évidence :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . Le sous-type  $\alpha$  affecte plutôt les enfants compris entre 3 et 16 ans et correspond au pire pronostic, en partie dû à la mutation TP53 fortement présente. Il se caractérise par la perte des chromosomes 9q, 10q et 17p ainsi que par l'amplification de MYCN, GLI2 et YAP1. Les sous-types  $\beta$  et  $\gamma$  affectent les nourrissons (< 3 ans). Le taux de survie des patients porteurs de tumeurs SHH $\beta$  est pire que celui de ceux porteurs de tumeurs SHH $\gamma$ , notamment parce que les tumeurs SHH $\beta$  métastasent plus fréquemment. Contrairement au sous-type SHH $\gamma$  qui sont des tumeurs à nodularité extensive et silencieuses sur le plan moléculaire, les tumeurs SHH $\beta$  se caractérisent par une fréquente délétion du gène PTEN. Le sous-groupe SHH $\delta$ , concerne principalement les MB survenant chez les adultes, avec un pronostic favorable, et se caractérise par des mutations sur le promoteur TERT (Cavalli et al., 2017; Lafay-Cousin et al., 2016).

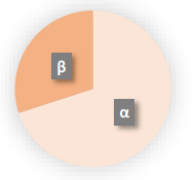
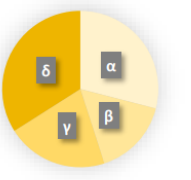


Les travaux de Cavalli *et al.* ont aussi permis de découvrir trois sous-types de MB dans le sous-groupe 3, nommés  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , qui possèdent des caractéristiques moléculaires et cliniques variables. Le sous-type 3 $\alpha$  affecte particulièrement les enfants en bas âge (< 3 ans) contrairement aux sous-types  $\beta$  et  $\gamma$ . Les MB de type 3 $\alpha$  et 3 $\beta$  sont de meilleur pronostic que les MB de type 3 $\gamma$ , en raison d'une moins grande fréquence de forme métastatique au diagnostic pour le sous-type 3 $\beta$ . Au niveau cytogénétique, le MB de sous-type 3 $\alpha$  se caractérise par la perte du chromosome 8q contrairement au sous-type  $\gamma$  où un gain du chromosome 8q est fréquent, se traduisant par l'augmentation du nombre de copies de MYC. Les patients atteints d'un MB de sous-type 3 $\beta$  montrent quant à eux une haute fréquence d'activation des oncogènes, GFI1 et GFI1B, ainsi qu'une amplification du gène OTX2 (Cavalli et al., 2017).

L'étude de Cavalli *et al* a aussi mis en évidence une hétérogénéité intra-tumorale dans les MB de sous-groupe 4 en identifiant trois sous-types différents :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Les patients de ces trois sous-types ont un même taux de survie, ainsi qu'une fréquence similaire de métastases au diagnostic. L'âge médian des patients atteints de ce type de tumeurs est légèrement plus élevé pour le sous-type 4 $\beta$  (10 ans) contrairement aux deux autres sous-types (7-8 ans). Sur le plan moléculaire, les sous-types 4 $\alpha$  et 4 $\gamma$  sont assez similaires car ils présentent tous deux une amplification de MYCN et CDK6 ainsi qu'une perte du chromosome 8q et un gain du chromosome 7q. Seul le sous-type 4 $\beta$  est différent puisque les tumeurs sont fortement enrichies avec la duplication de SNCAIP, et de i17q qui est omniprésente (Cavalli et al., 2017).

Il est donc important de souligner que même si le consensus établit quatre sous-groupes de MB, l'hétérogénéité intra-tumorale est à prendre en compte. En effet, l'identification des aberrations cytogénétiques et des voies de signalisations spécifiquement enrichies dans ces différents sous-types vont apporter d'importantes informations pour la création de modèles précliniques plus proches de la réalité et ainsi permettre des approches thérapeutiques plus personnalisées pour les patients.

Tableau 1 : Caractéristiques de chaque sous-groupe de médulloblastome

(Adapté de Kijima *et al.* 2016 et Cavalli *et al.*, 2017)

| Sous-groupes                | WNT   |             | SHH   |             |              |              | Groupe 3  |              |               | Groupe 4  |              |               |
|-----------------------------|---|-------------|---|-------------|--------------|--------------|---|--------------|---------------|---|--------------|---------------|
|                             | WNT $\alpha$  | WNT $\beta$ | SHH $\alpha$  | SHH $\beta$ | SHH $\gamma$ | SHH $\delta$ | Gp 3 $\alpha$   | Gp 3 $\beta$ | Gp 3 $\gamma$ | Gp 4 $\alpha$   | Gp 4 $\beta$ | Gp 4 $\gamma$ |
| Proportions des sous-types  |  |             |  |             |              |              |   |              |               |    |              |               |
| Epidémiologie               |   |             |   |             |              |              |   |              |               |   |              |               |
| Prévalence                  | 10%   |             | 30%   |             |              |              | 15-25%  |              |               | 35-45%  |              |               |
| Age                         | Enfants, adolescents  |             | Nourrissons, adultes  |             |              |              | Nourrissons, enfants  |              |               | Enfants, adultes  |              |               |
| Sexe (M : F)                | 1 : 1   |             | 1 : 1   |             |              |              | 2 : 1   |              |               | 3 : 1   |              |               |
| Caractéristiques cliniques  |   |             |   |             |              |              |   |              |               |   |              |               |
| Histologie                  | Classique   |             | Desmoplasique/nodulaire, classique  |             |              |              | Classique, anaplasique  |              |               | Classique, anaplasique  |              |               |
| Métastases                  | Rare  |             | Peu fréquent  |             |              |              | Très fréquent   |              |               | Fréquent  |              |               |
| Survie à 5 ans              | 90%   |             | 75%   |             |              |              | 50%   |              |               | 75%   |              |               |
| Pronostic                   | Très bon  |             | Bon/intermédiaire<br>(Dépend mutation TP53)   |             |              |              | Mauvais   |              |               | Intermédiaire   |              |               |
| Caractéristiques génétiques | Mutation CTNNB1<br>Mono chromosome 6<br>Amplification MYC                           |             | Mutations SMO, SUFU et PTCH1<br>Amplification GLI1/2 et MYCN                        |             |              |              | i17q<br>Perte chromosomes 8, 10q et 16q<br>Gain chromosomes 1q, 7 et 18<br>Duplication SNCAIP<br>Surexpression GABRA5<br>Amplification MYC (+++ Gp 3 $\gamma$ ) |              |               | i17q<br>Perte chromosomes 8q, 8p, 11p, X<br>Gain de chromosomes 7 et 18q<br>Mutations KDM6A, KMT2C<br>Surexpression PRDM6, GFII/GFII B<br>Amplification MYCN (+ Gp 4 $\alpha$ ),<br>OTX2 et CDK6 (Gp 4 $\gamma$ ) |              |               |

### 3. Les traitements

#### 3.1. Les traitements conventionnels

Actuellement, les traitements contre le MB basés sur les facteurs de risque des patients utilisent la chirurgie, la radiothérapie (RT) et/ou la chimiothérapie. Historiquement, les critères de stratifications des MB reposaient sur des données cliniques et pathologiques comme l'âge du patient, la présence de métastases ou non et les différents sous-types histologiques cités précédemment. Aujourd'hui, des groupes de facteurs de risque sont définis en fonction du taux de survie des patients. En effet, on retrouve les patients atteints de MB considérés de faible risque, avec un taux de survie supérieur à 90% (au niveau moléculaire principalement les MB de sous-groupe WNT), de risque standard avec un taux de survie compris entre 75% et 90% (groupe SHH et groupe 4 non métastatique), de risque élevé (taux de survie compris entre 50% et 75%) et les patients à risque très élevé dont le taux de survie est inférieur à 50% (groupe 3 et SHH avec la mutation TP53) (Ramaswamy et al., 2016) (Tableau 2). Cependant, il est actuellement reconnu que le MB est composé de sous-groupes moléculaires distincts qui répondent différemment aux traitements. Cette nouvelle classification moléculaire s'ajoute aux données à prendre en compte afin d'identifier le risque réel de récurrences (Louis et al., 2021).

Tableau 2 : Les stratifications des risques pour les sous-groupes de médulloblastome  
(Adapté de Ramaswamy *et al.*, 2016)

| Niveau de risque | Faible<br>(Survie > 90%)  | Standard<br>(Survie 75-90%)  | Elevé<br>(Survie 50-70%)  | Très élevé<br>(Survie < 50%)   | Inconnu  |
|------------------|---|--|---|--|--|
| WNT              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Non métastatique</li> <li>Age &lt; 16 ans</li> </ul>                                       |  |   |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Métastatique</li> </ul>   |
| SHH              |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Non métastatique</li> <li>TP53 non muté</li> <li>Pas d'amplification de MYCN</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Amplification de MYCN</li> <li>Métastatique</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>TP53 muté</li> </ul>                                  |  |
| Groupe 3         |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Non métastatique</li> <li>Pas d'amplification de MYC</li> </ul>                         |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Métastatique</li> <li>Amplification de MYC</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Non métastatique avec amplification de MYC</li> <li>117q</li> <li>Anaplasique/à grandes cellules</li> </ul> |
| Groupe 4         | <ul style="list-style-type: none"> <li>Non métastatique</li> <li>Perte du chromosome 11</li> <li>Gain du chromosome 17</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Non métastatique sans perte du chromosome 11</li> </ul>                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Métastatique</li> </ul>                                |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Anaplasique/à grandes cellules</li> </ul>   |

La première étape dans le traitement du MB est la chirurgie avec une résection maximale de la tumeur. Malheureusement, cette exérèse peut s'accompagner de complications, comme un mutisme cérébelleux (touchant ¼ des patients), et dans certains cas la tumeur n'est pas opérable. La seconde approche thérapeutique standard est la RT accompagnée ou non d'une chimiothérapie. En effet, l'irradiation crâniospinale est essentielle dans le traitement du MB pour éviter notamment le risque de dissémination métastatique. La dose conventionnelle de RT administrée aux patients à haut risque est de 36 Gray (Gy) et de 24 Gy pour les patients à risque standard, au niveau de l'ensemble du système nerveux centrale, en 30 fractions suivies d'un boost au niveau de la fosse postérieure à 54-56 Gy (Stripay et al., 2020). Selon les facteurs de risque des patients, différents schémas thérapeutiques vont être mis en place et incluant des cocktails de chimiothérapies comme par exemple : la vincristine, le VP16, le carboplatine et/ou des agents alkylants comme le cyclophosphamide (Sengupta et al., 2017). Pour les patients à faible risque, les essais cliniques en cours sont conçus pour réduire la dose de RT crâniospinale dans le but de réduire les effets secondaires à long terme. Chez les patients de moins de 3 à 5 ans, la RT a tendance à être évitée et remplacée par une chimiothérapie intensive (chimiothérapie à haute dose suivie de l'administration de cellules souches hématopoïétiques autologues) pour les formes à plus haut risque, et par une chimiothérapie à base de méthotrexate par voie systémique et intraventriculaire pour les formes standards (Remke & Ramaswamy, 2018).

Des effets secondaires importants, secondaires à la résection chirurgicale, à la RT et à la chimiothérapie, sont le plus souvent observés comme les déficits neurocognitifs, la perte auditive et les déficits endocriniens (Mulhern et al., 2005). Notamment, la RT a de nombreux effets tardifs, d'autant plus fréquents que les enfants sont plus jeunes, en particulier des déficits neurocognitifs et neuroendocriniens, des tumeurs bénignes ou malignes secondaires ou encore des anomalies vasculaires cérébrales (Mulhern et al., 2005). L'enjeu aujourd'hui est donc d'améliorer le taux de survie des patients atteints de MB tout en minimisant la toxicité de ces traitements.

Pour cela, plusieurs études cliniques ont été réalisées pour évaluer les effets d'une réduction de la dose et/ou du champ de l'irradiation (23,4 Gy), avec l'ajout de schémas de chimiothérapie (Gajjar et al., 2006; Merchant et al., 2008; Packer et al., 2006) montrant globalement des taux de survie sans évènement encourageant chez les patients atteints de MB non-disséminés ainsi qu'une relative préservation de leur qualité de vie et de leurs fonctions intellectuelles. Des études plus récentes, comme l'essai clinique COG ACNS1422 évalue une dose d'irradiation crâniospinale plus réduite, à 18 Gy, suivie d'une augmentation de la dose au

niveau du site primaire à 54 Gy ainsi qu'une approche de chimiothérapie réduite et sans vincristine, chez des patients du groupe WNT de risque standard (Children's Oncology Group, 2022). D'autres essais cliniques en cours comme l'étude SJMB12 s'intéresse aux effets de l'ajout de la gemcitabine et du pemetrexed, un antifolate multicible, au traitement standard chez les patients atteints d'un MB de risque élevé du sous-groupe 3 et 4 (Khan et al., 2021).

A l'heure actuelle, les sous-groupes 3 et 4 de MB et SHH TP53 muté ont un pronostic péjoratif malgré les traitements actuels. Il est donc imminent de trouver de nouveaux traitements et une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de ces tumeurs permettra à terme l'élaboration de nouvelles thérapies ciblées.

### 3.2. Les thérapies ciblées

Les progrès scientifiques au niveau moléculaire et génétique des dernières décennies ont amélioré nos connaissances sur le développement tumoral et ont permis l'essor d'une nouvelle génération de thérapies : les thérapies ciblées. Ces thérapies ont l'avantage de reconnaître spécifiquement une molécule cible dans les cellules tumorales pour ralentir leur croissance et leur propagation en provoquant moins de dommages sur les cellules saines que les thérapies non-ciblées.

#### 3.2.1. Thérapies ciblées des médulloblastomes de sous-groupe WNT

Les MB WNT sont de meilleur pronostic et se caractérisent par de fréquentes mutations touchant la voie de signalisation WNT, comme le gène *CTNBI* ou *APC*, qui sont potentiellement des cibles thérapeutiques. Cependant, cibler la voie de signalisation WNT interférerait avec des mécanismes physiologiques trop importants et pourrait altérer la chimiosensibilité des tumeurs WNT. C'est pourquoi aucune thérapie ciblée n'est en cours de développement concernant ce sous-groupe (Menyhárt et al., 2019).

#### 3.2.2. Thérapies ciblées des médulloblastomes de sous-groupe SHH

Le MB SHH est le sous-groupe le plus étudié et le mieux caractérisé au niveau moléculaire. En effet, les mutations caractéristiques de ce sous-groupe sont bien connues et touchent les membres de la voie de signalisation SHH tels que *PTCH1*, *SMO*, *SUFU*. L'identification des mutations *PTCH1* et *SMO*, présentes dans 80% des tumeurs du groupe SHH, a conduit à des études précliniques sur des inhibiteurs de *SMO* (Kool et al., 2014; Rudin et al., 2009) et plus récemment à des essais cliniques (Robinson et al., 2015; Rodon et al., 2014) testant le vidmodegib, l'erismodegib ou encore le saridegib. L'essai clinique de Robison *et al.*,

a montré que l'inhibition de SMO par le vismodegib était efficace sur les tumeurs SHH récurrentes mais que cela n'avait aucun effet sur les tumeurs non-SHH (Robinson et al., 2015). Certains patients ont développé une résistance au vismodegib et d'après les recherches de Kool *et al.*, il semblerait que les patients avec une mutation PTCH1 soient plus sensibles aux inhibiteurs SMO alors que les patients avec des mutations SUFU et/ou une amplification MYCN seraient plus résistants au traitement (Kool et al., 2014). Une étude plus récente a testé un nouvel inhibiteur SMO, le MK-4101, différent des autres inhibiteurs SMO via sa structure, qui semblerait être efficace sur les tumeurs de MB SHH résistantes au vismodegib (Filocamo et al., 2016).

D'autres recherches se sont appuyées sur l'utilisation des inhibiteurs de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) puisque l'activité de cette dernière est dérégulée dans le MB. En effet, la voie PI3K a été décrite comme étant un autre mécanisme potentiel de résistance et semblerait être une thérapie efficace dans le MB SHH avec les inhibiteurs SMO (Buonamici et al., 2010) et un traitement a été réalisé sur des modèles *in vitro* et *in vivo* (Ehrhardt et al., 2015).

L'amplification du facteur de transcription GLI2 de la voie SHH fait aussi partie des caractéristiques moléculaires des tumeurs SHH. Des équipes de recherche ont alors cibler le facteur de transcription GLI à l'aide de petites molécules antagonistes appelées GANT (Lauth et al., 2007) ou ATO pour Arsenic trioxyde (Kim et al., 2010). L'utilisation de ces antagonistes de GLI a démontré qu'en inhibant la transcription médiée par GLI, on obtient une diminution de la croissance des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Kim et al., 2010; Lauth et al., 2007; Lin et al., 2016). De plus, l'équipe de Lin a mis en avant que la suppression de GLI entraîne une augmentation de l'apoptose médiée par la voie mitochondriale dans les cellules de MB, et que ceci améliore la réponse au traitement par le cisplatine (Lin et al., 2016).

D'autres études précliniques ont montré différentes voies impliquées suggérant de nouvelles cibles thérapeutiques efficaces. Certaines études se sont concentrées sur des inhibiteurs des régulateurs clés du cycle cellulaire, comme les kinases AURORA ou polo-like-kinase (PLK). L'inhibition de ces kinases entraîne, *in vitro*, un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, et *in vivo* une diminution de la croissance tumorale accompagnée d'une augmentation de la sensibilité aux chimiothérapies (Markant et al., 2013; Triscott et al., 2013). La phosphodiesterase 4D (PDE4D) semblerait être aussi une cible thérapeutique prometteuse. Cette enzyme agit en aval de la signalisation SHH contrôlant sa transduction, et son inhibition a entraîné une diminution de la croissance tumorale du MB (Ge et al., 2015).

L'ensemble de ces études suggère que les MB du sous-groupe SHH sont susceptibles d'être sensibles à de multiples cibles thérapeutiques.

### 3.2.3. Thérapies ciblées de médulloblastome de sous-groupe 3 et 4

Le pronostic des MB de sous-groupe 3 et 4 reste le plus sombre. En effet, ce sont les MB les plus agressifs avec un fort potentiel de dissémination métastatique. Malheureusement, la compréhension limitée des mécanismes impliqués dans la tumorigenèse de ces tumeurs entrave le développement de nouvelles thérapies ciblées. Certaines études précliniques laissent tout de même entrevoir de potentielles cibles thérapeutiques pour ce type de MB (Menyhárt et al., 2019).

Une des pistes la plus étudiée est la régulation de l'expression de l'oncogène MYC puisque l'une des caractéristiques principales des tumeurs de sous-groupes 3 est la surexpression de MYC. En effet, des études précliniques montrent qu'en inhibant la protéine BET, appelée BRD4, avec l'inhibiteur JQ1, on obtient une diminution de l'expression de MYC ainsi qu'une dérégulation transcriptionnelle de ces cibles. Cela a pour effet, *in vitro*, de réduire la prolifération et la viabilité cellulaire, *in vivo*, d'augmenter la survie des animaux xéno greffés tout en diminuant la charge tumorale (Bandopadhyay et al., 2014; Henssen et al., 2013). D'autres travaux de recherche ont mis en avant que combiner les inhibiteurs de protéines BET avec des inhibiteurs des cyclines-kinases-dépendantes (CDK), kinases clés du cycle cellulaire, améliorerait la survie des animaux. Un retard d'acquisition de résistance aux traitements a été observé sur les cellules de MB exprimant fortement MYC (Bandopadhyay et al., 2014; Bolin et al., 2018). Plus récemment, une étude préclinique a montré le potentiel thérapeutique de cibler la voie TGF $\beta$ /Activin, activée dans les MB de sous-groupe 3. En effet, les auteurs démontrent que le traitement Galunisertib, actuellement testé dans des essais cliniques pour les patients atteints de glioblastome, ciblant la voie de signalisation TGF $\beta$ /Activin, entraîne une amélioration de la survie des animaux dans un modèle de xéno greffes dérivées de patients (PDX) de sous-groupe 3 (Morabito et al., 2019).

D'autres équipes se sont intéressées à l'effet de l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/mTOR impliquée dans de nombreux cancers. Ces études montrent qu'en ciblant PI3K accompagné de mTOR, on augmente les effets antinéoplasiques dans les MB de haut risque désignant ainsi la voie de signalisation PI3K/mTOR comme cible thérapeutique éventuelle (Eckerdt et al., 2019; Menyhárt et al., 2019; Pei et al., 2016). Pei *et al.* ont aussi montré qu'associer les inhibiteurs PI3K aux inhibiteurs des histones désacétylases (HDAC) inhibait, *in vitro* et *in vivo*, la croissance des MB exprimant fortement MYC (Pei et al., 2016). Ces nouvelles cibles thérapeutiques potentielles ont déjà montré des résultats bénéfiques pour d'autres cancers (K. Sun et al., 2017; Younes et al., 2016).

D'autre part, tout comme pour les MB de sous-groupe SHH, les inhibiteurs des kinases Aurora semblent être aussi des agents thérapeutiques potentiellement efficaces pour les sous-groupes non-WNT/non-SHH (Diaz et al., 2015). En effet, les cellules de MB surexprimant MYC sont plus sensibles à la mort cellulaire par apoptose après l'inhibition de la kinase Aurora B, et cette inhibition prolonge la survie des souris en inhibant la croissance de leurs tumeurs intracrâniennes (Diaz et al., 2015).

De plus en plus d'études précliniques mettent en avant de nouvelles cibles potentielles pour le traitement du MB. Des essais cliniques sont en cours pour tester de nouveaux traitements dans le but d'améliorer la survie et la qualité de vie des patients, mais peu d'études ont lieu pour les patients atteints de MB de haut risque comme le sous-groupe 3 et 4. Il est donc urgent de poursuivre les recherches et d'enrichir nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la tumorigenèse du MB afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Une des pistes pourrait se trouver dans l'étude du microenvironnement tumoral. En effet, le microenvironnement tumoral est aussi crucial dans la tumorigenèse et offre de nombreuses cibles thérapeutiques envisageables comme les thérapies anti-angiogéniques dont font l'objet de nombreuses études en cancérologie. Le Pazopanib, un inhibiteur des récepteurs à activité tyrosine kinase du VEGF, a d'ailleurs été identifié comme potentiel traitement pour les MB de haut risque en inhibant l'angiogenèse (Craveiro et al., 2014).

## **4. Le médulloblastome comme un écosystème : une hétérogénéité cellulaire inter-tumorale et intra-tumorale**

### **4.1. Une hétérogénéité inter-tumorale liée à l'origine cellulaire du médulloblastome**

Le MB est une tumeur primitive neuroectodermique du cervelet. Le cervelet se compose principalement de neurones, notamment avec les cellules de Purkinje et les neurones granulaires (représentant 50% des neurones du SNC), mais aussi d'astrocytes, d'oligodendrocytes et de cellules microgliales. Ce sont les cellules souches et les progéniteurs, dans et autour du cervelet, qui vont jouer un rôle important dans l'origine du MB. Il existe deux zones germinales majeures au niveau du cervelet : la zone ventriculaire, adjacente au 4<sup>ème</sup> ventricule qui est composée d'une majorité de neurones et de cellules gliales, et la couche externe de cellules granulaires cérébelleuses, qui se situent autour du cervelet, composée essentiellement de neurones (J. Wang & Wechsler-Reya, 2014). Plusieurs études ont montré que les quatre sous-groupes de MB avaient un développement et une origine cellulaire différents (Gibson et al., 2010; Hovestadt et al., 2019).

Gibson *et al.*, ont tout d'abord démontré que les tumeurs WNT et SHH provenaient de régions distinctes du cerveau postérieur et identifient le tronc cérébral dorsal pour le sous-groupe WNT (Gibson et al., 2010). De plus, les tumeurs associées au sous-groupe WNT ont un profil transcriptionnel proche des cellules progénitrices du tronc cérébral dorsal suggérant une origine extra-cérébelleuse pour ce type de tumeurs (Gibson et al., 2010; Pei et al., 2012).

Pour les tumeurs du sous-groupe SHH, la première hypothèse fut que leur origine provenait des cellules de la lignée granulaire (Gibson et al., 2010). Cette hypothèse fut confirmée par plusieurs études démontrant que la suppression spécifique de PTCH1 ou l'activation de SMO dans les neurones granulaires précurseurs cérébelleux entraînait la formation de MB de type SHH (Schüller et al., 2008; Z.-J. Yang et al., 2008). Plus tard, une étude a mis en avant que le MB de type SHH peut provenir de neurones granulaires précurseurs du noyau cochléaire du tronc cérébral (Grammel et al., 2012). Ces deux types de neurones sont dérivés de neurones issus de la lèvre rhombique et expriment tous deux *Atoh1*, suggérant une origine neuronale *Atoh1+* pour les cellules de MB de sous-groupe SHH (Grammel et al., 2012; J. Wang & Wechsler-Reya, 2014).

L'origine du développement des tumeurs de sous-groupe 3 et 4 a longtemps été incertaine et controversée. Une étude transcriptomique s'appuyant sur du single cell RNA seq a tenté de déterminer les origines du développement de ces différents sous-groupes de MB (Hovestadt et al., 2019). Ces auteurs confirment que chacun des sous-groupes ont une trajectoire spécifique qui consiste en des populations malignes indifférenciées et différenciées de type neuronal pour le sous-groupe 3, alors que le sous-groupe 4 présente plus de cellules différenciées de type neuronal-like (Hovestadt et al., 2019). Ce n'est que récemment, plusieurs études ont découvert que les tumeurs de sous-groupe 3 et 4 ont des signatures similaires à celle des progéniteurs de la zone ventriculaire de la lèvre rhombique, donnant naissance aux neurones appelés cellules de brosse unipolaires (Hendrikse et al., 2022; Z. Luo et al., 2022; Smith et al., 2022).

## 4.2. Une hétérogénéité cellulaire intra-tumorale

### 4.2.1. Une hétérogénéité au niveau des cellules tumorales

#### 4.2.1.1. Le concept de cellules souches cancéreuses

Un des aspects importants de la tumeur est son hétérogénéité cellulaire notamment par la présence d'une sous-population de cellules capables d'initier de nouvelles tumeurs primaires et des métastases. La capacité de ces cellules à pouvoir initier de nouvelles tumeurs a soulevé l'hypothèse de cellules souches cancéreuses (CSC). Il existe deux modèles théoriques pour expliquer la présence de ces CSC dans les tumeurs : le modèle stochastique, où chaque cellule

cancéreuse a la capacité de se dédifférencier et de se diviser à l'infini, et le modèle hiérarchique, où les CSC sont considérées comme les progéniteurs des cellules cancéreuses différenciées, capables de se renouveler, se différencier et d'élargir le pool de CSC (Clarke et al., 2006; Mercurio, 2019; Nunes et al., 2018) (Figure 5). Ces capacités contrastent fortement avec toutes les autres cellules de la masse tumorale, qui se caractérisent par une capacité proliférative limitée et de différenciation spécifique. Plus précisément, l'auto-renouvellement des CSC se définit comme la capacité d'une cellule parentale à générer une cellule fille identique et une seconde cellule de phénotype identique ou différent, alors que par le processus de différenciation, une CSC est capable de donner naissance à des cellules de lignées différentes qui composent la tumeur d'origine (Clarke et al., 2006; Mercurio, 2019; Nunes et al., 2018).

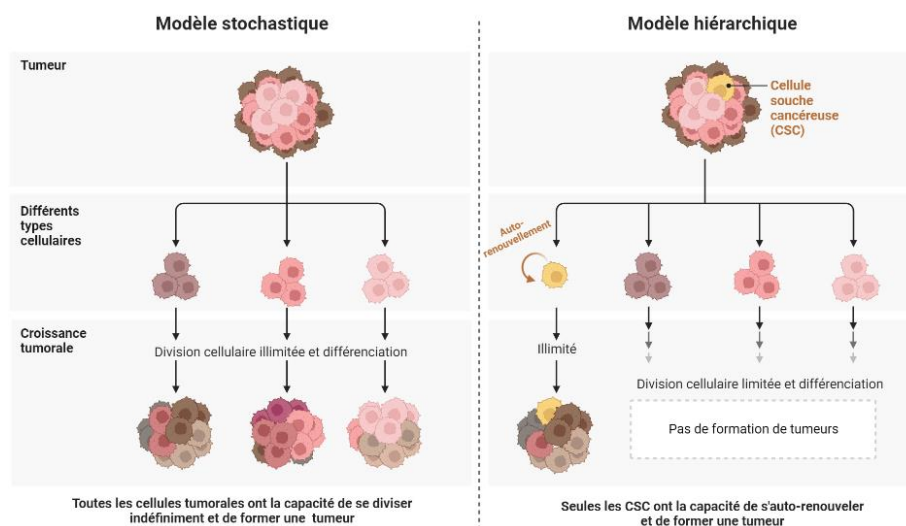


Figure 5 : Représentation des modèles théoriques concernant la formation des tumeurs et la présence des cellules souches cancéreuses (Cette figure a été créée avec BioRender.com)

De plus, ces CSC sont résistantes aux traitements et sont associées à l'apparition de métastases ainsi qu'au mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer (Mercurio, 2019; Nunes et al., 2018). Notamment, les CSC ont été cliniquement identifiées comme étant corrélées à un mauvais pronostic chez les patients atteints de tumeurs cérébrales pédiatriques en particulier dans le MB (Panosyan et al., 2010). Cette étude s'appuie sur la capacité des cellules tumorales dérivées de patients à former des sphères et subir des passages répétés en culture cellulaire lorsqu'elles sont placées dans un milieu sans sérum complété par des facteurs de croissance épidermiques et fibroblastiques. On parle alors de neurosphères (NS). Ces NS représentent un modèle de culture cellulaire de CSC très utilisé dans la recherche *in vitro*. Les NS possèdent certaines des caractéristiques de la cellule souche : auto-renouvellement et multipotence, expression des gènes associés aux cellules souches neurales et lorsqu'elles sont xénotransplantées, les NS confèrent une tumorigénicité *in vivo* en formant des tumeurs similaires aux tumeurs parentales (Panosyan et al., 2010).

#### 4.2.1.2. Identification des cellules souches cancéreuses dans les tumeurs cérébrales

Au cours des dernières décennies, de grands progrès dans l'identification des CSC de tumeurs cérébrales ont été réalisés. Le premier marqueur de CSC de tumeurs cérébrales a été décrit dans une étude de Singh *et al.* en 2004 (Singh, Hawkins, et al., 2004). Ils ont identifié une nouvelle population de CSC : les cellules souches cancéreuses de tumeurs cérébrales (BTSC). Ces cellules expriment le marqueur de cellule souche neurale, le CD133, ne présentent pas les marqueurs cellulaires différenciés, et ont les propriétés de cellule souche *in vitro*. L'étude a montré que les cellules CD133 ont la capacité de former des amas cellulaires dérivés de clones, comme les NS. Les BTSC se renouvellent, prolifèrent et se différencient en reproduisant le phénotype de la tumeur d'origine (Singh, Hawkins, et al., 2004). De plus, les BTSC ont la capacité d'initier la tumeur *in vivo* (Singh, Clarke, et al., 2004) et une exploration plus approfondie de ce processus a montré que les cellules CD133+ sont capables d'initier une nouvelle tumeur chez des souris immunodéficientes, alors que les cellules CD133- ne le pouvaient pas (Singh, Hawkins, et al., 2004). Néanmoins, CD133 ne semble pas être un marqueur de CSC idéal pour les tumeurs cérébrales pédiatriques étant donné que certaines études ont montré des capacités souches aux cellules CD133- (Huang et al., 2016; Manoranjan et al., 2013; Read et al., 2009).

Depuis, d'autres marqueurs de CSC dans le MB ont été découverts comme CD15 (Read et al., 2009), Nestin (Hambardzumyan et al., 2008) ou Sox2 (Vanner et al., 2014). CD15 (FUT4, SSEA-1) a montré un intérêt particulier en tant que marqueur des CSC pour le MB (Read et al., 2009; Ward et al., 2009). En 2009, des cellules CD15+ de MB ont été identifiées comme CSC car elles ont montré des capacités à initier la tumeur dans un modèle de souris SHH MB de manière similaire à la tumeur d'origine contrairement aux cellules CD133+ (Read et al., 2009), tout en ayant une capacité de prolifération infinie *in vitro* avec un potentiel tumorigène *in vivo* (Ward et al., 2009). Un autre marqueur reconnu des CSC, Sox2, a été identifié dans des cellules de MB. En effet, des cellules MB Sox2+ se sont avérées tumorigènes et quiescentes (Vanner et al., 2014). Fait intéressant, plus de 80 % des cellules Sox2+ étaient également CD15+, tandis que les cellules Sox2+ formaient une minorité (<10 %) de la population CD15+. Les auteurs soulignent que la rechute du MB peut être entraînée par un sous-ensemble de cellules CD15+ qui sont également Sox2+ (Vanner et al., 2014).

#### 4.2.1.3. Les voies de signalisation impliquées dans les cellules souches cancéreuses de médulloblastome

##### 4.2.1.3.1. La voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine

La voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine joue un rôle important dans l'auto-renouvellement, la différenciation, l'inhibition de l'apoptose et les métastases ainsi que dans le maintien des caractéristiques souches. En effet, de nombreuses études ont montré le lien entre l'activation de la voie WNT/  $\beta$ -caténine et le maintien des caractéristiques des CSC *in vitro* ainsi que la tumorigenèse et la récurrence tumorale *in vivo* dans divers cancers (Fang et al., 2015; Y. Wang et al., 2015; K. Wu et al., 2016; Z. Zhao et al., 2016). Cette voie de signalisation est aussi impliquée dans la radiorésistance des CSC, en augmentant les niveaux de  $\beta$ -caténine après les radiations. Par ailleurs, étant liée aux réparations de l'ADN et au cycle cellulaire, il a été montré qu'elle jouait un rôle important dans la régulation de l'apoptose des CSC favorisant leur survie et leur radiorésistance (Olivares-Urbano et al., 2020; L. Yang et al., 2020; Y. Zhao et al., 2018). De plus, Shi *et al.* ont découvert qu'en ciblant la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine au sein du glioblastome, cela altérerait la résistance des CSC au témozolomide (TMZ) (Shi et al., 2015). En revanche, concernant le MB, depuis la découverte d'un rôle anti-tumorigène de l'activation de WNT dans les sous-groupes SHH MB (Pöschl et al., 2014), le rôle de la voie WNT dans les CSC parmi les différents sous-groupes de MB reste en suspens. Récemment, il a été montré que l'expression ectopique de la  $\beta$ -caténine dans les MB de sous-groupe 3 et 4 altère les propriétés des CSC *in vitro* et réduit la formation de tumeurs tout en améliorant la survie globale *in vivo* (Manoranjan et al., 2020).

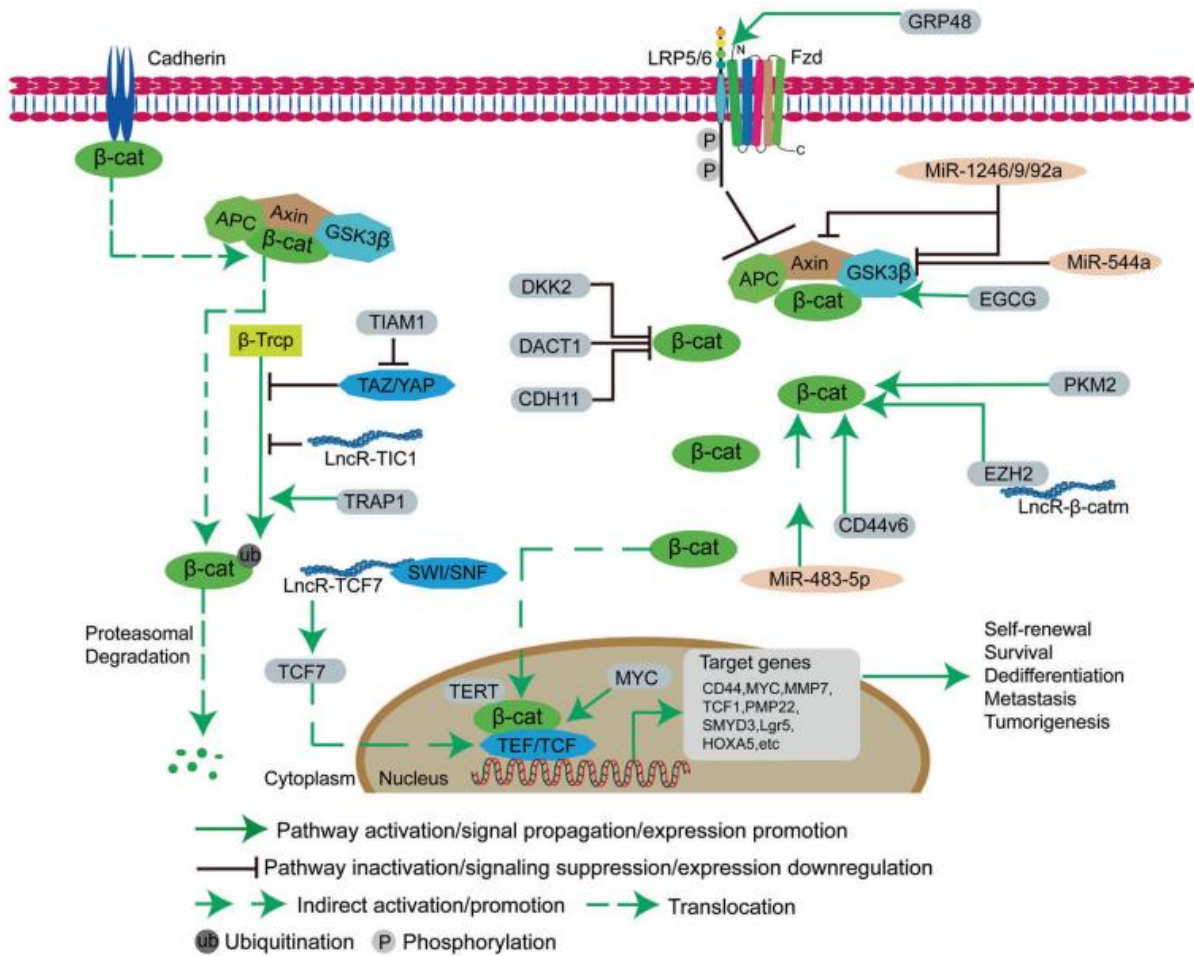


Figure 6 : La voie de signalisation WNT au sein des cellules souches cancéreuses

La voie canonique WNT/ $\beta$ -caténine régle la pluripotence des CSC et détermine le sort de différenciation des CSC. En l'absence de signalisation WNT, la  $\beta$ -caténine est liée au complexe Axin, qui contient APC et GSK3 $\beta$ , et est phosphorylée, conduisant à l'ubiquitination et à la dégradation protéasomique par la voie  $\beta$ -Trcp. Cependant, le complexe TAZ/YAP, l'ARN long non codant TIC1 et les protéines TRAP1 et TIAM1 régulent la voie  $\beta$ -Trcp. En présence de signalisation WNT, la liaison de LRP5/6 et Fzd inhibe l'activité du complexe Axin et la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine, ce qui fait entrer la  $\beta$ -caténine dans le noyau, puis se lie au TEF/TCF pour former un complexe, qui recrute ensuite des cofacteurs pour initier l'expression génique en aval. Certaines protéines (DKK2 (Dickkopf-related protein 2), DACT1, CDH11, GECG, PKM2, EZH2, CD44v6, MYC et TERT), les microARN (miR-1246, miR-9, miR-92a, miR-544a et miR-483-5p), et des ARN longs non codants (lncR- $\beta$ -catm et lncR-TCF7) régulent l'activation de la voie WNT/ $\beta$ -caténine dans les CSC. (D'après Yang *et al.* 2020)

#### 4.2.1.3.2. La voie de signalisation SHH

La voie de signalisation Sonic Hedgehog (SHH) est principalement impliquée dans la régulation de la différenciation cellulaire et de la maintenance du caractère souche des cellules durant le développement embryonnaire, et joue un rôle dans la réparation tissulaire (Skoda et al., 2018) (Figure 7). Elle est aussi impliquée dans de nombreux cancers, dont le MB où le sous-groupe SHH se caractérise par une activation anormale de la voie de signalisation SHH (Sigafos et al., 2021). Plusieurs études ont montré l'implication de SHH dans les CSC contribuant à leur prolifération, leur auto-renouvellement et leur dédifférenciation (Du et al., 2015; Memmi et al., 2015; F. Wang et al., 2016; S. Zhang et al., 2012). Dans le MB, la voie SHH semble aussi contribuer au maintien et à l'expansion des CSC. En effet, Wang *et al.* ont mis en avant le lien entre la protéine Bmi1, surexprimée dans le MB (Leung et al., 2004), et la voie SHH, qui, régulée à la hausse va être essentielle à la survie des CSC (X. Wang et al., 2012). Plus récemment, les travaux de Miele *et al.* montrent qu'en réexprimant le miR326 et Arrb1 dans les CSC de MB, il y a inhibition de la voie SHH/Gli ce qui affecte la prolifération, l'auto-renouvellement des CSC ainsi qu'une perte d'expression de marqueurs souches (Miele et al., 2017).

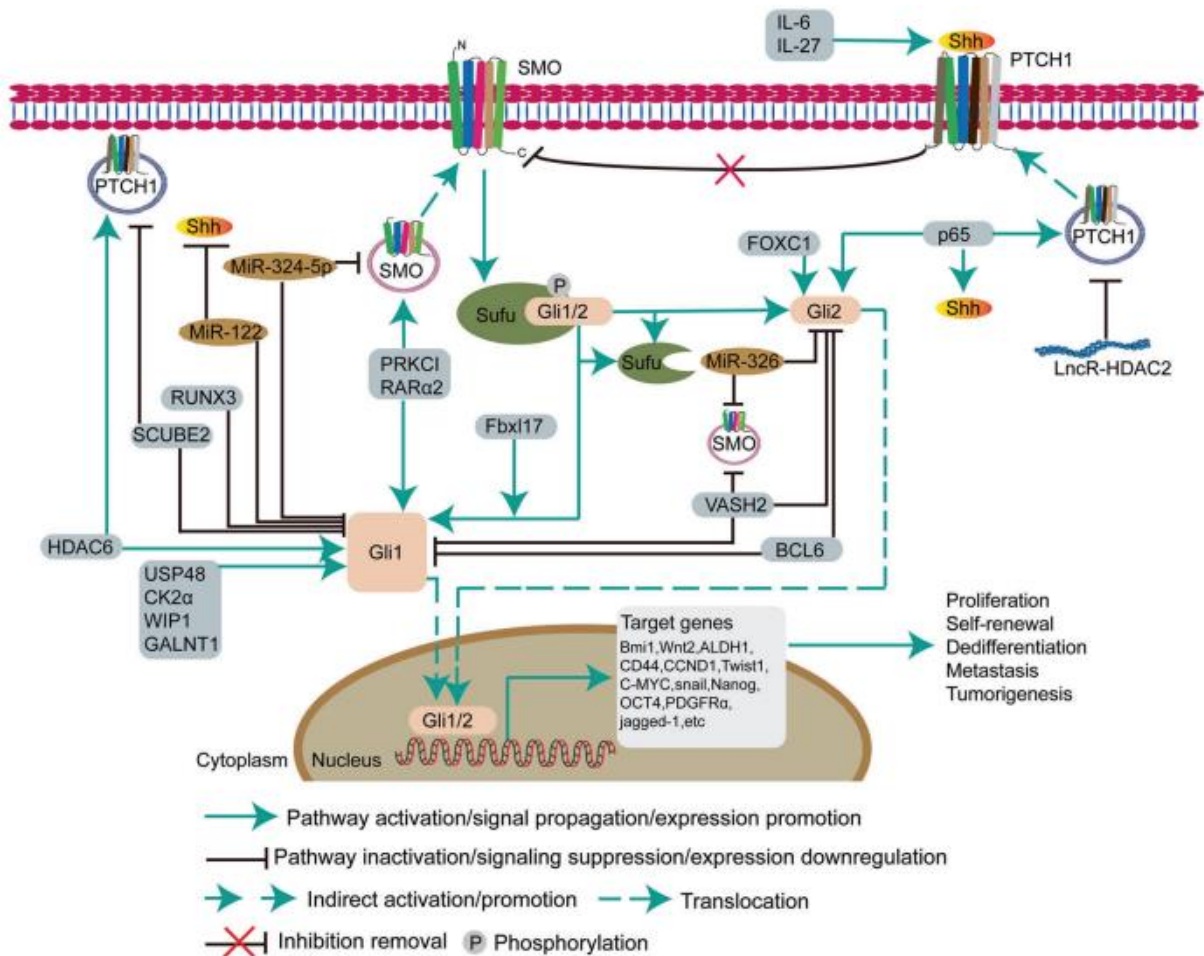


Figure 7 : La voie de signalisation SHH dans les cellules souches cancéreuses

La voie Sonic Hedgehog (SHH) joue un rôle clé dans la maintenance, l'auto-renouvellement et la régénération des CSC. Après avoir reçu le signal Shh, le récepteur de protéine transmembranaire PTCH1 supprime l'inhibition de la protéine transmembranaire SMO, ce qui induit Gli1/2 à se détacher de SUFU et à pénétrer dans le noyau pour réguler la transcription génique en aval. Lors de l'activation de la voie SHH, certaines protéines (IL-6, IL-27, Fbx117 (F-box et leucine-rich repeat protein 17), PPKCI, RAR $\alpha$ 2, RUXN3, SCUBE2, HDAC6 (histone déacétylase 6), USP48, CK2 $\alpha$ , WIP1, GALNT1, VASH2 (Vasohibine 2), BCL6, FOXC1 (forkhead box C1) et p65), les microARN (miR-3245p, miR-122 et miR-326) et le long ARN non codant HDAC2 sont impliqués dans la voie SHH pour affecter la croissance des CSC (D'après Yang *et al.* 2020).

#### 4.2.1.3.3. La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch est liée à l'agressivité des tumeurs cérébrales (Teodorczyk & Schmidt, 2015). Cette voie est connue dans les CSC pour être impliquée dans le maintien des caractéristiques souches, la répression de la différenciation des cellules, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et la résistance aux traitements (Choi *et al.*, 2019; Garcia-Heredia *et al.*, 2017; Z.-F. Miao *et al.*, 2017; Sarkar *et al.*, 2017; J. Wang *et al.*, 2012;

C. Zhang et al., 2017; F. Zhang et al., 2017) (Figure 8). D'autre part, l'activité de Notch est activée par la sécrétase  $\gamma$  et l'inhibition de la sécrétase  $\gamma$  semble être une cible thérapeutique efficace dans différents cancers puisqu'elle inhibe la présence de CSC et la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* (Q. Chu et al., 2013; Huynh et al., 2011). Dans le MB, la signalisation Notch contribue à la croissance tumorale, même si le récepteurs Notch 1 et Notch 2 ont des effets opposés sur la croissance du MB (Fan et al., 2004). L'activation de la voie Notch contribue particulièrement à l'expansion et la viabilité des CSC MB (Pistollato et al., 2010).

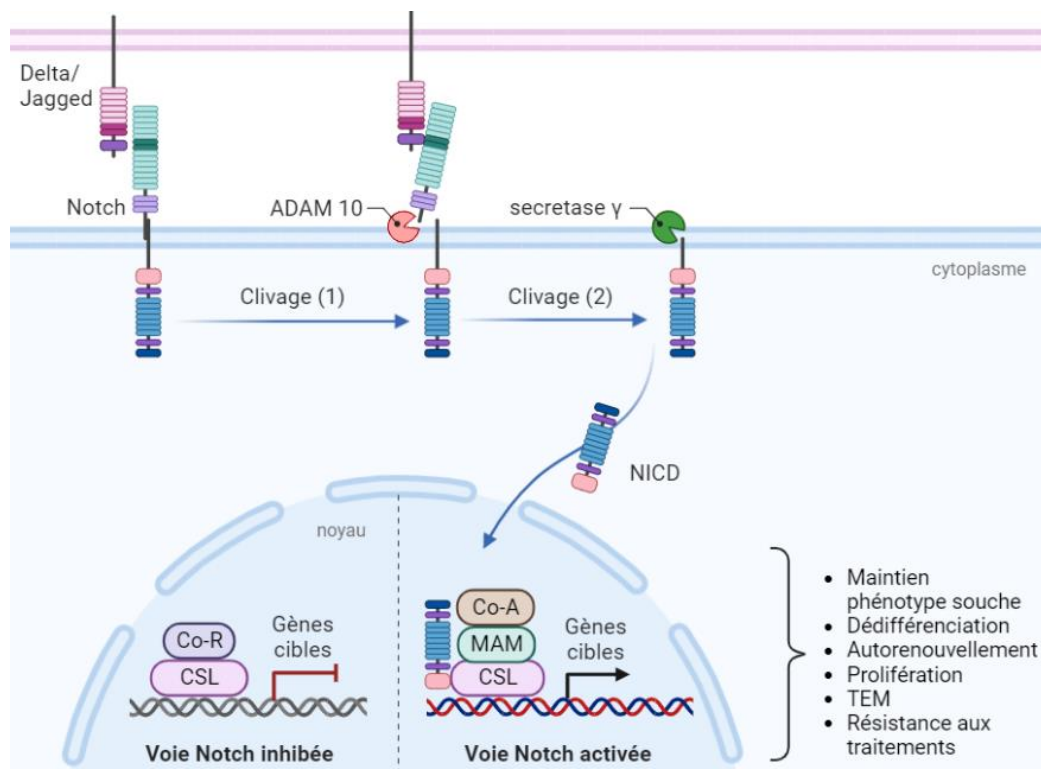


Figure 8 : La voie de signalisation Notch impliquée dans les CSC

La voie Notch est activée lorsque le récepteur Notch se lie avec l'un de ces ligands (Delta-like protein (DLL) ou Jagged). Cette liaison entraîne directement deux clivages successifs du récepteur Notch : un par l'enzyme ADAM-10 qui libère le fragment extra-cytoplasmique du récepteur, et le second par la sécrétase  $\gamma$  qui libère un court fragment transmembranaire et le segment intracytoplasmique Notch Intra Cellular Domain (NICD). Une fois libéré, le fragment NICD est transloqué dans le noyau où il s'associe à des protéines pour former un complexe capable de réguler la transcription de plusieurs gènes cibles. Dans le cas des CSC, la voie de signalisation est connue pour être impliquée dans le maintien des caractéristiques souches, la répression de la différenciation des cellules, la transition épithélio-mésenchymateuse (TME) et la résistance aux traitements. (Cette figure a été créée avec BioRender.com)

#### 4.2.1.3.4. La voie de signalisation Pi3K/AKT/mTOR

Cette voie de signalisation joue un rôle important dans le cycle cellulaire, la prolifération cellulaire et elle est souvent dérégulée dans les cancers. De plus, l'activation de Pi3K/AKT/mTOR dans les CSC maintient le caractère souche de ces cellules et favorise leur survie et leur prolifération (Dubrovskaya et al., 2009; Keysar et al., 2017). Il a été démontré que cibler la voie PI3K/Akt/mTOR augmentait l'efficacité des traitements dans plusieurs cancers, en particulier sur des CSC radio et chimiorésistants (Chang et al., 2013; Deng et al., 2019). En 2008, une étude a mis en avant le lien entre la voie PI3K et la survie des CSC MB (Hambardzumyan et al., 2008). D'autres études plus récentes ont montré l'importance de l'activation de la voie Pi3K/Akt/mTOR dans la prolifération et la dédifférenciation des CSC de MB (Frasson et al., 2015; Gong et al., 2018). Il semblerait même que les CSC MB soient plus sensibles à l'inhibition de Pi3K/AKT/mTOR que les cellules de MB non-souches (Frasson et al., 2015) (Figure 9).

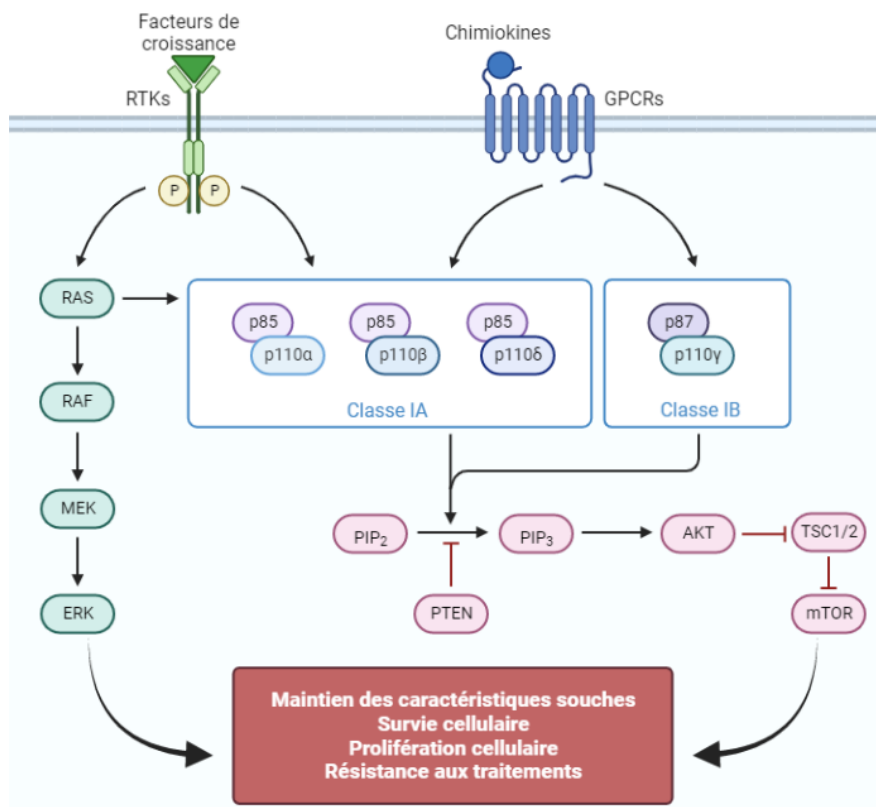


Figure 9 : La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR et son rôle dans les CSC

L'activation des récepteurs tyrosine kinase (RTKs) ou des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) recrute des phosphoinositide-3-kinases (PI3K) de classe IA et IB, où l'inhibition médiée par p85 de p110 n'est plus et p110 phosphoryle directement PIP2 pour produire PIP3. Ce lipide agit comme un second messenger activant AKT qui va inhiber TSC1/2 libérant mTOR. La voie PI3K peut aussi interagir avec la voie ERK. L'activation de cette voie contribue au maintien du caractère souche des CSC et favorise leur survie, leur prolifération et leur résistance aux traitements. (Cette figure a été créée avec BioRender.com)

## 4.2.2. Une hétérogénéité au niveau des cellules du microenvironnement tumoral

### 4.2.2.1. Les cellules immunitaires

Le système immunitaire est une partie à part entière du microenvironnement tumoral au sein des tumeurs cérébrales. Les cellules immunitaires vont établir des connexions complexes avec d'autres cellules immunitaires, et les cellules tumorales, favorisant la prolifération et l'invasion des tumeurs. Le MB est décrit comme étant une tumeur froide, c'est-à-dire à faible potentiel immunogène. En effet, au sein de ces tumeurs, on retrouve une faible infiltration de cellules immunitaires. En revanche, cette faible proportion de cellules immunitaires est spécifique et varie en fonction des sous-groupes de MB (Bockmayr et al., 2018). Différentes populations de cellules immunitaires ont été étudiées dans cette étude et les tumeurs du sous-groupe SHH ont montré un microenvironnement tumoral plus distinctif comparé aux autres sous-groupes de MB (Figure 10). En particulier, elles présentaient un plus grand nombre de lymphocytes T (LT), de fibroblastes et de cellules de la lignée monocytaire ainsi qu'un nombre inférieur de neutrophiles, comparé aux autres sous-groupes de MB. Au contraire, les tumeurs du groupe 3 avaient une faible proportion de LT et de macrophages, mais un nombre plus élevé de LT CD8+. Les tumeurs du groupe 4 avaient le plus petit nombre de fibroblastes et le plus grand nombre de lymphocytes cytotoxiques (Bockmayr et al., 2018).

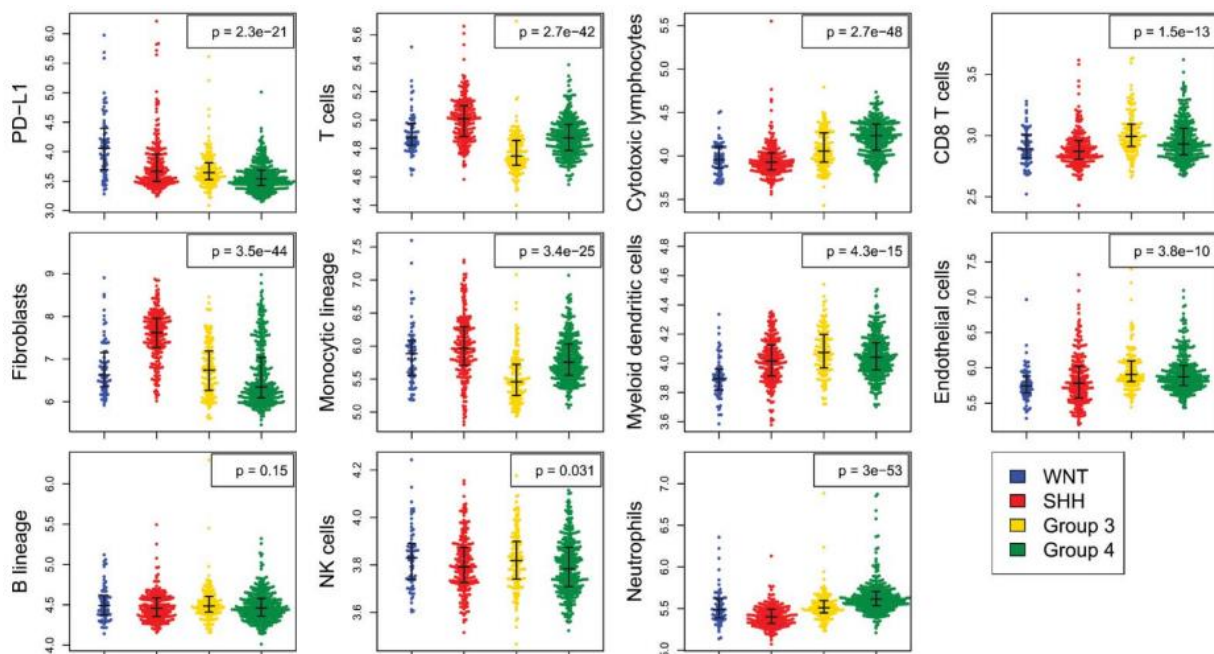


Figure 10 : Différentes populations de cellules du microenvironnement et de l'expression de PD-L1 selon les sous-groupes moléculaires de médulloblastome.

Les diagrammes révèlent des modèles d'expression fortement spécifiques aux sous-groupes de médulloblastome pour la plupart des populations de cellules du microenvironnement considérées. (D'après Bockmayr *et al.*, 2018)

Les LT, acteurs majeurs de la réponse immunitaire, sont impliqués dans la carcinogenèse et infiltrent régulièrement les tumeurs telles que le MB. Les LT sont particulièrement présents dans les tumeurs de sous-groupe SHH, et du sous-groupe 3 qui présente une forte infiltration de LT CD8+ (Bockmayr et al., 2018). Il semblerait que les traitements standards, tels que la RT et la chimiothérapie, influenceraient l'infiltration des LT au sein des MB. En effet, Gururangan *et al.* ont découvert qu'au diagnostic, les patients présentaient une réduction du nombre de LT CD4+, avec une faible proportion de lymphocytes T régulateurs (LTreg) alors que le nombre de LT reg augmentait durant le traitement standard puis baissait graduellement après la thérapie (Gururangan et al., 2017). Dans le cas du MB, le lien entre la survie des patients et l'infiltrat des LT reste flou. L'étude de Vermeulen *et al.* affirme qu'il n'existe pas de corrélation entre les LT et la survie des patients atteints de médulloblastome (Vermeulen et al., 2018) mais les patients dont les tumeurs présentent une faible infiltration de LT CD8+ ont un pronostic plus péjoratif que les autres patients d'après Murata *et al.* (Murata et al., 2018).

Concernant les lymphocytes B (LB), ils jouent un double rôle dans le microenvironnement tumoral. Ils peuvent avoir une activité antitumorale (en tuant directement les cellules tumorales ou étant des cellules présentatrices de l'antigène) ou une activité protumorale (via la sécrétion de chimiokines et l'activation des LTreg principalement). Le rôle des LB est très peu étudié dans le cadre des MB car ils sont peu présents dans l'infiltrat de ces tumeurs (Bockmayr et al., 2018).

Les Natural Killers (NK) jouent aussi un rôle dans le microenvironnement du MB. Ce sont de grands lymphocytes granuleux qui vont avoir une activité cytotoxique directe sur les cellules tumorales sans immunisation spécifique. Bien qu'ils n'infiltrant pas les MB en grand nombre (Bockmayr et al., 2018), la présence des NK, qui ont la capacité de lyser les cellules de MB *in vitro* et de réduire la croissance tumorale *in vivo*, semble corrélée au bon pronostic des patients (Kennis et al., 2019). Il semblerait que l'expression élevée des antigènes des leucocytes humains (HLA) de classe I dans le MB le protège de la cytotoxicité des cellules NK. L'étude de Fernandez *et al.* montre qu'en bloquant le système HLA de classe I sur des cellules de MB *in vitro* et/ou en stimulant les cellules NK par l'IL-15, celles-ci retrouvent la capacité de cibler les cellules de MB (Fernández et al., 2013). Ces études montrent que les cellules NK offrent de nouvelles opportunités de stratégies de traitement contre le MB.

Les macrophages infiltrants la tumeur, les TAMs, pour « Tumor Associated Macrophages », sont une autre population de cellules immunitaires importantes dans l'évolution des MB. Il s'agit de cellules immunitaires majoritaires de certaines tumeurs cérébrales comme le gliome et le MB qui se composent principalement de macrophages et de

la microglie résidente dans le cerveau (Hambardzumyan et al., 2016; Maximov et al., 2019). Environ 4 à 5 % des cellules du MB sont des cellules myéloïdes infiltrantes (Griesinger et al., 2013). Plusieurs études ont montré que le sous-groupe SHH possède le plus de TAMs comparé aux autres sous-groupes de MB (Bockmayr et al., 2018; Margol et al., 2015; Maximov et al., 2019) (Figure 11). Ces études insistent sur le fait que le groupe SHH se démarque par son microenvironnement, ce qui peut avoir des implications physiopathologiques et thérapeutiques importantes. Maximov *et al.* ont étudié un effet antitumoral des TAMs infiltrants les tumeurs SHH dans un modèle *in vivo* (Maximov et al., 2019). Mais le rôle des TAMs est controversé dans la littérature. Il est reconnu qu'il existe deux phénotypes différents lors de la polarisation des macrophages activés : les macrophages de type M1 et de type M2, qui ne vont pas jouer le même rôle. Il est conventionnellement établi que les macrophages de type M1 ont une activité pro-inflammatoire et antitumorale tandis que les macrophages de type M2 ont une activité anti-inflammatoire et protumorale. De manière intéressante, Lee *et al.* montrent qu'au contraire dans les tumeurs SHH MB, les macrophages de type M1, plutôt que M2, sont corrélés à un mauvais pronostic (Lee et al., 2018).

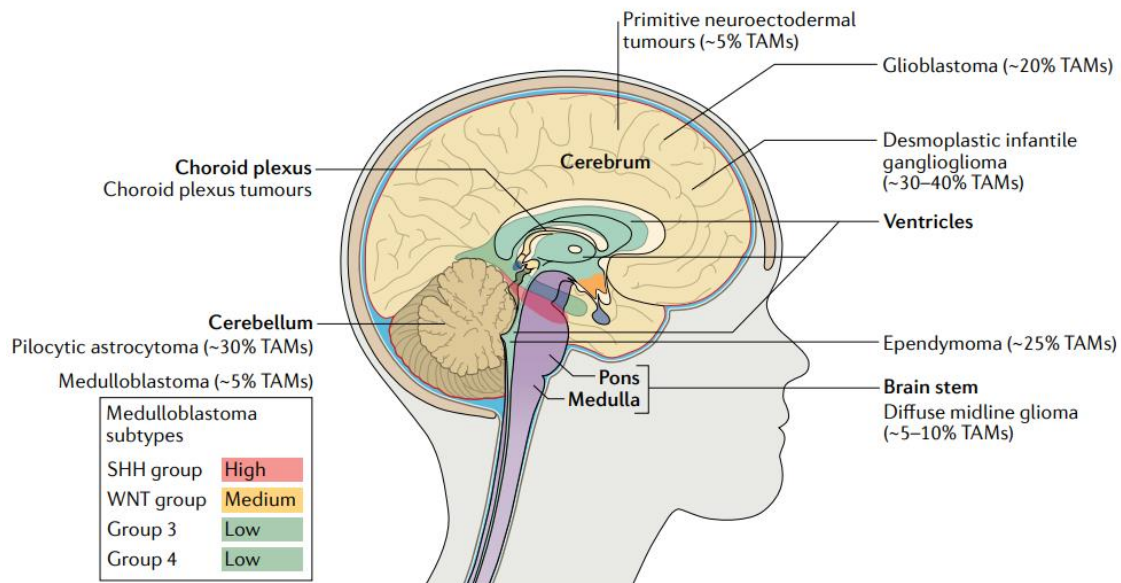


Figure 11 : Répartition des TAMs au sein des tumeurs cérébrales pédiatriques

Le pourcentage approximatif de microglies et de macrophages associés aux tumeurs (TAMs) par rapport au contenu total des cellules tumorales est indiqué entre parenthèses pour les tumeurs cérébrales pédiatriques et est représenté pour chaque sous-groupe moléculaire de médulloblastome. (D'après Keane *et al.*, 2021)

Il a été établi que 15% des TAMs se composent de cellules microgliales (Z. Chen et al., 2017). La microglie est une cellule immunitaire à part entière puisqu'elle représente l'ensemble des macrophages résidants dans le SNC. Elle participe aux réponses inflammatoires du SNC en adoptant un phénotype de microglie activée. Elle va alors changer de morphologie et être de forme amiboïde, plus mobile, et ces capacités phagocytaires vont augmenter (Vandenbark et al., 2021). La microglie peut produire une variété de médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines, les chimiokines, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'oxyde nitrique (NO), qui contribuent à l'élimination des infections pathogènes (Vandenbark et al., 2021). Le rôle de la microglie dans les premières étapes de la transformation tumorale est peu décrit dans la littérature. Il semblerait qu'au début du processus tumoral, la microglie joue un rôle dans l'immunité afin de stopper la progression tumorale. En revanche, lors de la progression tumorale, la microglie favoriserait le développement de la tumeur comme cela a été démontré dans le glioblastome (Wei et al., 2013). Tout comme les macrophages, la microglie va délivrer des facteurs de croissance et des chemokines qui vont moduler le microenvironnement tumoral (Dzaye et al., 2016) ainsi que des métalloprotéinases matricielles (MMPs) pour favoriser l'invasion tumorale (Markovic et al., 2009).

Il est reconnu aujourd'hui qu'il existe plusieurs sous-types de microglie mais certains de ces sous-types restent controversés dans la littérature (Keane et al., 2021). Dans le cervelet, c'est le sous-type CD11c+ de la microglie qui est le plus présent. La microglie CD11c+ se caractérise par l'expression de l'intégrine alpha X (codé par *Itgax*) (Keane et al., 2021). Considérant à la fois l'origine du MB dans le cervelet et sa survenue chez les enfants à un âge où le cerveau est encore en développement ainsi que la forte présence de microglie CD11c+ dans les zones du cervelet lors du développement postnatal (Wlodarczyk et al., 2017), il est intéressant de supposer que ce sous-type microgliale pourrait être important dans l'initiation ou progression du MB. De plus, la microglie CD11c+ présente une expression robuste du gène *Igf1* (Hammond et al., 2019; Q. Li et al., 2019) et l'*Igf1* s'est avéré crucial pour la croissance tumorale dans un modèle murin de MB (Yao et al., 2020).

#### 4.2.2.2. Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses dans le cerveau. Elles sont en contact avec toutes les cellules résidentes du SNC et notamment les cellules cancéreuses lors de la tumorigenèse. Les astrocytes sont des acteurs clés du microenvironnement et assurent une diversité de fonctions importantes au sein du SNC. Ils sont spécialisés dans la modulation du flux sanguin local, participent au maintien des fluides extracellulaires, des ions et des

transmetteurs (Duarte et al., 2021; Nedergaard et al., 2003). De plus, ils possèdent une activité cruciale pour le circuit neuronal puisqu'ils agissent sur le fonctionnement et la plasticité des synapses neuronales (Duarte et al., 2021; Nedergaard et al., 2003). Dans le cervelet, les astrocytes sont unipolaires et spécialisés. En condition physiologique, les astrocytes présents dans le cervelet vont agir sur la prolifération et la migration des cellules précurseurs granulaires (Araujo et al., 2019).

Dans un contexte tumoral, les astrocytes semblent jouer un double rôle : dans les premières étapes de la carcinogenèse, ils vont limiter la progression de la tumeur puis ils vont agir pour favoriser la croissance de la tumeur (Duarte et al., 2021). Les astrocytes agissent sur le microenvironnement tumoral via la sécrétion paracrine d'enzymes de dégradation, de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance (Y. Liu et al., 2017; Sofroniew, 2014). De plus, ils possèdent de multiples extrémités et ramifications capables d'interagir avec les cellules tumorales facilitant ainsi la croissance, la prolifération, la survie et l'invasion des cellules tumorales (Duarte et al., 2021).

Lors de la progression tumorale, les astrocytes vont jouer un rôle critique dans le MB. En effet, il a été démontré que le MB est une tumeur enrichie en astrocytes, en particulier au niveau des zones tissulaires où une forte expression de SHH a été détectée. Liu *et al.* ont découvert que les astrocytes sécrétaient la protéine SHH dans le microenvironnement tumoral du MB (Y. Liu et al., 2017). Or l'influence de la protéine SHH dans le MB est depuis longtemps connue (Grammel et al., 2012; Rudin et al., 2009; Skoda et al., 2018). Les protéines SHH sécrétées par les astrocytes activent la signalisation dans le stroma environnant, ce qui fournit un microenvironnement favorable à la prolifération et la croissance tumorale du MB (Y. Liu et al., 2017).

Les astrocytes peuvent aussi exercer une influence directe sur les CSC et inversement. Les CSC vont avoir un effet sur l'activité des astrocytes (Duarte et al., 2021; Gronseth et al., 2020; H. Liu et al., 2020). En effet, une étude récente a montré que les astrocytes influençaient le phénotype des cellules de MB en augmentant l'expression de marqueurs de surface de CSC (Gronseth et al., 2020). En ajoutant le milieu conditionné des astrocytes sur la lignée DAOY de MB, ils constatent une augmentation de l'invasion, de la formation de neurosphères mais aussi de l'expression de marqueurs de cellules souches comme le CD133, la Nestin ou Oct 4 (Gronseth et al., 2020). D'autres part, la sécrétion de l'interleukine 6 (IL6) par les CSC MB active les astrocytes associés à la tumeur (tumor-associated astrocytes : TAA) (H. Liu et al., 2020). Une fois activés, les TAA vont produire la chimiokine ligand 2 (CCL2). L'augmentation de CCL2 dans le microenvironnement tumoral va enrichir le MB de CSC. Liu *et al.* identifient

les voies de signalisation JAK2/STAT3 (Janus kinase 2/ signal transductor and activator of transcription 3) et Notch impliquées dans le processus souche des cellules de MB via CCL2 dérivé des astrocytes (H. Liu et al., 2020) (Figure 12). L'activation de la voie de signalisation STAT3 dans les astrocytes profite aussi aux cellules métastatiques par leur effet modulateur sur le système immunitaire (Priego et al., 2018).

Les astrocytes vont jouer un rôle important dans la réponse inflammatoire et immunitaire tout comme la microglie au sein du SNC (comme décrit précédemment). Une communication astrocyte/microglie avec les cellules néoplasiques selon différents mécanismes est décrite dans la littérature (Vandenbark et al., 2021) . Récemment, Yao *et al.* montrent que les astrocytes présents dans le MB produisent de l'interleukine 4 (IL4) et stimulent la microglie pour produire de l'IGF1 et favoriser la croissance tumorale. (Yao et al., 2020). Cette étude met aussi en avant que ces astrocytes proviennent d'une fraction de cellules tumorales qui se sont transdifférenciées en astrocytes (appelée Tu astrocytes) (Yao et al., 2020). La connaissance de la transdifférenciation des cellules de type astrocyte à partir des cellules tumorales de MB est une avancée majeure dans ce domaine et l'ensemble des implications des astrocytes au sein de la tumeur montrent leur importance capitale dans le microenvironnement du MB.

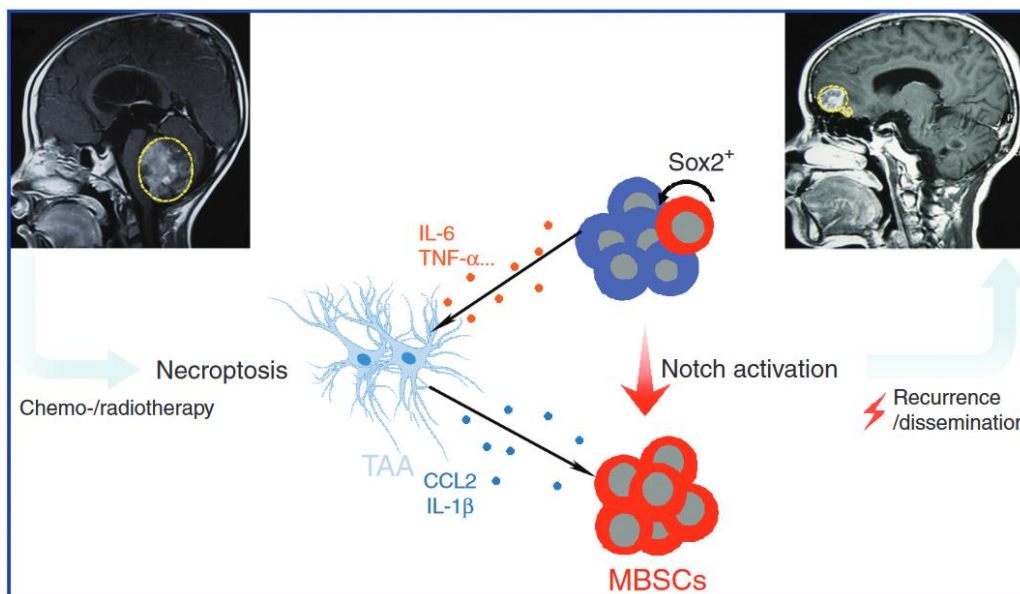


Figure 12 : Contribution des astrocytes associés à la tumeur aux cellules souches cancéreuses et inversement  
 Les cellules souches cancéreuses (CSC) sécrètent de l'IL6 et du TNF $\alpha$  dans le microenvironnement ce qui active les astrocytes associés à la tumeur (TAA). Les chimio-radiothérapies entraînent la nécroptose des TAA qui vont former un environnement cytokinique favorable aux CSC via l'activation de la voie Notch et ainsi contribuer à la dissémination des cellules tumorales. (D'après Liu *et al.*, 2020).

#### 4.2.2.3. Les cellules endothéliales

Le MB et les autres tumeurs cérébrales se caractérisent par une vascularisation excessive qui favorise la croissance tumorale. La densité vasculaire dans les tumeurs cérébrales est corrélée à un mauvais pronostic. Ce processus de formation des nouveaux vaisseaux au sein des tumeurs, appelé angiogenèse tumorale, est peu étudié dans les tumeurs cérébrales pédiatriques. Ces tumeurs se caractérisent par la formation d'amas de vaisseaux, qu'on appelle glomérule vasculaire, exprimant principalement le récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire 2 (VEGFR-2) et le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR : (Platelet-derived growth factor receptor) (Virág et al., 2014). Le MB est la tumeur cérébrale pédiatrique qui présente le plus de glomérules vasculaires avec une expression très élevée du PDGFR (Virág et al., 2014). De plus, la caractérisation de quatre sous-groupes moléculaires du MB a aussi permis de mettre en avant des différences dans l'angiogenèse de ces tumeurs. D'Asti *et al.* ont étudié les profils d'expression de gènes liés à l'angiogenèse dans les différents sous-groupes de MB, et a constaté que le sous-groupe SHH se distinguait le plus des autres sous-groupes par la surexpression de facteurs de coagulations, tels que F3/TF et F2R/PAR-1 (D'Asti et al., 2014). Une autre étude a mis en avant l'importance de l'angiogenèse dans le MB de sous-groupe 3, comparé aux autres sous-groupes, entraînant un pronostic plus sombre chez ces patients (Thompson et al., 2017).

Le réseau vasculaire au sein des tumeurs est un élément clé du microenvironnement tumoral et joue un rôle crucial dans le développement et la croissance tumorale. Le principal acteur de ce réseau vasculaire est la cellule endothéliale (CE). En effet, un vaisseau sanguin se compose de différentes couches et types cellulaires mais parmi eux les CE sont les plus critiques car elles forment les capillaires alimentant les tissus en oxygène et en nutriments tout en éliminant les déchets présents dans l'organisme (Peleli et al., 2020). Normalement, les CE restent quiescentes à moins d'être activées par des signaux pro-angiogéniques comme le VEGF (Potente & Carmeliet, 2017).

Dans le MB, les CE augmentent progressivement au fur et à mesure que la tumeur progresse (Yao et al., 2020). Les travaux menés par Taylor *et al.* ont montré qu'un niveau élevé de cellules circulantes progénitrices dérivées de la moelle osseuse VEGFR2<sup>+</sup> est corrélé à une dissémination métastatique dans les tumeurs cérébrales pédiatriques comme le MB (M. Taylor et al., 2009). En effet, les cellules tumorales pour proliférer nécessitent un approvisionnement en oxygène et en nutriments, la tumeur pour sa croissance va donc déclencher le processus d'angiogenèse et tout au long de ce processus, ce sont les voies de signalisation du facteur du VEGF et Notch qui sont impliquées (T. Li et al., 2018; Peleli et al., 2020) (Figure 13). Le

VEGF est le facteur pro-angiogénique le plus connu et décrit dans la littérature pour ces rôles dans l'angiogenèse et la vasculogenèse. Dans le MB, la surexpression du VEGF $\alpha$ , a été corrélée à un mauvais pronostic pour les patients du sous-groupe 3 (Thompson et al., 2017). On retrouve aussi l'expression de son récepteur, le VEGFR2, au sein du MB mais c'est surtout la surexpression du récepteur des facteurs de croissance dérivés des plaquettes, le PDGFR, qui différencie le MB des autres tumeurs cérébrales pédiatriques (Virág et al., 2014). Concernant la voie Notch, une étude récente a décrit son lien dans le MB avec les CE. En effet, les travaux de Wang *et al.* montrent que les CE activent la voie Notch dans le MB ce qui contribue au maintien des caractères souches des cellules (Y. Wang et al., 2017).

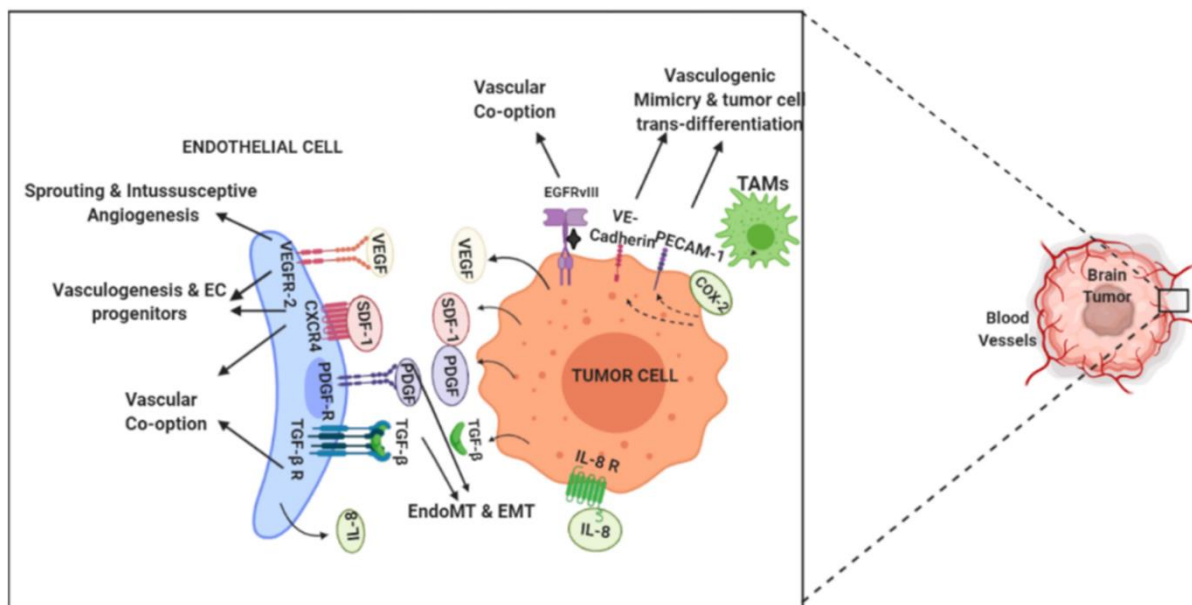


Figure 13 : Mécanismes et médiateurs moléculaires impliqués dans la formation de nouveaux vaisseaux qui favorisent la poursuite de la tumorigénèse dans les tumeurs du cerveau

Les facteurs sécrétés par les cellules tumorales tels que le VEGF, le SDF-1, le PDGF et le TGF- $\beta$  agissent sur les récepteurs respectifs des cellules endothéliales (CE) et déclenchent de nouveaux mécanismes de formation de vaisseaux tels que la germination et l'angiogenèse, la vasculogenèse et le recrutement des CE de la moelle osseuse. (D'après Peleli *et al.*, 2020)

Les CE prennent une place majeure dans le microenvironnement tumoral et vont donc interagir avec les cellules tumorales. Différents niveaux d'interactions entre les CE et les cellules tumorales ont été décrit dans la littérature : il existe des interactions via les facteurs sécrétés dans le microenvironnement de la tumeur, des interactions directes via les gap junctions, et des interactions indirectes via des cellules intermédiaires présentes dans le microenvironnement tumoral (Peleli et al., 2020) (Figure 14).

Le principal facteur de croissance sécrété au sein des tumeurs est le VEGF, à la fois dérivé de la tumeur et des CE qui exerce donc ses effets de manière paracrine et autocrine par une liaison de haute affinité aux récepteurs tyrosine kinase VEGFR-1 et VEGFR-2 (Peleli et al., 2020). On retrouve aussi le facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF2 : Fibroblast growth factor 2), FGF le plus important concernant la régulation de l'angiogenèse dans les tumeurs cérébrales (Auguste et al., 2001). Le FGF2 se lie au FGFR1, qui est un récepteur tyrosine kinase principalement exprimé sur les CE et leur interaction favorise l'angiogenèse de deux manières, soit en modulant l'activité des CE, soit en régulant l'expression du VEGF par les cellules tumorales (Plate et al., 1992). Le FGF2 influence la migration des CE à travers la matrice extracellulaire et agit comme un agent chimiotactique pour les CE, et les aide à former des tubes de type capillaire favorisant la croissance tumorale (Peleli et al., 2020). Enfin, il a été prouvé que le FGF2 induisait directement l'expression et la production de VEGF, qui est le principal potentialisateur de l'angiogenèse dans les tumeurs cérébrales (Plate et al., 1992). D'autres facteurs de croissance jouent un rôle dans l'interaction entre les cellules tumorales et les CE, comme le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF $\beta$ ) et le PDGF $\beta$ , améliorant l'angiogenèse dans les tumeurs cérébrales (Dieterich et al., 2012; P. Guo et al., 2003; Reis et al., 2012).

Les gap jonctions permettent une interaction directe entre les cellules tumorales et les CE. Les gap jonctions sont des canaux formés par des protéines membranaires appelées connexines. Elles permettent des interactions intercellulaires avec les cellules adjacentes. La connexine la plus étudiée dans les tumeurs cérébrales, notamment dans le gliome, est la connexine 43 (Cx43) (Aasen et al., 2019). La Cx43 est exprimée par l'ensemble des CE et des cellules tumorales dans le gliome (W. Zhang et al., 2003). Une communication directe de cellule à cellule via Cx43 semble cruciale dans le transport du VEGF des cellules tumorales aux CE pour la formation de nouveaux vaisseaux (W. Zhang et al., 2003). Une autre étude a confirmé l'importance de la Cx43 dans l'angiogenèse du glioblastome (Thuringer et al., 2016).

L'interaction entre les CE et les cellules tumorales se fait souvent de manière indirecte en impliquant d'autres cellules intermédiaires qui sont présentes dans le microenvironnement tumoral. Par exemple, les astrocytes, population cellulaire très présente dans le microenvironnement des tumeurs cérébrales, vont interagir avec les CE, puisque c'est le principal composant de la BHE (Abbott et al., 2006). Il a été démontré que les astrocytes sont capables de soutenir l'angiogenèse tumorale via de multiples mécanismes impliquant la sécrétion de facteurs angiogéniques et de croissance tels que le VEGF (Abbott et al., 2006). De plus, les astrocytes sont capables de sécréter de l'endothéline-1 (ET-1), qui a un puissant effet

mitogène sur la CE en plus de son rôle classique de vasoconstricteur (Ostrow et al., 2011). D'autres cellules présentes dans le microenvironnement tumoral vont jouer un rôle sur les CE : la microglie résidente et les TAMs. Les deux types cellulaires sécrètent des cytokines, telles que le TGF $\beta$  et l'IL6, connues pour maintenir le caractère souche des cellules cancéreuses et soutenir l'angiogénèse (Dieterich et al., 2012; Middleton et al., 2014). Les TAMs et la microglie associés aux tumeurs présentent un phénotype immunosuppresseur, le phénotype M2, qui aide non seulement les cellules tumorales à échapper à l'immunosurveillance tumorale, mais les macrophages/microglie M2 sécrètent également des facteurs angiogéniques comme le VEGF et des MMPs qui aident à l'angiogénèse et à l'invasion des cellules tumorales (Hambardzumyan et al., 2016).

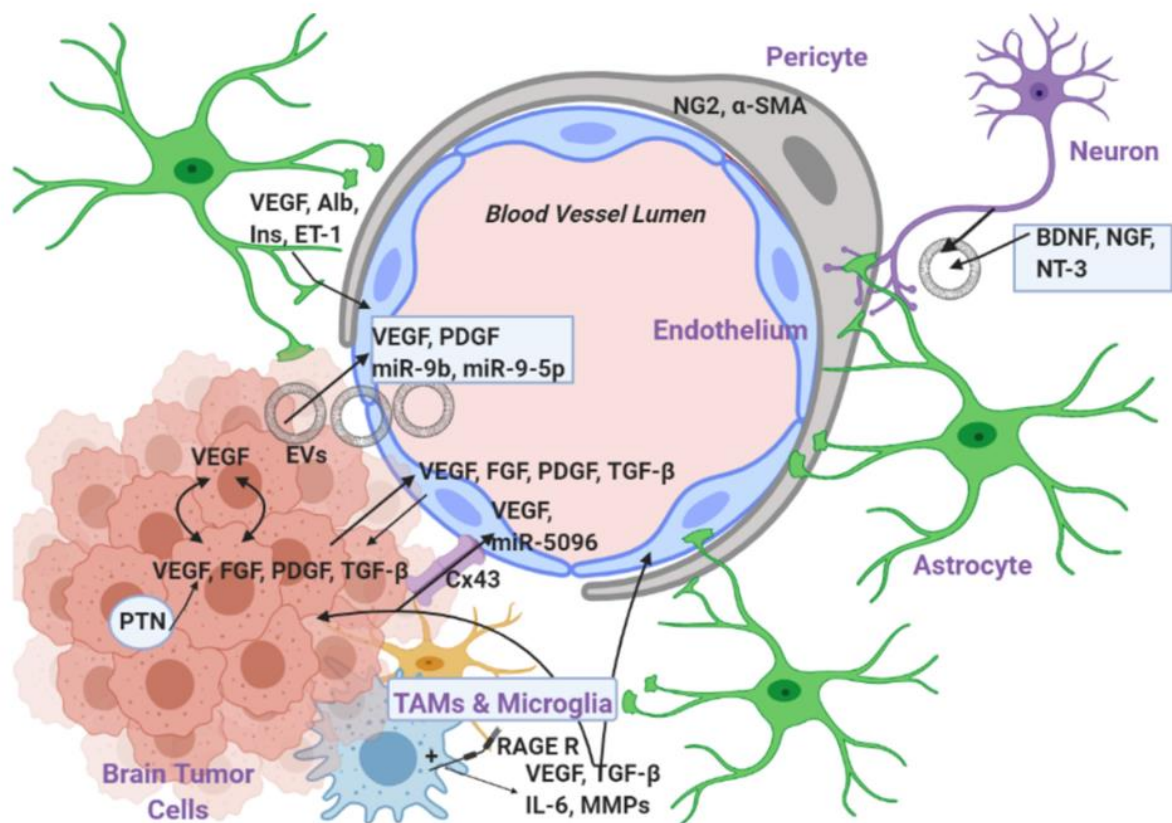


Figure 14 : Différents niveaux d'interaction entre les cellules endothéliales et les cellules tumorales. L'interaction se produit à trois niveaux différents : (a) la sécrétion de facteurs, (b) les gap junctions et (c) les cellules intermédiaires tels que les astrocytes, les neurones, les péricytes ou les microglies et macrophages associés à la tumeur (TAMs). Les facteurs sécrétés proviennent soit de la tumeur, soit des cellules endothéliales et il existe une relation réciproque entre eux. (D'après Peleli *et al.*, 2020)

## II. La Neuropiline-1 et le cancer

### 1. Découverte et structure des neuropilines

Les neuropilines (NRPs) sont des glycoprotéines transmembranaires impliquées dans de multiples voies de signalisation essentielles aux processus biologiques tels que le développement du système cardiovasculaire, du système neuronal et le système immunitaire (Kawasaki et al., 1999; Kitsukawa et al., 1995; Roy et al., 2017). Elles sont exprimées dans des types cellulaires très variés tels que les neurones, les cellules endothéliales, les cellules immunitaires, les cellules musculaires lisses et les cellules tumorales. Elles agissent comme co-récepteurs en se complexant avec d'autres récepteurs et ainsi augmentent leurs liaisons avec leurs ligands. Elles sont principalement connues pour se lier aux membres de la famille des sémaphorines de classe 3 (SEMA 3), acteurs du « guidage axonal » (Kolodkin et al., 1997) et de la famille des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor) et leurs récepteurs (VEGFR), acteurs de l'angiogenèse (H.-F. Guo & Vander Kooi, 2015).

La famille des NRPs comprend deux membres, la neuropiline-1 (NRP1) et la neuropiline-2 (NRP2), qui sont spécifiques aux vertébrés. C'est en 1987 que la première neuropiline, NRP1, a été identifiée grâce à un anticorps monoclonal ciblant les protéines de surface impliquées dans le « guidage axonale » pendant le développement neuronal (Takagi et al., 1987). NRP2 a été découverte quelques années plus tard, en 1997, exprimée, elle aussi, sur les neurones en développement (H. Chen et al., 1997). Chez l'Homme, les gènes des NRPs ont des positions différentes, le gène *NRP1* se situe sur le chromosome 10 (10q12) alors que le gène *NRP2* se situe sur le chromosome 2 (2q34). Même si elles sont situées sur des chromosomes différents, ces deux glycoprotéines possèdent 44% d'homologie de séquences (Napolitano & Tamagnone, 2019) et leur structure est identique.

Elles se composent de cinq domaines : trois domaines extracellulaires, nommés a1a2 (CUB), b1b2 et c, un domaine transmembranaire ainsi qu'un domaine intracellulaire. Ce sont les domaines extracellulaires a et b qui sont impliqués dans la liaison du ligand, le domaine c, lui, assure la médiation de l'homo- et de l'hétérodimérisation des NRPs, ce qui semble essentiel pour leur fonction, tandis que le domaine cytoplasmique se termine par une séquence consensus (SEA) qui lui permet d'interagir avec les domaines protéiques PSD-95 / Dlg / ZO-1 (PDZ) (Pellet-Many et al., 2008; Wild et al., 2012). De plus, il a été démontré que le domaine a1a2 et b1 des NRPs correspond au domaine de liaison des sémaphorines tandis que le domaine b1b2

est capable de lier les ligands de la famille du VEGF (Dumond & Pagès, 2020; Gaur et al., 2009) (Figure 15).

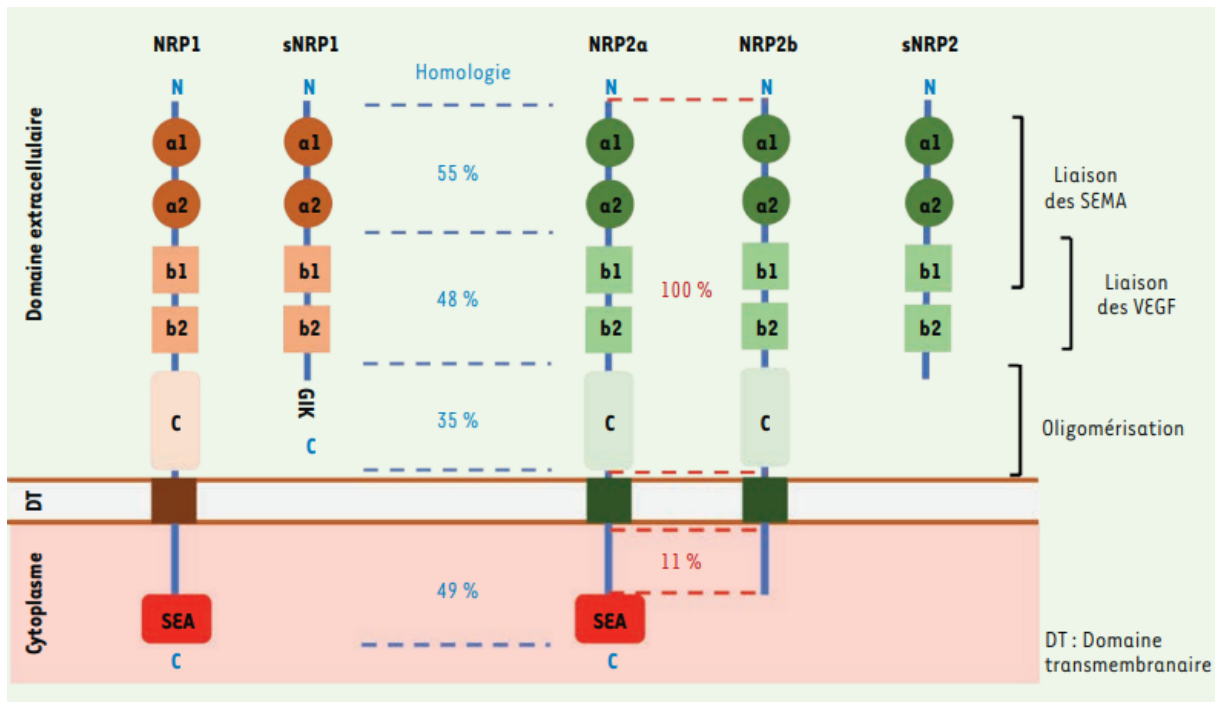


Figure 15 : Structure générale des Neuropilines

Les formes transmembranaires des neuropilines (NRPs) se composent d'un domaine extracellulaire avec deux domaines CUB (a1/a2), deux domaines d'homologie aux facteurs de coagulation V/VIII (b1/b2), et un domaine MAM (c). Les domaines de liaison de SEMA 3 et du VEGF sont indiqués. Les domaines C-terminaux de NRP1 et NRP2 contiennent une séquence de liaison (SEA) à la protéine à domaine PDZ GIPC1 (aussi appelée NIP ou synectine). Les formes solubles (sNRP1 and sNRP2) ont un domaine extracellulaire tronqué et sont dépourvues des domaines transmembranaires et cytosoliques. Le pourcentage d'homologie des différents domaines (extracellulaire membranaire et cytosolique) est indiqué. (D'après Dumond *et al.*, 2020).

## 2. Voies de signalisation des NRPs et rôles biologiques

### 2.1. Récepteurs des Sémaphorines de classe 3

Les NRPs ont été dans un premier temps identifiées pour leur rôle dans le développement du système nerveux particulièrement grâce à leur fonction de récepteurs des sémaphorines, en particulier les SEMA 3 (Kolodkin et al., 1997). Les sémaphorines sont regroupées en huit classes et seules les classes 3, 4, 6 et 7 sont représentées uniquement chez les vertébrés. Les SEMA 3 constituent un des huit sous-groupes de famille de protéines qui ont pour rôle de guider la croissance des axones, rôle essentiel pour la structuration du système nerveux. Elles sont aussi impliquées dans des processus tels que l'apoptose, la migration cellulaire et la carcinogénèse (Gaur et al., 2009; Niland & Eble, 2019). Elles se constituent de sept protéines

solubles, désignées par les lettres A à G, et sont sécrétées par différentes lignées cellulaires comme les neurones, les cellules épithéliales ou encore les cellules tumorales (Gaur et al., 2009).

Chacune des SEMA 3 ont différentes affinités de liaison aux NRPs et par conséquent, chaque SEMA 3 a une fonction biologique distincte. Les NRPs se lient aux SEMA 3 via leur domaine extracellulaire a1a2 et b1 (Dumond & Pagès, 2020; Gaur et al., 2009) (Figure 16). Cette liaison requiert l'association avec une autre famille de récepteurs : les plexines. En agissant comme co-récepteurs les NRPs augmentent l'affinité de liaison des plexines avec les SEMA 3. Le complexe formé par NRPs/SEMA3/Plexines améliore la transduction de signal durant le développement embryonnaire, le guidage des axones et les réponses immunitaires. Par exemple, NRP1 forme un complexe stable avec la plexine 1 qui permet la fixation avec une plus forte affinité à la SEMA 3A (Takahashi et al., 1999). Il a aussi été démontré que la liaison entre NRP1 et le complexe SEMA 3E/PlexinD1 transforme la répulsion axonale en attraction durant le développement cérébral (Chauvet et al., 2007). NRP1 se lie préférentiellement à SEMA 3A tandis que NRP2 se lie habituellement à la SEMA 3C ou SEMA 3F (Gaur et al., 2009; Roy et al., 2017). De plus, il est aujourd'hui reconnu que la fonction des NRPs dans la signalisation des SEMA 3 est importante non seulement pour le guidage de la croissance des axones, mais également pour la signalisation des lésions de la moelle épinière (Parker et al., 2012).

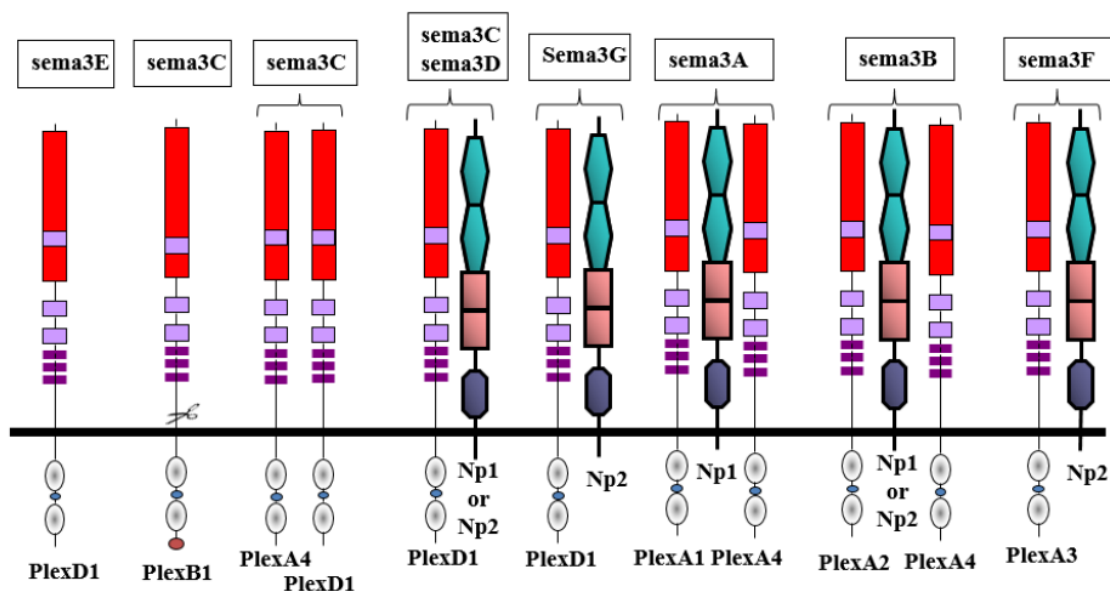


Figure 16 : Récepteurs des sémaphorines de classe 3 (SEMA 3)

Np1=NRP1; Np2=NRP2; Plex= plexine. (D'après Toledano *et al.*, 2019)

## 2.2. Récepteurs de la famille des VEGF

En plus de se lier aux sémaphorines, on sait aujourd'hui que les NRPs sont des récepteurs de la famille du VEGF (Soker et al., 1998). La famille du VEGF se compose de plusieurs facteurs de croissance, nommés par les lettres A, B, C et D ainsi que du facteur de croissance placentaire (PIGF : Placental Growth factor) dont le rôle principal est de médier l'angiogenèse et la lymphangiogenèse. De plus, il a été décrit que ces facteurs de croissance sont impliqués dans la carcinogenèse (Mercurio, 2019).

Les récepteurs classiques des VEGF sont des récepteurs tyrosines kinases appelés VEGFR. Il en existe 3 : le VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3, ayant différentes affinités avec les ligands VEGF et par conséquent différentes actions biologiques. Par exemple, le VEGFR-2, récepteur du VEGF le plus connu, se lie préférentiellement avec le VEGF-A et est exprimé principalement par les cellules endothéliales vasculaires et par conséquent joue un rôle essentiel dans la vasculogenèse et l'angiogenèse (Koch & Claesson-Welsh, 2012). La fonction du VEGFR-1 reste quant à elle moins décrite, elle semblerait réguler de manière négative l'angiogenèse en entrant en compétition avec le VEGFR-2 et aussi impliquée dans la migration des monocytes/macrophages puisque le VEGFR-1 est fortement exprimé dans ces types cellulaires (Koch & Claesson-Welsh, 2012). Contrairement aux deux autres récepteurs du VEGF, le VEGFR-3 ne joue pas de rôle dans l'angiogenèse mais plutôt dans la lymphangiogenèse, ceci est lié à son affinité aux VEGF-C et D et son expression dans les cellules endothéliales lymphocytaires.

La liaison du VEGF à son récepteur induit l'homo- ou l'hétérodimérisation du récepteur. Le changement de conformation des VEGFR qui en résulte conduit à l'exposition du site de liaison à l'ATP dans le domaine à activité tyrosine kinase intracellulaire et à son activation par phosphorylation, entraînant alors des cascades d'activation des voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la migration et l'angiogenèse (Koch & Claesson-Welsh, 2012). L'affinité du VEGF à son récepteur est renforcée par la formation d'un complexe avec les NRPs. Initialement, NRP1 a été identifié comme étant un récepteur spécifique de l'isoforme VEGF-A 165 (Soker et al., 1998), et plus récemment pour d'autres isoformes tel que le VEGF-A 121 (Pan, Chathery, et al., 2007). Ce sont les domaines extracellulaires b1b2 des NRPs qui sont impliqués dans cette liaison (Gu et al., 2002). NRP1 semble agir principalement comme un co-récepteur pour VEGFR-1 et 2, acteurs importants de l'angiogenèse, alors que NRP2 est un co-récepteur du VEGFR-3, un récepteur essentiel de la lymphangiogenèse (Koch & Claesson-Welsh, 2012).

### 2.3. Autres ligands des NRPs

Etant donné la capacité de liaison aux protéines de la famille du VEGF des NRPs, plusieurs équipes de recherche ont émis l'hypothèse que les NRPs pourraient interagir avec d'autres protéines de liaison à l'héparine et ainsi de nouveaux ligands des NRPs ont été découverts. En effet, NRP1 interagit avec d'autres partenaires tels que le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) (West et al., 2005), le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) (Hu et al., 2007; Matsushita et al., 2007), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (Banerjee et al., 2006; Kofler & Simons, 2016) ou encore le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (Glinka & Prud'homme, 2008; Kofler & Simons, 2016) (Figure 17).

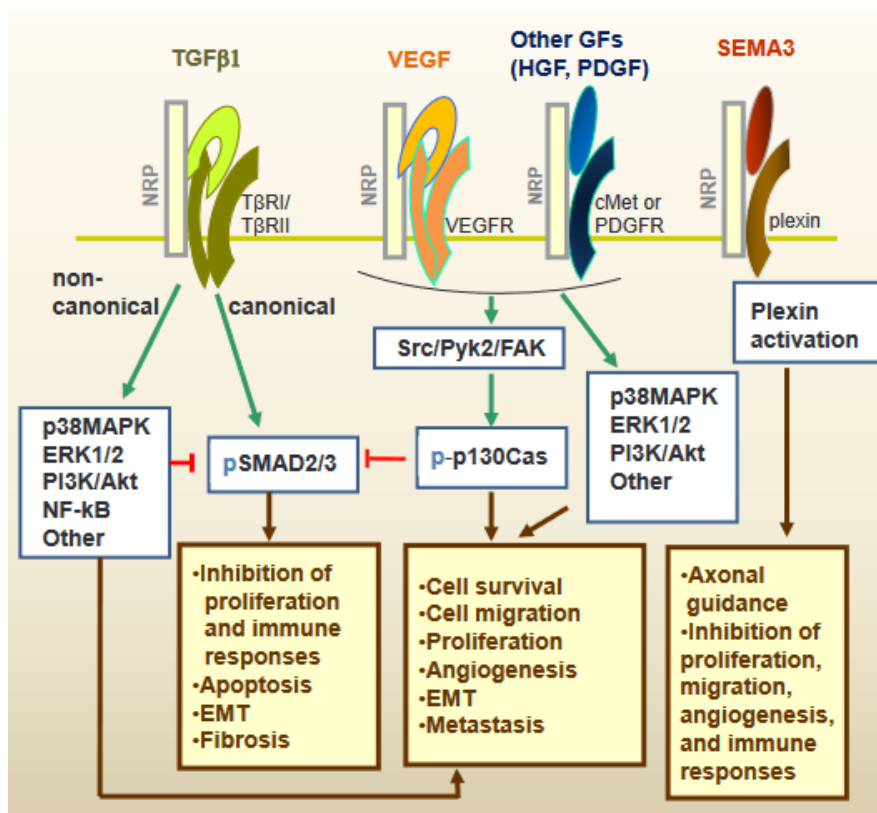


Figure 17 : Ligands des NRPs et leurs fonctions  
(D'après Glinka & Prud'homme *et al.*, 2008)

D'après les travaux de West *et al.*, FGF-2 se lie à NRP1 tout comme les formes 4 et 7 du FGF ainsi que son récepteur le FGFR-1 contribuant ainsi à l'angiogenèse. Ces interactions peuvent être inhibées par l'héparine ce qui confirme la présence d'un site mimétique de l'héparine sur NRP1 (West et al., 2005). Cette même équipe a aussi montré que NRP1 se liait à HGF, impliqué dans des fonctions variées comme la prolifération et la migration cellulaire ou la morphogenèse (Hu et al., 2007; West et al., 2005). La liaison de NRP1 à HGF potentialise l'activité du facteur de croissance avec son récepteur, c-MET, ce qui favorise la survie des

cellules et leur capacité invasive. Ce phénomène de potentialisation d'activité du HGF par NRP1 contribue au développement de certains cancers comme les gliomes ou les adénocarcinomes canaux pancréatiques (Hu et al., 2007; Matsushita et al., 2007).

La découverte de la liaison de NRP1 avec PDGF lui confère un nouveau rôle dans la régulation de la signalisation du PDGF au sein des cellules musculaires lisses vasculaires. Il est vrai que NRP1 et NRP2 sont fortement exprimés dans les cellules musculaires lisses vasculaires ainsi que dans d'autres types cellulaires, comme il a été démontré dans les cellules souches mésenchymateuses (Ball et al., 2010), et leur association avec le PDGF joue un rôle dans la migration, prolifération et la survie de ces cellules (Kofler & Simons, 2016).

NRP1 a aussi été décrit dans la littérature comme jouant un rôle critique dans le développement et l'homéostasie vasculaire via la régulation du TGF $\beta$  dans les cellules endothéliales (Kofler & Simons, 2016). Effectivement, NRP1 se lie au TGF $\beta$  sous sa forme active et sa forme latente associée à la protéine LAP (LAP-TGF- $\beta$ ) via son domaine b1. De plus, ces deux formes du TGF $\beta$  entrent en compétition avec le VEGF 165 pour la liaison avec NRP1 (Glinka & Prud'homme, 2008). En plus de se lier au TGF $\beta$ , NRP1 peut former des complexes avec les trois formes des récepteurs au TGF $\beta$  (T $\beta$ R) mais une affinité plus élevée pour T $\beta$ R-1 (Glinka et al., 2011). Une autre étude a montré que NRP1 dans les cellules endothéliales supprime l'activation et la signalisation du TGF $\beta$  en formant des complexes protéiques avec l'intégrine  $\beta$ 8, ce qui laisse penser à un rôle inhibiteur de NRP1 sur la signalisation du TGF $\beta$  (Hirota et al., 2015).

De plus, on sait aujourd'hui que TGF $\beta$  joue un rôle important dans la régulation de l'immunité cellulaire. L'équipe de Glinka et Prud'homme a d'ailleurs mis en avant que NRP1, via sa liaison au TGF $\beta$ , joue un rôle important dans l'activité des lymphocytes T régulateurs (LTreg) en améliorant leur capacité à capturer le TGF $\beta$ 1 (Glinka & Prud'homme, 2008).

#### 2.4. Une signalisation intracellulaire via GIPC1

NRP1 étant avant tout connu pour son rôle de récepteur de SEMA 3 et du VEGF, initialement, on ignorait l'existence d'une signalisation intracellulaire venant de NRP1 seul mais plusieurs études ont démontré le contraire. Tout d'abord, la découverte de la liaison de NRP1 et GIPC1 (GAIP interacting protein C terminus 1), aussi appelé NIP ou Synectin, a pu mettre en évidence que NRP1, via la séquence de trois acides aminés (SEA-COOH) de son domaine intracellulaire, se liait au domaine PDZ de GIPC1. Cela suggérait que cette liaison était impliquée dans le trafic membranaire qui a lieu durant la croissance des axones (Cai & Reed, 1999). En effet, GIPC1 est initialement connu pour interagir avec le domaine SEA de

GAIP, une protéine activant les GTPases et régulant le trafic vésiculaire (De Vries et al., 1998). GIPC1 fait partie de la famille des GIPCs qui se composent de deux autres protéines, nommées GIPC2 et GIPC3. Ces protéines sont impliquées dans le trafic de différentes protéines transmembranaires et dans la régulation de processus cellulaires variés tels que la prolifération, la cytokinèse et la migration (Katoh, 2013).

D'autre part, une étude a montré que le domaine C terminal de NRP1 est indispensable dans l'angiogenèse et que GIPC, via son interaction avec NRP1, permet la transmission du signal du VEGF pour réguler la migration des cellules endothéliales pendant l'angiogenèse (L. Wang et al., 2006). Cette étude révèle aussi qu'avec un modèle de zebrafish KO de GIPC, le même phénotype vasculaire que celui du modèle KO pour NRP1 est observé, mettant ainsi en avant un nouveau rôle de GIPC dans l'endothélium vasculaire et la formation des vaisseaux via la signalisation GIPC/NRP1 (L. Wang et al., 2006). Mais il existe aussi une voie indépendante du VEGF et de SEMA 3. En effet, la signalisation de NRP1/ GIPC1 régule le trafic et la fonction de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  dans les cellules endothéliales indépendamment du VEGF-A165 et SEMA3A (Valdembri et al., 2009). NRP1, par son motif cytoplasmique SEA se lie à GIPC1, favorise spécifiquement l'adhésion des cellules endothéliales médiée par l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  à la fibronectine, ce qui est cruciale pour le développement vasculaire.

De plus, il semblerait que la signalisation NRP1/GIPC1 soit impliquée dans de nombreux cancers. En effet, l'association NRP1/GIPC1 favorise la progression tumorale (G. Zhang et al., 2016), par exemple en activant le microenvironnement tumoral (Yaqoob et al., 2012) ou encore en augmentant la survie des cellules souches (Grun et al., 2018).

## 2.5. Rôle dans l'immunité

De manière intéressante, NRP1 joue aussi un rôle important dans l'immunité cellulaire, que ce soit dans des conditions physiologiques ou physiopathologiques comme dans le cancer. Cependant, il y a actuellement peu de connaissance concernant les voies moléculaires impliquées dans ces fonctions. L'expression de NRP1 a été caractérisée dans différents types de cellules immunitaires tels que les macrophages, les cellules dendritiques (CD) et les lymphocytes en particulier les lymphocytes T régulateurs (LTreg) (Bruder et al., 2004; Catalano, 2010; Stepanova et al., 2007) (Figure 18).

Quelques équipes de recherche travaillant sur les maladies auto-immunes ont montré que NRP1 joue un rôle critique dans la régulation des réponses immunitaires. L'équipe de Solomon *et al.* a fait des recherches sur la sclérose en plaque avec un modèle d'encéphalomyélite auto-immune (EAE) de souris déficientes en NRP1 sur leurs lymphocytes T CD4+ (LT CD4+) et a

montré que cela aggravait l'EAE, contrairement aux souris sur-exprimant NRP1 sur leurs LT CD4+, qui elles ne développaient pas d'EAE (Solomon et al., 2011). Ceci suggère un rôle anti-inflammatoire de NRP1 qui a aussi été mis en avant dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde via la voie de signalisation de SEMA 3A/NRP1 (Catalano, 2010). Il est vrai que NRP1 est un récepteur fonctionnel des sémaphorines et qu'elle est présente sur les LT (Catalano, 2010; Lepelletier et al., 2007). La signalisation SEMA 4A/Plexine A4/NRP1 a d'ailleurs été impliquée dans l'augmentation du nombre des LTreg, cellules essentielles dans le maintien de la tolérance périphérique et la régulation des réponses immunitaires, et dans la potentialisation de leur fonction. De plus, la formation du complexe SEMA 4A/Plexine A4/NRP1 est lié à une augmentation de la sécrétion de l'IL10, une interleukine anti-inflammatoire, contribuant ainsi à la régulation de la réponse immunitaire (Delgoffe et al., 2013). Plus récemment, il a été démontré que la protéine B7-H4-ig se liait au complexe SEMA 3A/Plexine A4/NRP1 pour moduler la réponse des LTreg. La protéine B7-H4-ig étant associée à la régulation de l'immunité en réduisant les réponses inflammatoires des LT CD4+, cela suggère un rôle immunorégulateur pour le complexe SEMA 3A/Plexine A4/NRP1 (Podojil et al., 2018).

En plus de jouer un rôle immunorégulateur, NRP1 est impliqué dans la migration des cellules immunitaires. Par exemple, une étude a montré que SEMA 3A diminuait la capacité d'adhésion des thymocytes exprimant NRP1 et que cela induisait leur migration par un effet répulsif (Lepelletier et al., 2007). De plus, NRP1 forme un complexe avec Plexine A1, qui est connue pour jouer un rôle crucial dans le trafic des cellules dendritiques (CD). La formation de ce complexe à la surface des CD permet de lier SEMA 3A présente au niveau des vaisseaux lymphatiques et cela entraîne la migration des CD dans les vaisseaux lymphatiques (Takamatsu et al., 2010).

D'autre part, on sait que NRP1 est exprimé à la surface CD qui sont concernées par une étape importante dans l'initiation de l'immunité : la reconnaissance des antigènes pathogènes. En effet, les CD sont des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) qui ont la capacité, via les molécules de CMH-I et CMH-II, de présenter un antigène en formant une synapse immunologique avec les LT et ainsi stimuler leurs réponses. NRP1 est exprimé à la fois sur la surface des CD et des LT et apparaît essentiel dans leur interaction pour initier la réponse immunitaire (Tordjman et al., 2002). En particulier, il a été démontré que NRP1 est exprimé par les LTreg, ce qui améliore et prolonge leur interaction avec les CD lors de la synapse immunologique leur conférant ainsi une sensibilité plus élevée aux antigènes (Sarris et al., 2008). De plus, une étude a mis en avant le fait que NRP1 pouvait être transféré des CD aux LT lors de cette synapse immunologique, leur permettant ainsi de se lier au VEGF-165 sécrété

par les CD. Ces résultats suggèrent que les LT exprimant NRP1 pourraient participer au remodelage des vaisseaux dans les organes lymphoïdes secondaires lors de l'inflammation (Bourbié-Vaudaine et al., 2006).

Un des autres acteurs importants de l'immunité est le macrophage qui lui aussi exprime NRP1 (Aung et al., 2016; Stepanova et al., 2007). Les macrophages sont des cellules immunitaires présents dans tous les tissus et jouent un rôle dans la surveillance immunitaire, dans la réponse et la résolution de l'inflammation et contribuent à la cicatrisation des plaies. Ils proviennent de la différenciation de leucocytes sanguins circulants, les monocytes, et NRP1 semble jouer un rôle dans cette étape. En effet, il a été mis en avant que l'expression de la SEMA-3A, et de NRP1, augmentait significativement lors de la différenciation des monocytes en macrophages. Plus particulièrement, lors de la différenciation des monocytes dans des conditions favorisant les macrophages de phénotypes M2, qui se caractérisent par des phénotypes anti-inflammatoires et pro-angiogéniques, alors que l'expression de NRP1 semble diminuer lors de la différenciation des monocytes lorsque les conditions sont en faveur des macrophages de phénotype M1 pro-inflammatoires (Ji et al., 2009).

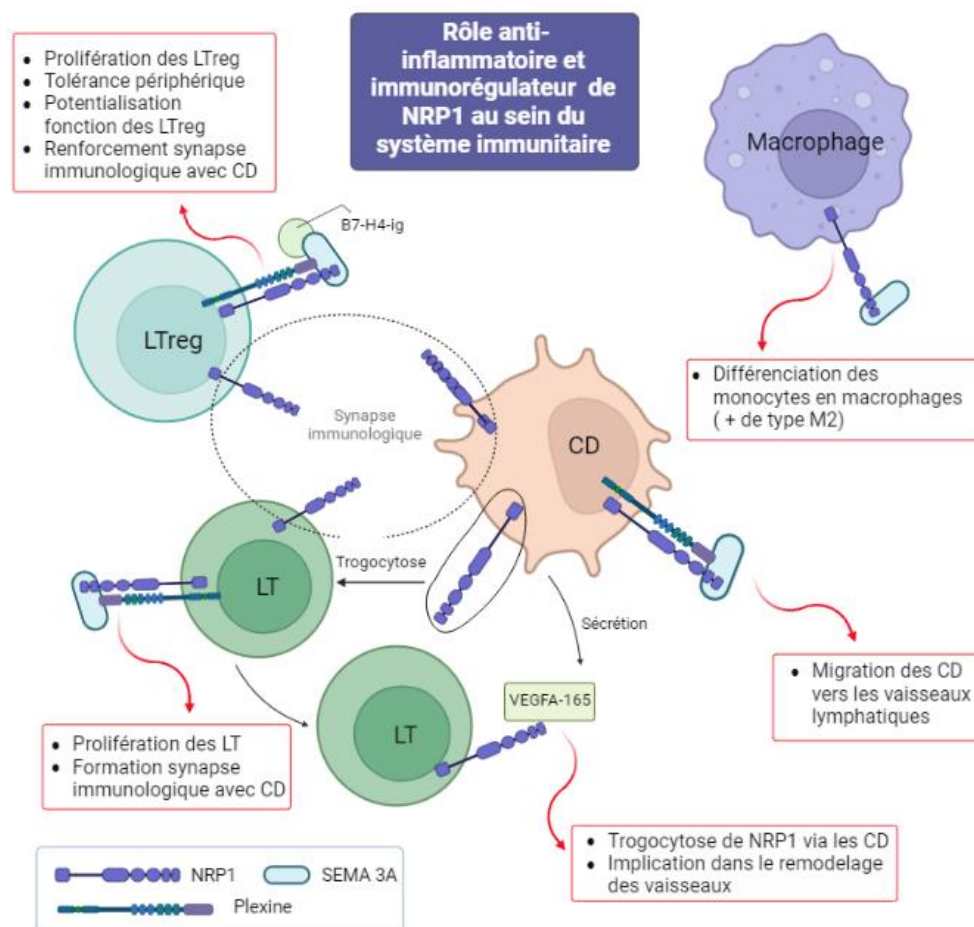


Figure 18 : Rôles anti-inflammatoires et immunorégulateurs de NRP1 dans le système immunitaire

Cette figure, inspirée de Roy *et al.*, 2017, a été créée avec BioRender.com

### 3. Rôle de NRP1 dans la carcinogénèse

#### 3.1. Surexpression NRP1 : facteur de mauvais pronostic et progression tumorale

L'implication de NRP1 dans les différentes voies de signalisation, décrites dans la partie précédente, l'a inévitablement liée au cancer. Plusieurs études ont montré que NRP1 est exprimé dans les cellules tumorales de nombreux cancers comme le cancer du sein (M. Luo et al., 2016), le cancer des poumons (Kawakami et al., 2002), le cancer du pancréas (Ben et al., 2014), le cancer buccal (W. Chu et al., 2014) ou encore les tumeurs cérébrales telles que le gliome (Hamerlik et al., 2012; Osada et al., 2004) et le médulloblastome (Snuderl et al., 2013).

De plus, la surexpression de NRP1 dans les tumeurs est associée à un mauvais pronostic. En effet, plusieurs équipes ont relevé que lorsque NRP1 était surexprimé dans les tissus tumoraux, le pronostic des patients était mauvais contrairement aux patients ne montrant pas de surexpression du récepteur. NRP1 est donc décrit comme un facteur de mauvais pronostic dans différents cancers tels que le cancer des poumons (Kawakami et al., 2002), le cancer du pancréas (Ben et al., 2014), le cancer du foie (Yaqoob et al., 2012), le cancer du sein (M. Luo et al., 2016), le gliome (Osada et al., 2004) et le médulloblastome (Snuderl et al., 2013).

De nombreux articles mettent en avant ce lien entre NRP1 et la progression tumorale dans différents types de cancers. Par exemple, l'équipe d'Hu *et al.*, a trouvé une corrélation entre les cellules tumorales exprimant NRP1 et la progression du gliome. Ils le démontrent à travers un modèle de xénogreffes de cellules tumorales surexprimant NRP1 où on peut constater une augmentation de la prolifération via l'activation de la voie de signalisation HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor) et c-Met en lien avec NRP1 (Hu et al., 2007). Par ailleurs, l'inhibition de NRP1 dans des cellules du cancer du sein a diminué la prolifération cellulaire, mettant là aussi en évidence le lien entre NRP1 et la progression tumorale (M. Luo et al., 2016). De plus, la présence de métastases est corrélée à l'expression de NRP1, comme par exemple chez les patients atteints d'adénocarcinome canalaire pancréatique (Ben et al., 2014), or on sait aujourd'hui que NRP1 joue un rôle essentiel dans la migration des cellules endothéliales (L. Wang et al., 2003).

Des études ont montré que NRP1 intervenait dans la migration et l'invasion des cellules tumorales (Bagci et al., 2009; Cao et al., 2008; M. Luo et al., 2016). En effet, dans le glioblastome, la présence de NRP1 est nécessaire pour la migration des cellules cancéreuses et la déplétion de SEMA 3A a inhibé leur migration, suggérant un rôle de NRP1, via son interaction avec SEMA 3A, dans l'infiltration des cellules de glioblastome (Bagci et al., 2009). D'autres études, sur le cancer du sein ou du rein, par exemple, ont obtenu des résultats similaires

en constatant une perte de la migration et de l'invasion cellulaire lors de l'inhibition de l'expression de NRP1 (Cao et al., 2008; M. Luo et al., 2016). Etant donné l'implication de NRP1 dans l'invasion cellulaire, plusieurs études ont émis l'hypothèse qu'elle soit impliquée dans la transition-épithélio-mésenchymateuse (TEM), processus désignant la perte d'adhérence entre les cellules, les rendant invasives et contribuant à la formation de métastases. Les résultats de ces études ont montré qu'effectivement NRP1 régule et favorise la TEM, en stimulant l'activation de la voie de signalisation NFκB et de la β-caténine (W. Chu et al., 2014; M. Luo et al., 2016).

D'autre part, il est actuellement reconnu dans la communauté scientifique que le microenvironnement tumoral joue un rôle essentiel dans la carcinogenèse. Yaqoob *et al* a d'ailleurs montré que NRP1 contribuait à la carcinogenèse en activant le microenvironnement tumoral (Yaqoob et al., 2012). NRP1, en se liant à GIPC, active l'intégrine α5β1, ce qui facilite l'association entre les myofibroblastes et la fibronectine puis l'assemblage des fibrilles de fibronectines, entraînant une rigidité de la matrice et contribuant ainsi à la croissance tumorale (Yaqoob et al., 2012). Le microenvironnement se compose, certes, de fibroblastes et de la matrice extracellulaire, mais aussi de cellules endothéliales (CE), de cellules immunitaires ou bien de cellules souches cancéreuses, qui sembleraient être toutes un lien avec NRP1, suggérant son implication dans de nombreux processus favorisant le développement des tumeurs, comme l'angiogenèse, la tolérance immunitaire et la résistance aux traitements, que nous évoquerons dans les parties suivantes.

### 3.2. NRP1 et angiogenèse

L'angiogenèse est un processus physiologique qui est vital lors du développement embryonnaire et indispensable à tous tissus en cours de développement. Cependant la dérégulation de l'angiogenèse est impliquée dans différentes pathologies comme le cancer. On sait aujourd'hui que les NRPs sont fortement exprimées dans le système vasculaire mature et en développement, en particulier sur les cellules musculaires lisses vasculaires et les cellules endothéliales. Leur présence a aussi été détectée dans l'endothélium vasculaire tumoral (Soker et al., 1998), ce qui laisse suggérer qu'elles jouent un rôle également dans l'angiogenèse tumorale. De plus, l'expression de NRP1 sur les cellules endothéliales est augmentée par VEGF via la signalisation du VEGFR2 (Oh et al., 2002). Cette même étude montre que l'altération de l'expression de NRP1 par un anticorps inhibe la prolifération des cellules endothéliales générée par VEGF (Oh et al., 2002). Des modèles de souris transgéniques KO pour NRP1 ont mis en avant son rôle essentiel dans le développement du système vasculaire lors de l'embryogenèse.

En effet, les souris KO NRP1 meurent *in utero* et les sacs vitellins sont avasculaires, et ce phénotype vasculaire anormal ressemble en tout point à celui des modèles transgéniques KO pour VEGF et VEGFR2, facteurs clés de l'angiogenèse (Takashima et al., 2002).

NRP1 est impliqué dans les différentes étapes de la néovascularisation et notamment dans sa régulation. En se liant avec son ligand, VEGF, NRP1 va avoir un effet pro-angiogénique alors qu'il semblerait que lorsque NRP1 se fixe aux SEMA 3, elle joue un rôle anti-angiogénique. Ce constat permet d'émettre l'hypothèse que SEMA 3 entre en compétition avec VEGF pour sa liaison avec NRP1 (Toyofuku et al., 2007). En outre, NRP1 agit sur l'endothélium vasculaire en favorisant la fonction des « tip cells », les cellules endothéliales de front qui bourgeonnent à partir d'un vaisseau préexistant et guide le néovaisseau, pendant l'angiogenèse (Fantin et al., 2013). Une autre étude a montré que NRP1 favorise le phénotype des « tip cells » en limitant l'activation du complexe Smad 2/3 impliqué dans la signalisation du TGF $\beta$  (Aspalter et al., 2015).

Cependant, l'angiogenèse peut se produire de manière anormale, en particulier dans le cas du cancer. NRP1 contribue à ce processus qui est courant dans les tumeurs dès qu'elles dépassent quelques millimètres dans le but d'alimenter le tissu tumoral en oxygène et en nutriments, contribuant ainsi à sa croissance. En effet, NRP1 peut favoriser le développement tumoral en améliorant l'angiogenèse tumorale ou en contribuant à l'œdème tissulaire en augmentant la perméabilité des vaisseaux. L'étude de Miao *et al.* est une des premières à mettre en avant que l'expression de NRP1 par les cellules tumorales favorise l'angiogenèse tumorale en augmentant la densité des vaisseaux et leur dilatation au sein de tumeurs de la prostate dans un modèle de xénogreffes chez le rat (H.-Q. Miao et al., 2000).

D'autres études ont montré que l'expression de NRP1 était corrélée à un mauvais pronostic pour le patient car elle entraînait une néovascularisation importante au sein de la tumeur comme par exemple dans le cancer du sein ou des poumons (Kawakami et al., 2002; Stephenson et al., 2002). De plus, il semblerait que l'angiogenèse dans le cancer gastrique soit favorisée par l'expression de NRP1 et du VEGF qui est accentuée par le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF-R). De même, il a été prouvé dans le cancer des poumons, *in vitro* et *in vivo*, que cibler NRP1 avec un anticorps réduisait l'angiogenèse ainsi que le remodelage vasculaire. Le blocage de NRP1 rendait également les vaisseaux plus sensibles aux anticorps anti-VEGF, réhaussant ainsi l'effet de la thérapie anti-angiogénique pour réduire la croissance tumorale (Akagi et al., 2003). Une étude plus récente sur le glioblastome a démontré que NRP1, via les voies de signalisation PI3K/Akt/NF $\kappa$ B, contribuait à l'angiogenèse tumorale. Dans leur modèle *in vivo* avec des PDX, leurs résultats affirment que la surexpression du mir-

124-3p, en se fixant à l'ARN messenger de NRP1, supprime son expression et réduit la densité des micro-vaisseaux tumoraux, ce qui a pour conséquence de bloquer la croissance tumorale (G. Zhang et al., 2018).

### 3.3. NRP1 et cellules souches cancéreuses

Un des aspects importants de la tumeur est son hétérogénéité cellulaire notamment par la présence de cellules souches cancéreuses (CSC). Ces CSC jouent un rôle important au sein de la tumeur puisqu'elles contribuent à la résistance aux traitements et sont associées à l'apparition de métastases ainsi qu'au mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer (Mercurio, 2019; Nunes et al., 2018).

Plusieurs études ont démontré que la signalisation de NRP1 favorisait la survie des CSC et l'agressivité des tumeurs. En effet, une équipe travaillant sur les gliomes a mis en avant le fait que la viabilité et l'auto-renouvellement des cellules souches, et par conséquent leur tumorigénicité, repose sur la voie de signalisation VEGF/VEGFR2/NRP1 (Hamerlik et al., 2012). Leurs résultats suggèrent qu'inhiber VEGFR2 ou NRP1 dans ces cellules serait une thérapie sûre, contrairement au bevacizumab, un anticorps monoclonal ciblant le VEGF, qui, lui, reste inefficace face aux CSC de gliomes (Hamerlik et al., 2012). L'équipe de Grun, *et al.*, a fait le constat que la voie de signalisation VEGF/NRP1 était impliquée dans la survie des cellules souches cancéreuses de l'épiderme (ECS) contribuant ainsi à l'agressivité de la tumeur. Le VEGF-A est requis pour maintenir le phénotype des ECS et ce processus ne passe pas par les récepteurs classiques du VEGF, mais par NRP1. L'inhibition de l'expression de NRP1 dans les ECS réduit la formation des sphéroïdes, leur invasion et leur migration diminuant par conséquent le développement des tumeurs (Grun et al., 2016). Ceci a aussi été décrit pour les CSC du cancer du sein (L. Zhang et al., 2017). Les CSC du cancer du sein surexpriment VEGF-A et NRP1 et l'équipe de Zhang et al. ont démontré, en utilisant un modèle de CSC KO pour NRP1 ou VEGF-A, que cet axe de signalisation était nécessaire pour assurer les traits spécifiques aux CSC *in vitro* et *in vivo* et que VEGF-A/NRP1 conférait le phénotype souche aux cellules du cancer du sein en activant la voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine (L. Zhang et al., 2017).

Mais il semblerait que NRP1 n'agisse pas seulement avec VEGF sur la survie des CSC. Quelques articles scientifiques mettent en avant que l'interaction entre NRP1 et GIPC1 est aussi impliquée dans ce phénomène. Dans les ECS, NRP1 forme un complexe avec GIPC1 et l'intégrine  $\alpha 6/\beta 4$  pour activer la voie de signalisation FAK/Src qui va permettre la stabilisation de YAP1/ $\Delta$ Np63 $\alpha$  ce qui a pour conséquence d'améliorer la survie des ECS, l'invasion et

l'angiogenèse (Grun et al., 2018). NRP1/GIPC1 est aussi une signalisation clé dans le caractère souche de cellules cancéreuses de l'épiderme lorsqu'elle forme un complexe avec Syx, le facteur d'échange guanine-RhoA impliqué dans l'angiogenèse. Ceci a pour effet d'améliorer la formation des sphéroïdes, l'invasion, la migration et le potentiel angiogénique des cellules *in vitro*. La formation de ce complexe entraîne, par ailleurs, une augmentation de l'activité de la voie MAPK p38, qui dépend de RhoA (Grun et al., 2019). Conjointement, lorsqu'il y a suppression de l'expression de NRP1 ou de GIPC1, cela baisse l'activité de RhoA et celle de MAPK p38 entraînant une perte du phénotype des ECS et une diminution de la croissance tumorale (Grun et al., 2019) (Figure 19).

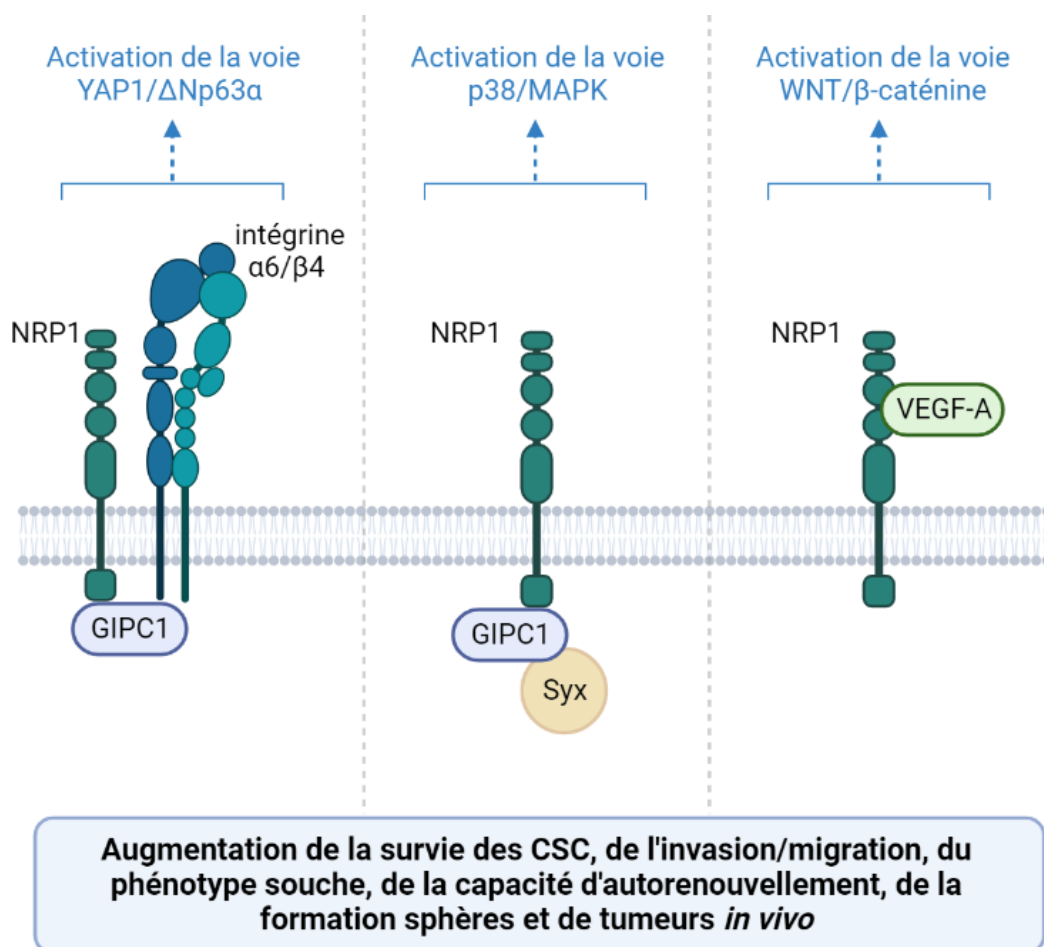


Figure 19 : Implication de NRP1 dans les cellules souches cancéreuses

Cette figure, inspirée de Grun *et al.*, 2018, 2019, a été créée avec BioRender.com.

### 3.4. NRP1 et immunité antitumorale

Un des aspects importants de la progression tumorale est la capacité des cellules cancéreuses à échapper à la surveillance et à la clairance du système immunitaire. Par son expression dans de nombreuses cellules immunitaires et son implication dans la fonction de ces dernières, NRP1 a fait l'objet de plusieurs études concernant son implication dans la dérégulation de l'immunité antitumorale (Tableau 3).

Tableau 3 : Résumé de l'implication de NRP1 dans le système immunitaire (D'après Douyère *et al.*, 2021)

| Expression de NRP1                | Effets  | Voies de signalisation   | Maladie  |
|-----------------------------------|---|--|--|
| <b>Cellules dendritiques (CD)</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Migration</li> <li>• Réorganisation du cytosquelette de F-actine</li> <li>• Reconnaissance des antigènes pathogènes</li> <li>• Formation synapse immunologique avec LT par interaction entre NRP1 sur DC et LT</li> <li>• Transfert de NRP1 des DC aux LT</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• SEMA3A/SEMA3C/PlexinA1</li> <li>• VEGF-A</li> </ul>                                       |  |
| <b>Macrophages/microglie</b>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Promotion des macrophages type M2</li> <li>• Migration macrophages associés à la tumeur</li> <li>• Infiltration au sein de la tumeur</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• SEMA 3A</li> <li>• SEMA 3A</li> <li>• SEMA 3A</li> </ul>                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cancer</li> <li>• Cancer</li> <li>• Cancer</li> </ul> |
| <b>Lymphocytes (LT)</b>           |   |  |  |
| • Thymocytes                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminution des capacités d'adhésion</li> <li>• Migration par effets répulsifs</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• SEMA 3A</li> </ul>  |  |
| • Lymphocytes T CD4+              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Suppression prolifération LT et production de leurs cytokines</li> </ul>   |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Autoimmune disease</li> </ul>                         |
| • Lymphocytes T CD8+              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition de migration dans tumeur,</li> <li>• Inhibition fonction de lyse cellules tumorales</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• SEMA 3A</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cancer</li> </ul>                                     |
| • Lymphocytes Treg (LTreg)        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunosuppression and induction de tolérance</li> <li>• Augmentation du nombre de LT, Augmentation de sécrétion de l'IL10</li> <li>• Prolongation de l'interaction entre LTreg et CD</li> <li>• Stabilité and fonction des LTreg</li> <li>• Infiltration des LTreg dans la tumeur, et échappement immunitaire de la tumeur</li> <li>• Activation des LTreg et augmentation de production TGFβ par LTreg</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• SEMA 4A/PlexinA4, B7-H4/SEMA 3A/Plexin A4</li> <li>• SEMA 4A</li> <li>• VEGF-A</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cancer</li> <li>• Cancer</li> </ul>                   |

Tout d'abord, il a été démontré que dans un contexte tumoral hypoxique, la voie de signalisation SEMA 3A/NRP1 contrôlait la migration des macrophages infiltrant la tumeur (Casazza *et al.*, 2013). En effet, l'équipe de Casazza *et al.* a montré que lorsque l'on supprime uniquement l'expression génique de NRP1 au sein des macrophages, cela favorise leur présence en zones normoxiques dans les tumeurs entraînant une diminution de leurs fonctions pro-angiogéniques et immunosuppressives. Par conséquent, l'inhibition de NRP1 dans les

macrophages s'accompagne d'une baisse de la croissance tumorale et de la présence de métastases (Casazza et al., 2013). Dans cette même optique, l'équipe de Chen *et al.*, en inhibant NRP1 dans le cancer cervical hypoxique, où elle est fortement exprimée, a découvert que cela prévenait le recrutement des macrophages de type M2. Les macrophages de type M2 possèdent des propriétés immunosuppressives favorables au développement des tumeurs, et cibler NRP1 semble approprié pour s'affranchir des effets pro-tumoraux des macrophages infiltrant la tumeur (X.-J. Chen et al., 2019).

D'autre part, on sait aujourd'hui que l'environnement tumoral induit une tolérance des cellules immunitaires et en particulier par l'immunosuppression des lymphocytes T (LT). Par ailleurs, les LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup> infiltrants la tumeur surexpriment NRP1 qui semble être lié à la tolérance des LT CD8<sup>+</sup> (Jackson et al., 2014). Mais les mécanismes et les voies moléculaires impliquées sur ces cellules immunitaires lors d'un traitement anti-NRP1 ne sont pas encore clairement définis. En revanche, l'implication de NRP1 dans la fonctionnalité des LT reg est plus documentée notamment dans le cadre du cancer. L'infiltration des LT reg est une étape critique dans le développement et la progression tumorale et ces cellules sont corrélées à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers (Overacre-Delgoffe et al., 2017). En effet, les LT reg vont supprimer localement toutes les réponses immunitaires antitumorales. L'interaction de NRP1, exprimée par les LT reg, avec VEGF entraîne un recrutement des LT reg au sein des tumeurs. Mieux comprendre le lien entre NRP1 et les LT permettrait donc d'améliorer l'immunothérapie des cancers. A travers un modèle *in vivo* de transplantation de mélanome, Hansen *et al* ont démontré qu'en inhibant NRP1 dans les LT reg on peut bloquer le mécanisme d'échappement au système immunitaire mis en place par la tumeur, avec pour conséquence de réduire fortement la croissance tumorale et prolonge la survie des animaux (Hansen et al., 2012). Hansen *et al.* font aussi le constat, dans leur modèle de souris déficientes en NRP1, que le nombre de cellules Treg baisse énormément et qu'au contraire cela entraîne une augmentation des LT CD8<sup>+</sup> favorables à l'immunité antitumorale (Hansen et al., 2012).

Les mécanismes sous-jacents entre le lien de NRP1 et des lymphocytes Treg restent encore flous. Une des hypothèses est que la voie de signalisation NRP1 favorise une fragilité et une instabilité des LTreg (Delgoffe et al., 2013; Overacre-Delgoffe et al., 2017). La fragilité des lymphocytes Treg est liée à la production d'interférons  $\gamma$  (INF $\gamma$ ) présent lors de l'inhibition de NRP1, et cette inhibition de NRP1 stimule l'immunité antitumorale et facilite l'élimination des tumeurs. Notamment, l'équipe d'Overacre-Delgoffe montre que la fragilité des LTreg induite par la production d'INF $\gamma$  est nécessaire pour une réponse aux thérapies anti-PD1 (Overacre-Delgoffe et al., 2017). Une autre étude a démontré que bloquer NRP1 dans les LT

reg réduisait considérablement leur production de TGF $\beta$  et avait pour conséquence de réduire le nombre de LTreg au sein des gliomes (Powell et al., 2018).

### 3.5. NRP1 et résistance aux traitements

Un des problèmes majeurs des thérapies actuelles contre le cancer est que les tumeurs acquièrent une résistance aux traitements. Pour améliorer l'efficacité des traitements, tels que la radiothérapie et la chimiothérapie, il est nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance des cellules cancéreuses.

#### 3.5.1. Résistance à la radiothérapie

La radiothérapie (RT) est l'une des principales méthodes de traitement chez les patients atteints de cancers. Malheureusement, dans certains cas, les cellules tumorales acquièrent des capacités leur permettant de résister aux radiations. Plusieurs études ont montré la corrélation entre l'expression de NRP1 et la radiorésistance des cellules cancéreuses, en particulier dans le cancer des poumons (Cong et al., 2021; J. C. Dong et al., 2015; Shao et al., 2021; Xiong et al., 2018). Le lien entre NRP1 et la résistance aux radiations des cellules tumorales implique différentes voies de signalisation. Dans un premier temps, c'est la voie de signalisation du VEGF qui a été décrite comme impliquée dans la radiorésistance des cellules tumorales via NRP1. En effet, VEGF-121 et VEGF-165 ont un effet protecteur sur les cellules cancéreuses par rapport au stress qu'elles subissent après radiations (Brieger et al., 2005). Cong *et al.* ont d'ailleurs démontré qu'en inhibant l'interaction entre VEGF et NRP1, les cellules tumorales perdent leur capacité à résister à la RT et la voie de signalisation NRP1-VEGF-PI3K-NF $\kappa$ B est impliquée dans ce phénomène (Cong et al., 2021; J. C. Dong et al., 2015).

Durant les dernières années, l'implication d'autres voies de signalisation liée à NRP1 a été découverte. Par exemple, NRP1 associée à MLL5, un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes HOXs impliqués dans la radiorésistance, augmente la radiorésistance des cellules tumorales pulmonaires via HOXA6 et HOXA9 (Shao et al., 2021). Dans le cancer de l'œsophage, il a été montré que l'augmentation de l'expression de NRP1 affectait la radiosensibilité des cellules tumorales via l'activation de la voie PI3K/AKT (J. Zhang et al., 2022). Autre fait intéressant, NRP1 joue un rôle dans la radiorésistance en influençant le microenvironnement tumoral puisque Dong *et al.* ont montré que NRP1 régule les facteurs de l'inflammation, comme le TNF ou l'IL6, et induit une résistance à la radiothérapie dans des modèles de culture 3D *in vitro* et dans des modèles de xénogreffes chez la souris *in vivo* (Z. Dong et al., 2019).

### 3.5.2. Résistance aux chimiothérapies

Quelques études ont été publiées montrant l'implication de l'expression de NRP1 dans la résistance aux traitements du cancer du pancréas (Wey et al., 2005), des poumons, des reins et de la prostate (Jia et al., 2010). Dans les cellules cancéreuses du pancréas, la surexpression de NRP1 conduit à une augmentation de l'activité de la voie de signalisation MAPK entraînant une augmentation de la survie des cellules et une résistance à l'apoptose après traitement par la gemcitabine et le fluoracile (Wey et al., 2005). De plus, l'utilisation d'un antagoniste de NRP1 a induit une amélioration des effets cytotoxiques d'agents chimio-thérapeutiques, tels que le fluoracile, le paclitaxel ou le cisplatine, sur des cellules de carcinomes humains (Jia et al., 2010). Cibler NRP1 semble être une stratégie thérapeutique à envisager dans la résistance aux traitements puisqu'elle améliore la sensibilité des cancers aux chimiothérapies (Jia et al., 2010; Wey et al., 2005). Mais il semblerait que dans le cancers du sein, la surexpression de NRP1 ait un effet contraire (Naik et al., 2018). En effet, l'étude menée par Naik *et al* rapporte que la surexpression de NRP1 est liée à une réduction de l'expression de la protéine ABCG2, transporteur ABC, et contribue à l'augmentation de la chimiosensibilité des cellules cancéreuses du sein (Naik et al., 2018).

### 3.5.3. Résistance aux thérapies ciblées

D'autres part, on sait aujourd'hui que les cellules cancéreuses sont dépendantes de l'activation d'oncogènes. Une des approches thérapeutiques envisagée est le ciblage de ces oncogènes, mais dans la plupart des cas les cellules acquièrent une résistance aux thérapies ciblées. Par conséquent, Rizzolio *et al* se sont intéressés au lien entre l'expression de NRP1 et la résistance aux traitements ciblant certains oncogènes, comme BRAF, caractéristique des mélanomes, ou HER2 et MET, amplifiés dans les cancers du seins et des poumons (Rizzolio et al., 2018). Leurs résultats montrent qu'il y a une surrégulation de l'expression de NRP1 dans les cellules résistantes aux inhibiteurs de ces oncogènes et que cette résistance est dépendante de l'expression de NRP1. La régulation positive de NRP1 associée à la résistance aux traitements peut être due à différents mécanismes selon les différents types de tumeurs. Dans les cellules cancéreuses du sein, la résistance aux traitements est due à l'implication de la voie de signalisation NRP1, associée à GIPC, qui conduit à une augmentation d'EGFR et d'IGF1R via l'activité de la kinase JNK et du facteur de transcription SOX2/JUN (Rizzolio et al., 2018).

L'utilisation de molécules ciblant NRP1 apparait donc comme une stratégie efficace pour s'affranchir de la résistance aux traitements en combinaison avec les traitements actuels ou les thérapies ciblées.

## 4. NRP1 : une cible thérapeutique à envisager dans le Médulloblastome ?

### 4.1. Ciblage de NRP1 dans le cadre du cancer

NRP1 est impliqué dans différents types de tumeurs et est considéré comme un promoteur de tumeur dans la littérature comme nous l'avons démontré dans la partie précédente de cette introduction générale. Pour son implication dans différents mécanismes contribuant au développement tumoral, comme l'angiogenèse ou la résistance aux traitements anticancéreux, plusieurs études ont été menées pour envisager NRP1 comme cible thérapeutique contre le cancer. Le développement de stratégie d'inhibition de NRP1 est un défi intéressant pour le traitement du cancer et différentes approches ont été explorées et seront détaillées dans les parties suivantes (Figure 20).

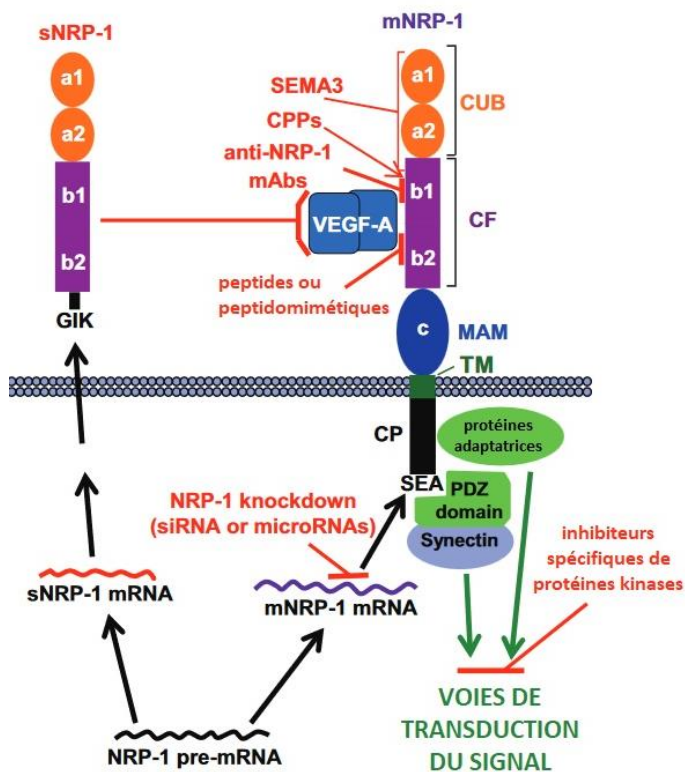


Figure 20 : Différentes stratégies pour cibler NRP1

Les stratégies possibles pour cibler la fonction NRP1 sont indiquées en rouge : i) blocage de la liaison du facteur de croissance à la membrane NRP1 par NRP1 soluble (sNRP1) ; ii) blocage de la liaison du VEGF-A à NRP1 avec des anticorps monoclonaux (mAbs), des peptides ou des peptidomimétiques; (iii) knockdown de l'expression de NRP1 avec de petits ARN interférents (siARN) ou des microARN ; (iv) administration d'agents thérapeutiques à des cellules exprimant NRP1 à l'aide de peptides pénétrant dans les cellules (CPPs), qui interagissent avec le domaine CF ; (v) inhibition des voies de transduction du signal déclenchées par l'activation de NRP1. (D'après Graziana *et al.*, 2015).

#### 4.1.1. Les formes solubles de NRP1

Les formes solubles de NRP1 (sNRP1) sont générées naturellement par un épissage alternatif. Elles contiennent une partie des domaines extracellulaires de liaison aux ligands et peuvent fonctionner comme des pièges à ligands en empêchant l'interaction de ces ligands à leurs récepteurs exposés à la surface des cellules. Les sNRP1 sont exprimées de manière différente de la forme NRP1 membranaire et sont des antagonistes du VEGFA-165 et SEMA 3A (Cackowski et al., 2004). Cackowski *et al.* ont montré que les sNRP1 empêchent le VEGFA-165 de se lier aux récepteurs du VEGF et agissent comme des antagonistes de NRP1. De plus, la séquestration du VEGF par les sNRP1 va avoir pour effet d'inhiber la migration des cellules cancéreuses du sein (Cackowski et al., 2004). De même, dans un modèle de leucémie systémique, l'administration de sNRP1 retarde la progression tumorale, l'invasion et augmente la survie *in vivo* (Schuch et al., 2002).

#### 4.1.2. Les microARNs ciblant NRP1

Les microARNs (miRs) sont des régulateurs post-transcriptionnels capables de cibler un ARN messenger (ARNm) ce qui va conduire à l'inhibition de sa traduction ou à sa dégradation, selon le degré de complémentarité entre la séquence du miR et celle de son ARNm cible. Les transcrits de NRP1 sont ciblés par plusieurs miRs : miR-9, miR-181b, miR-320 et miR-338 (Cui et al., 2012; C. Liu et al., 2015; Y.-Y. Wu et al., 2014). Par exemple, miR-9 et miR-181b ont été décrits comme ciblant NRP1 et altérant son effet sur l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* (Cui et al., 2012). De même, le miR-320 influence l'angiogenèse tumorale via l'inhibition de NRP1 sur les cellules endothéliales (Y.-Y. Wu et al., 2014). L'inhibition de NRP1 par les miRs semble aussi affecter son influence sur la croissance et l'invasion tumorale comme il a été démontré avec le miR-338 (C. Liu et al., 2015). Malheureusement, l'application des miRs en clinique est difficile et nécessite l'utilisation de véhicules, tels que des microvésicules ou des liposomes, afin d'assurer la stabilité, d'augmenter la libération tissulaire et de prévenir la réponse immunitaire (Hydbring & Badalian-Very, 2013).

#### 4.1.3. Les anticorps monoclonaux anti-NRP1

Les anticorps monoclonaux (mAb) anti-NRP1 sont très utilisés dans les études précliniques sur le cancer afin de déterminer et de mieux comprendre l'implication du co-récepteur dans les différents processus tumoraux. Par exemple, l'utilisation d'anticorps monoclonal ciblant NRP1 a montré une implication de NRP1 dans la prolifération, la migration et de l'invasion des cellules tumorales *in vitro* dans le cancer du sein et le cancer gastrique

(Ding et al., 2018; Zeng et al., 2014) et une réduction de la croissance tumorale *in vivo* via une baisse de l'expression du VEGF (Ding et al., 2018). Ces études montrent que l'inhibition de NRP1 avec un mAb anti-NRP1 peut avoir des effets thérapeutiques dans le traitement du cancer. Plusieurs études ont d'ailleurs montré un effet potentialisateur des effets thérapeutiques anti-VEGF via l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant NRP1. Pan *et al.* ont généré deux anticorps monoclonaux anti-NRP1 ciblant respectivement les domaines a1a2, pour la liaison aux SEMA, et le domaine b1b2, pour la liaison au VEGF. Ils ont montré que l'ensemble des deux anticorps réduisait l'angiogenèse et le remodelage vasculaire, tout en ayant un moindre effet que le bevacizumab sur la croissance tumorale. Au contraire l'association bevacizumab et anticorps anti-NRP1 améliore l'effet de la thérapie anti-VEGF pour réduire la croissance tumorale en rendant les vaisseaux plus sensibles au traitement anti-VEGF (Pan, Chantry, et al., 2007). Un essai clinique utilisant un mAb anti-NRP1, le MNRP1685A, associé à la thérapie anti-angiogénique a été mené sur une cohorte de patients atteints de cancers. L'essai clinique a montré que le MNRP1685A était bien toléré seul avec une prémédication pour gérer les effets indésirables du traitement (Weekes et al., 2014) mais que l'association avec le bevacizumab entraînait un taux de protéinurie trop élevé chez les patients justifiant l'arrêt des tests de MNRP1685A avec la thérapie anti-VEGF (Patnaik et al., 2014). Un autre problème majeur lié à l'utilisation d'un anticorps dirigé contre NRP1 est qu'il est exprimé dans divers tissus sains, ce qui entraîne une élimination très rapide de l'anticorps NRP1 empêchant son absorption dans les tumeurs (Bumbaca et al., 2012).

#### 4.1.4. Les peptides et les peptidomimétiques ciblant NRP1

Les oligopeptides et les peptidomimétiques ont également été proposés pour cibler NRP1. Les premiers étant des peptides constitués principalement d'acides aminés qui sont présents naturellement dans l'organisme et les seconds étant des peptides synthétisés chimiquement pour substituer les peptides actifs. Il existe des peptides naturels se liant à NRP1. Un des premiers identifiés a été la tuftsine, Thr-Lys-Pro-Arg (TKPR), décrite en 1970 par l'équipe de Najjar et Nishioka (Najjar & Nishioka, 1970). La tuftsine peut se lier à la NRP1 ce qui bloque la liaison au VEGF et a des effets immunostimulateurs ainsi qu'un rôle dans le SNC (Nissen et al., 2013; von Wronski et al., 2006). Starzec *et al.* ont identifié un peptide capable d'empêcher l'interaction du VEGF-165 avec NRP1 : le peptide ATWLPPR. Dans cette étude, ils montrent un effet antitumoral du peptide via l'inhibition de la voie VEGF-165/NRP1 (Starzec et al., 2006). Cependant les peptides pourraient souffrir d'une faible biodisponibilité et d'une

instabilité au sein de l'organisme (Pernot et al., 2011), et la conception de nouveaux composés organiques tels que les dérivés peptidomimétiques semble être une alternative intéressante.

Les séquences développées pour les composés peptidomimétiques ont été structurées pour s'adapter à la règle « C-end » de liaison à NRP1 (CendR) basée sur l'observation que les NRPs interagissent avec une haute affinité avec une large gamme de molécules contenant une chaîne basique d'acides aminés à leur extrémité C-term, y compris les SEMA 3 et le VEGF (Teesalu et al., 2009). Plusieurs molécules ont été validées pour le couplage avec le site de liaison au VEGF des NRPs empêchant leur interaction ligand-récepteur. Par exemple, Jarvis *et al.* ont publié en 2010 une étude sur une molécule, appelée EG00229, qui est un ligand de NRP1. De la même manière que le VEGF-A, EG00229 se lie au niveau du domaine b1 de NRP1. L'EG00229 a montré une inhibition de la liaison du VEGF-A à NRP1 et a pour effet de réduire la viabilité des cellules cancéreuses tout en augmentant l'efficacité des agents cytotoxiques tels que le paclitaxel et le 5-fluorouracile dans le cancer du poumon (Jarvis et al., 2010). L'EG3287, un autre peptidomimétique antagoniste du domaine b1 de NRP1, a aussi fait ses preuves dans différents types de cancers en montrant un effet sur l'invasion cellulaire et l'amélioration de thérapies préexistantes (Jia et al., 2010). Durant les dernières années, plusieurs études ont aussi montré l'efficacité d'un peptide appelé iRGD, se composant d'un motif RGD, qui se lie aux intégrines, et du motif CendR, qui se lie à NRP1 pour inhiber efficacement les métastases. En combinaison avec des agents de contraste, des chimiothérapies, des nanoparticules ou des protéines, le peptide iRGD peut être efficacement délivré au site tumoral, réduire les effets secondaires des médicaments, et améliorer l'efficacité thérapeutique des traitements actuels (Yin et al., 2017).

Tous ces éléments ont mené notre équipe à la synthèse d'un peptidomimétique à base de sucres ciblant spécifiquement la NRP1, le MR438 (développé en collaboration avec le Dr Nadia Pellegrini-Moïse du L2CM) (Figure 21). Ce composé a été synthétisé pour cibler spécifiquement le site de liaison au VEGF, b1, de la NRP1. Dans leur étude Richard *et al.* montrent que le MR438 a inhibé la liaison du VEGFA-165 et NRP1 avec une IC<sub>50</sub> de 88 µM, affinité supérieure aux autres composés testés dans l'étude. Le MR438 remplit toutes les caractéristiques nécessaires pour cibler des cellules surexprimant NRP1 comme des cellules cancéreuses par exemple (Richard et al., 2016).

Le ciblage de NRP1 apparaît être une approche prometteuse pour concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques combinées dans le cadre du cancer. De plus, une meilleure compréhension des mécanismes dépendants de NRP1 contrôlant la progression des tumeurs et

la réactivité aux thérapies mérite des recherches plus approfondies afin d'identifier des cibles thérapeutiques futures.

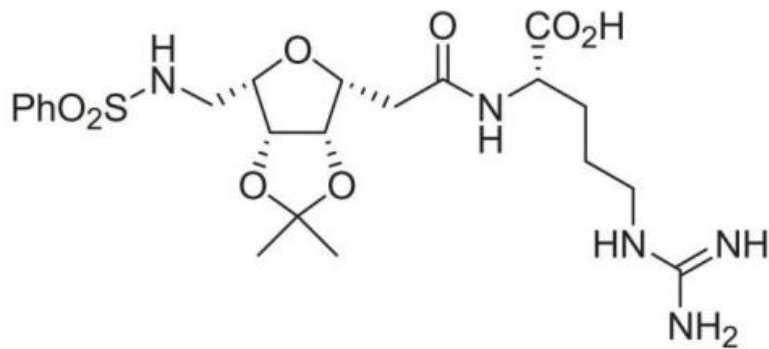


Figure 21 : Structure du MR438

Le MR438 est un peptidomimétique ciblant spécifiquement NRP1. Formule chimique : C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S; Masse moléculaire : 527.59 g/mol ; Affinité de liaison à NRP1 : 88 mmol/L. (D'après Richard *et al.*, 2016)

#### 4.2. Rôle de NRP1 dans le médulloblastome

Le médulloblastome (MB) étant un cancer pédiatrique rare, (environ 150 nouveaux cas par an en France), peu d'études se sont intéressées à l'implication de NRP1 dans le MB. Pourtant NRP1, comme démontré dans les parties précédentes de cette introduction, semble être une cible thérapeutique innovante dans le cadre du cancer. De plus, l'expression de NRP1 est augmentée dans les différents cancers cérébraux pédiatriques (Douyère *et al.*, 2021). Il a aussi été montré que sa surexpression dans le MB est corrélée à un mauvais pronostic, les patients dont le MB a une forte expression de NRP1 ont un pourcentage de survie drastiquement plus faible (diminué de 50%) (Snuderl *et al.*, 2013; Yogi *et al.*, 2015) (Figure 22).

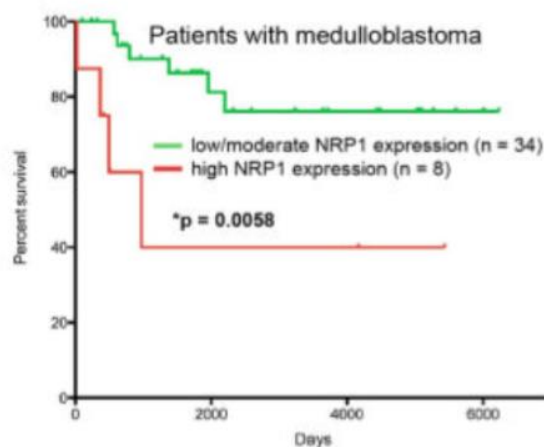


Figure 22 : Pourcentage de survie de patients atteints de médulloblastome corrélée à l'expression de NRP1 (D'après Snuderl *et al.*, 2013)

Les travaux menés par Snuderl *et al.* ont démontré en 2013 que NRP1 contribuait à la croissance du MB en agissant avec PIGF. La signalisation PIGF/NRP1 dans le MB entraîne l'activation des voies de signalisation liées à la survie cellulaire comme la voie ERK, Pi3K/AKT et MAPK. Ce PIGF est produit par les cellules du stroma cérébral en réponse au ligand SHH sécrété par les cellules tumorales elles-mêmes. Snuderl *et al.* ont testé l'efficacité d'un traitement inhibant PIGF dans un modèle de xénogreffes de médulloblastome. L'inhibition du PIGF a empêché la croissance tumorale et augmenté la survie des animaux (Snuderl *et al.*, 2013). Une autre étude a montré l'importance de NRP1 dans le sous-groupe SHH de MB. En effet, NRP1 est nécessaire pour la voie SHH et favorise la tumorigénicité des cellules de MB *in vitro* via une augmentation de la migration cellulaire (Hayden Gephart *et al.*, 2013). Autre fait intéressant, le miR-148a semble lié à un pronostic favorable dans le MB, étant surexprimé que dans le sous-groupe WNT au meilleur pronostic vital, et il a été démontré qu'une de ces cibles était NRP1 (Yogi *et al.*, 2015). La surexpression exogène du miR-148a dans les sous-groupes SHH, 3 et 4 de MB entraîne une réduction de la croissance tumorale, du potentiel clonogénique ainsi qu'une diminution du potentiel invasif des lignées de MB. En surexprimant NRP1 dans des lignées de MB, Yogi *et al.* observent une réversion des phénomènes réduits par miR-148a impliquant NRP1 dans la progression du MB (Yogi *et al.*, 2015).

De nombreuses études ont montré que les CSC jouent un rôle très important dans la progression tumorale et la résistance aux traitements et devant les nouvelles données concernant NRP1 et le MB, notre équipe de recherche a observé les effets de l'inhibition de NRP1 par un peptidomimétique, le MR438, sur les CSC de MB (Gong *et al.*, 2018; Richard *et al.*, 2016). Nous avons trouvé que NRP1 est surexprimé au sein des CSC de MB pour les différents sous-groupes de MB. De plus, MR438, en inhibant NRP1, stimule la différenciation des CSC de MB via l'inactivation des voies PI3K/AKT/MAPK pour les cellules de sous-groupe SHH (Gong *et al.*, 2018). Cibler NRP1 dans les CSC semble alors pertinent d'autant plus que nos résultats ont été confirmés dans l'étude de Paul *et al.* où la surexpression de NRP1 est présente dans une sous-population de cellules de MB CD114+, nouvellement reconnu comme marqueurs de cellules souches, désignant le récepteur du facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF : Granulocyte colony stimulated factor) (Paul *et al.*, 2020). Dans cette étude les cellules CD114+, surexprimant NRP1, contribuent à la croissance tumorale et sont capables de résister aux traitements de chimiothérapie standards (Paul *et al.*, 2020).

De plus, grâce à une étude de bases de données de patients pédiatriques, nous avons montré qu'il existait une corrélation entre l'expression de NRP1 et l'expression du CD15, marqueur de CSC de MB (Douyère et al., 2021) (Figure 23).

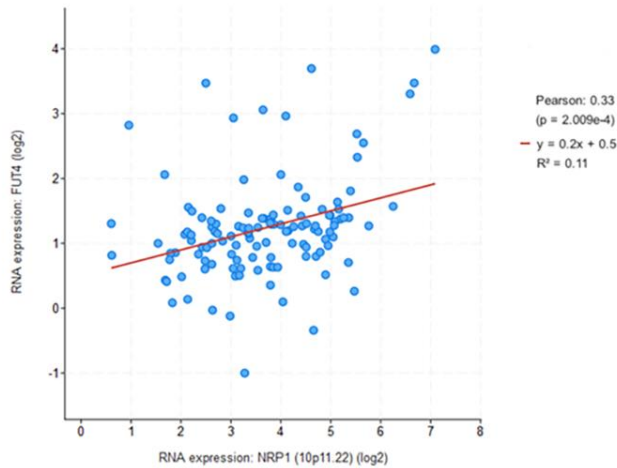


Figure 23 : Corrélation entre l'expression NRP1 et du CD15 (FUT4) au sein du médulloblastome

La caractérisation génomique a été obtenue avec cBioPortal fourni par la base de données du Children's Brain Tumor Tissue Consortium ; Médulloblastome : 130 échantillons. (D'après Douyère *et al.*, 2021)

Pour donner suite aux résultats intéressants concernant NRP1 et les CSC de MB, les travaux de thèse de C. Gong ont porté sur l'inhibition de NRP1 dans le MB en association avec la RT (Thèse de C. Gong). Ces travaux ont montré que l'inhibition de NRP1 associée à la RT dans les CSC de MB induit une radio-sensibilisation des CSC de MB *in vitro*. De façon intéressante, dans des modèles de xénogreffes hétérotopiques de MB, le traitement MR438 associé à la RT engendre une diminution du nombre de CSC par rapport à la RT seule pour l'ensemble des sous-groupes de MB. De plus, les travaux *in vivo* ont montré que l'inhibition de NRP1 associée à la RT avait des effets significatifs sur la croissance tumorale et la survie des animaux pour le sous-groupe SHH (Thèse C. Gong) (Figure 24).

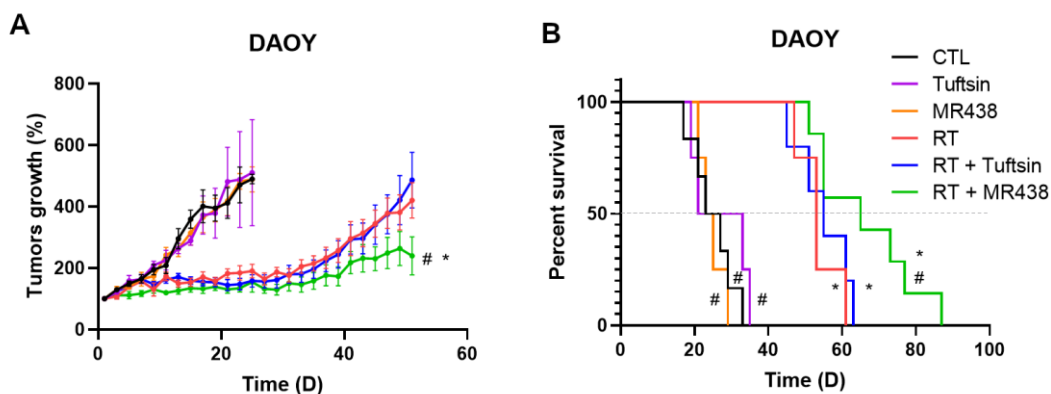


Figure 24 : Effets du MR438 associé à la radiothérapie dans un modèle de xénogreffes orthotopiques de MB (A) Courbe de croissance tumorale en fonction des différents traitements ; (B) courbe de survie des souris en fonction des différents traitements. (D'après thèse de C. Gong, 2018)

### III. Objectifs de la thèse

Le médulloblastome (MB) est la tumeur cérébrale maligne pédiatrique la plus fréquente. Actuellement, le pronostic du MB reste sombre, en particulier pour les sous-groupes 3 et 4 et SHH TP53 muté, en raison d'un taux de récurrences important et d'une faible efficacité des protocoles thérapeutiques qui s'accompagnent constamment d'importantes séquelles. Il est donc urgent de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'améliorer les traitements actuels tout en prenant en compte l'importance de l'hétérogénéité cellulaire et moléculaire qui existe au sein du MB, ainsi que l'importance du microenvironnement tumoral.

L'équipe de Snuderl a mis en avant la corrélation entre l'expression de la neuropiline-1 (NRP1) et le mauvais pronostic des patients atteints de MB. Durant les dernières décennies, l'implication de NRP1 dans les processus de tumorigenèse a été décrite dans plusieurs cancers, notamment par son rôle dans les cellules souches cancéreuses (CSC) et son lien avec les différents acteurs du microenvironnement tumoral.

C'est pourquoi notre laboratoire s'est intéressé tout particulièrement à NRP1 comme cible thérapeutique potentielle dans le MB. Les travaux précédents ont permis l'évaluation d'un peptidomimétique ciblant NRP1, le MR438 (L2CM UMR 7053, Dr Nadia Pellegrini-Moise). Le MR438 a montré des effets sur la différenciation des CSC de MB ainsi qu'un potentiel radiosensibilisant *in vitro*. Les travaux de thèse *in vivo* de C. Gong ont souligné le potentiel thérapeutique bénéfique de l'inhibition de NRP1 via le MR438 en association avec la radiothérapie (RT) dans un modèle de xénogreffes hétérotopiques de MB dans le sous-groupe SHH. Par conséquent, nous nous sommes demandé quelle serait l'implication de l'inhibition de NRP1 en prenant en compte l'environnement tumoral du MB. Nous présenterons les résultats obtenus pendant ce travail de thèse en trois parties, puis nous les discuterons.

La première partie présente les résultats des études concernant la **mise en place d'un modèle cellulaire exprimant la luciférase et d'un suivi de croissance tumorale par imagerie de bioluminescence *in vivo*, dans un modèle de xénogreffes orthotopiques de MB.**

Dans la seconde partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à **l'intérêt thérapeutique du MR438, en association avec la radiothérapie, dans un modèle de xénogreffes orthotopiques de MB.** Pour cela nous avons évalué la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence et effectué un suivi de la survie des animaux. Puis nous avons tenté de comprendre les effets de la combinaison des traitements en nous intéressant à la

prolifération cellulaire, la vascularisation et la présence de marqueurs de CSC par des analyses immunohistochimiques.

Dans la troisième partie du travail de thèse, nous avons cherché à **évaluer l'impact de l'inhibition de NRP1 sur le microenvironnement tumoral** en particulier les cellules résidentes dans le système nerveux central, comme la microglie, en travaillant sur des modèles 2D et 3D de coculture *in vitro*.

# Résultats

# I. Mise en place d'un modèle cellulaire bioluminescent et d'un suivi de croissance tumorale par imagerie de bioluminescence *in vivo*

## 1. Contexte

Le médulloblastome (MB) n'est plus considéré comme une entité tumorale unique mais plutôt comme plusieurs tumeurs distinctes en fonction des sous-groupes, chacune d'entre elles nécessitant des approches thérapeutiques plus ciblées. C'est en 2013 que les travaux menés par Snuderl *et al.* ont mis en lumière l'implication de la neuropiline-1 (NRP1) dans la progression du MB (Snuderl *et al.*, 2013). NRP1 est un co-récepteur qui joue un rôle très important dans le développement neuronal et vasculaire. Il a été décrit dans de nombreuses publications comme étant un acteur de la carcinogenèse notamment via ces liaisons avec ses ligands comme le VEGF ou les SEMA 3 (H.-F. Guo & Vander Kooi, 2015; Kolodkin *et al.*, 1997). Cibler ce récepteur apparaît donc comme une approche thérapeutique intéressante pour freiner la progression du MB.

Nos précédents travaux sur un peptidomimétique ciblant spécifiquement NRP1, le MR438, ont permis de mettre en évidence le lien entre NRP1 et le statut indifférencié des cellules de MB (Gong *et al.*, 2018). Plus récemment, à travers les travaux de thèse de C. Gong, nous avons pu démontrer que l'inhibition de NRP1 sur des cellules souches de MB améliorait l'efficacité de la radiothérapie (RT) en réduisant le nombre de cellules souches *in vitro* lorsque les deux traitements étaient combinés. L'effet radio-potentialisant du MR438 a aussi été démontré dans un modèle de xénogreffes hétérotopiques de MB SHH améliorant la survie des animaux tout en réduisant la progression de la tumeur (Thèse C. Gong 2018).

Comparés aux modèles cellulaires, les modèles animaux sont plus représentatifs de la physiopathologie du MB. Le modèle hétérotopique présente de nombreux avantages mais il ne prend pas en compte le microenvironnement de la tumeur. L'importance du microenvironnement tumoral est aujourd'hui clairement reconnue dans la littérature. De nombreuses études ont été réalisées afin de comprendre par quels mécanismes les acteurs du microenvironnement contribuent à la croissance tumorale. Le modèle de xénogreffes orthotopiques peut prendre en compte cet environnement tumoral et présente une nature biologique plus proche de la clinique du MB (Kawauchi *et al.*, 2017; Pei *et al.*, 2012). Au cours de la dernière décennie, une modalité d'imagerie a été développée comme outil d'étude des processus biologiques *in vivo* : la bioluminescence (BLI). La BLI est la capacité de certains

organismes, comme la luciole, à produire de la lumière. Cette lumière est produite par un mécanisme oxydatif enzymatique en deux étapes : (i) deux molécules sont combinées en présence d'oxygène pour former une molécule riche en énergie, (ii) la molécule riche en énergie émet un photon de lumière pour revenir à son état stable. Cette forme d'imagerie optique offre de nombreux avantages, c'est un outil peu coûteux et non-invasif qui facilite l'analyse en temps réel de la progression de la tumeur dans des modèles *in vivo* (Alsawaftah et al., 2021).

Il apparaît donc intéressant d'étudier l'inhibition de NRP1 en association avec la RT dans un modèle *in vivo* de MB tenant compte de son microenvironnement. Pour cela nous avons mis en place un modèle de xénogreffes orthotopiques de MB avec un suivi de croissance tumorale par imagerie de bioluminescence. **Dans ce chapitre, nous présenterons dans un premier temps les résultats concernant la caractérisation d'un modèle cellulaire bioluminescent de MB puis dans un second temps la mise en place d'une procédure d'imagerie de bioluminescence *in vivo*.**

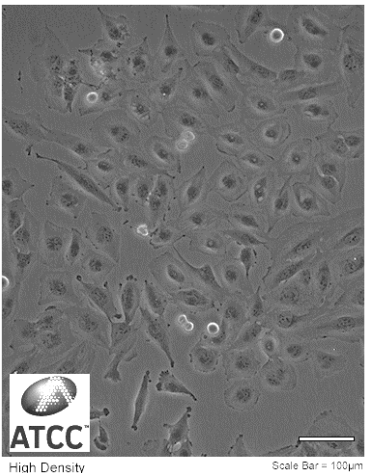
## 2. Matériels et Méthodes

### 2.1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire humaine de MB, DAOY (Jacobsen et al., 1985), provient de l'ATCC (Manassas VA, USA). Les cellules sont maintenues dans du milieu MEM (Gibco, Life Technologies Corporation, UK), contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF, SIGMA, USA), 1% de L-glutamine (SIGMA, UK), 1% d'acides aminés non-essentiels (Gibco, UK), 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco, UK) et 1% de sodium de pyruvate (Gibco, UK) à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

Tableau 4 : Caractéristiques de la lignée de médulloblastome, DAOY, provenant de l'ATCC

| <b>DAOY</b>                          |                                       |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Origine</b>                       | Médulloblastome d'un garçon de 4 ans. |
| <b>Tissu</b>                         | Cervelet                              |
| <b>Sous-groupe moléculaire de MB</b> | SHH                                   |
| <b>Propriétés de croissance</b>      | Cellules adhérentes                   |
| <b>Morphologie</b>                   | Polygonale                            |



### 2.2. Infection des cellules de médulloblastome par un lentivirus contenant le gène de la luciférase

Afin de réaliser un suivi *in vitro* et *in vivo* des cellules par microscopie de bioluminescence, la lignée cellulaire DAOY a été transduite pour permettre l'expression de la protéine luciférase. Des lentivirus possédant un vecteur contenant le gène codant la luciférase (Lentivirus-LV-CMV-Firefly luciferase (CMV, puromycin)) sont utilisés pour l'infection. Les cellules ont par la suite été sélectionnées en ajoutant un antibiotique, la puromycine (concentrée à 2 µg/mL), pour n'obtenir que les cellules exprimant le gène transfecté. La lignée obtenue à la suite de l'infection lentivirale sera nommée DAOY-LUC.

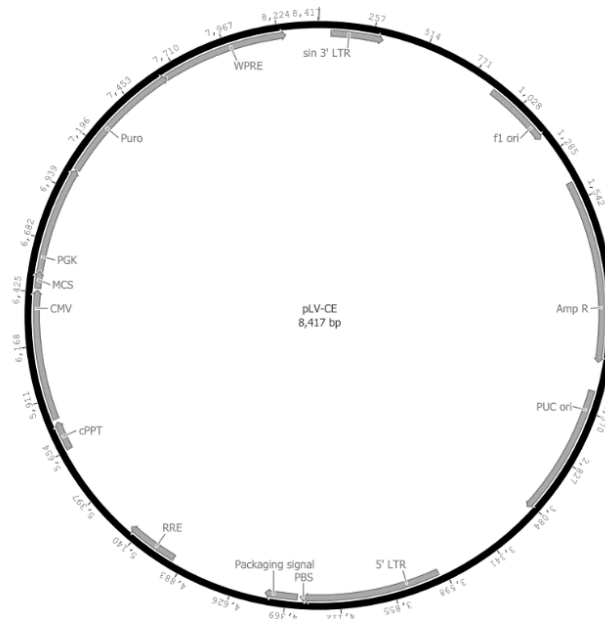


Figure 25 : Cartographie génétique du lentivirus Lentivirus-LV-CMV-Firefly luciferase.

Ce lentivirus de 8417pb possède la séquence codant l'enzyme luciférase et une cassette de résistance à la puromycine qui permet la sélection des cellules ayant intégré le lentivirus.

### 2.3. Visualisation de la bioluminescence *in vitro*

Les cellules sontensemencées à différentes concentrations cellulaires (de 10 000 cellules/mL à 500 000 cellules/mL) et mises en contact avec le substrat de la luciférase, la luciférine (D-Luciferin Firefly, PerkinElmer® #122799) à une concentration de 150 µg/ml. La bioluminescence a ensuite été imagée via l'Optimax® puis mesurée après traitement des images sur Image J®.

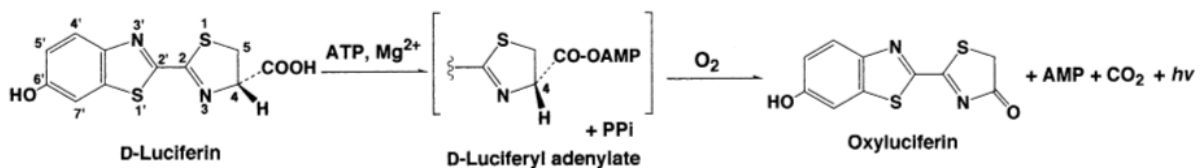


Figure 26 : Réaction de bioluminescence par la luciférase en présence de son substrat, la luciférine

La luciférase catalyse la réaction de bioluminescence en oxydant la luciférine en oxy luciférine en présence d'oxygène, d'ATP et de Mg<sup>2+</sup>. Ceci provoque alors l'émission d'un photon. Lors de cette réaction, l'ATP est hydrolysée en AMP. (D'après Oba *et al.* 2003)

### 2.4. Culture des médullosphères

Les lignées cellulaires sont cultivées dans du DMEM/F12 (GibcoUK) supplémenté en B27 et N2 (Gibco, Life Technologies Corporation, USA), 20 ng/mL du facteur de croissance épidermique recombinant humain (EGF) et facteur de croissance des fibroblastes (bFGF) (EGF

and FGF de Miltenyi Biotec, Germany) pendant une semaine en présence de méthylcellulose (1 :100, SIGMA, USA) pour favoriser la formation de médullosphères. Les médullosphères sont par la suite comptées à l'aide du système Gelcount™ (Oxford Optronix, UK).

### 2.5. Etude de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée par deux méthodes distinctes : par comptage cellulaire et via l'analyse de l'activité métabolique des cellules par un test MTT. Le comptage cellulaire est réalisé après une coloration au bleu de Trypan (Sigma) marquant les cellules non-viables et un comptage des cellules non-colorées, viables, via une cellule de Malassez. Le test MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide, Acros Organics™) est réalisé à partir d'une solution MTT à 2,5mg/ml déposée sur les cellules et incubée pendant 3h. Après l'incubation, du DMSO est ajouté sur le tapis cellulaire puis l'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à 540nm.

### 2.6. Migration cellulaire 2D

Une blessure est réalisée sur le tapis cellulaire à confluence, au centre du puit, à l'aide d'un cône de pipette p200. La blessure est alors photographiée sous microscope inversé à contraste de phase Leica DM IL LED, équipé d'une caméra Leica DFC450, au grossissement x10, au niveau du centre de la blessure puis à nouveau 16h après. Les photos prises ont permis de mesurer le comblement de la blessure via Image J®, permettant d'évaluer la vitesse de migration des cellules.

### 2.7. Analyse de l'expression des protéines par Western blot

Le Western blot a été réalisé pour l'analyse de l'expression protéique de NRPI. Le tampon de lyse cellulaire de la protéine totale contenant 10 % de protéases (Roche, Allemagne), 1% Cocktail 2 et 3 (Sigma-Aldrich, Allemagne) était utilisé pour la lyse des cellules. Un dosage Bradford a été réalisé pour déterminer la concentration de protéines via une lecture d'absorbance à 595nm avec un spectrophotomètre. Les aliquots de protéines (50 µg) étaient dénaturés dans le tampon Laemmli contenant du β-mercaptoéthanol avant la migration par SDS électrophorèse sur gel Stain Free (Biorad, Etats-Unis) pendant 30 à 40 min à 200V. Les protéines séparées ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose (Biorad, Etats-Unis) via le Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Biorad, Etats-Unis).

Après avoir bloqué la membrane avec du tampon Tris avec 0,1 % de Tween-20 et 5 % de sérum bovin albumine dans un délai d'une heure, l'anticorps primaire anti-NRPI (#3725, CellSignalisation, dilution 1 :1000) a été incubé pendant une heure à température ambiante,

puis l'anticorps secondaire anti-lapin HRP (Horseradish Peroxidase) (#A21429, Invitrogen, dilution 1 :10000) pendant 30 min à température ambiante. Le kit de révélation ECL Prim (Amersham™) a été utilisé pour la révélation des bandes à l'aide du densitomètre (ChemiDoc™, Biorad, Etats-Unis).

La quantification de la densité des bandes obtenues est réalisée par rapport à la quantité de protéine totale obtenue et quantifiable grâce aux gels Stain Free sur le logiciel ImageLab.

## 2.8. Xénogreffes orthotopiques de médulloblastome

Le modèle de xénogreffe orthotopique de médulloblastome chez les souris nude, femelles âgées de cinq semaines (NMRI-nu, Janvier Labs, France), a été utilisé avec l'agrément du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (agrément n°APAFiS #20085). Les souris sont anesthésiées avec une injection de 5µL/g de poids du corps d'une solution de Xylazine/Kétamine (90 mg/kg Rompun 2%, BayerBayer, et 8 mg/kg Imalgene 1000 Boehringer Ingelheim, respectivement) en intra-péritonéale (IP) puis elles sont anesthésiées localement avec une injection de 50µL de Lidocaïne (Lurocaïne, Vetoquinol), en sous-cutanée, au niveau du crâne. Un anti-inflammatoire stéroïdien, la dexaméthasone (Dexadreson, MSD Santé Animale), est aussi injectée en intramusculaire (25µL) chez les souris.

L'instrument de stéréotaxie (KOPF®) a été utilisé pour fixer les souris lors de la procédure. Après avoir réalisé une incision verticale sur la tête de la souris, le site de la transplantation orthotopique est défini par les coordonnées au niveau de l'hémisphère droit du cervelet en se positionnant à 2 mm à droite et en bas de la suture lambda. Les cellules sont préparées dans leur milieu d'origine (à  $1.10^5$  cellules/µL, soit  $5.10^5$  cellules au total) pour l'injection via une seringue Hamilton à 2 mm de profondeur du cortex cérébelleux. Toutes les souris sont suivies pendant plusieurs semaines post-injection jusqu'à l'apparition de signes neurologiques (point limite expérimental).

La méthode de sacrifice utilisée est une surdose de pentobarbital (Exagon®, Axience). Le prélèvement du cerveau complet de chacune des souris a été réalisé (les hémisphères cérébraux et le cervelet) à 50 jours post-greffes pour cette étude préliminaire. Les cerveaux sont par la suite fixés dans une solution de formaldéhyde à 4% (Diapath, Italie) pendant une semaine, puis ils sont conservés dans de l'éthanol à 70°.

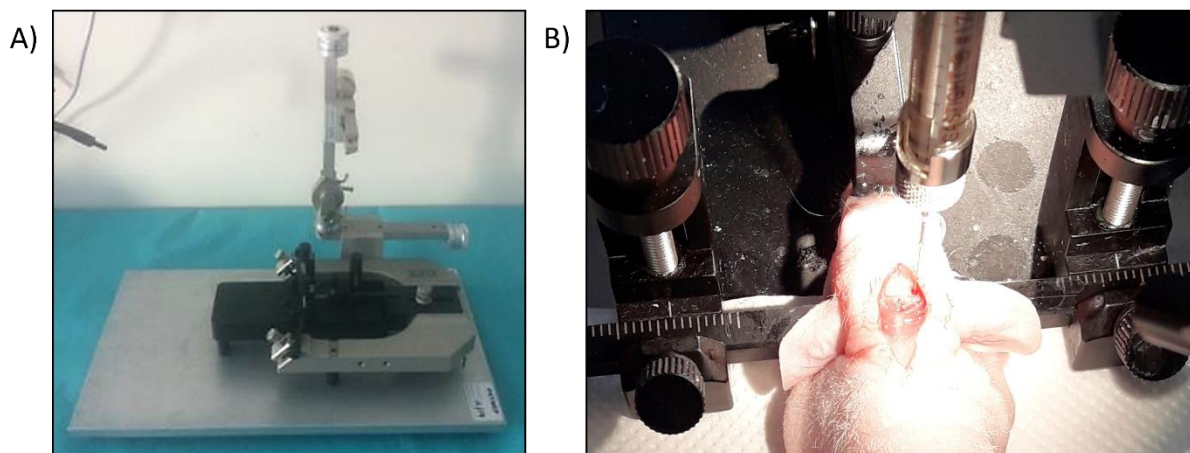


Figure 27 : Transplantation en orthotopique avec un instrument de stéréotaxie  
 (A) Instrument stéréotaxique pour fixer la souris lors de la procédure de transplantation orthotopique. (B) Injection par seringue HAMILTON des cellules tumorales dans l'hémisphère droit du cervelet.

### 2.9. Suivi de la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence

Afin d'évaluer la croissance tumorale, un suivi par imagerie de bioluminescence est effectué chaque semaine post-injection à l'aide du système OptiMAX®. L'imagerie de bioluminescence se fait après administration en I.P. d'une solution de D-Luciférine (D-Luciferin Firefly, PerkinElmer® #122799) diluée dans une solution de PBS stérile (à 15 mg/ml et 10 $\mu$ L/g de poids du corps). Les animaux sont par la suite anesthésiés par un mélange de xylazine/kétamine (90 et 8 mg/kg, respectivement) en I.P. Puis, les animaux sont imagés, en les positionnant sur le dos, après l'injection de la luciférine. L'intensité de la bioluminescence est déterminée ensuite sur Image J® en mesurant le paramètre Integrated Density.

### 2.10. Statistiques

Tous les résultats ont été donnés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM). Le test non paramétrique de Mann-Whitney et le T-test de Student pour les comparaisons deux par deux ont été utilisés pour déterminer la signification statistique à l'aide de GraphPad Prism® (GraphPad Prism 8.0, USA). Le nombre d'expériences indépendantes réalisées a été indiqué par « n » dans la légende de chaque figure. Tous les  $p < 0,05$  (marqué par \*) ont été considérés comme significatif et  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  sont marqués par \*\* et \*\*\*, respectivement.

### 3. Résultats

#### 3.1. Mise en place d'un modèle cellulaire de médulloblastome exprimant la luciférase

Pour pouvoir étudier la progression tumorale dans un modèle orthotopique *in vivo*, nous avons besoin de suivre la croissance des cellules tumorales dans leur environnement, au sein même du cervelet de la souris. Le suivi dynamique des cellules tumorales invasives *in vitro* ou *in vivo* est difficilement réalisable en microscopie optique mais l'avancée majeure des dernières décennies concernant l'imagerie par bioluminescence peut y remédier. La mise en contact de la luciférase, exprimée par les cellules tumorales, avec son substrat la luciférine, entraîne une réaction chimique émettant de la lumière qui permet de réaliser des suivis de la progression de la tumeur en temps réel par imagerie de bioluminescence *in vivo* de manière non-invasive pour l'animal. De plus, cette méthode s'affranchit de l'utilisation de radiotraceurs (TEP) ou d'équipements coûteux et peu accessibles (IRM). C'est pourquoi, pour ce projet, nous avons mis en place une lignée cellulaire de MB exprimant la luciférase.

##### 3.1.1. Validation de l'expression de la luciférase dans les lignées DAOY

Les cellules de la lignée DAOY ont été infectées par des lentivirus avec un vecteur contenant le gène codant pour la luciférase (Lentivirus-LV-CMV-Firefly luciferase (CMV, puromycin)). Deux concentrations de lentivirus ont été testées : à 0,5 Tu et une plus élevée à 1 Tu, les lignées obtenues sont nommées DAOY-LUC 0,5 Tu et DAOY-LUC 1 Tu respectivement. L'unité de transduction, Tu (Transducing units), représente le nombre de particules virales fonctionnelles dans une solution qui sont capables de transduire une cellule et d'exprimer le transgène. Comme présenté sur la figure 28, l'expression de la luciférase a été validée par imagerie de bioluminescence sur les cellules DAOY-LUC 0,5 Tu et DAOY-LUC 1 Tu *in vitro* en 2D. Différentes concentrations cellulaires ont été testées (de 10 000 cellules/mL à 500 000 cellules/mL) et mises en contact avec le substrat de la luciférase, la luciférine (XenoLight D-Luciferin, PerkinElmer®), à une concentration de 150 µg/ml, pour mesurer l'intensité du signal en fonction de la concentration cellulaire. Les résultats montrent que l'intensité lumineuse est plus importante à une forte concentration cellulaire ( $> 2,5 \cdot 10^5$  cellules/mL) et les DAOY-LUC 0,5 Tu paraissent avoir un signal bioluminescent légèrement plus important que les DAOY-LUC 1 Tu, mais il n'y a pas de différences majeures entre les deux lignées (Figure 28).

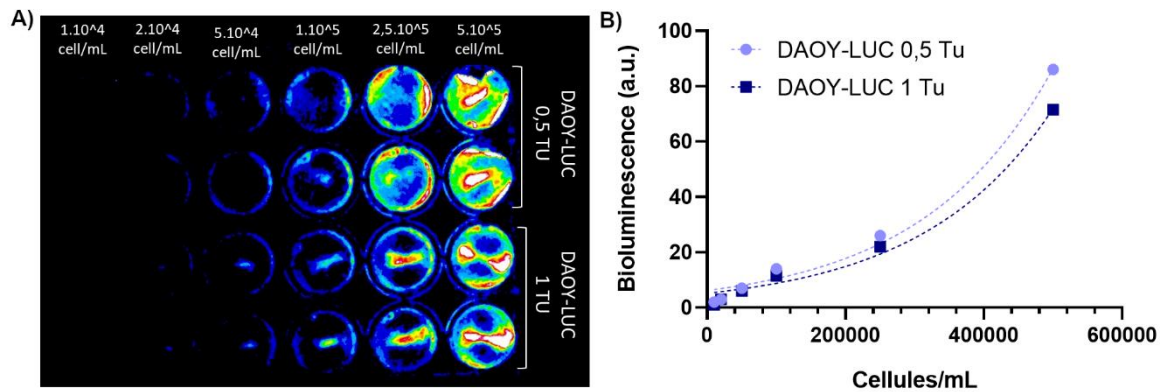


Figure 28 : Mise en évidence de l'expression de la luciférase dans les lignées infectées par imagerie de bioluminescence

A) Image de bioluminescence, traitée via le logiciel Image J®, de la lignée DAOY transfectée en fonction de différentes concentrations de lentivirus (0,5 Tu et 1 Tu) et de différentes concentrations cellulaires. B) Histogramme représentant l'intensité de bioluminescence maximale des lignées DAOY-LUC 0,5 TU et DAOY-LUC 1 Tu en fonction de concentrations cellulaires croissantes (n=1).

### 3.1.2. Caractérisation de l'expression de la luciférase sur le comportement des cellules de médulloblastome

Le lentivirus ne contient pas de séquence permettant une intégration localisée dans le génome des cellules, l'insertion du gène de la luciférase se fait de manière aléatoire, ce qui peut provoquer des modifications du phénotype cellulaire et des processus physiologiques tels que la prolifération et la migration (Gill & Denham, 2020). Dans le cadre de notre étude, pour évaluer l'impact de la transduction, nous avons comparé la lignée DAOY-LUC 0,5 Tu et 1 Tu avec leur lignée non-infectée, DAOY, en étudiant la viabilité cellulaire, de la prolifération et la migration cellulaire.

Les résultats ne montrent aucune différence significative pour l'activité métabolique des trois lignées (Figure 29 A). De même concernant la croissance cellulaire et le temps de doublement des cellules (Figure 29 B et C), même si la croissance des DAOY-LUC 1 Tu paraît légèrement plus faible comparée aux cellules DAOY non-transfectées et DAOY-LUC 0,5 Tu. La transfection n'affectant ni l'activité métabolique ni la croissance cellulaire, nous nous sommes demandé s'il en était de même pour la migration des cellules. Le test de migration réalisé n'a montré aucune différence significative entre les trois lignées, signifiant que les DAOY transfectées adoptaient le même comportement migratoire que les cellules DAOY non-transfectées (Figure 29 D). A partir de ces données, nous avons calculé la vitesse de migration des cellules. La vitesse de migration des DAOY-LUC 1 Tu semble légèrement plus faible mais

de manière non significative. L'infection lentivirale n'a donc pas impacté la vitesse de migration des cellules.

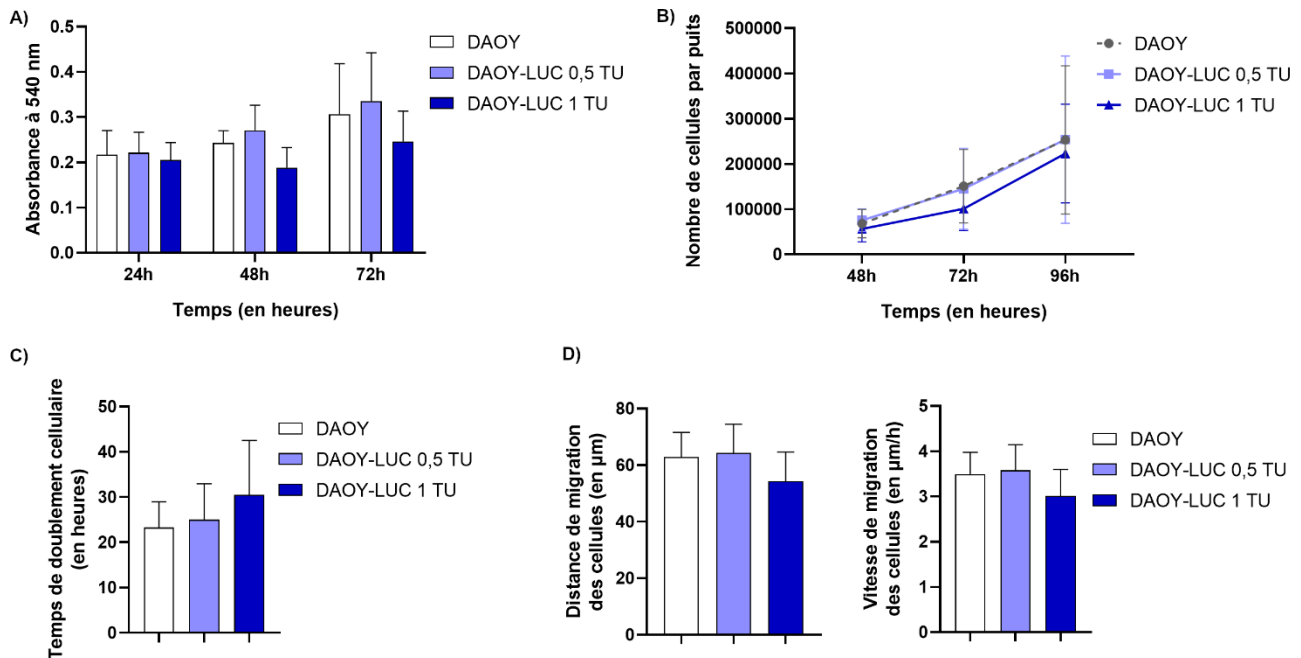


Figure 29 : Effets de l'infection lentivirale sur le comportement cellulaire de la lignée DAOY

A) Les cellules DAOY transfectées et non transfectées ont été mises en culture pendant 24h, 48h et 72h et le nombre de cellules métaboliquement actives a été évalué à l'aide d'un test MTT par mesure de l'absorbance à 450nm ;  $p > 0,05$  ( $n=3$ ). B) Les cellules exprimant la luciférase ou non sont trypsinées après 48h, 72h et 96h de prolifération pour un comptage cellulaire sur cellules de Malassez. Les cellules mortes sont discriminées par test d'exclusion au bleu Trypan, donnant ainsi le nombre de cellules viables. Les données sont représentées sous forme de courbe de croissance et le temps de doublement cellulaire (C) a été calculé avec la formule suivante :  $(t_{72h} - t_{24h}) \log 2 / \log N_{t72h} - \log N_{t24h}$  où  $t_{24h}$  et  $t_{72h}$  sont les temps après 24h et 72h de culture, et  $N_{t24h}$  et  $N_{t72h}$  sont le nombre de cellules au temps  $t_{24h}$  et  $t_{72h}$  ;  $p > 0,05$  ( $n=4$ ). D) La distance et la vitesse de migration des cellules transfectées et non-transfectées ont été mesurées et calculées grâce à la réalisation d'un test de blessure sur tapis cellulaire en 2D ;  $p > 0,05$  ( $n=3$ ).

### 3.1.3. Caractérisation de l'expression de la luciférase sur le comportement « souche » des cellules de médulloblastome

Les trois lignées cellulaires, DAOY, DAOY-LUC 0,5 TU et 1 Tu ont été utilisées *in vitro* pour obtenir des médullosphères (MS), modèle de cellules souches de médulloblastome. Ces MS sont par la suite comptées à l'aide d'un système Gelcount™ (Oxford Optronix, UK) (Figure 30). On remarque une légère augmentation du nombre de MS pour la lignée DAOY-

LUC 0,5 Tu comparé aux DAOY non-transfectées. A l'inverse, le nombre de MS des DAOY-LUC 1 Tu est légèrement plus faible que les DAOY non-transfectées. Statistiquement, aucune différence significative n'a été relevée confirmant que la transfection n'affecte pas la capacité des cellules à former des MS.

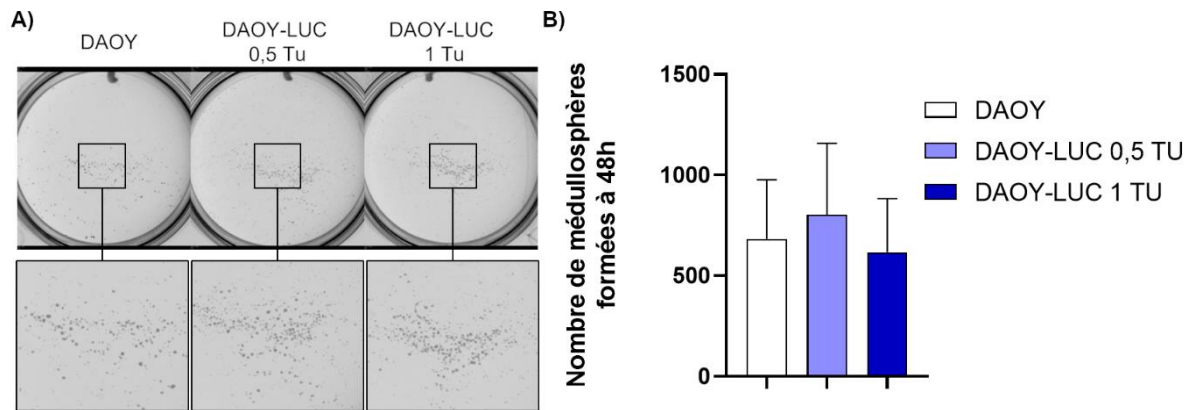


Figure 30 : Effets de l'expression de la luciférase sur la capacité des lignées DAOY à former des médullosphères A) Images représentatives des médullosphères formées par les lignées DAOY non transfectées et transfectées. B) Nombre de médullosphères pour chacune des lignées après 48h de culture une fois les médullosphères formées ;  $p > 0,05$  (n=4)

L'ensemble des résultats obtenus pour caractériser le modèle DAOY luciférase positive, nous permet de confirmer que la transfection n'a pas d'impact significatif sur le comportement des cellules comparé aux DAOY non-transfectées. Etant donné que les DAOY-LUC 0,5 Tu semble avoir un signal lumineux plus marqué que les DAOY-LUC 1 Tu et un comportement cellulaire similaire aux cellules sauvages, nous avons choisi le modèle cellulaire DAOY-LUC 0,5 Tu pour la suite des expériences. La lignée sera désormais nommée DAOY-LUC.

#### 3.1.4. Effets de la transduction sur l'expression de notre protéine d'intérêt, la neuropiline-1

L'insertion du gène de la luciférase se faisant de manière aléatoire lors de la transfection, cela peut altérer l'expression de certains gènes et ainsi modifier l'expression de certaines protéines. Nous avons donc vérifié l'expression protéique de notre protéine d'intérêt, NRP1, dans nos modèles cellulaires transfectés par Western Blot. Bien que l'expression de NRP1 semble être augmentée dans les lignées DAOY-LUC comparé à l'expression protéique dans la lignée DAOY non-transfectée, ainsi que dans les MS, aucune différence significative n'a été statistiquement relevée (Figure 31).

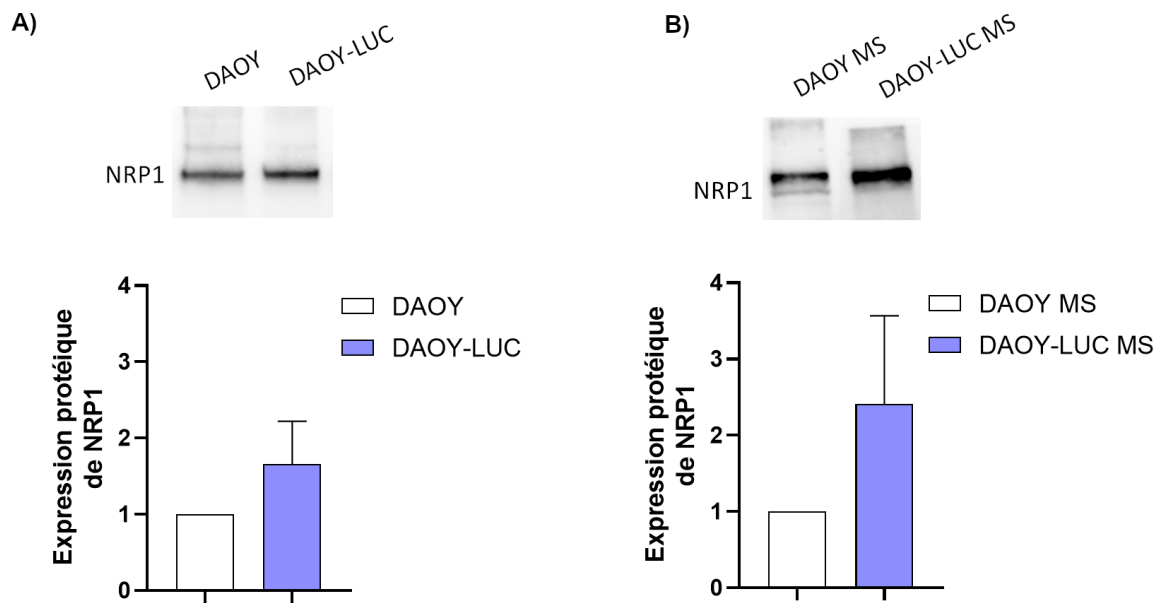


Figure 31 : Effet du lentivirus contenant le gène de la luciférase sur l'expression de NRP1

A) L'expression protéique de NRP1 a été évaluée par Western Blot dans les lignées DAOY et DAOY-LUC, ainsi que dans les médullosphères (MS) DAOY MS et DAOY-LUC MS (B). La quantification de la densité des bandes obtenues est réalisée par rapport à la quantité de protéine totale obtenue et quantifiable grâce aux gels Stain Free ;  $p > 0,05$  (n=3)

### 3.2. Mise en place d'un modèle de suivi de croissance tumorale par imagerie de bioluminescence dans un modèle *in vivo* de xénogreffes orthotopiques de médulloblastome

Les souris NUDE (NMRI-Foxn1 nu/nu, Janvier Labs, France) (n=3), femelles âgées de cinq semaines, ont été xénogreffées avec les cellules DAOY-LUC (à 1.10<sup>5</sup> cellules/ $\mu$ L, soit 5.10<sup>5</sup> cellules au total) en stéréotaxie au niveau du cervelet dans l'hémisphère droit. Le suivi tumoral par imagerie de bioluminescence a débuté une semaine post-transplantation et a duré 7 semaines. Une image a été prise à chaque semaine (OptiMAX®, PXi Precision, USA), après injection d'une solution de luciférine à 15mg/mL en I.P chez chacune des souris. Les images sont ensuite traitées via le logiciel Image J. Pour déterminer le temps optimal de l'activité de la luciférase après l'injection de la luciférine *in vivo*, nous avons effectué une cinétique en imageant l'animal toutes les cinq minutes après l'injection de la luciférine (Figure 32 B). La bioluminescence n'est visible qu'à partir de 15 min après l'injection du substrat de la luciférase puis la courbe de cinétique montre que le signal lumineux atteint un plateau après 20 min d'injection.

Concernant le suivi de la croissance tumorale en fonction du temps, les premières images de bioluminescence *in vivo* nous montrent que jusqu'à 35 jours, nous avons un plateau où le

signal lumineux est très faible et évolue peu. Mais après 35 jours de suivi, nous pouvons constater que le signal lumineux augmente assez rapidement, suggérant une croissance tumorale exponentielle (Figure 32 A et C).

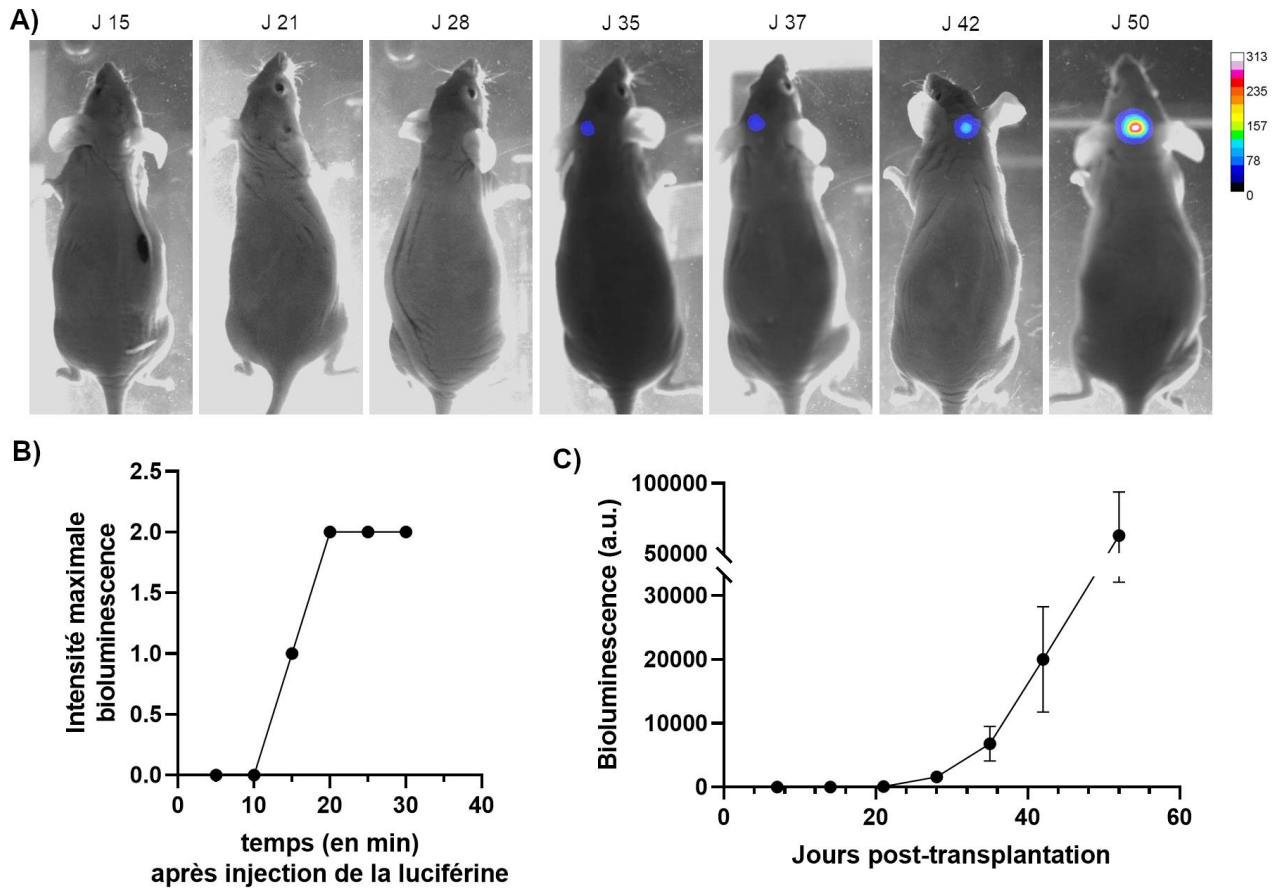


Figure 32 : Etude d'un modèle *in vivo* de suivi de croissance tumorale par imagerie de bioluminescence

A) Tumeur intracérébrale visualisée par imagerie de bioluminescence *in vivo* chaque semaine après la transplantation des cellules DAOY-LUC B) Courbe cinétique de l'activité de la luciférase dans un modèle de xénogreffes orthotopiques de médulloblastome. C) Evolution de la croissance tumorale après transplantation des cellules DAOY-LUC mesurée par bioluminescence (n=3)

#### 4. Bilan des études préliminaires

La caractérisation de notre modèle cellulaire de cellules de médulloblastome exprimant la luciférase met en évidence qu'aucune divergence de comportement n'a été relevée comparé à la lignée sauvage. En effet, l'expression de la luciférase dans la lignée DAOY n'a pas d'impact significatif sur le comportement cellulaire, comme la viabilité, la prolifération et la migration cellulaire, quelle que soit la dose de lentivirus utilisée pour infecter la lignée. De plus, le pouvoir souche de la lignée DAOY est intact même lorsque les cellules ont été infectées par le lentivirus. Au regard de ces résultats, nous avons sélectionné la lignée DAOY-LUC 0,5 Tu pour la suite de nos expérimentations, d'autant plus que cette lignée semble avoir un signal lumineux plus élevé que la lignée DAOY-LUC 1 Tu *in vitro*. Nous nous sommes, par la suite, intéressés à l'impact de l'infection virale sur l'expression de notre protéine d'intérêt, NRP1. Ne montrant qu'une légère augmentation non significative de l'expression de NRP1 dans les cellules de médulloblastomes et dans les médullosphères, nous avons poursuivi nos expérimentations avec la lignée DAOY-LUC pour mettre en place un suivi de croissance tumorale par imagerie de bioluminescence *in vivo*. Cette étude préliminaire *in vivo* nous a permis de déterminer le temps optimal de l'activité de la luciférase ainsi que de préciser la période de traitement pour les prochaines expériences *in vivo*. Pour évaluer l'intérêt de l'association de la radiothérapie avec l'inhibition de NRP1 par le MR438, nous avons choisi de commencer le traitement à J 28 post-injection cellulaire (début de la phase de croissance exponentielle de la tumeur). Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication scientifique dans le journal Cancer Cell International (Douyère et al., 2022) et seront décrits dans la partie suivante.

## **II. Effets de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie dans un modèle de xénogreffes orthotopiques de médulloblastome**

### **1. Contexte**

Actuellement, les traitements contre le médulloblastome (MB) consistent à utiliser la chirurgie, la radiothérapie (RT) et/ou la chimiothérapie. Malheureusement ces traitements s'accompagnent de graves séquelles (Mulhern et al., 2005). En particulier la RT, qui va atteindre le tissu sain autour de la tumeur, et entraîner des dégâts chez les enfants dont le système nerveux central (SNC) est en croissance. L'irradiation crâniospinale est pourtant essentielle dans le traitement du médulloblastome pour guérir les métastases déjà présentes ou pour les éviter. La dose conventionnelle de radiothérapie administrée aux patients à haut risque est de 36 Gy, et de 24 Gy pour les patients à risque standard, au niveau de l'ensemble du SNC, en 30 fractions, suivies d'un boost au niveau de la fosse postérieure à 54-56 Gy (Stripay et al., 2020). Actuellement, des essais cliniques sont conçus pour réduire la dose de RT crâniospinale dans le but de réduire les effets secondaires à long terme pour les formes de bon pronostic.

Un des désavantages de la RT est que certaines des cellules tumorales vont acquérir une résistance aux irradiations. Une sous-population de cellules tumorales en particulier possède cette capacité : les cellules souches cancéreuses (CSC). Aujourd'hui, de nombreuses études travaillant sur la résistance des CSC à la RT démontrent qu'elles sont associées à un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer (Mercurio, 2019; Nunes et al., 2018). En 2004, les cellules souches cancéreuses des tumeurs cérébrales (BTSC) ont été découvertes. Ces cellules expriment le marqueur de cellule souche neurale, le CD133 et présentent toutes les caractéristiques d'une CSC : auto-renouvellement, prolifération illimitée, capacité de différenciation et de générer une tumeur *in vivo* (Singh, Hawkins, et al., 2004). Depuis, d'autres marqueurs de CSC dans le MB ont été décrits comme CD15 (Read et al., 2009), Nestin (Hambardzumyan et al., 2008) ou encore Sox2 (Vanner et al., 2014).

Récemment, notre équipe a mis en avant un lien entre les CSC de MB et une glycoprotéine transmembranaire, NRP1 (Gong et al., 2018). NRP1 est impliqué dans de nombreux cancers ainsi que dans le MB où sa surexpression est associée à un mauvais pronostic (Snuderl et al., 2013; Yogi et al., 2015). D'après les travaux menés par notre équipe, il s'est avéré que NRP1 est surexprimé au sein des CSC de MB, que ce soit pour le sous-groupe SHH ou les sous-groupes 3/4 (Gong et al., 2018). De plus, en inhibant NRP1, par un peptidomimétique ciblant spécifiquement NRP1 (MR438), notre équipe a montré que cela

stimulait la différenciation des CSC de MB. En effet, le MR438 a diminué la capacité d'auto-renouvellement des CSC de MB dans le sous-groupe SHH et le sous-groupe 3/4. L'inhibition de NRP1 a aussi réduit la capacité invasive des CSC de MB, tandis que l'expression de NRP1 et les marqueurs de cellules souches cancéreuses ont diminué en même temps dans ces lignées. Concernant les voies de signalisation impliquées dans ce processus, l'inhibition de NRP1 a entraîné une baisse significative de l'activation des voies PI3K/AKT et MAPK pour le modèle cellulaire du sous-groupe SHH (Gong et al., 2018).

Pour donner suite aux résultats intéressants concernant l'influence de NRP1 sur le potentiel souche des cellules de MB, notre équipe s'est intéressée à l'inhibition de NRP1 dans le médulloblastome en association avec la RT (Thèse de C. Gong). Ces travaux ont montré que l'inhibition de NRP1 associée à la RT dans les CSC de MB induit une radio-sensibilisation des CSC de MB *in vitro*. De plus, les travaux *in vivo* de thèse de C. Gong ont montré que l'inhibition de NRP1 associée à la RT engendrait une diminution du nombre de CSC par rapport à la RT seule pour l'ensemble des sous-groupes de MB, et qu'elle avait des effets significatifs sur la croissance tumorale et la survie des animaux pour le sous-groupe SHH (Thèse C. Gong).

Cibler NRP1 en association avec la RT apparaît donc intéressant comme nouvelle stratégie thérapeutique contre le MB. Nous avons donc poursuivi l'étude de l'effet du MR438 associé à la RT *in vivo* en prenant en compte le microenvironnement tumoral du MB. **Dans cette partie, nous présenterons les résultats concernant l'évaluation de l'inhibition de NRP1 associée à la RT dans un modèle de xénogreffes orthotopiques de MB** par l'analyse de la croissance tumorale en temps réel via l'imagerie de bioluminescence *in vivo*, par le suivi de la survie des animaux, ainsi que par l'étude histologique de marqueurs spécifiques du développement tumoral et des CSC.

## 2. Matériels et Méthodes

### 2.1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire humaine de MB, DAOY (Jacobsen et al., 1985), provient de l'ATCC (Manassas VA, USA) et a été transfectée par des lentivirus possédant un vecteur contenant le gène codant la luciférase (Lentivirus-LV-CMV-Firefly luciferase (CMV, puromycin)) comme décrit précédemment. La lignée obtenue à la suite de ces infections lentivirales est appelée DAOY-LUC. Les cellules sont maintenues dans du milieu MEM (Gibco, Life Technologies Corporation, UK), contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF, SIGMA, USA), 1% de L-glutamine (SIGMA, UK), 1% d'acides aminés non-essentiels (Gibco, UK), 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco, UK) et 1% de sodium de pyruvate (Gibco, UK) à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.2. Xénogreffes orthotopiques de médulloblastome

Le modèle de xénogreffe orthotopique de médulloblastome chez les souris nude, femelles âgées de cinq semaines (NMRI-nu, Janvier Labs, France), a été utilisé avec l'agrément du ministère de la Recherche Française (agrément n°APAFiS #20085). Les souris sont anesthésiées avec une injection de 5µL/g de poids du corps d'une solution de Xylazine/Kétamine (90 mg/kg Rompun 2%, BayerBayer, et 8 mg/kg Imalgene 1000 Boehringer Ingelheim, respectivement) en intra-péritonéale (IP) puis elles sont anesthésiées localement avec une injection de 50µL de Lidocaïne (Lurocaïne, Vetoquinol), en sous-cutanée, au niveau du crâne. Un anti-inflammatoire stéroïdien, la dexaméthasone (Dexadreson, MSD Santé Animale), est aussi injectée en intramusculaire (25µL). L'instrument de stéréotaxie (KOPF®) a été utilisé pour fixer les souris lors de la procédure. Après avoir réalisé une incision verticale sur la tête de la souris, le site de la transplantation orthotopique est défini par les coordonnées au niveau de l'hémisphère droit du cervelet en se positionnant à 2 mm à droite et en bas de la suture lambda. Les cellules sont préparées dans leur milieu d'origine (à 1.10<sup>5</sup> cellules/µL, soit 5.10<sup>5</sup> cellules au total) pour l'injection via une seringue Hamilton à 2 mm de profondeur du cortex cérébral.

Toutes les souris sont suivies pendant plusieurs semaines post-injection jusqu'à l'apparition de signes neurologiques (point limite expérimental). La méthode de sacrifice utilisée est une surdose de pentobarbital (Exagon®, Axience). Le prélèvement du cerveau complet de chacune des souris est réalisé (les hémisphères cérébraux et le cervelet) soit à 50 jours post-greffes pour les souris satellites, soit au point final des expérimentations. Les

cerveaux sont par la suite fixés dans une solution de formaldéhyde à 4% (Diapath, Italy) pendant une semaine, puis conservés dans de l'éthanol à 70°.

### 2.3. Traitement des animaux et suivi de la croissance tumorale

Pour tester l'efficacité de notre traitement en association avec la RT, les animaux ont été traités 28 jours post-injection pendant une semaine ou deux semaines d'affilée. Quatre groupes de traitements ont été définis : un groupe contrôle non-traité (CTL), un groupe traité avec le MR438 seul (MR438), un groupe traité avec la radiothérapie seule (RT) et un groupe traité avec le MR438 en association avec la radiothérapie (RT + MR438). Le composé MR438 est préparé extemporanément à 10 mg/kg/souris (soit à une concentration de 2,5mg/mL) dans du sérum physiologique NaCl 0,9% (B.Braun®). Ensuite, la solution MR438 est injectée en intraveineux (I.V.), au niveau de la veine caudale. Le volume de la solution injecté est de 4µL/g de poids du corps, et trois injections sont réalisées par semaine à J1, J3 et J5. Concernant les irradiations, la zone tumorale est irradiée à 2 Gy/jour pendant 5 jours, ou 10 jours, à l'aide de l'irradiateur préclinique X-rad 320® après anesthésie des animaux avec un mélange xylazine/kétamine (90 and 8 mg/kg, respectivement).

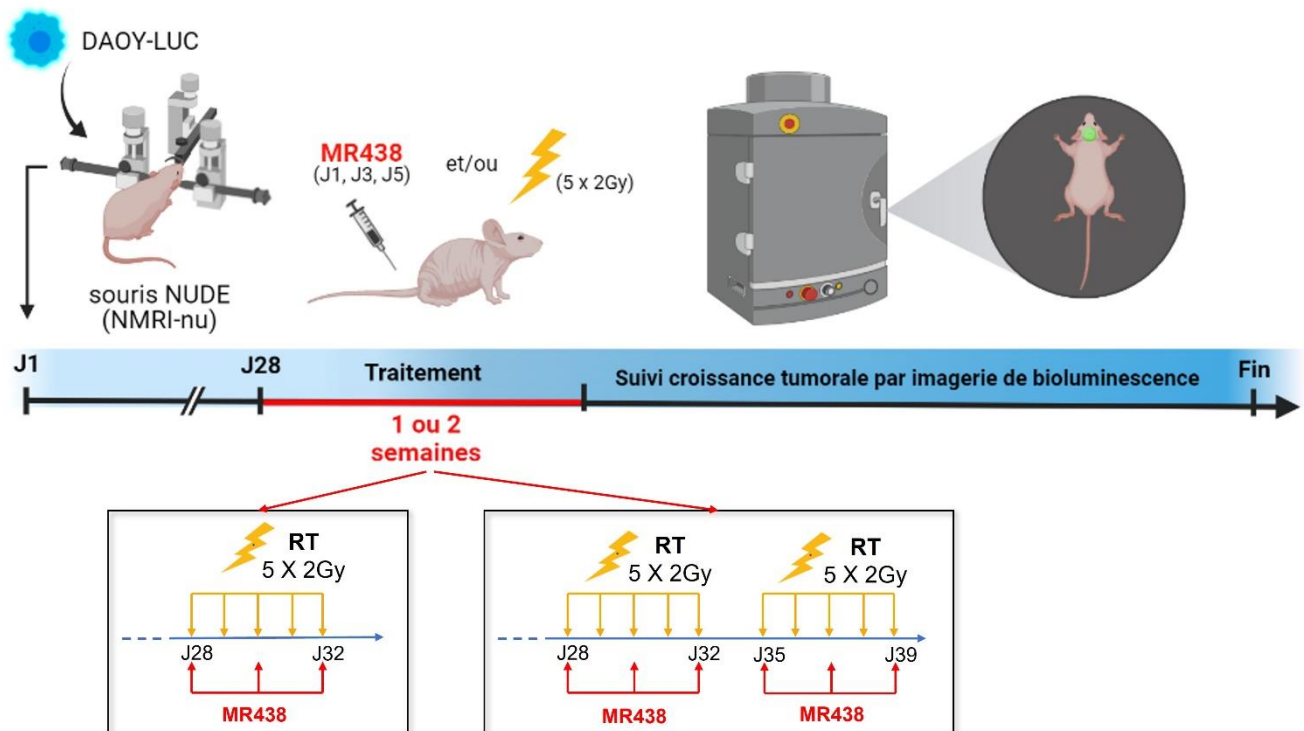


Figure 33 : Schéma expérimental et thérapeutique du modèle de xénogreffes orthotopiques de MB

Afin d'évaluer la croissance tumorale, un suivi par imagerie de bioluminescence est effectué à partir de J15 post-injection et chaque semaine jusqu'à l'atteinte des points limites à l'aide du système OptiMAX®. L'imagerie de bioluminescence se fait après administration en I.P. d'une solution de D-Luciférine (D-Luciferin Firefly, PerkinElmer® #122799) diluée dans une solution de PBS stérile (à 15 mg/ml et 10µL/g de poids du corps). Les animaux sont par la suite anesthésiés par un mélange de xylazine/kétamine (90 and 8 mg/kg, respectivement) en I.P. Puis, les animaux sont imagés, en les positionnant sur le dos, 20 min après l'injection de la luciférine. Les paramètres d'acquisition sont les suivant : une ouverture de 0,5, un binning de 1, un temps d'exposition de 180 secondes et un focus de 0,3. L'intensité de la bioluminescence est déterminée ensuite sur Image J® en mesurant le paramètre Integrated Density, qui équivaut à la somme des valeurs des pixels, au niveau de la zone d'intérêt de la région tumorale déterminée par seuillage à 50% de l'intensité maximale du signal de BLI.

## 2.4. Histologie

### 2.4.1. Préparation des coupes de tumeurs

Après une fixation dans du formaldéhyde 4% pendant une semaine, les échantillons ont été transférés dans une cassette d'inclusion dans une solution d'éthanol à 70°. Les cassettes sont ensuite transférées dans une machine de déshydratation automatisée (HISTO-PRO 300) pendant une nuit pour l'inclusion dans la paraffine. Les blocs de paraffine sont coupés à 5 µm d'épaisseur, à l'aide du microtome (LEICA RM 2135). Ensuite, les images obtenues sont fixées sur les lames polysines® (Thermo Scientific Menzel-Gläser) pour l'étape de coloration.

### 2.4.2. Coloration Hématoxyline et Eosine (HE)

Les lames sont déparaffinées dans deux bains de toluène de 5 minutes, puis hydratées dans des bains d'alcool décroissants (éthanol 100%, éthanol 96%, éthanol 70%) et un bain d'eau distillée. La coloration à l'hématoxyline est effectuée dans un premier temps (2min), puis après quelques lavages et un passage dans l'alcool chlorhydrique 0,25%, les lames sont colorées à l'éosine pendant 2min. Après quelques lavages dans l'eau distillée, les lames sont déshydratées dans des bains successifs d'alcool croissants (éthanol 70%, éthanol 96%, éthanol à 100%). Les lames sont laissées dans un bain de toluène pendant au moins 5 min puis le montage des lames est réalisé par le kit de montage Eukitt®.

### 2.4.3. Immunohistochimie

Après avoir réalisé des coupes au microtome, les coupes sont fixées sur des lames en polylysines pour les marquages immunohistochimiques. Les lames sont ensuite déparaffinées dans trois bains de toluène de 5 minutes, puis hydratées dans des bains d'alcool décroissants (éthanol 100%, éthanol 96%, éthanol 70%) et un bain d'eau distillée de 5 min. L'appareil Decloaking Chamber™ NxGen de chez Biocare Medical® est utilisé afin de réaliser un cycle de démasquage dans du tampon citrate à pH 6 ou du tampon EDTA selon l'anticorps utilisé ; 40 minutes à 110°C. Après lavage au PBST, les anticorps primaires sont incubés une nuit à +4°C en chambre humide. Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : anti-NRP1 (1 : 1500, ab81321, abcam®), anti-CD15 (1 : 500, SAB5500041, Sigma-Aldrich®), anti-Ki67 (1 : 1500, ab16667, abcam®) et anti-Col IV (1 : 3200 20451, Novotec). Une digestion enzymatique à la collagénase de type IV (10mg % CaCl<sub>2</sub>, Gibco) est réalisée avant l'incubation de l'anticorps primaire anti-Col IV pendant 20 min à 37°C. Après une incubation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% pendant 20 minutes, l'anticorps secondaire polymérique marqué à la peroxydase (Histofine® Nichirei Biosciences™) est incubé 20 minutes à température ambiante. Le kit ImmPACT® NovaRED™ Peroxidase (HRP) Substrate (Eurobio®) permet de révéler la réaction peroxydasique. Les lames sont ensuite colorées à l'hématoxyline pendant 2 min, fixées 4 secondes dans du TRIS-HCl, puis déshydratées dans des bains d'éthanol 100% et un bain de toluène pour être montées sur lames avec le kit de montage Eukitt®.

Les lames colorées à l'hématoxyline et éosine ainsi que les lames d'immunohistochimie sont observées au microscope optique (Nikon® Eclipse E 600) puis photographiées grâce au logiciel NIS Elements Documentation. La quantification des cellules exprimant les protéines NRP1, CD15 et Ki67 est réalisée avec le logiciel QuPath (v0.2.0-m2, logiciel libre, University of Edinburgh). Pour les marquages Col IV la quantification des vaisseaux est réalisée à l'aide du logiciel Image J®.

### 2.5. Statistiques

Tous les résultats sont donnés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM). Le test non paramétrique de Mann-Whitney et le T-test de Student pour les comparaisons deux par deux sont utilisés pour déterminer la signification statistique à l'aide de GraphPad Prism® (GraphPad Prism 8.0, USA) avec un minimum de 3 répétitions pour les expériences d'histologie avec 3 animaux différents pour chaque groupe minimum et de 6 animaux minimum pour les expérimentations *in vivo*. Tous les  $p < 0,05$  (marqué par \*) sont considérés comme significatif et  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  sont marqués par \*\* et \*\*\*,

respectivement. Pour les expériences *in vivo*, l'atteinte du point final préalablement défini a servi à construire les courbes de Kaplan-Meier et le test du log-rank est utilisé pour comparer les courbes de survie.

### 3. Résultats

#### 3.1. Effets du MR438 associé à la RT sur la croissance tumorale et la survie des souris après une semaine de traitement (5 jours)

Basé sur les précédents travaux de thèse de C. Gong sur l'effet du MR438 associé à la radiothérapie dans un modèle hétérotopique de MB, un modèle orthotopique avec la lignée DAOY-LUC a été utilisé pour prendre en compte l'environnement tumoral de la tumeur. Le but étant de confirmer l'effet bénéfique de l'inhibition de NRP1 associée à la RT pour le sous-groupe SHH de MB observé dans les précédents travaux du laboratoire. Les souris NUDE ont été traitées à J28 post-implantation des cellules tumorales pendant une semaine de traitement composée d'une irradiation à 2 Gy par jour (5 x 2 Gy), soit une dose cumulée de 10 Gy au total, et de trois injections en I.V. du MR438 à J1, J3 et J5 (à 10 mg/kg, soit à une concentration de 2,5mg/mL).

Après 50 jours de suivi de la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence, nous montrons que le MR438 seul et la RT seule n'ont pas d'effets significatifs sur la croissance tumorale comparé au groupe CTL (Figure 34 C), même si la RT seule semble retarder la croissance de la tumeur comparé au groupe CTL ou MR438 seul. En revanche, l'association du MR438 et de la RT diminue de manière significative le signal de bioluminescence au cours du temps comparé au groupe CTL (\* $p < 0.05$  versus CTL) mais aucune différence n'a pu être relevée, comparé au groupe RT seule. De plus, l'effet sur la croissance tumorale avec la combinaison du traitement apparait moins efficace à la fin de l'expérience comparé à la RT seule (Figure 34 B). Concernant la survie des souris, elle a été évaluée lorsque les souris présentaient les premiers signes neurologiques (atteinte du point limite). La survie médiane (Figure 34 D) a été significativement améliorée pour le groupe RT + MR438 par rapport au groupe CTL, contrairement au groupe RT (72 jours pour RT + MR438, 64 jours pour CT ou MR438 et 67 jours pour RT seule).

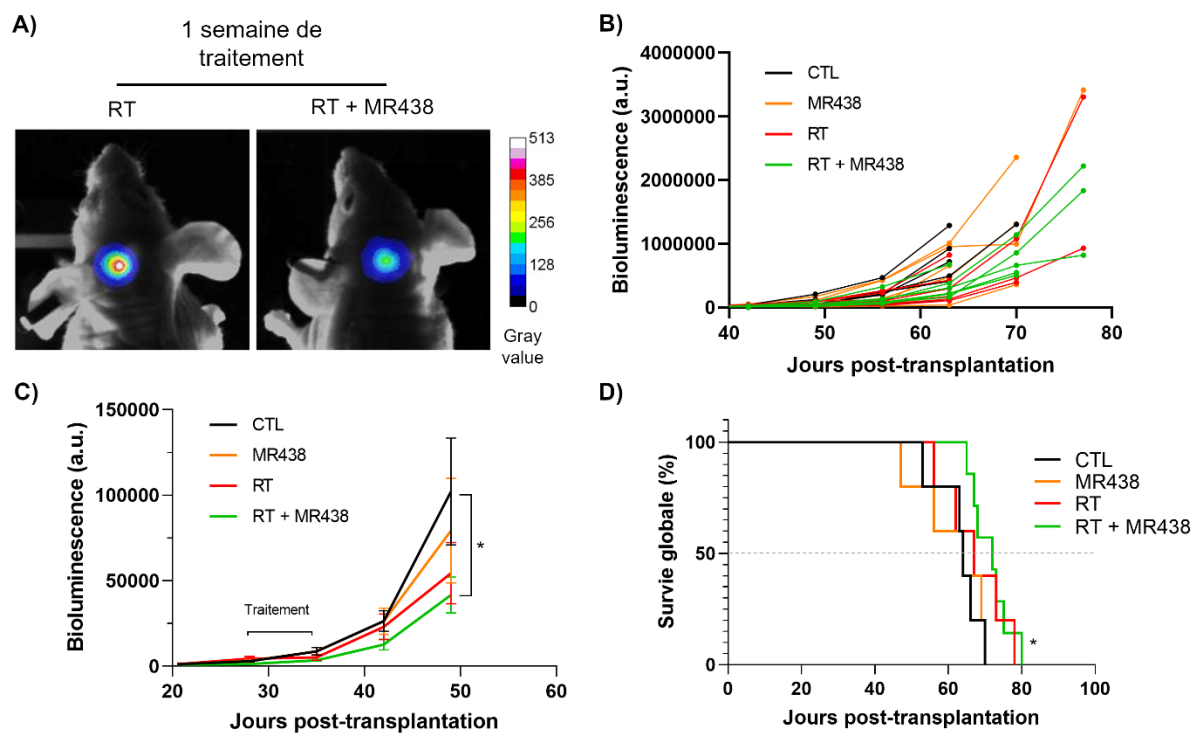


Figure 34 : Effets de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie dans un modèle de xénogreffes orthotopiques de médulloblastome pendant une semaine de traitement

A) Tumeurs intracérébrales visualisées par imagerie de bioluminescence *in vivo* au jour 50 post-transplantation des cellules DAOY-LUC pour le groupe RT versus le groupe RT+MR438 après une semaine de traitement (5 jours). La croissance tumorale après une semaine de traitement (radiations : 5x 2 Gy et/ou administration de MR438 : 10 mg/kg) jusqu'à la fin des expérimentations (B) et à jusqu'à J50 post transplantation (C) a été évaluée par mesure de la bioluminescence. D) La fraction de survie globale a été évaluée via l'atteinte des points limites chez les souris. \* $p < 0.05$  versus CTL ;  $n = 7$  par groupe.

### 3.2. Analyses immunohistochimiques du modèle de xénogreffes orthotopiques DAOY-LUC après une semaine de traitement (5 jours)

Après l'atteinte des points limites, les animaux sont sacrifiés et chacune des tumeurs a été prélevée pour réaliser des analyses d'immunohistochimie (Figure 35). Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'expression de notre protéine d'intérêt, NRP1, dans les tumeurs en fonction des différents traitements. Il semblerait qu'aucune différence ne soit statistiquement releuable concernant l'expression de NRP1 même si son expression semble plus faible dans les tumeurs traitées au MR438 ou RT + MR438 (Figure 35 B). Ensuite, nous avons analysé l'expression du Ki67, marqueur clé de la prolifération, sans qu'aucune différence n'ait été relevée entre le groupe RT + MR438 comparé au groupe CTL ou RT seule. Le MR438 seul a augmenté de manière significative le pourcentage de cellules positives au Ki67 indiquant une prolifération plus élevée à la suite de ce traitement comparé au groupe CTL (Figure 34 C). A la

suite des résultats de C. Gong sur la dédifférenciation des CSC de MB après inhibition de NRP1 (Gong et al., 2018), nous avons étudié l'expression d'un marqueur de cellules souches de MB : le CD15. Étonnamment, le MR438 seul diminue de manière significative le nombre de cellules positives au CD15 alors que le traitement RT seul ou RT + MR438 augmente de manière significative le pourcentage de cellules positives au CD15 au point final de l'expérience (Figure D).

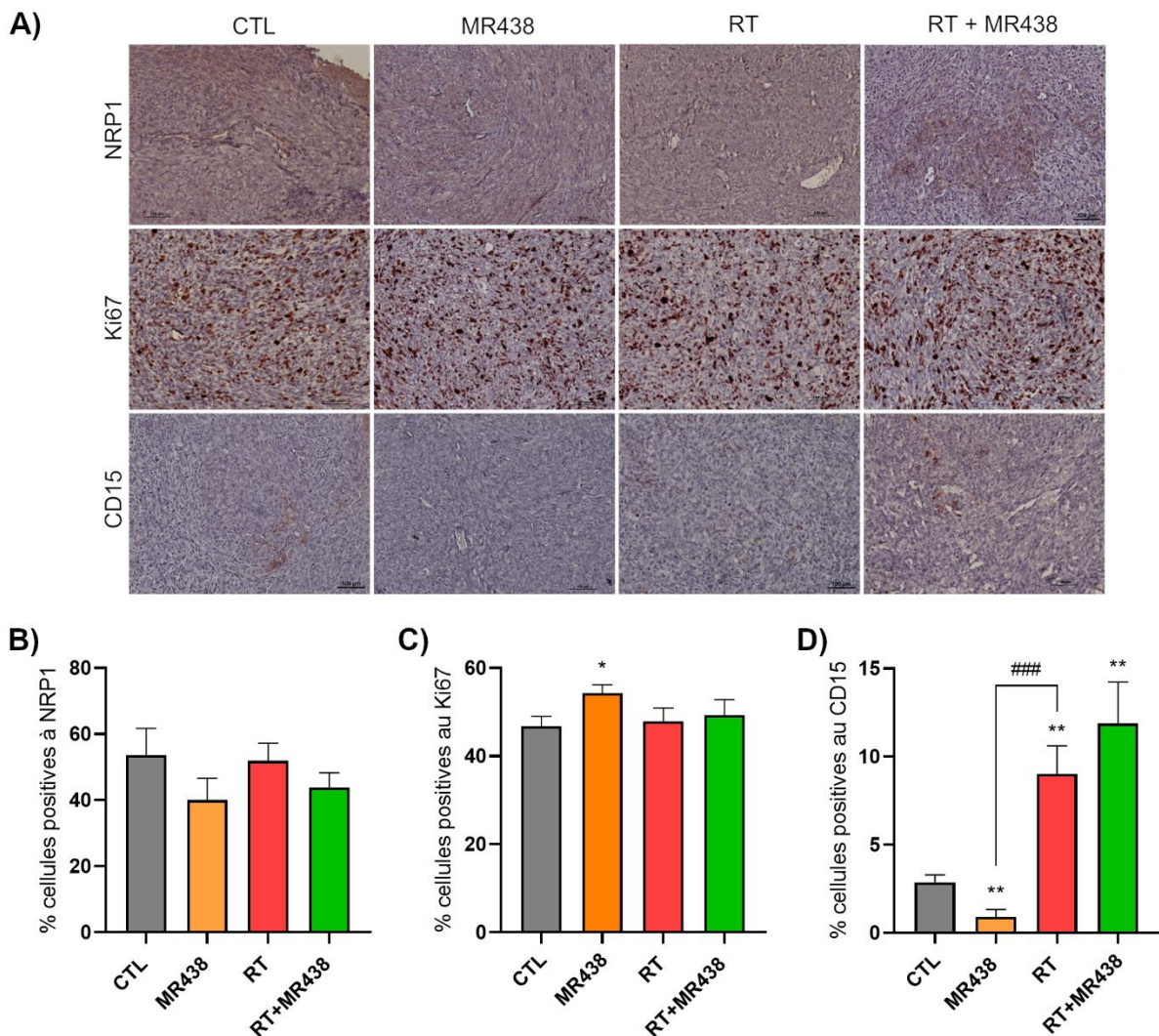


Figure 35 : Evaluation de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie par des analyses immunohistochimiques sur l'expression de NRP1, Ki67 et CD15 après une semaine de traitement

A) Images des marquages immunohistochimiques de NRP1, Ki67 et CD15 au grossissement X10, échelle de l'image 100µm. B) Le pourcentage de cellules positives pour NRP1 (B), Ki67 (C) ou CD15 (D), au point final de l'expérience après une semaine de traitement, a été quantifié avec le logiciel QuPath à partir d'environ 5000 cellules pour 3 images différentes avec un large champ d'observation de 4 tumeurs différentes. \*p<0,05 versus CTL, \*\*p<0,01 versus CTL, ###p<0,001 versus RT ; n = 4 par groupe.

### 3.3. Effets de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie pendant une semaine de traitement (5 jours) sur la vascularisation des tumeurs intracérébrales DAOY-LUC

La vascularisation au sein de la tumeur joue un rôle très important dans le développement tumoral, et NRP1 est reconnu dans la littérature comme étant un acteur clé de l'angiogenèse tumorale (Kawakami et al., 2002; Stephenson et al., 2002; G. Zhang et al., 2018). Nous avons donc tenu à évaluer la vascularisation des tumeurs des souris traitées par une analyse histologique de l'expression du collagène de type IV (Col IV), marqueur de l'endothélium vasculaire. Après une analyse des marquages avec le logiciel Image J®, on observe que le nombre de vaisseaux et l'aire moyenne des vaisseaux sanguins ne sont pas impactés par les différents traitements (Figure 36).

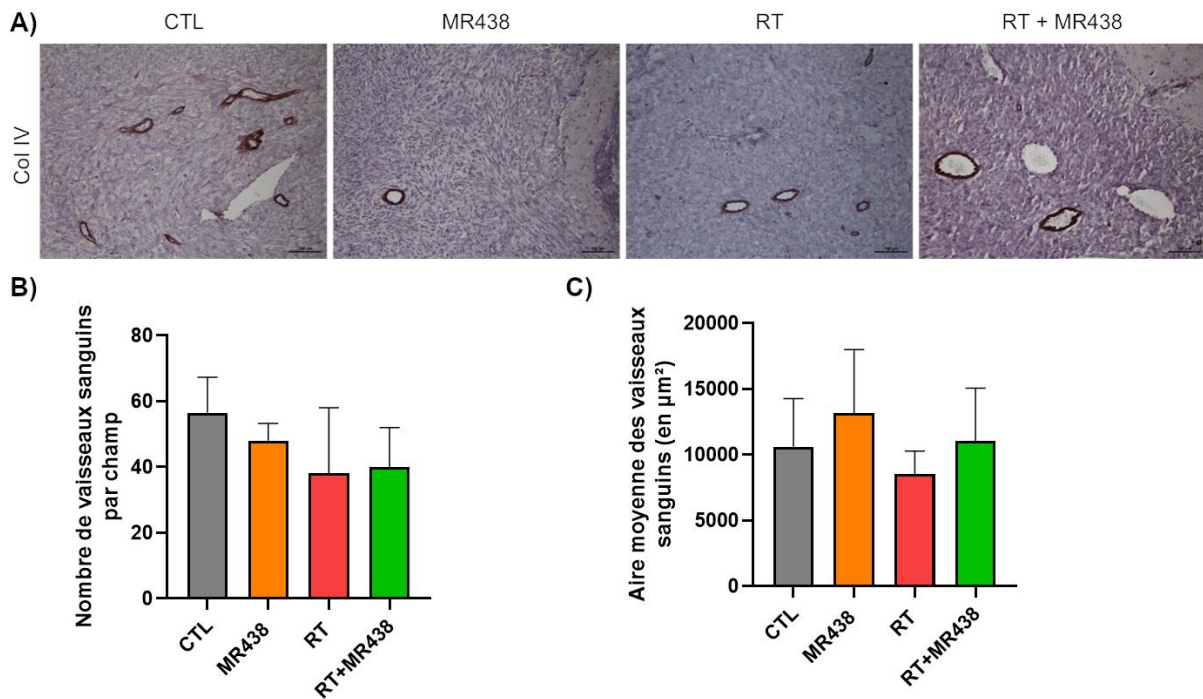


Figure 36 : Evaluation de l'effet du MR438 associée à la radiothérapie, après une semaine de traitement, sur la vascularisation par des analyses immunohistochimiques sur l'expression du collagène de type IV.

A) Images des marquages immunohistochimiques du collagène de type IV (Col IV) réalisés au point final de l'expérience, au grossissement X10, échelle de l'image 100µm. Le nombre de vaisseaux sanguins par champ (B) et l'aire moyenne des vaisseaux sanguins (C) au point final de l'expérience, après une semaine de traitement, ont été quantifiés avec le logiciel Image J® à partir de 3 images différentes avec un large champ d'observation pour 3 tumeurs différentes. Aucune différence significative n'a pu être relevée versus CTL et versus RT ; n = 3 par groupe.

### 3.4. Effets de l'inhibition de NRP1 associée à la RT sur la croissance tumorale et la survie des souris après deux semaines de traitement (10 jours)

Au vu des résultats encourageants sur la diminution de la croissance tumorale et l'augmentation de la survie des souris, dans le modèle orthotopique DAOY-LUC, après une semaine de traitement par le MR438 associé à la RT, nous avons tenté d'augmenter ces effets en prolongeant la phase de traitement, se rapprochant ainsi du schéma thérapeutique utilisé en clinique. Nous avons traité les souris xéno greffées avec la lignée DAOY-LUC pendant deux semaines consécutives, soit une dose cumulée de 20 Gy au total (10 x 2 Gy) et de six injections en I.V. du MR438 à J1, J3 et J5 pour chaque semaine de traitement (à 10 mg/kg, soit à une concentration de 2,5mg/mL).

Le suivi de croissance tumorale par imagerie de bioluminescence a montré une baisse significative de la bioluminescence pour le groupe RT seule et RT + MR438 comparé au groupe CTL, à J50 post-transplantation, mais aucune différence entre la bioluminescence entre les groupes RT et RT + MR438 à ce stade (Figure 37 C). De plus, le suivi de croissance tumorale jusqu'au terme de l'expérience semble indiquer un ralentissement de la croissance tumorale pour le groupe RT seule qu'on ne retrouve pas pour le groupe RT + MR438 (Figure 37 B). Dans le même sens, les résultats sur la survie des souris ont montré un effet bénéfique du traitement RT seule et au contraire une baisse significative de la survie des animaux lorsque les deux traitements étaient associés comparé au groupe RT seule. La médiane de survie pour le groupe RT + MR438 étant plus faible que celle du groupe RT seule (79 jours pour RT seul, 74,5 jours pour RT + MR438, 65 jours pour CTL et 59 jours pour MR438 seul) (Figure 37 D).

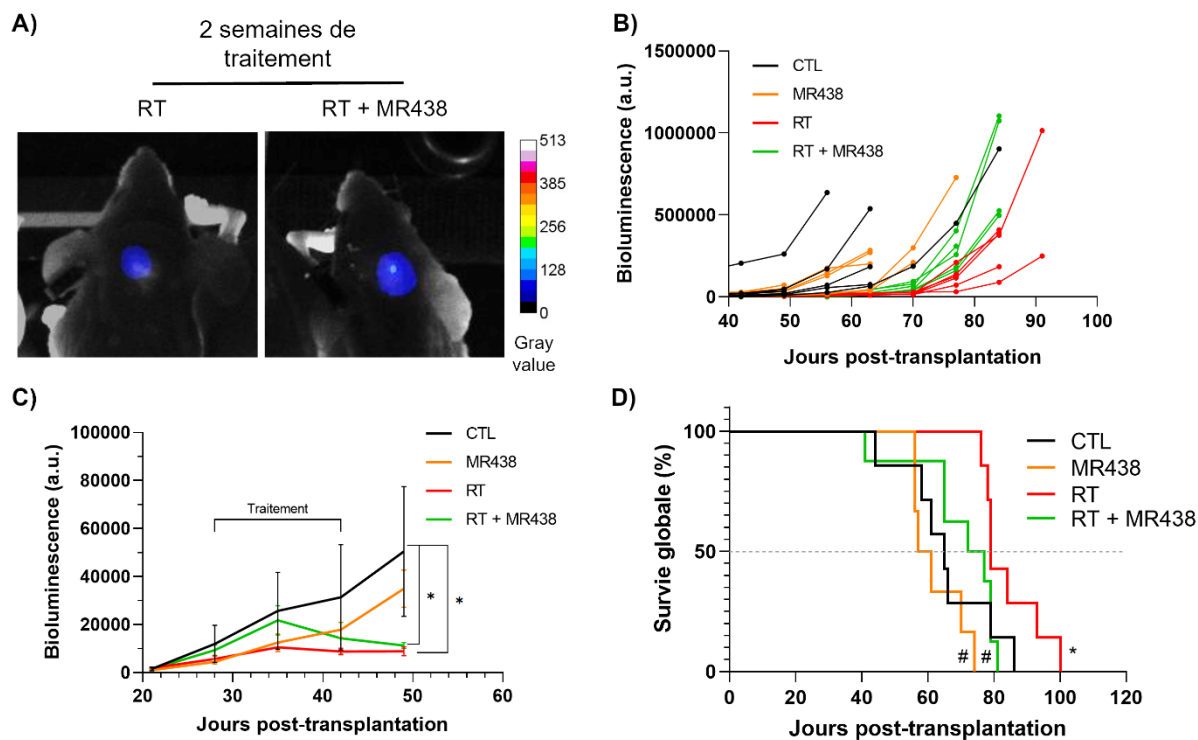


Figure 37 : Effets de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie dans un modèle de xénogreffes orthotopiques de médulloblastome pendant deux semaines de traitement

A) Tumeurs intracérébrales visualisées par imagerie de bioluminescence *in vivo* au jour 50 post-transplantation des cellules DAOY-LUC pour le groupe RT versus le groupe RT + MR438 après deux semaines de traitement. La croissance tumorale après deux semaines de traitement (radiations : 10x 2 Gy et/ou administration de MR438 : 10 mg/kg) jusqu'à la fin des expérimentations (B) et à J50 post-transplantation (C) a été évaluée par mesure de la bioluminescence. D) La fraction de survie globale a été évaluée via l'atteinte des points limites chez les souris. \* $p < 0.05$  versus CTL ; #  $p < 0.05$  versus RT ;  $n = 7$  par groupe.

### 3.5. Analyses immunohistochimiques du modèle de xénogreffes orthotopiques DAOY-LUC après deux semaines de traitement (10 jours)

Les souris ont été traitées pendant deux semaines (10 jours) avec le MR438 et/ou RT puis certaines ont été sacrifiées à J15 post-traitement (= souris satellites) et d'autres à la fin de l'expérimentation aux premiers signes du point limite. Les cervelets des souris ont été prélevés pour effectuer des analyses immunohistochimiques comme précédemment (Figure 38). L'expression de NRP1 a été étudiée dans les tumeurs et les résultats ont montré une baisse significative du nombre de cellules positives à notre protéine d'intérêt pour le groupe RT seule et RT + MR438 juste 15 jours après la phase de traitement. En revanche, au point final des expérimentations, les analyses des marquages ont montré une augmentation de l'expression de NRP1 au sein des tumeurs traitées avec la RT seule et RT + MR438 (Figure 38 B). Au niveau de la prolifération, les traitements n'ont montré aucun effet, que ce soit 15 jours après la phase

de traitement ou à la fin des expériences (Figure 38 C). Les résultats sur l'analyse immunohistochimique du marqueur de CSC, le CD15, ont été plus intéressants. En effet, le pourcentage de cellules positives au CD15 a drastiquement été diminué seulement par le peptidomimétique associé à la RT quinze jours après le traitement tandis qu'au point final, ce pourcentage semble augmenter pour ce même groupe (Figure 38 D).

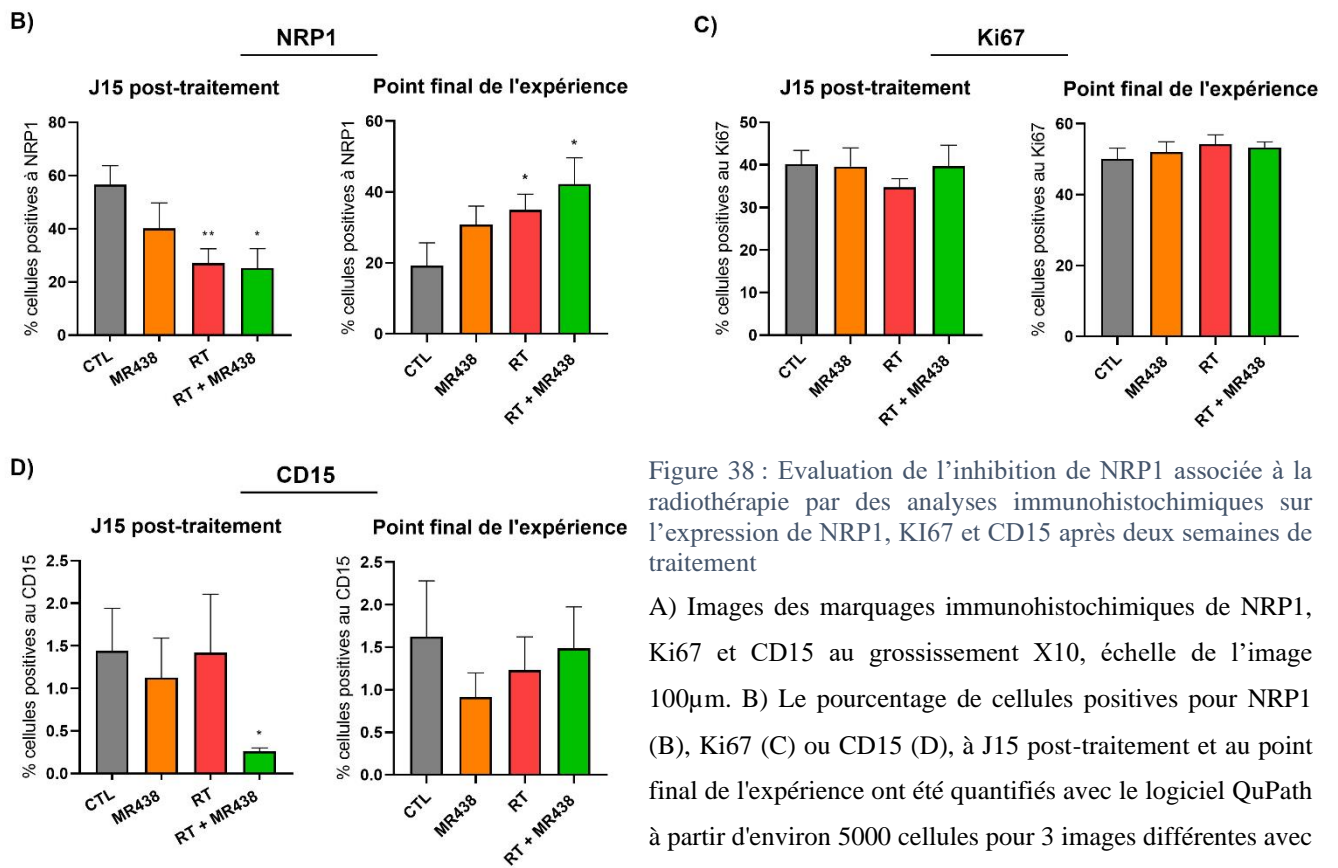
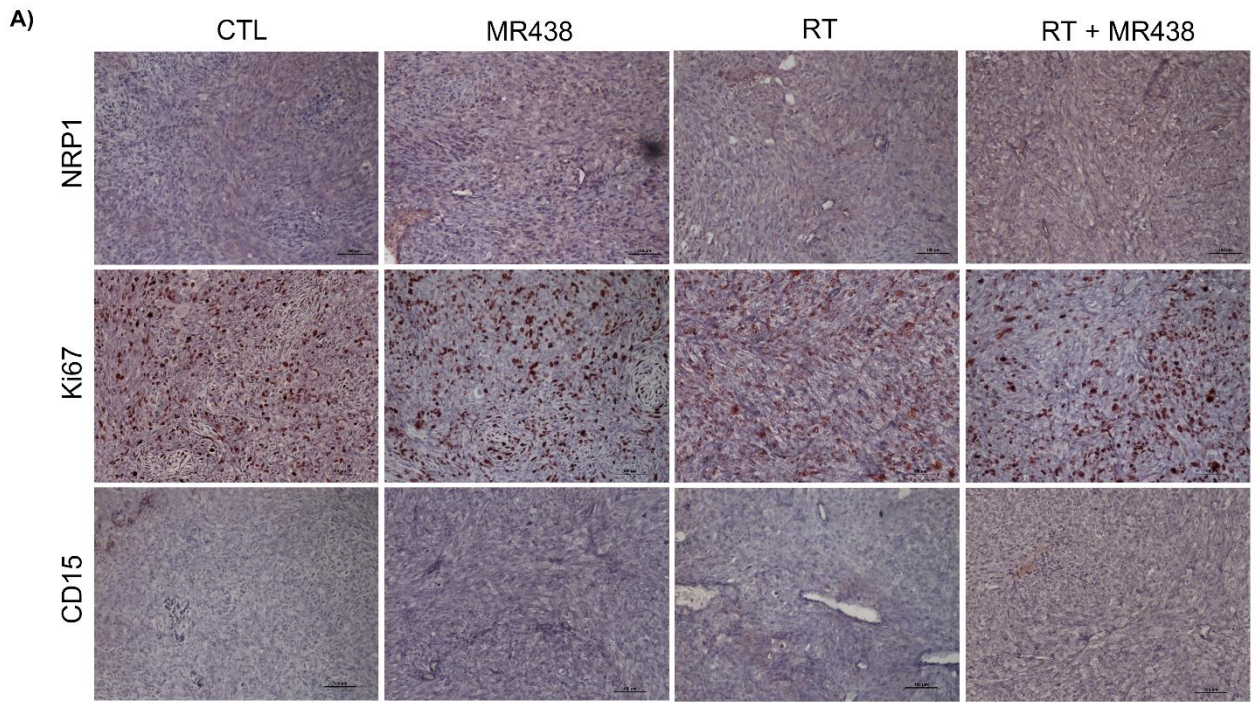


Figure 38 : Evaluation de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie par des analyses immunohistochimiques sur l'expression de NRP1, Ki67 et CD15 après deux semaines de traitement

A) Images des marquages immunohistochimiques de NRP1, Ki67 et CD15 au grossissement X10, échelle de l'image 100µm. B) Le pourcentage de cellules positives pour NRP1 (B), Ki67 (C) ou CD15 (D), à J15 post-traitement et au point final de l'expérience ont été quantifiés avec le logiciel QuPath à partir d'environ 5000 cellules pour 3 images différentes avec un large champ d'observation de 3 tumeurs différentes. \*p<0,05 versus CTL, \*\* p<0,01 versus CTL ; n = 3 par groupe.

### 3.6. Effets de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie pendant deux semaines de traitement (10 jours) sur la vascularisation des tumeurs intracérébrales

La vascularisation contribuant pleinement à la croissance tumorale, et NRP1 étant impliqué dans l'angiogenèse, nous avons évalué l'effet de l'inhibition de NRP1 sur l'expression du Col IV, marqueurs de la vascularisation, sur nos échantillons récupérés au point final de l'expérience. Après une analyse des marquages avec le logiciel Image J®, le nombre de vaisseaux sanguins ne semble pas être impacté bien que diminué pour les souris traitées pendant deux semaines au MR438 seul et RT + MR438. De plus, une augmentation significative de l'aire moyenne des vaisseaux a été observée uniquement chez les souris traitées RT + MR438. (Figure 39).

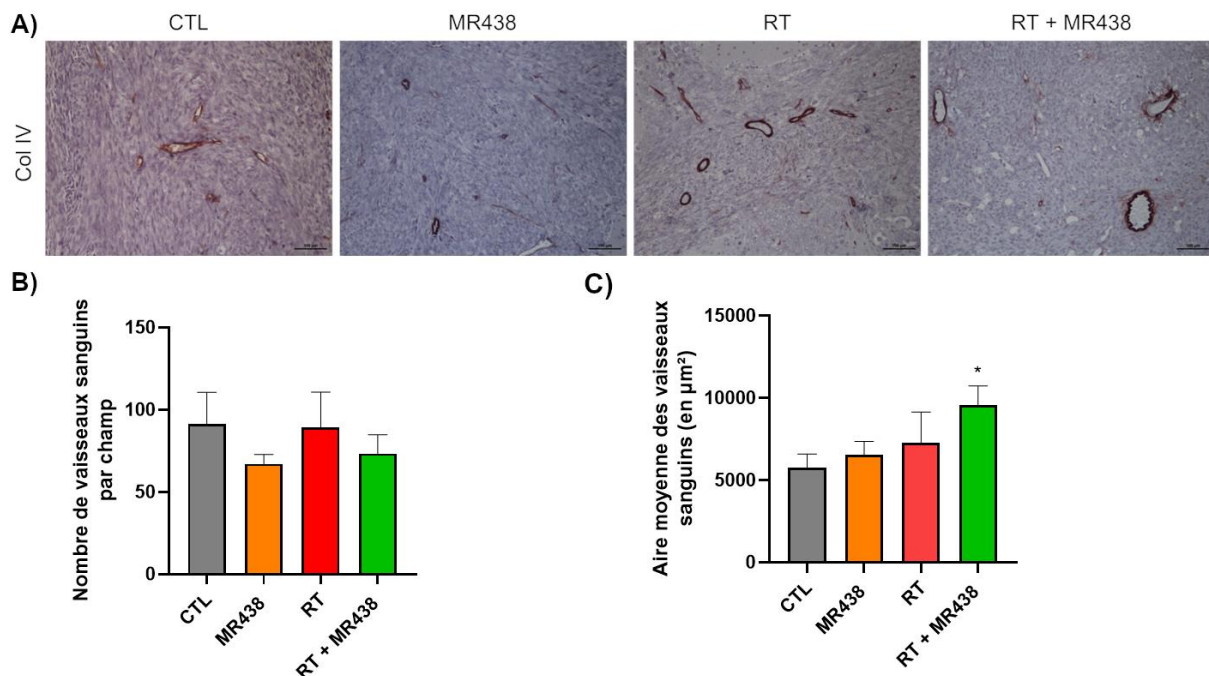


Figure 39 : Evaluation de l'effet du MR438 associée à la radiothérapie, après deux semaines de traitement, sur la vascularisation par des analyses immunohistochimiques sur l'expression du collagène de type IV.

A) Images des marquages immunohistochimiques du collagène de type IV (Col IV) réalisés au point final de l'expérience, au grossissement X10, échelle de l'image 100µm. Le nombre de vaisseaux sanguins par champ (B) et l'aire moyenne des vaisseaux sanguins (C) au point final de l'expérience, après deux semaines de traitement (10 jours), ont été quantifiés avec le logiciel Image J® à partir de 3 images différentes avec un large champ d'observation pour 3 tumeurs différentes. \*p<0,05 versus CTL ; n = 3 par groupe.

#### 4. Discussion et conclusion

La radiothérapie (RT) est le traitement essentiel du médulloblastome (MB) après résection de la tumeur. Ce traitement améliore significativement la survie des patients et réduit le risque de récurrences. Malheureusement, la RT est un traitement très agressif qui va provoquer de graves séquelles notamment chez les plus jeunes patients dont le cerveau est en développement. De plus, certaines cellules cancéreuses possèdent la capacité de résister aux radiations et de permettre ainsi la récurrence des tumeurs. Il a été suggéré qu'une sous-population des cellules tumorales était impliquée dans la résistance aux radiothérapies : les cellules souches cancéreuses (CSC). En effet, des études récentes ont démontré le rôle que jouaient les CSC dans la radiorésistance du MB (L. Sun et al., 2017; Zhu et al., 2021).

Nous avons précédemment montré que NRP1 était lié au statut indifférencié des CSC de MB (Gong et al., 2018). En effet, Gong *et al.*, ont observé que NRP1 était surexprimé dans les CSC de MB et que lorsque NRP1 était inhibé par le peptidomimétique MR438, les CSC se différenciaient en perdant la présence de marqueurs souches et leur capacité d'auto-renouvellement. L'effet différenciant du MR438 sur les CSC de médulloblastome a donc été envisagé en association avec la radiothérapie pour favoriser l'effet de la radiothérapie sur cette population cellulaire. Les travaux antérieurs réalisés lors de la thèse de C. Gong ont permis d'étudier l'effet de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie *in vitro* et dans des modèles hétérotopiques de MB. Le MR438 a eu un effet radiosensibilisant *in vitro* sur les CSC issues de trois lignées différentes : DAOY, D283-Med et D341-Med représentant respectivement les sous-groupes SHH et 3/4 de MB. Les travaux *in vivo* de thèse de C. Gong ont démontré une amélioration de la survie des animaux et une baisse de la croissance tumorale dans le modèle hétérotopique de la lignée DAOY du sous-groupe SHH. Par conséquent, nous avons tenu à évaluer l'effet de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie dans un modèle orthotopique de MB, en utilisant un modèle DAOY luciférase, développé et caractérisé au laboratoire, afin de prendre en compte le microenvironnement tumoral au niveau du système nerveux central.

Dans un premier temps, nous avons traité les souris porteuses d'une tumeur de MB dans l'hémisphère droit du cervelet pendant cinq jours de radiothérapie, avec un total de 10 Gy (5 x 2 Gy), et de trois injections du MR438 à une dose de 10mg/kg. Le suivi de croissance tumorale de ces souris a montré que le MR438 seul n'avait aucun effet sur le développement de la tumeur et la survie des animaux. En revanche, l'association des deux traitements s'accompagne d'une amélioration de la survie et d'un retard de la croissance qui est significatif comparé au groupe CTL contrairement au groupe RT seule à J50 post-transplantation des tumeurs. Nous avons pu

constater un effet radio-potentialisant du MR438. En effet, l'association des traitements augmentait d'un facteur 2,67 la médiane de survie des animaux par rapport aux mêmes traitements administrés séparément : (RT + MR438) = 8 jours alors que (RT) + (MR438) = 3 jours. Ces résultats confirment ceux précédemment observés dans un modèle hétérotopique de MB (Thèse de C. Gong) même si aucune différence significative n'a pu être mise en évidence lors d'une comparaison avec le groupe RT seule. Au niveau protéique, les analyses histologiques réalisées n'ont pas montré de baisse de l'expression de NRP1 à la suite d'un traitement MR438 seul ou RT + MR438. Ceci peut s'expliquer par le fait que les analyses ont été réalisées en point final de l'expérience, soit une trentaine de jours en moyenne après le traitement, le MR438 n'agissant probablement plus à ce stade de l'expérience au vu du suivi de bioluminescence jusqu'au terme de l'expérience et de la survie des animaux (médiane de survie MR438 = 64 jours ; RT + MR438 = 72 jours). Cependant, des expériences complémentaires ont été réalisées pour évaluer les effets de l'association RT + MR438 après 15 jours de traitement et sont en cours d'analyses.

D'autre part, il a été précédemment montré par Nasarre *et al.* qu'un peptide antagoniste de NRP1 pouvait diminuer la croissance tumorale dans un modèle de gliome en ciblant directement les cellules tumorales ou les cellules des vaisseaux sanguins (Nassarre et al., 2010). Contrairement à ce travail, nous n'avons pas observé d'effet antiprolifératif avec le composé seul ou associé à la RT sur les cellules de MB. Snuderl *et al.* ont obtenu des résultats similaires aux nôtres sur la prolifération cellulaire en inhibant l'expression génique de NRP1 dans un modèle *in vivo* obtenu à partir de la lignée de médulloblastome D283-Med (Snuderl et al., 2013). De plus, nous n'avons pas observé de fluctuation du pourcentage de cellules positives à Col IV dans nos échantillons selon les différents traitements. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que nous n'avons pas observé d'effet sur les cellules endothéliales du composé MR438 *in vitro* (Richard et al., 2016). Snuderl *et al.* ont obtenu des résultats similaires lors de l'inhibition de la voie PIGF/NRP1 dans le MB, ne montrant qu'un effet modeste sur l'angiogenèse avec aucun changement concernant le diamètre des vaisseaux et leur perméabilité vasculaire (Snuderl et al., 2013). Dans notre étude, nous n'avons pas élucidé les voies moléculaires impliquées à la suite de l'inhibition de NRP1 par le MR438. Précédemment, dans les travaux *in vivo* de thèse de C. Gong, le MR438 contribuait à l'inactivation de la voie PI3K/Akt. Il serait donc intéressant de vérifier les processus moléculaires impliqués afin de mieux comprendre les mécanismes liés à l'amélioration de la survie des souris après une semaine de traitement RT + MR438.

Concernant les CSC, le marqueur CD15 a été étudié dans ce modèle, montrant une baisse significative de son expression après un traitement par le MR438 seul confirmant les résultats de Gong *et al.* sur la capacité du MR438 à différencier les CSC via l'inhibition de NRP1 (Gong *et al.*, 2018). Étonnamment, cet effet est effacé lors de l'ajout de la radiothérapie. En effet, les échantillons du groupe RT seule et RT + MR438 ont significativement plus de cellules positives au CD15 que les autres groupes. Ces résultats vont à l'encontre des résultats précédemment observés *in vitro* sur la radio-sensibilisation des CSC de MB ainsi que les résultats *in vivo* des travaux de thèse de C. Gong où l'ajout de la RT n'affectait pas l'expression du CD15 dans le modèle DAOY. L'expression du CD15 étant évaluée au point final de l'expérience, soit une trentaine de jours en moyenne après le traitement, l'efficacité du MR438 est compromise, et à ce stade, l'ajout de la RT semble sélectionner les CSC qui sont connues pour être radiorésistantes (Mercurio, 2019; Nunes *et al.*, 2018). Bien que le CD15 soit un marqueur spécifique des CSC des tumeurs cérébrales (Read *et al.*, 2009), nous sommes conscients qu'un seul marqueur des CSC n'est pas suffisant pour identifier une population cellulaire, c'est pourquoi des analyses sont prévues avec d'autres marqueurs de CSC comme Sox2 (Vanner *et al.*, 2014) et le CD133 par exemple (Singh, Hawkins, *et al.*, 2004).

Devant les résultats encourageants de l'association RT + MR438 après une semaine de traitement, nous avons tenté de prolonger l'effet du MR438 en augmentant la période de traitement à deux semaines. Le but étant également de se rapprocher d'un schéma thérapeutique plus proche de celui utilisé actuellement en clinique, où le traitement de RT est étalé sur une durée de cinq à six semaines. Or l'étalement d'une même dose de radiothérapie diminue fortement son efficacité (Pinel *et al.*, 2006). Les résultats ont montré une réduction de la croissance tumorale pour le groupe RT + MR438 similaire au groupe RT seul à J50 post-transplantation. Malheureusement l'association des deux traitements n'a pas eu l'effet escompté sur la survie des souris contrairement aux souris traitées par la RT seule. En effet, la combinaison des deux traitements semble avoir un effet précoce sur le développement de la tumeur mais perd tout effet bénéfique quelques semaines après la fin des traitements.

Au niveau de l'expression de notre protéine d'intérêt, on remarque une baisse significative des cellules positives à NRP1 à J15 post-traitement alors qu'en fin d'expérience les cellules positives à NRP1 sont nettement plus présentes. L'étude de Tsutsumi *et al.* a constaté qu'après une irradiation plus prononcée d'une dose unique à 10 Gy, on retrouvait une surexpression de NRP1 dans les cellules tumorales, qui pourrait expliquer l'augmentation des cellules NRP1 positives par une sélection clonale dans les tumeurs à la fin de l'expérience (Tsutsumi *et al.*, 2021). De même pour l'expression de CD15, RT + MR438 diminue

significativement le pourcentage de cellules positives au CD15 à J15 post-traitement alors que ce pourcentage semble être augmenté en comparaison au groupe CTL à la fin de l'expérience. Là encore, ces résultats pourraient être expliqués par une sélection des cellules résistantes à la RT, des CSC, après un traitement long et donc de plus fortes doses cumulatives d'irradiations.

De plus, l'analyse de la vascularisation des tumeurs à la fin des expérimentations, après un traitement étalé sur deux semaines, montrent que le nombre des vaisseaux sanguins n'est pas diminué mais que leur surface est augmentée par l'association des deux traitements. Afin de développer des stratégies thérapeutiques plus efficaces dans le traitement du médulloblastome, des études plus approfondies des mécanismes moléculaires de la signalisation NRP1 des cellules souches cancéreuses sont nécessaires pour élucider le rebond des cellules positives à NRP1 observé après deux semaines de traitement. Nous pouvons spéculer que la non-réponse au traitement de deux semaines est peut-être due à une sélection de cellules tumorales résistantes à l'inhibition de NRP1 ou à des mécanismes d'échappement impliquant la vascularisation.

En conclusion, ce travail souligne le potentiel intérêt de cibler NRP1, en association avec de faibles doses cumulées de radiothérapie (2 Gy/jour durant 5 jours), pour limiter la progression du MB en ciblant le nombre de CSC. L'inhibition de NRP1 via MR438 pourrait augmenter la radiosensibilité des CSC de médulloblastome, notamment à faible dose d'irradiation et ceci pourrait être vérifié par une étude comparant l'association du MR438 avec une dose de RT à 1 Gy/jour versus RT à 2 Gy/jour sans MR438. L'effet alors attendu en pratique clinique serait une diminution des séquelles pour une efficacité identique. De plus, de nouvelles études restent nécessaires pour explorer le mécanisme de régulation de NRP1, en lien avec les CSC, dans la progression du MB. Devant les effets bénéfiques mais précoces de l'association des traitements, il serait intéressant de poursuivre les expériences afin d'optimiser l'association thérapeutique, par exemple en augmentant la durée des injections de MR438 au de-là de la phase de traitement par RT, afin d'éventuellement s'affranchir du rebond des tumeurs observé en fin d'expérience. Par ailleurs, la différence de résultats sur nos modèles hétérotopiques (Thèse de C. Gong) et orthotopiques laisse suggérer une implication du microenvironnement tumoral. Plusieurs études ont déjà montré l'influence que pouvait jouer le microenvironnement de la tumeur dans la réponse aux traitements. Afin d'éclaircir ce point, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'inhibition de NRP1 sur le microenvironnement du médulloblastome dans la réponse à la radiothérapie. C'est pourquoi, dans la troisième partie de mes résultats de thèse, nous tenterons d'évaluer l'effet du MR438 associé à la radiothérapie sur les cellules

résidentes dans le SNC, comme la microglie et les astrocytes, en travaillant sur des modèles 2D et 3D de coculture *in vitro*.

Tableau 5 : Bilan des résultats de l'effet de l'inhibition de NRP1 associée à la radiothérapie dans un modèle de xénogreffes orthoptiques de médulloblastome

Légende : – = sans effet ; ↑ = augmentation ; ↓ = diminution

|   | Traitement court<br>(5 jours) |                    |                    | Traitement long<br>(10 jours)              |  |  |
|---|-------------------------------|--------------------|--------------------|--|--|--|
| Schéma thérapeutique                            |                               |                    |                    |  |  |  |
| Traitements                                     | MR438                         | RT                 | RT + MR438         | MR438                                      | RT   | RT + MR438                                 |
| Evolution de la croissance tumorale (à J50)     | –                             | –                  | ↓                  | –  | ↓  | ↓  |
| Survie des animaux                              | –<br>(64 jours)               | ↑<br>(67 jours)    | ↑↑<br>(72 jours)   | ↓<br>(59 jours)                            | ↑↑<br>(79 jours)                           | ↑<br>(74,5 jours)                          |
| Expression NRP1                                 | –<br>(Point final)            | –<br>(Point final) | –<br>(Point final) | – (J15 post-traitement)<br>– (Point final) | ↓ (J15 post-traitement)<br>↑ (Point final) | ↓ (J15 post-traitement)<br>↑ (Point final) |
| Expression CD15, (cellules souches cancéreuses) | ↓<br>(Point final)            | ↑<br>(Point final) | ↑<br>(Point final) | – (J15 post-traitement)<br>– (Point final) | – (J15 post-traitement)<br>– (Point final) | ↓ (J15 post-traitement)<br>– (Point final) |
| Expression Ki67, (prolifération cellulaire)     | ↑<br>(Point final)            | –<br>(Point final) | –<br>(Point final) | – (J15 post-traitement)<br>– (Point final) | – (J15 post-traitement)<br>– (Point final) | – (J15 post-traitement)<br>– (Point final) |
| Vascularisation des tumeurs                     | –<br>(Point final)            | –<br>(Point final) | –<br>(Point final) | –<br>(Point final)                         | –<br>(Point final)                         | ↑<br>(Point final)                         |

### **III. Effets de l'inhibition de NRP1 sur le microenvironnement tumoral du médulloblastome**

#### **1. Contexte**

Le microenvironnement tumoral est une niche de cellules à proximité des cellules tumorales qui peut stimuler la progression du cancer. La complexité cellulaire du microenvironnement tumoral est associée à la croissance tumorale, aux métastases et à la réponse aux traitements. Les tumeurs cérébrales sont composées non seulement de cellules tumorales et de cellules souches, mais également de composants associés à la tumeur tels que les cellules vasculaires et immunitaires, comme la microglie, les astrocytes et la matrice extracellulaire. Ces cellules associées à la tumeur pourraient faire l'objet de thérapies ciblées afin d'améliorer les résultats cliniques des patients.

Le médulloblastome (MB) est décrit comme étant une tumeur froide, c'est-à-dire à faible potentiel immunogène, avec une faible infiltration de cellules immunitaires. En revanche, la population immunitaire infiltrant le MB est spécifique et varie en fonction des différents sous-groupes (Bockmayr et al., 2018). Dans cette étude, différentes populations de cellules immunitaires ont été étudiées et les tumeurs du sous-groupe SHH ont montré un microenvironnement tumoral plus distinctif des autres sous-groupes de MB. En particulier, elles présentaient un plus grand nombre de lymphocytes T, de fibroblastes et de cellules de la lignée monocyttaire ainsi qu'un nombre inférieur de neutrophiles, comparé aux autres sous-groupes de MB (Bockmayr et al., 2018). Ces différences de microenvironnement tumoral, entre les différents sous-groupes de MB, pourraient expliquer, en partie, les différentes réponses aux traitements dans ces tumeurs.

Globalement, dans le système nerveux central (SNC), la population immunitaire majoritaire est représentée par la microglie qui représente 10% des cellules gliales. La microglie, représentant l'ensemble des macrophages résidants dans le SNC, sera le premier niveau de défense contribuant à la réponse immunitaire. L'environnement du MB est donc principalement composé de cellules microgliales (Ginhoux & Merad, 2011) mais aussi d'astrocytes. Les astrocytes sont des acteurs clés du microenvironnement cérébral et jouent un rôle critique dans la progression du MB. Le MB est une tumeur enrichie en astrocytes qui sécrètent la protéine SHH dans le microenvironnement tumoral (Y. Liu et al., 2017). Les protéines SHH sécrétées par les astrocytes activent la signalisation dans le stroma environnant,

ce qui fournit un microenvironnement favorable à la prolifération et la croissance tumorale du MB (Y. Liu et al., 2017).

La neuropiline-1 (NRP1), connue pour son implication dans le système immunitaire, semble jouer un rôle important dans l'activation et la polarisation microgliale (Nissen et al., 2013). En particulier, il a été démontré que la polarisation M2 de la microglie peut être bloquée par une molécule inhibitrice du domaine b1 de NRP1, EG00229 (Jarvis et al., 2010; Nissen et al., 2013). Plus récemment, les travaux de Myauchi *et al.* ont mis en avant l'implication de NRP1, via son expression sur la microglie, dans la progression de tumeurs cérébrales adultes telles que le gliome. L'inhibition de l'expression de NRP1 sur la microglie a pour effet de retarder la croissance tumorale et d'améliorer la survie des animaux tout en contribuant à augmenter l'infiltrat microglial au sein de la tumeur (Miyuchi et al., 2016, 2018).

Devant l'importance du microenvironnement tumoral et le possible lien entre NRP1 et la microglie, dans la troisième partie de ce travail de thèse, **nous avons cherché à évaluer l'impact de l'inhibition de NRP1 sur le microenvironnement tumoral**, en particulier les cellules résidentes dans le SNC, comme la microglie et les astrocytes, en travaillant sur des modèles 2D et 3D de coculture *in vitro*.

## 2. Matériels et Méthodes

### 2.1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire humaine de MB, DAOY (Jacobsen et al., 1985), provient de l'ATCC (Manassas VA, USA). Les cellules sont maintenues dans du milieu MEM (Gibco, Life Technologies Corporation, UK), contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF, SIGMA, USA), 1% de L-glutamine (SIGMA, UK), 1% d'acides aminés non-essentiels (Gibco, UK), 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco, UK) et 1% de sodium de pyruvate (Gibco, UK) à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

Les lignées du microenvironnement tumoral utilisées sont la lignée microgliale HMC3 (CRL-3304™) et la lignée astrocytaire C8D1A (CRL-2541™) provenant de l'ATCC (Manassas VA, USA). Les cellules sont maintenues dans du milieu DMEM (Gibco Life Technologies Corporation, UK) et du milieu DMEM (ATCC, USA) respectivement, celui des HMC3 étant supplémenté avec 10% de SVF (SIGMA, USA) et celui des C8D1A avec 10% de SVF (SIGMA, USA), 2% de L-glutamine (SIGMA, USA) et 1% de Pénicilline/Streptomycine (GIBCO, UK) ; à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

|                                      | <b>DAOY</b>                           | <b>HMC3</b>  | <b>C8D1A</b>                                       |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--|--|
| <b>Organisme</b>                     | Médulloblastome d'un garçon de 4 ans. | Microglie primaire dérivée de cerveau fœtal humain | Astrocytes dérivés de cervelet de souris postnatal |
| <b>Tissu</b>                         | Cervelet                              | Cerveau  | Cervelet   |
| <b>Sous-groupe moléculaire de MB</b> | SHH                                   | -  | -  |
| <b>Propriétés de croissance</b>      | Cellules adhérentes                   | Cellules adhérentes                                | Cellules adhérentes                                |
| <b>Morphologie</b>                   | Polygonale                            | Macrophage   | Neuronale  |

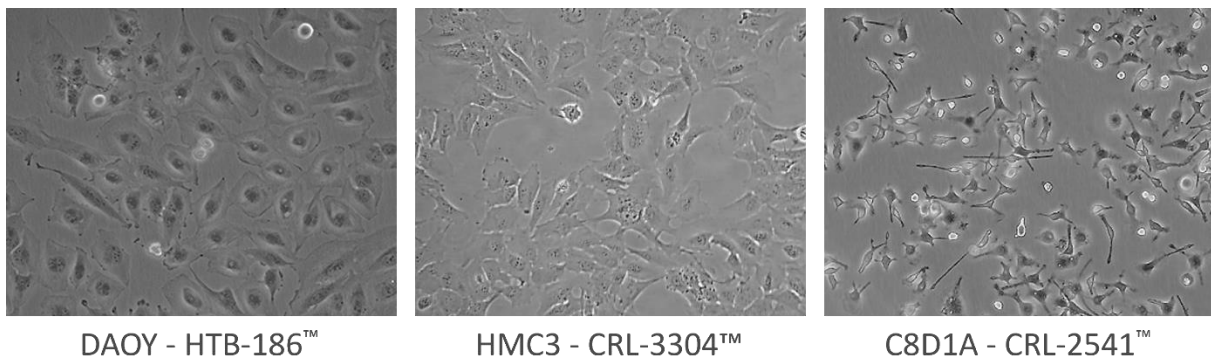


Figure 40 : Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées pour l'étude du microenvironnement tumoral du médulloblastome

## 2.2. Infection des cellules de médulloblastome et de microglie par lentivirus

Afin de réaliser un suivi *in vitro* des cellules par microscopie de fluorescence, les lignées cellulaires ont été transduites pour permettre l'expression cytoplasmique de la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein), pour la lignée DAOY, et la protéine fluorescente RFP (Red Fluorescent Protein) pour la lignée HMC3. Pour la transfection de la lignée DAOY en GFP, des lentivirus possédant un vecteur contenant le gène codant la protéine fluorescente GFP sont utilisés pour l'infection (pLV-EF1A-GFP-PGK-Puro, Cellomics Technology). La lignée HMC3 a été infectée par un lentivirus contenant le gène de la RFP (pLV-EF1A-RFP, Cellomics Technology). Les cellules ont par la suite été sélectionnées en ajoutant un antibiotique, la puromycine (concentrée à 2 µg/mL), pour n'obtenir que les cellules exprimant le gène transfecté. Les lignées obtenues à la suite de ces infections lentivirales sont les suivantes : DAOY-GFP et HMC3-RFP.

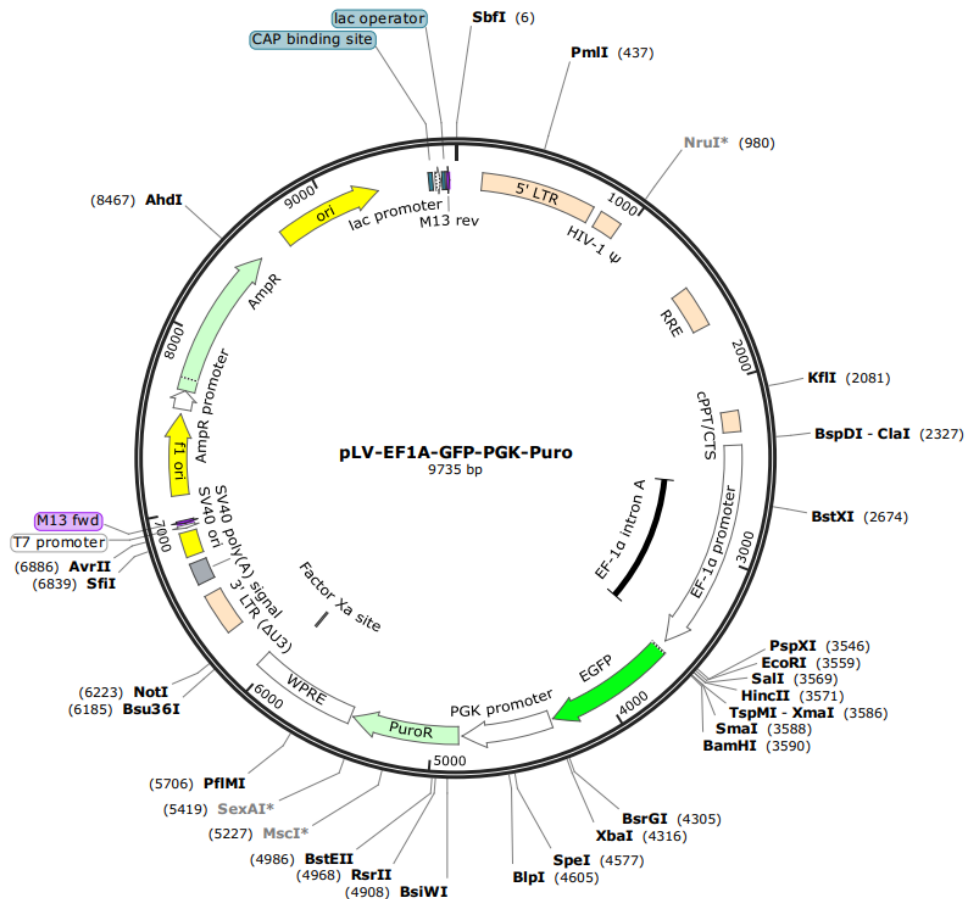


Figure 41 : Cartographie du lentivirus pLV-EF1A-RFP

Ce lentivirus de 8 417pb possède la séquence codant la protéine RFP sous le contrôle du promoteur EF1a une cassette de résistance à la puromycine qui permet la sélection des cellules ayant intégrées le lentivirus.

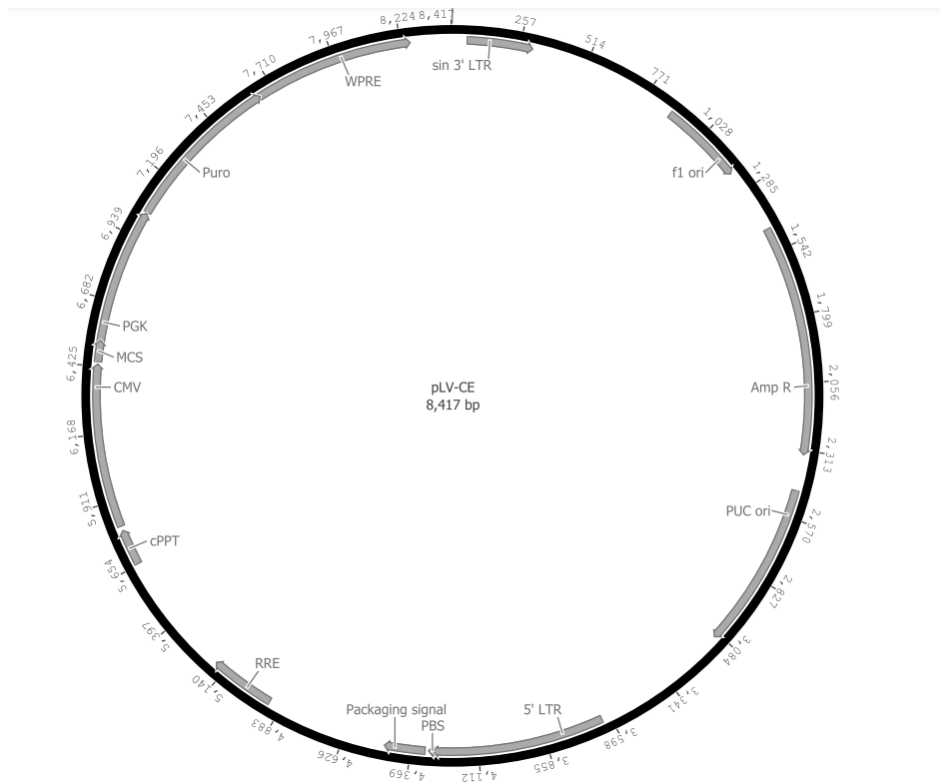


Figure 42 : Cartographie génétique du lentivirus pLV-EF1A-GFP-PGK-Puro

Ce lentivirus de 9735pb possède la séquence codant la protéine GFP sous le contrôle du promoteur EF1a et une cassette de résistance à la puromycine qui permet la sélection des cellules ayant intégrées le lentivirus.

### 2.3. Culture des médullosphères, traitements et récupération des milieux conditionnés

La lignée cellulaire de MB est cultivée dans du DMEM/F12 (GibcoUK), supplémenté en B27 et N2 (Gibco, Life Technologies Corporation, USA), 20 ng/mL du facteur de croissance épidermique recombinant humain (EGF) et du facteur de croissance des fibroblastes (bFGF) (EGF and FGF de Miltenyi Biotec, Germany), pendant une semaine en présence de méthylcellulose (1 :100, SIGMA, USA) pour favoriser la formation de médullosphères.

Une fois les médullosphères formées, elles sont traitées au MR438 à une concentration de 25µmol/L, pendant 48h ou 72h, puis irradiées à une dose de 2 Gy réalisée par un irradiateur X-RAD 320 (Precision X-Ray INC., North Branford, CT, USA). L'ensemble des conditions de traitements sont les suivantes : non-traitées = contrôle (CTL), irradiation à 2 Gy, (RT), traitement de 48h au MR438, (MR438 48h), traitement de 72h au MR438 (MR438 72h), traitement de 48h au MR438 suivi d'une irradiation à 2 Gy, (MR438 48h + RT), traitement de 72h au MR438 suivi d'une irradiation à 2 Gy (MR438 72h + RT). Le milieu conditionné sera récupéré 24h post-traitement, après une centrifugation à 300G pendant 10 minutes et conservé à -20°C pour les différentes expérimentations.

Pour chacune des expériences utilisant les milieux conditionnés, deux conditions contrôles supplémentaires ont été utilisées : un contrôle avec le milieu de référence des cellules microgliales (noté HMC3) et un contrôle avec le milieu utilisé pour la culture des neurosphères (noté NS), en plus du contrôle, noté CTL, faisant référence au milieu conditionné des médullosphères non-traitées.

#### 2.4. Etude de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée par un test MTT. Le test MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide, Acros Organics™) est réalisé à partir d'une solution MTT à 2,5mg/ml déposée sur les cellules, et incubée pendant 3h. Après l'incubation, du DMSO est ajouté sur le tapis cellulaire puis l'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à 540 nm.

#### 2.5. Analyse de l'expression des protéines par Western blot

Le Western blot a été réalisé pour l'analyse de l'expression protéique de NRP1. Le tampon de lyse cellulaire de la protéine totale contenant 10 % de protéases (Roche, Allemagne), 1% Cocktail 2 et 3 (Sigma-Aldrich, Allemagne) était utilisé pour la lyse des cellules. Un dosage Bradford a été réalisé pour déterminer la concentration de protéines via une lecture d'absorbance à 595 nm avec un spectrophotomètre. Les aliquots de protéines (50 µg) étaient dénaturés dans le tampon Laemmli contenant du β-mercaptoéthanol avant la migration par SDS électrophorèse sur gel Stain Free (Biorad, Etats-Unis) pendant 30 à 40 min à 200V. Les protéines séparées ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose (Biorad, Etats-Unis) via le Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Biorad, Etats-Unis).

Après avoir bloqué la membrane avec du tampon Tris avec 0,1 % de Tween-20 et 5 % de sérum bovin albumine dans un délai d'une heure, l'anticorps primaire anti-NRP1 (#3725, CellSignalisation, dilution 1:1000) a été incubé pendant une heure à température ambiante, puis l'anticorps secondaire anti-lapin HRP (Horseradish Peroxidase) (#A21429, Invitrogen, dilution 1:10000) pendant 30 min à température ambiante. Le kit de révélation ECL Prim (Amersham™) a été utilisé pour la révélation des bandes à l'aide du densitomètre (ChemiDoc™, Biorad, Etats-Unis).

La quantification de la densité des bandes obtenues est réalisée par rapport à la quantité de protéine totale obtenue et quantifiable grâce aux gels Stain Free sur le logiciel ImageLab.

## 2.6. Coculture et mesure de la croissance tumorale *in vitro* par bioluminescence

Les cellules DAOY-LUC sontensemencées à une concentration cellulaire de  $1.10^4$  cellules/mL dans des puits de plaque 6 puits (Falcon®, #353046) en même temps que les cellules microgliales, HMC3, et/ou astrocytaires, C8D1A, à une concentration cellulaire équivalente aux cellules tumorales (ratio 1 :1). L'ensemble de la coculture est traité pendant 72h avec le MR438 puis irradié à 2 Gy. Ensuite, les cellules sont mises en contact avec le substrat de la luciférase, la luciférine (D-Luciferin Firefly, PerkinElmer® #122799) à une concentration de 150 µg/ml. La bioluminescence a ensuite été imagée via l'Optimax®, sur plusieurs jours pour créer une cinétique, puis a été mesurée après traitement des images sur Image J®.

## 2.7. Analyse de la prolifération cellulaire après culture dans les milieux conditionnés

Les cellules microgliales, HMC3-RFP, sontensemencées à  $1.10^4$ cellules/mL par puits, dans plaque de culture de 24 puits à fond en verre (Eppendorf® #0030741021), avec leur milieu de référence (DMEM (Gibco Life Technologies Corporation, UK)). Après 24h, le milieu est changé par du milieu conditionné selon les différents traitements préétablis. L'acquisition des images a été réalisée par microscopie de fluorescence via l'ImageXpress® Micro Confocal et le comptage des noyaux via le logiciel MetaXpress (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

## 2.8. Analyse de l'invasion cellulaire après culture dans les milieux conditionnés

Pour évaluer l'invasion des cellules microgliales *in vitro*, nous avons réalisé des essais basés sur les chambres de Boyden ou Transwell chamber. Les chambres de Boyden sont préparées en amont, du matrigel® (Corning® Matrigel®) est ajouté dans chacun des inserts, dilué dans du milieu de culture sans SVF à une concentration de 20 µg/insert, puis incubé 1h à température ambiante. Les cellules HMC3-RFP y sontensemencées à  $2.10^5$  cellules/mL dans un volume de 500 µL par insert. En fond de puits sont déposés 700 µL du milieu de culture ou de milieu conditionné selon les différents traitements. Après 24h, les cellules ayant migrées sont fixées au paraformaldéhyde (PAF) 4% pendant 10 min. Puis, un marquage au Hoechst est réalisé, dilué au  $1/3000^{\text{ème}}$ . Après 30 minutes d'incubation, les inserts sont rincés au DPBS puis pris en photo par un microscope de fluorescence (imageXpress®, Micro Confocal).

L'analyse de l'invasion des cellules se fait par un comptage des noyaux sur plusieurs champs via le logiciel MetaXpress (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

## 2.9. Test de recrutement de la microglie sur les médullosphères

Une médullosphère DAOY-GFP est ensemencée dans chacun des puits d'une plaque 96 puits à fond rond (Falcon®, #353072) coatée au polyHema (poly-2-hydroxyethyl methacrylate, Sigma, #P3932) puis elle est recouverte de Matrigel (Matrigel® Matrix, Corning, #353634) dilué au 10<sup>ème</sup> dans du milieu de culture. Après sédimentation du matrigel, les cellules microgliales, HMC3-RFP, sont ensemencées à une concentration cellulaire de 4.10<sup>4</sup> cellules/mL (soit 6000 cellules par puits dans 150 µl). Une image des médullosphères est prise chaque jour pendant une semaine via l'ImageXpress® Micro Confocal pour créer une cinétique.

L'aire de fluorescence rouge, pour les HMC3-RFP, est mesurée sur l'aire en vert, pour les médullosphères GFP+, via le logiciel MetaXpress (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), afin de déterminer le pourcentage de recrutement de microglie sur la médullosphère. Concernant les conditions de traitements, soit les médullosphères ont été traitées post-ensemencement seules avec le MR438 à 25 µmol/L pendant 72h puis une irradiation à 2 Gy, soit l'ensemble de la coculture a été traité dès l'ensemencement pendant 72h avec le MR438 à 25µmol/L suivi d'une dose de RT à 2 Gy.

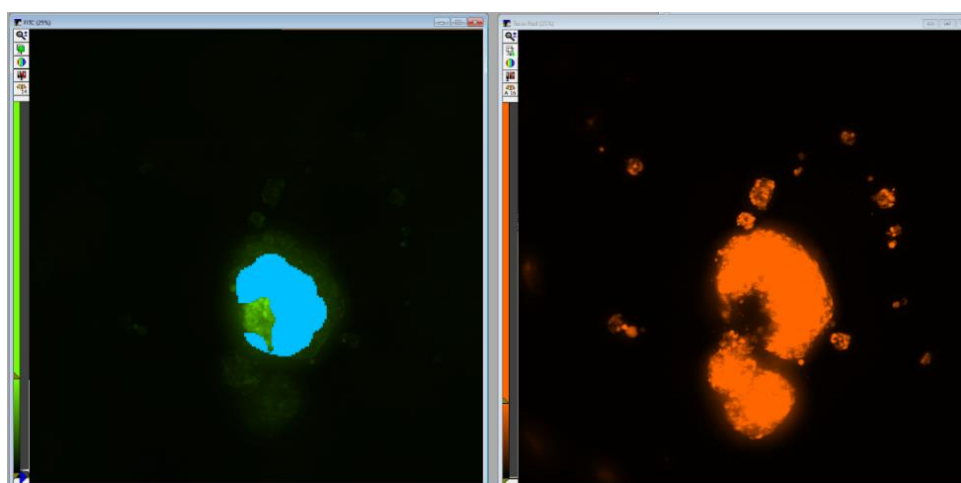


Figure 43 : Mesure du recrutement de la microglie sur les médullosphères

Image représentative du custom module de l'ImageExpress permettant de mesurer le recrutement de la microglie (en rouge) sur la médullosphère (en vert). Le bleu représentant les zones communes aux deux couleurs.

## 2.10. Statistiques

Tous les résultats ont été donnés sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur standard de la moyenne (SEM). Le test non paramétrique de Mann-Whitney et le T-test de Student pour les comparaisons deux par deux, ou une analyse de la variance unidirectionnelle (ANOVA), suivie du test de comparaison multiple de Dunnett, ont été utilisés pour déterminer la signification statistique à l'aide de GraphPad Prism® (GraphPad Prism 8.0, USA). Le nombre d'expériences indépendantes réalisées a été indiqué par « n » dans la légende de chaque figure. Tous les  $p < 0,05$  (marqué par \*) ont été considérés comme significatif et  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  sont marqués par \*\* et \*\*\*, respectivement.

### 3. Résultats

#### 3.1. Impact d'une coculture 2D *in vitro* avec des cellules de microglie et d'astrocytes sur la croissance tumorale du médulloblastome

Dans un premier temps, nous avons voulu connaître l'influence des cellules de microglie et d'astrocyte sur la croissance de notre lignée cellulaire de médulloblastome. Pour cela, nous avons travaillé à partir d'un modèle de coculture 2D *in vitro* où les lignées DAOY-LUC, HMC3 (microglie) et C8D1A (astrocyte) ont étéensemencées en même temps et à la même concentration (Figure 44 A). L'analyse de la bioluminescence des DAOY-LUC nous a permis d'observer que la présence des astrocytes et de la microglie, séparément, augmentait significativement la croissance tumorale des cellules de médulloblastome (d'un facteur 1,90 avec la microglie et de 1,43 avec les astrocytes). La présence de la microglie semble avoir un effet plus important sur l'augmentation de la croissance tumorale comparé aux astrocytes, mais aucune différence significative n'a pu être relevée. De même, la coculture avec les trois lignées cellulaires induisait une augmentation de la croissance des cellules tumorales sans différence significative par rapport aux cocultures simples (Figure 44 A).

La proportion des différentes populations cellulaires n'étant pas égale au niveau du SNC, nous avons voulu tester différentes proportions de cellules du microenvironnement tumoral et l'effet obtenu sur la croissance des cellules tumorales (Figure 44 B). Lorsque le nombre de cellules du microenvironnement est deux fois plus élevé que le nombre de cellules tumorales (coculture 1 :2 ; microglie et astrocytes), nous avons constaté une augmentation de 60% de la croissance des DAOY-LUC. En revanche, lorsque l'on augmente cinq fois plus le nombre de cellules du microenvironnement tumoral, la croissance des DAOY-LUC a été significativement diminuée de 74% en présence de la microglie, suggérant un effet antitumoral de la microglie sur le médulloblastome uniquement à une forte concentration cellulaire. Concernant la coculture avec les astrocytes seuls, cela n'induisait pas d'effet sur la prolifération des cellules tumorales. De même, aucun effet antitumoral n'était observé avec les deux lignées de cellules du microenvironnement. Pour un ratio de 1 :10 (1 cellule tumorale pour 10 cellules du microenvironnement tumoral), on conserve l'effet antitumoral de la microglie (DAOY-LUC = 100% versus DAOY-LUC + HMC3 = 25%) que l'on retrouve également avec les astrocytes seuls avec une baisse significative du même ordre de grandeur. De façon inattendue, pour la coculture avec les trois lignées au ratio 1 :10, cet effet antitumoral semblait moins important avec une baisse non-significative de 33% (Figure 44 B).

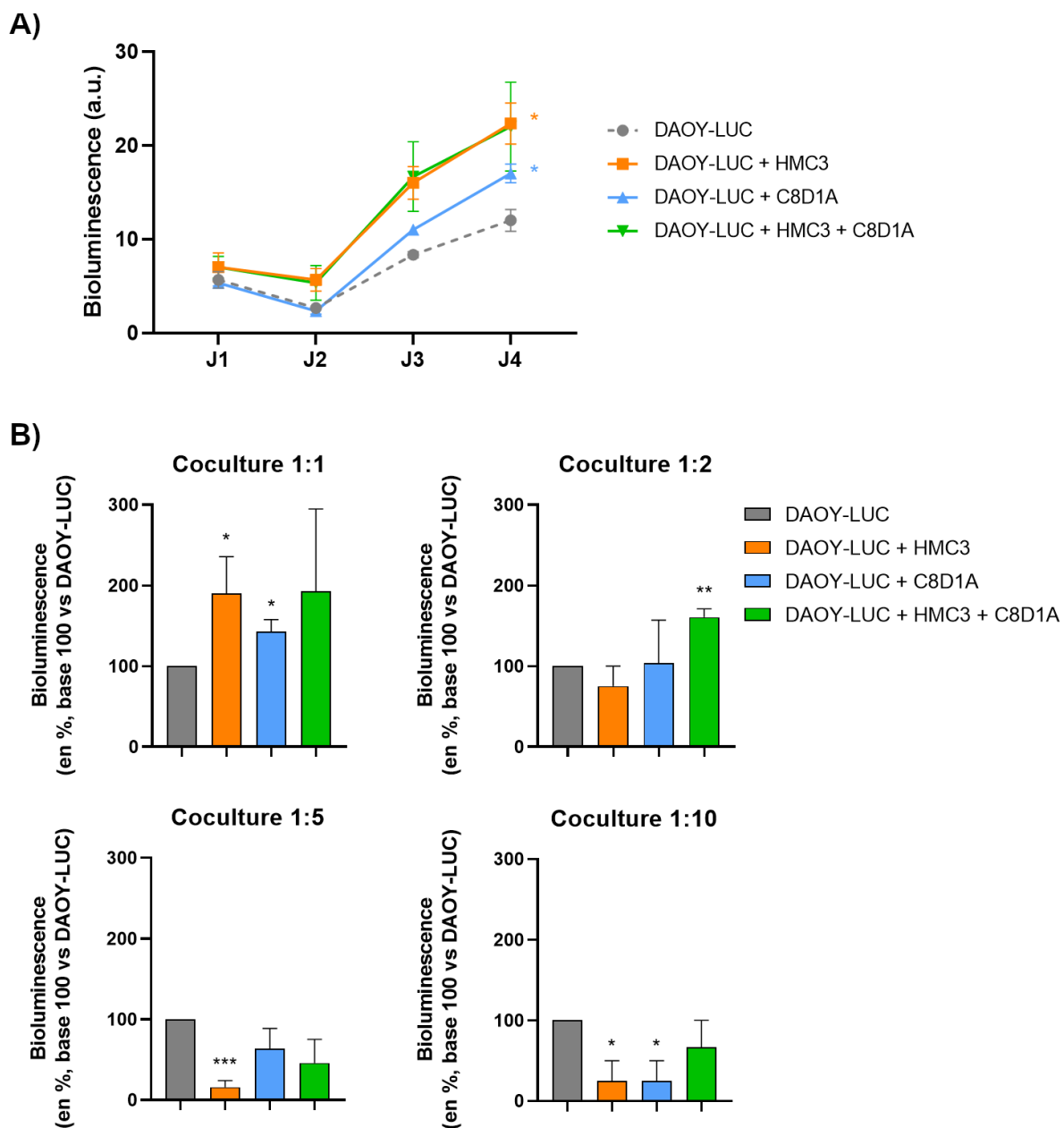


Figure 44 : Etude de la prolifération des cellules de médulloblastome en coculture avec la microglie et/ou les astrocytes

A) Bioluminescence des DAOY-LUC en fonction du temps et selon les différentes conditions de coculture (n=3).

B) Pourcentage de bioluminescence des DAOY-LUC (base 100 vs DAOY-LUC) après quatre jours de coculture avec des cellules microgliales (HMC3) et/ou astrocytaires (C8D1A) en fonction de différents ratios de cellules (1 :1 = une cellule tumorale pour une cellule du microenvironnement tumoral ; 1 :2 = 1 cellule tumorale pour deux cellules du microenvironnement tumoral ; 1 :5 = une cellule tumorale pour cinq cellules du microenvironnement tumoral ; 1 :10 = une cellule tumorale pour dix cellules du microenvironnement tumoral). \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 versus DAOY-LUC ; n=3.

### 3.2. Evaluation de la cytotoxicité de l'inhibition de NRP1 par le MR438 associé ou non à la radiothérapie sur les cellules du microenvironnement du médulloblastome

Tout d'abord, nous avons évalué l'expression de notre protéine d'intérêt au sein de ces différentes lignées, et comme attendu l'ensemble des lignées exprime NRP1, avec une plus forte expression retrouvée pour la lignée DAOY-GFP (d'un facteur 3,7) (Figure 45 B). Par la suite, nous avons vérifié la cytotoxicité du MR438 seul à différentes concentrations sur les différentes lignées utilisées pour nos travaux sur la coculture de lignées du microenvironnement du MB (Figure 45 A). Il s'est avéré que l'inhibition de NRP1 seule n'avait aucun impact sur la viabilité cellulaire de nos différentes lignées. La toxicité du traitement associé à la radiothérapie sur la microglie et les astrocytes a également été évaluée par un test MTT (Figure 45 C et D). Seule l'exposition du MR438 pendant 48h a diminué de manière significative l'activité métabolique des cellules microgliales (1 versus 0,8) (Figure 45 C), contrairement aux astrocytes, dont la viabilité a été augmentée de manière significative avec les traitements MR438 72h (facteur 2), RT seule (facteur 1,3) et RT + MR438 72h (facteur 1,4) comparé à la condition contrôle non-traité (CTL) (Figure 45 D).

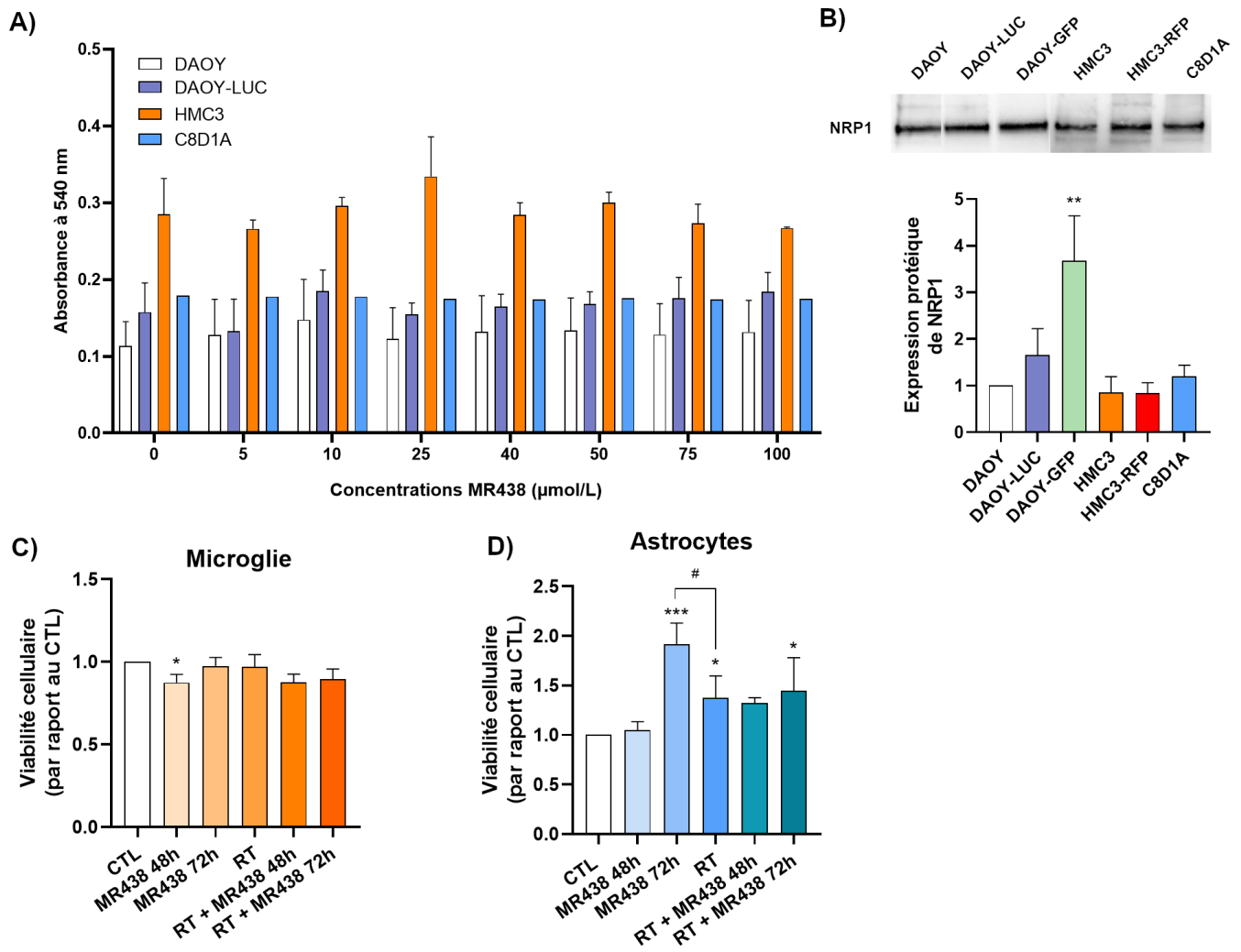


Figure 45 : Etude de la cytotoxicité du MR438 associé ou non à la RT sur les cellules du microenvironnement tumoral du médulloblastome

A) Les cellules de médulloblastome (DAOY et DAOY-LUC) ainsi que les cellules du microenvironnement tumoral (microglie : HMC3 ; astrocytes : C8D1A) ont été mises en culture pendant 72h avec des concentrations croissantes de MR438 (0 µmol/L à 100 µmol/L) et le nombre de cellules métaboliquement actives a été évalué à l'aide d'un test MTT par mesure de l'absorbance à 450nm (n=3 ; astrocytes n=1). B) L'expression de NRP1 a été évaluée par Western Blot dans les différentes lignées de médulloblastome et du microenvironnement tumoral (n=3). La quantification de la densité des bandes obtenues est réalisée par rapport à la quantité de protéine totale obtenue et quantifiable grâce aux gels Stain Free. C) La viabilité de la microglie et des astrocytes (D) a été évaluée par un test MTT, via la mesure de l'absorbance à 450nm, après 48h et 72h de traitement au MR438 (à 25 µmol/L) associé ou non à la radiothérapie (RT). \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 versus CTL ou DAOY ; #p<0,05 versus RT ; (n=4).

### 3.3. Effets de l'inhibition de NRP1 et/ou de la RT sur la croissance tumorale en présence des différentes populations du microenvironnement tumoral

Pour la suite de nos expériences sur nos modèles de coculture 2D, nous avons gardé un ratio de cellules 1 pour 1 afin d'évaluer les modifications induites par nos traitements sur l'effet pro-tumoral observé précédemment avec les lignées du microenvironnement et ceci au cours du temps (Figure 46).

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet de la coculture avec la microglie (HMC3) sur la croissance des DAOY-LUC en fonction des différents traitements. De manière générale, l'inhibition de NRP1 associée ou non à la RT n'a pas d'effet significatif sur la croissance des cellules tumorales en coculture avec la microglie que ce soit aux temps 24h ou 72h après RT. On remarque seulement que la coculture tend à faire diminuer la croissance tumorale de 25% en moyenne, à 24h ou 72h après RT, indépendamment des traitements (Figure 46 B).

Dans un second temps, nous avons évalué l'effet de la coculture avec les astrocytes (C8D1A) sur la croissance des cellules de MB en fonction des différents traitements. Les différents traitements n'ont aucun impact sur la croissance des cellules tumorales en coculture avec les astrocytes aux temps 24h et 72h après RT (Figure 46 C). Tout comme pour la microglie, la coculture avec les astrocytes semble avoir un effet antitumoral, non significatif et indépendamment des traitements, en diminuant en moyenne de 26% le pourcentage de BLI des cellules de MB (Figure 46 C).

Pour finir, nous avons aussi mesuré la bioluminescence des DAOY-LUC en coculture avec les deux populations cellulaires, microglie et astrocyte, après traitement au MR438 associé ou non à la RT. Comme précédemment, aucune différence n'a été statistiquement significative en comparant les différents traitements après 24h et 72h post RT. De plus, la tendance à la diminution de la croissance tumorale en présence de microglie seule et astrocytes seuls n'est plus observée en présence des deux lignées du microenvironnement du SNC (seulement de 17% en moyenne, indépendamment des traitements) (Figure 46 D).

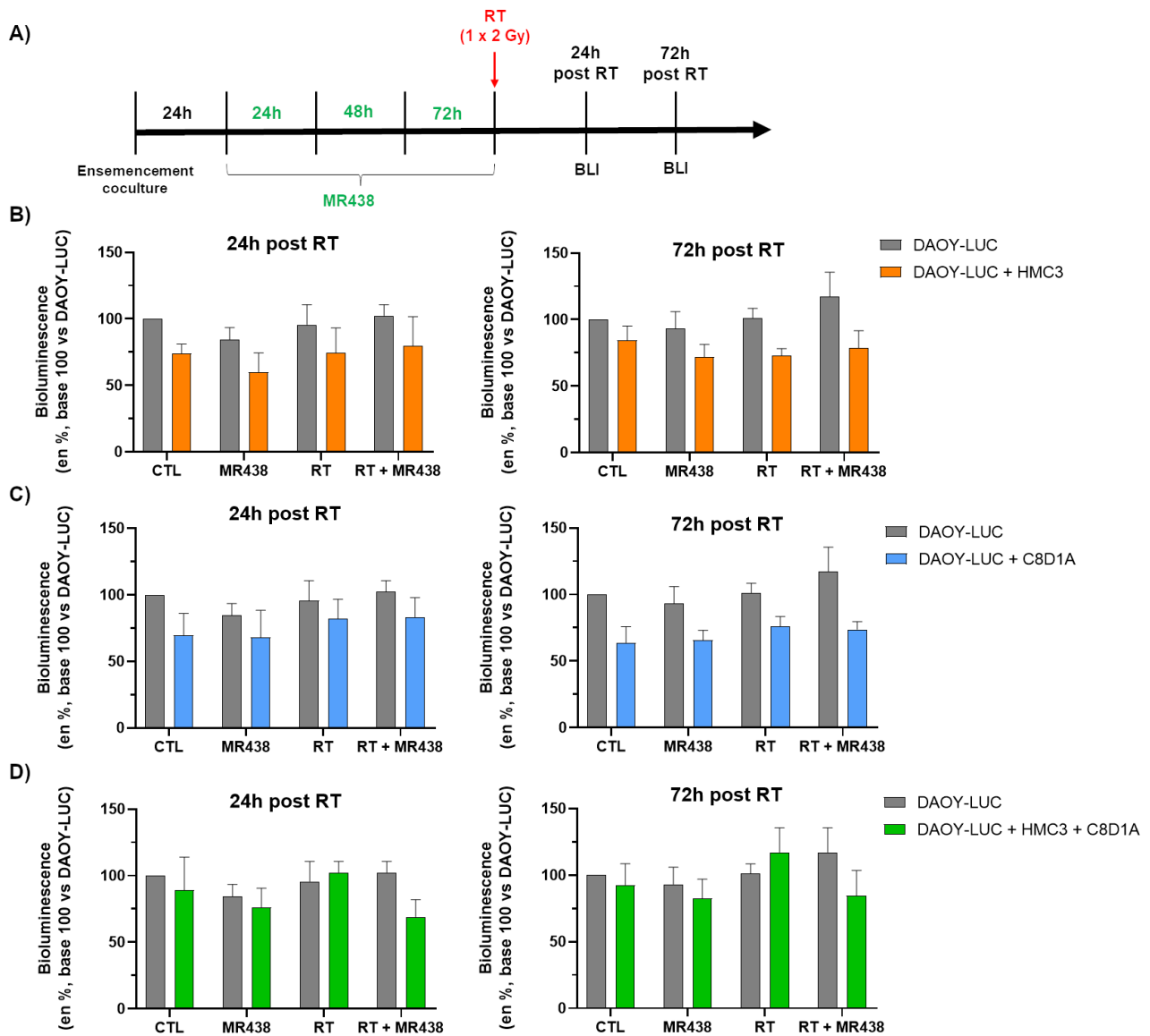


Figure 46 : Effets du MR438 associé à la RT sur la prolifération des cellules de MB mises en coculture avec les cellules du microenvironnement tumoral

A) Schéma représentant le traitement par MR438 et/ou radiothérapie (RT) et le suivi de la croissance tumorale par bioluminescence (BLI) des cellules de médulloblastome en coculture avec les cellules microgliales (HMC3) et/ou astrocytaires (C8D1A). Représentation de la bioluminescence des DAOY-LUC, en fonction des différents traitements pour la coculture avec les cellules microgliales (HMC3) (B), les cellules astrocytaires (C8D1A) (C) et les deux populations cellulaires (HMC3 + C8D1A) (D) 24h post RT et 72h post RT ;  $p > 0,05$  (n=4).

### 3.4. Evaluation des effets directs du traitement au MR438 associé à la radiothérapie sur le recrutement de la microglie par les CSC de médulloblastome dans un modèle 3D *in vitro*

Les médullosphères sont des modèles cellulaires reconnus pour être fortement enrichis en cellules souches, nous avons donc utilisé ce modèle de culture pour évaluer l'effet de l'inhibition de NRP1 sur le recrutement et l'effet antitumoral de la microglie. Pour cela, après la formation de médullosphères, ces dernières ont été mises en culture avec les cellules de microglie, séparées par une couche de matrigel, afin d'évaluer la capacité de recrutement de la microglie à travers une matrice extracellulaire au niveau des médullosphères. L'ensemble de la coculture a été traité après l'ensemencement comme décrit dans la partie « matériels et méthodes » (Figure 47).

Nous nous sommes intéressés aux temps 24h et 72h après RT, cinétique identique aux expériences précédentes. Les analyses concernant l'aire de la microglie sur la médullosphère montrent que 24h après RT, les différents traitements n'ont eu aucune incidence sur le recrutement de la microglie au niveau des médullosphères. En revanche, 72h post RT, on observe une augmentation significative d'un facteur 2,7 pour MR438 seul et d'un facteur de 3,6 pour RT seule et RT + MR438 comparé au contrôle non-traité (MS + HMC3) (Figure 47 C). Cependant, il ne semble pas y avoir d'effet positif de l'association thérapeutique dans ces conditions expérimentales sur le recrutement de la microglie.

Lorsque nous nous sommes intéressés à l'effet cytotoxique sur les médullosphères, la microglie seule diminuait de moitié la prolifération des médullosphères par rapport aux médullosphères seules. Après le pré-traitement par MR438 seul, de façon inattendue l'aire des médullosphères a été significativement augmentée d'un facteur 1,8 24h post-RT en comparaison aux cellules non-traitées (MS + HMC3). Le composé MR438 modifiant probablement l'effet antitumoral de la microglie. L'irradiation seule à 2 Gy n'induisait pas d'effet significatif sur la taille des sphères par rapport aux cellules non traitées quel que soit le temps d'observation. Au temps 72h post-RT, aucune différence significative n'a été relevée quelle que soit la condition expérimentale en comparaison de médullosphères sans traitement (noté MS) (Figure 47 D).

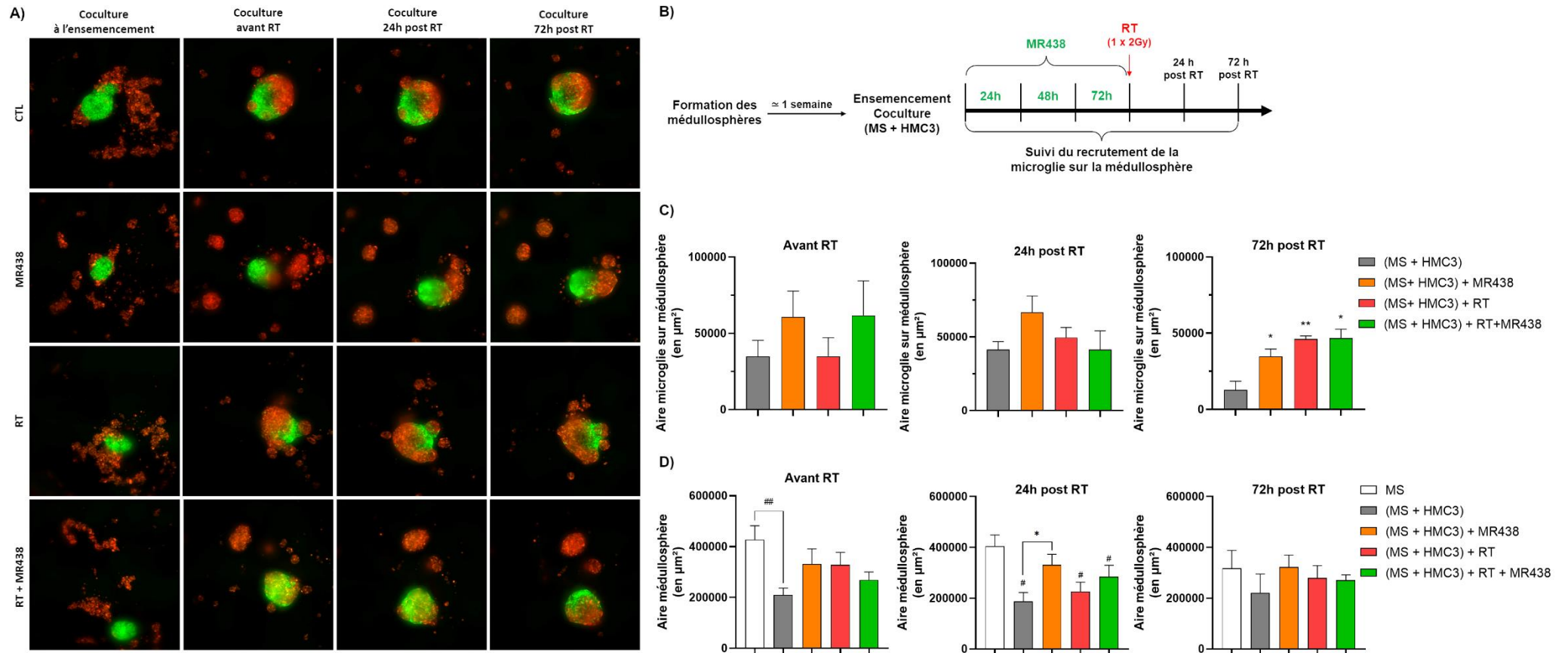


Figure 47 : Effets directs de l'inhibition de NRPI et/ou RT sur le recrutement de la microglie au niveau des CSC de médulloblastome

A) Images de la coculture de la microglie (en rouge) et des médullosphères (en vert) à l'ensemencement, avant la radiothérapie (RT), 24h et 72h post RT. B) Schéma expérimental représentant les conditions de traitement et du suivi du recrutement de la microglie sur les médullosphères. C) Histogrammes représentant l'aire de la microglie (en  $\mu\text{m}^2$ ) recouvrant la médullosphère en fonction des différentes conditions de traitement avant RT ainsi que 24h et 72h post RT. D) Histogrammes représentant l'aire de la médullosphère (en  $\mu\text{m}^2$ ) en fonction des différentes conditions de traitement avant RT ainsi que 24h et 72h post RT. \* $p < 0,05$  versus (MS + HMC3) ; # $p < 0,05$  ; ## $p < 0,01$  versus MS ;  $n = 5$ .

### 3.5. Evaluation des effets indirects du MR438 associé à la radiothérapie sur le recrutement de la microglie par les CSC dans un modèle 3D *in vitro*

Nous avons tenté d'évaluer les effets indirects de l'inhibition de NRP1 associée ou non à la RT sur la microglie en présence des CSC. Pour cela, après la formation de médullosphères en culture, ces dernières ont été traitées avec le MR438 et/ou une dose de radiation à 2 Gy, indépendamment des cellules de microglie. De la même façon que précédemment, les CSC ont ensuite été mises en culture avec les cellules de microglie, séparées par une couche de matrigel, afin d'évaluer l'effet des facteurs solubles libérés des CSC traitées sur le recrutement de la microglie au niveau des médullosphères comme décrit dans la partie « matériels et méthodes » (Figure 48).

De façon intéressante, les résultats ont montré une augmentation significative du recrutement de la microglie lorsque les cellules ont été en contact avec des médullosphères traitées antérieurement avec le MR438 pendant 72h seul et associé à la radiothérapie (Figure 48 C). En effet, les médullosphères traitées par le MR438 augmentaient d'un facteur 3 le recrutement de la microglie et d'un facteur 2,5 pour les médullosphères traitées RT + MR438 comparé au groupe non-traité (noté MS + HMC3). L'aire de la médullosphère a aussi été évaluée afin de discerner un effet cytotoxique des cellules microgliales sur les CSC dans notre modèle 3D. Ces analyses n'ont donné aucune différence significative pour chacun des différents traitements (Figure 48 D).

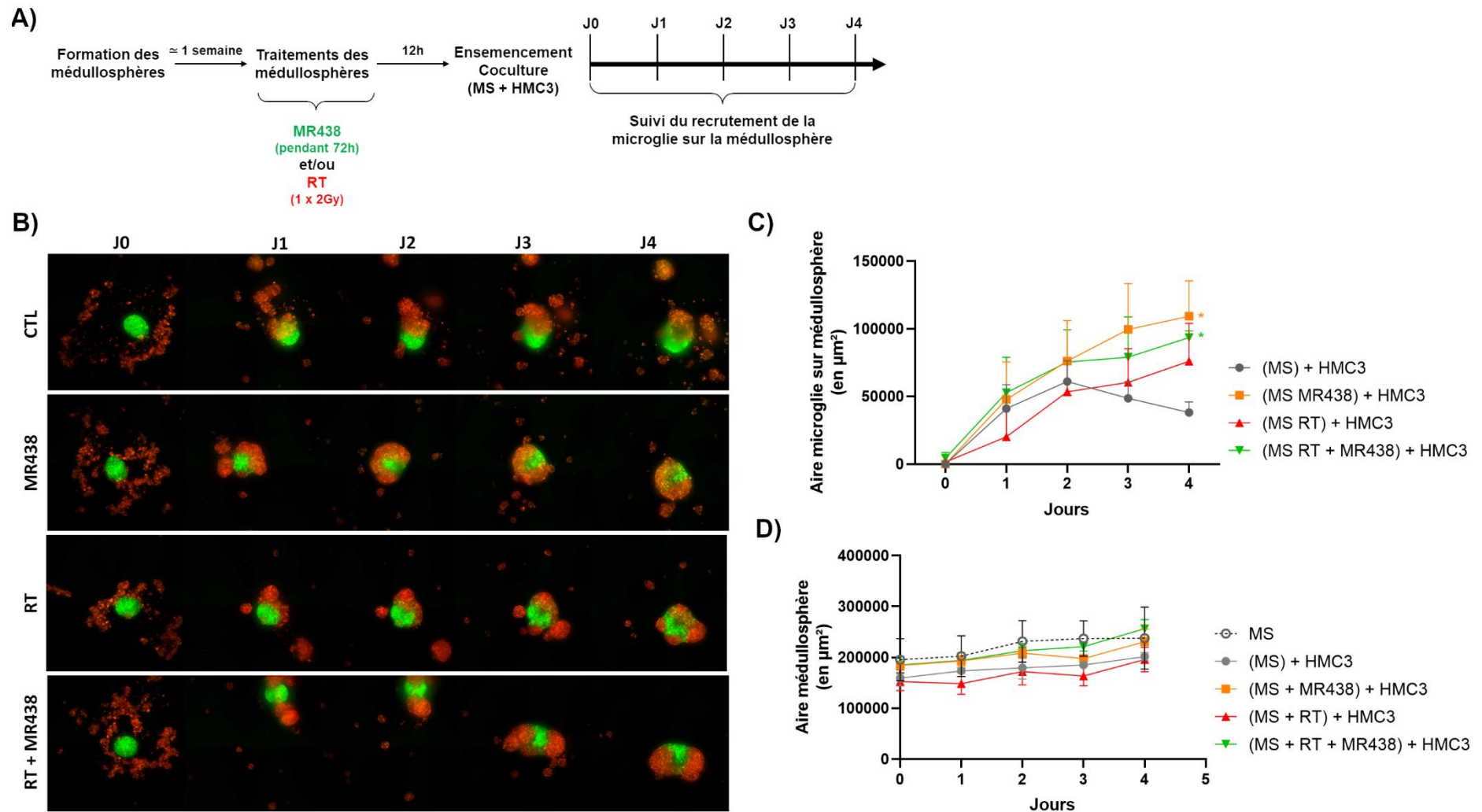


Figure 48 : Effets indirects de l'inhibition de NRP1 et/ou RT sur le recrutement de la microglie au niveau des CSC de médulloblastome

A) Schéma expérimental représentant le déroulement du traitement des médullosphères (MS) et l'analyse du recrutement de la microglie sur les médullosphères après mise en coculture. B) Images de la coculture de la microglie (en rouge) et des médullosphères (en vert). C) Cinétique représentant l'aire de la microglie (en  $\mu\text{m}^2$ ) recouvrant la médullosphère en fonction des différentes conditions de traitement. D) Courbes représentant l'évolution de l'aire de la médullosphère, en  $\mu\text{m}^2$ , en fonction du temps et des différentes conditions de traitement ; \* $p < 0,05$  versus (MS) + HMC3 ; (n=4).

### 3.6. Impact des milieux conditionnés des cellules souches de médulloblastome sur les cellules microgliales

Afin d'évaluer les effets des molécules libérées par les CSC de MB, des milieux conditionnés ont été préparés selon les différentes conditions décrites dans la partie « matériels et méthodes ». Afin de mieux comprendre l'impact des milieux conditionnés sur les cellules microgliales, deux conditions contrôles supplémentaires ont été utilisées : un contrôle avec le milieu de référence des cellules microgliales (noté HMC3) et un contrôle avec le milieu utilisé pour la culture des neurosphères (noté NS), en plus du contrôle, noté CTL, faisant référence au milieu conditionné des médullosphères non-traitées. Les milieux conditionnés ont été mis en contact avec les cellules microgliales pendant 72h afin d'étudier les effets sur la viabilité, la prolifération et l'invasion cellulaire de la microglie (Figure 49).

Concernant la viabilité des cellules après mise en contact avec les milieux conditionnés, on retrouve globalement une baisse de l'activité métabolique des cellules liée à l'ajout de milieu conditionné comparé à leur milieu de référence (noté HMC3) ou du milieu des neurosphères seul (noté NS). De plus, on constate que les traitements par MR438 seul et par RT seule augmentaient significativement la viabilité cellulaire par rapport à la condition contrôle. De manière intéressante, le milieu conditionné des cellules traitées par RT + MR438 72h induisait une baisse significative de l'activité métabolique des cellules de microglie comparé au milieu conditionné RT seule probablement dû à un appauvrissement de facteurs de croissance pour cette condition (Figure 49 A).

De même que précédemment, l'analyse des données de la prolifération cellulaire montre que la mise en contact de la microglie avec les milieux conditionnés engendrait une baisse globale de la prolifération cellulaire (Figure 49 B). Les effets sur la prolifération des cellules microgliales sont probablement dus aux molécules relarguées par les CSC. Ces molécules semblent avoir un effet positif sur la prolifération pour les traitements utilisés de façon indépendante mais l'association thérapeutique tend à fortement diminuer le pouvoir prolifératif de la microglie en particulier à 72h. En revanche, seul le milieu conditionné MR438 48h a augmenté significativement la prolifération des cellules microgliales par rapport à la condition CTL (Figure 49 B).

L'évaluation de l'invasion de la microglie dans les chambres de Boyden nous a permis de voir qu'aucun des milieux conditionnés n'avait d'effets sur la migration des HMC3 à travers le matrigel comparé au milieu conditionné CTL. En revanche, le milieu conditionné RT + MR438 48h montre une invasion significativement diminuée des cellules microgliales comparé au milieu conditionné RT seule (Figure 49 C). Il semblerait donc que la présence des deux

populations (CSC et microglie) soit un facteur important à prendre en compte pour évaluer les propriétés invasives des cellules de la microglie. En effet, la condition RT + MR438 a montré des résultats opposés au travers de ces deux conditions expérimentales (milieux conditionnés / coculture).

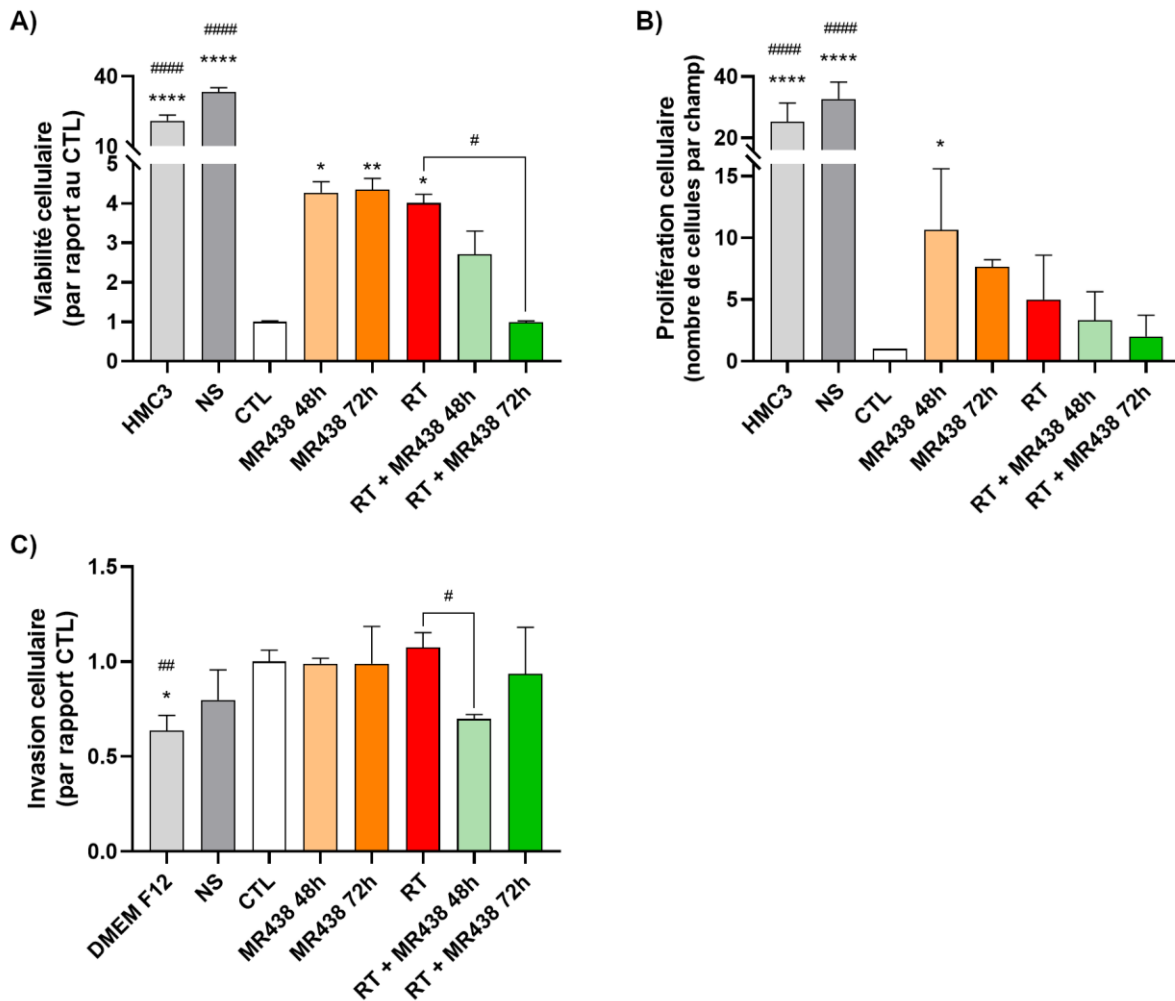


Figure 49 : Etude de l'effet des milieux conditionnés des CSC de médulloblastome sur les cellules microgliales

A) Les cellules de microglie (HMC3) ont été mises en culture avec du milieu conditionné des CSC de MB et le nombre de cellules métaboliquement actives a été évalué à l'aide d'un test MTT par mesure de l'absorbance à 450nm. La prolifération cellulaire (B) et l'invasion cellulaire (C) de la microglie, après 72h de culture dans les différents milieux conditionnés des CSC de MB, ont été évaluées par un comptage noyau, après un marquage au Hoechst, par microscopie de fluorescence. La condition « HMC3 » représentant le milieu de référence de la microglie, la condition « DMEM F12 » représentant le milieu des CSC non supplémenté et la condition « NS » représentant le milieu des CSC supplémenté en facteurs de croissance. \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  versus CTL ; # $p < 0,05$  ; ## $p < 0,01$  ; #### $p < 0,0001$  versus RT ; (n=3).

#### 4. Discussion et conclusion

Ces dernières années, l'interaction entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement tumoral est apparue comme un régulateur crucial de la croissance tumorale et une cible thérapeutique prometteuse. Le microenvironnement tumoral se retrouve modifié au cours du développement tumoral et en réponse aux thérapies, comme la radiothérapie par exemple. Cependant, les mécanismes régulant la communication entre les cellules malignes et non malignes sont encore mal compris, notamment dans le cas du médulloblastome (MB). De manière générale, le MB est considéré comme étant une tumeur « froide » et la conversion en une tumeur « chaude » serait une étape importante vers la mise en place de nouvelles thérapies ciblant le système immunitaire.

De précédentes études transcriptomiques et immunohistochimiques sur des échantillons de patients atteints de MB ont révélé un taux plus élevé de cellules immunitaires dans le sous-groupe SHH comparé aux autres sous-groupes de MB. La population cellulaire la plus présente étant les macrophages/microglie associés à la tumeur (Bockmayr et al., 2018; Margol et al., 2015; Maximov et al., 2019). Notamment, le sous-groupe SHH se distingue des autres sous-groupes par un enrichissement de monocytes et de microglie (Dang et al., 2021).

Nos précédents travaux sur l'implication de NRP1 dans le maintien des CSC de MB a mis en avant un rôle important de NRP1 dans le progression tumorale du MB (Gong et al., 2018). NRP1 est également connu pour son implication dans le système immunitaire et joue un rôle important dans l'activation et la polarisation de la microglie (Jarvis et al., 2010; Nissen et al., 2013). Plus récemment, les travaux de Myauchi *et al.* ont mis en avant l'implication de NRP1, via son expression sur la microglie, dans la progression de tumeurs cérébrales telles que le gliome. Inhiber l'expression de NRP1 sur la microglie apparaît être un traitement efficace pour retarder la croissance tumorale dans les tumeurs cérébrales (Miyuchi et al., 2016, 2018).

Dans ce contexte, nous pouvons nous demander comment l'interaction entre les cellules de MB et les cellules de microglie/astrocytes sont impactées par l'inhibition de NRP1 associée ou non à la radiothérapie et si la composante environnementale traitée affecte la progression du MB.

Plusieurs études ont décrit un rôle protumoral de la microglie et des astrocytes dans les tumeurs cérébrales (Henrik Heiland et al., 2019; Placone et al., 2016; Seike et al., 2011). En particulier, dans le MB, il a été montré que les astrocytes favorisaient la prolifération des cellules tumorales via la sécrétion de protéines SHH (Y. Liu et al., 2017) et que la microglie contribuait à la progression tumorale dans le sous-groupe SHH et le sous-groupe 3 de MB

(Sreenivasan et al., 2022; Tan et al., 2021). Nos résultats ont confirmé ces rôles en révélant une augmentation de la croissance des cellules de MB en présence de microglie et/ou d'astrocytes. En revanche, une forte proportion de cellules microgliales, par rapport aux cellules tumorales (ratio 1 :5 ou 1 :10), a induit un effet antitumoral sur le MB. De manière intéressante, l'association avec les astrocytes provoque la perte de cet effet antitumoral. Ceci peut s'expliquer par le fait que la microglie entraîne l'activation des astrocytes, communément appelée astroglie. Ce phénomène va entraîner un changement morphologique des astrocytes qui vont alors sécréter des facteurs de croissance et des cytokines protumorales (Henrik Heiland et al., 2019; Placone et al., 2016). Il aurait été intéressant d'étudier la morphologie des cellules ainsi que l'expression de certains facteurs et cytokines dans ce modèle de coculture afin de voir si la microglie entraînait une activation des astrocytes contribuant ainsi au développement tumoral.

Devant l'intérêt de cibler NRP1 dans la microglie associée au glioblastome (Caponegro et al., 2018; Miyauchi et al., 2018), nous nous sommes intéressés à l'effet de l'inhibition de NRP1 sur le microenvironnement tumoral du MB. Après avoir validé l'expression de notre protéine d'intérêt au sein de nos lignées cellulaires, nous avons traité ces lignées avec le MR438 pendant 72h à 25µmol/L, associé ou non à d'une dose simple d'irradiation à 2 Gy. L'inhibition de NRP1 n'impacte pas la viabilité de la microglie qu'elle soit irradiée ou non. En revanche, l'inhibition de NRP1 induit une augmentation de la viabilité des astrocytes pour les conditions traitées par le MR438 pendant 72h, par RT seule, ainsi que par les traitements combinés.

Par la suite, nous avons évalué si l'inhibition de NRP1 et/ou la radiothérapie sur le microenvironnement tumoral affectait la croissance du MB dans un modèle de coculture en 2D *in vitro*. La croissance tumorale semble être affectée par la présence de la microglie ou des astrocytes contrairement aux résultats précédents. Le temps de suivi de la coculture étant plus long que précédemment, sans renouvellement de milieu, ceci a pu impacter le développement des cellules et ainsi expliquer la diminution de la croissance des cellules tumorales au sein de la coculture, bien qu'elle ne soit pas significative. En revanche, les différents traitements n'ont eu aucun impact sur la croissance des cellules différenciées de MB quelle que soit la composante du microenvironnement présent dans la coculture. L'inhibition de NRP1 ne semble pas impacter la microglie comme démontré par les travaux de Miyauchi *et al.* où la délétion de NRP1 au sein de la microglie engendre un retard de croissance tumorale ainsi qu'une augmentation de survie dans un modèle murin de gliome (Miyauchi et al., 2016, 2018). De plus, la RT associée au MR438, ou le traitement par RT seule n'a pas eu d'effet significatif sur la croissance du MB, ce qui signifie que la radiothérapie à la dose de 2 Gy n'influence pas la microglie et/ou les astrocytes dans leur comportement face aux cellules tumorales. Plusieurs

travaux ont indiqué que seule une irradiation à forte dose avait un effet activateur de la microglie entraînant un changement de morphologie des cellules (forme amiboïde), la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines pro-inflammatoires, et la prolifération des cellules microgliales (Akkari et al., 2020; H. Chen et al., 2016; Osman et al., 2020; Zhou et al., 2017). L'activation de la microglie par la radiothérapie nécessite des doses de RT supérieures à 8 Gy et apparaît transitoirement après l'irradiation d'après l'étude *in vivo* de Osman *et al.* (Osman et al., 2020). Chen *et al.* décrivent qu'à de faibles doses de RT, la microglie est résistante à la RT et ne montre aucun signe d'activation *in vitro* (H. Chen et al., 2016). En revanche, de faibles doses d'irradiations vont rendre plus immunogènes les cellules de MB comme le démontrent l'étude de Das *et al.*, en augmentant l'expression des molécules de CMH à la surface des cellules tumorales ainsi qu'en augmentant leur production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Das et al., 2017). Ces ROS sont d'ailleurs connues pour favoriser l'activation de la microglie ainsi que celles des astrocytes (Alfonso-Loeches et al., 2014).

L'interaction entre les cellules souches cancéreuses (CSC) et la microglie est un sujet très peu décrit dans la littérature. Dzaye *et al.* met en avant que les CSC influencent différemment le comportement de la microglie par rapport aux cellules tumorales de gliomes en favorisant la sécrétion de l'interleukine 6 impliquée dans la progression du gliome (Dzaye et al., 2016). C'est pourquoi, nous nous sommes également penchés sur la question des CSC de MB et leur impact sur la microglie. Les résultats obtenus laissent supposer que des facteurs solubles sont sécrétés par les CSC de MB traitées par le MR438 et que ces facteurs solubles favorisent le recrutement de la microglie au sein de la médullospère. Cependant, la présence des deux populations cellulaires apparaît nécessaire pour obtenir cet effet sur le recrutement microgliale car il n'est pas retrouvé à partir des milieux conditionnés de CSC. Par ailleurs, le traitement pourrait agir directement sur la microglie en limitant l'effet sur le recrutement et agir également sur l'effet cytotoxique de la microglie. Pour expliquer en partie nos résultats, il serait intéressant d'évaluer l'effet de nos traitements sur la polarisation de la microglie. En effet, la microglie, tout comme les macrophages, peut s'activer selon deux phénotypes : un phénotype de type M1, qui est pro-inflammatoire et antitumoral, ou un phénotype de type M2 qui lui est anti-inflammatoire et protumoral (Kuntzel & Bagnard, 2022). Ceci d'autant plus que la polarisation de la microglie/macrophages est plutôt controversée dans la littérature, notamment dans le médulloblastome où les travaux de Lee *et al.* ont démontré que le phénotype M1, plutôt que M2, était corrélé à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'un MB de sous-groupe SHH (Lee et al., 2018).

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats montrent un effet protumoral de la microglie et des astrocytes à concentration égale avec les cellules de MB. En revanche, à forte concentration cellulaire de la population du microenvironnement, nous avons pu constater un effet antitumoral de la microglie seule sur la croissance du MB. La suite de notre étude a montré que l'inhibition de NRP1 associée ou non à la RT n'a aucun effet sur la composante du microenvironnement en présence des cellules différenciées du MB, que ce soit sur la viabilité cellulaire de ces derniers ou encore via leur action sur la progression du MB. De plus, nous avons montré que les CSC pouvaient influencer le recrutement de la microglie possiblement via la libération de facteurs solubles. Ces résultats restent à être confirmés par d'autres études permettant de caractériser le sécrétome des CSC de MB par des approches transcriptomiques ou de cytokines array par exemple. D'autres expériences sur des analyses morphologiques ou des marqueurs de l'activation de la microglie et/ou des astrocytes pourraient aussi appuyer nos résultats et enfin, étudier l'influence des CSC de MB sur les astrocytes, et inversement, pourrait aussi être une perspective intéressante à étudier.

Tableau 6 : Bilan des effets directs et indirects de l'inhibition de NRPI associée ou non à la radiothérapie sur des modèles de coculture 2D et 3D du médulloblastome et de son microenvironnement

|  | Modèle coculture 2D<br>(Cellules différenciées)   | Modèle coculture 3D<br>(Cellules souches cancéreuses)   |
|--|---|---|
| <b>Effets directs des traitements</b> (cellules traitées pendant la coculture)   | Pas d'effets des différents traitements sur la prolifération des cellules de MB en coculture avec microglie et/ou astrocytes  | Augmentation du recrutement de la microglie sur les CSC avec les différents traitements<br><br>Augmentation de la prolifération des CSC 24h post-RT après traitement au MR438 seul (inhibition microglie ?) |
| <b>Effets indirects des traitements</b> (milieux conditionnés ; médullosphères traitées antérieurement à la coculture) | Diminution de la viabilité cellulaire de la microglie avec RT + MR438 72h<br><br>Tendance à diminuer la prolifération de la microglie avec RT + MR438 72h<br><br>Diminution de l'invasion de la microglie avec RT + MR438 48h | Augmentation du recrutement de la microglie avec MR438 seul et RT + MR438<br><br>Pas d'effets cytotoxiques de la microglie sur les CSC avec les différents traitements                                      |

# Discussion et conclusion générale

Le médulloblastome (MB) est la tumeur cérébrale pédiatrique maligne la plus courante. Elle représente 15 à 20% des tumeurs cérébrales qui sont la première cause de décès par cancer chez l'enfant. Malgré les progrès des traitements actuels, la fréquence des récurrences reste élevée avec dans 30% des cas, la présence de métastases dès le diagnostic. Les avancées dans la classification moléculaire du MB permettent aux recherches actuelles de se concentrer sur les cibles impliquées dans les voies de signalisation liées aux sous-groupes moléculaires du MB. Il est évident que les quatre sous-groupes moléculaires principaux (WNT, SHH, Groupe 3 et Groupe 4) ne suffisent pas pour la pratique clinique, ainsi des mutations importantes doivent être considérées comme des facteurs pronostiques, comme par exemple la mutation TP53 (Louis et al., 2021). En effet, le sous-groupe SHH TP53 muté est associé à un pronostic sombre chez les enfants âgés entre 5 et 18 ans, avec une survie globale de 41 % à 5 ans. Chez les enfants de plus de 5 ans, les tumeurs porteuses de mutations TP53 représentent les deux tiers des décès (Zhukova et al., 2013). Dans notre étude, nous avons donc focalisé notre travail sur la lignée DAOY correspondant au sous-groupe SHH avec la mutation TP53.

En 2013, Snuderl *et al.* a montré le lien entre la surexpression du récepteur NRP1 et le mauvais pronostic des patients atteints de MB (Snuderl et al., 2013). Ce récepteur est également impliqué dans de nombreux processus biologiques et joue un rôle dans le développement de nombreux cancers (Ben et al., 2014; Hamerlik et al., 2012; Kawakami et al., 2002; M. Luo et al., 2016). Notamment, il s'est avéré que la surexpression de NRP1 était liée aux cellules souches cancéreuses (CSC), contribuant à leur survie et à leur capacité d'auto-renouvellement (Grun et al., 2016; Hamerlik et al., 2012). Ces CSC sont également considérées comme actrices majeures de la récurrence des tumeurs et de la résistance aux radio-chimiothérapies (Nunes et al., 2018; K. Sun et al., 2017; Zhu et al., 2021). Dans ce contexte, notre équipe a participé à l'évaluation d'un peptidomimétique ciblant spécifiquement NRP1, le MR438 (Richard et al., 2016), et a montré l'implication de cette protéine dans la dédifférenciation des CSC de MB *in vitro* (Gong et al., 2018). De plus, il est connu que la résistance des tumeurs aux traitements telle que la radiothérapie (RT) est liée à la présence de CSC. La RT est un traitement essentiel du MB, après la résection de la tumeur, malheureusement elle s'accompagne constamment de graves séquelles. La RT affecte les tissus sains au niveau du système nerveux central en développement des enfants entraînant des dysfonctionnements neurocognitifs et endocriniens irréversibles (Mulhern et al., 2005). Aujourd'hui, il est donc important de développer de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'améliorer l'efficacité de la RT dans le MB. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse, où NRP1 apparaît comme un candidat pertinent en tant que cible thérapeutique potentielle dans le cadre du MB. Dans un premier temps, nous

avons donc développé un modèle cellulaire exprimant la luciférase afin de pouvoir assurer un suivi de la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence dans un modèle de xénogreffes orthotopiques de MB. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'intérêt thérapeutique d'un peptidomimétique à base de sucres ciblant spécifiquement NRP1, le MR438, en association avec la radiothérapie dans ce modèle de xénogreffes orthotopiques. Pour finir, devant l'importance du microenvironnement de la tumeur, nous avons évalué l'impact de l'inhibition de NRP1 sur le microenvironnement du système nerveux central, comme la microglie, en travaillant sur des modèles 2D et 3D de coculture *in vitro*.

Après avoir développé et caractérisé un modèle de MB DAOY exprimant la luciférase, nous avons évalué l'inhibition de NRP1 avec le MR438 dans un modèle de xénogreffes orthotopiques de MB. L'inhibition de NRP1, associée à la RT, a montré un effet bénéfique sur la survie des animaux en réduisant la croissance des tumeurs après une phase de traitement d'une durée d'une semaine (5 jours) avec l'association MR438 (3 doses à 2,5 mg/mL) et RT (5 x 2 Gy). De manière intéressante, le traitement par le MR438, sur une durée de 5 jours, potentialise l'effet de la RT en augmentant la médiane de survie des animaux par rapport aux mêmes traitements administrés séparément : (RT + MR438) = 8 jours alors que (RT) + (MR438) = 3 jours. Ces premiers résultats sont en cohérence avec les travaux de notre équipe, réalisés lors de la thèse de C. Gong, qui ont montré l'effet radiosensibilisant du MR438 *in vitro* sur les CSC dans les sous-groupes SHH, 3 et 4 de MB, et *in vivo*, une amélioration de la survie des animaux avec une baisse de la croissance tumorale dans un modèle hétérotopique de MB obtenu avec la lignée DAOY du sous-groupe SHH. Cependant, l'effet bénéfique de l'inhibition de NRP1 et de la RT dans le modèle orthotopique n'est pas pérenne dans le temps. Par ailleurs, le schéma thérapeutique sur cinq jours consécutifs étant très éloigné du traitement administré aux patients, nous avons voulu étaler les administrations et les irradiations sur deux semaines (10 jours), afin de se rapprocher du traitement réalisé actuellement en clinique, avec un étalement de la radiothérapie durant 5-6 semaines. Avec une prolongation du traitement à deux semaines (10 jours), nous avons observé une perte des effets bénéfiques de l'association du composé avec la RT, entraînant une diminution de la survie des animaux, comparée à la RT seule. La perte de ces effets au point final des expériences peut s'expliquer par l'augmentation de l'expression de NRP1 ainsi que de l'expression de CD15, marqueur des CSC de MB. Ces dernières observations pourraient traduire une sélection clonale dans les tumeurs de cellules résistantes à la RT, après un traitement long et donc une plus forte dose cumulative d'irradiation. En effet, il a été démontré qu'une irradiation plus prononcée induit une

surexpression de NRP1 au sein des cellules tumorales (Tsutsumi et al., 2021) qui semble être corrélée avec l'expression de CD15 dans notre travail.

Dans un premier temps, il apparaît donc intéressant d'optimiser la phase de traitement, par exemple en augmentant la période d'injections du MR438 bien après la phase d'irradiations successives. De ce fait, l'action du MR438 serait pérenne dans le temps et hypothétiquement permettrait de cibler les CSC, résistantes à la RT, afin d'éviter la progression et l'échappement tumoral. Dans un second temps, pour mieux comprendre les mécanismes d'action de l'inhibition de NRP1 associée à la RT sur les cellules tumorales, dont les CSC, l'implication de certaines voies de signalisation devra faire l'objet d'études transcriptomiques. En effet, la voie VEGF/NRP1 a été décrite comme étant impliquée dans la viabilité et l'auto-renouvellement des cellules souches de l'épiderme mais aussi de gliomes (Grun et al., 2016; Hamerlik et al., 2012). Il semblerait que la voie GIPC1/NRP1 ait également un rôle à jouer dans le développement des cellules souches d'après les travaux de Grun *et al.* (Grun et al., 2018, 2019).

D'autre part, bien que le modèle orthotopique de MB soit un modèle animal humanisé très utilisé en recherche, il possède certaines limites. En effet, c'est un modèle animal immunodéprimé, qui de plus, associe à la tumeur humaine un microenvironnement tumoral murin. Par ailleurs, l'utilisation de lignées cellulaires immortalisées induit un biais en représentant la tumeur à un stade de développement en point final où les cellules sont déjà transformées et les réarrangements génétiques ont déjà eu lieu. Ces lignées cellulaires cultivées *in vitro* sont également sujettes à la dérive génétique et l'hétérogénéité tumorale observée dans les tumeurs des patients est rarement représentée dans sa totalité à travers ces lignées cellulaires (Ivanov et al., 2016).

Pour pallier ces limitations, l'utilisation d'un modèle de xénogreffes dérivés de patients (PDX = patient derived xenograft) permettraient d'être plus proche de l'origine des tumeurs, comparé aux lignées cellulaires, de conserver l'hétérogénéité tumorale, intra et inter-patient, ainsi que de garder une diversité au niveau des populations cellulaires présentes dans les tumeurs. Il existe également des modèles basés sur l'utilisation de cellules IPS (Induced Pluripotent Stem cells) comme le montrent les travaux de Susanto *et al.* où des cellules souches neurales dérivées de patients et porteuses de la mutation sur PTCH1 permettent d'imiter l'initiation et la progression du MB chez les enfants (Susanto et al., 2020). Ces approches n'étant pas accessibles au sein du laboratoire, pour la suite de nos travaux, nous avons donc opté pour une approche *in vitro* en 3D afin de garder les caractéristiques physiologiques de la tumeur de manière supérieure par rapport à la culture *in vitro* 2D, et d'imiter au mieux les interactions entre les cellules souches tumorales et les cellules du microenvironnement du SNC.

De plus en plus de recherches mettent en avant l'importance de prendre en compte le microenvironnement des tumeurs impliqué dans diverses étapes du développement de la tumeur. Ce microenvironnement tumoral se retrouve modifié au cours du développement tumoral et en réponse aux thérapies. Cependant, les mécanismes régulant la communication entre les cellules malignes et non malignes sont encore mal compris, notamment dans le cas du MB. Il a été décrit que les cellules non-tumorales présentes au niveau du SNC, telles que la microglie, sont impliquées dans la progression des tumeurs cérébrales (Henrik Heiland et al., 2019; Placone et al., 2016; Seike et al., 2011). En raison de la différence de résultats entre le modèle hétérotopique et le modèle orthotopique obtenus à partir de la même lignée cellulaire de MB, la lignée DAOY, il nous est apparu légitime de nous demander quel rôle jouait le microenvironnement tumoral du MB dans la réponse à nos traitements. Tout d'abord, nos résultats en coculture 2D ont montré un effet protumoral de la microglie confirmant des résultats déjà publiés (Y. Liu et al., 2017; Sreenivasan et al., 2022; Tan et al., 2021). Ensuite, l'inhibition de NRP1 n'a montré aucun effet significatif sur la croissance tumorale en présence de microglie contrairement aux travaux de Miyauchi *et al.* dans le gliome (Miyauchi et al., 2016, 2018). L'ajout de la radiothérapie sur notre modèle de coculture 2D, associé ou non à l'inhibition de NRP1, n'a pas modulé l'effet des cellules du microenvironnement sur la croissance tumorale malgré le fait qu'à de faibles doses d'irradiations les cellules de MB deviennent plus immunogènes (Das et al., 2017).

Les CSC sont minoritaires parmi les cellules du MB, mais elles ont un fort impact sur la progression de la maladie, car elles sont impliquées dans la résistance aux traitements ainsi que dans la rechute de la maladie. Nos expériences utilisant des milieux conditionnés de CSC ont montré que les différents traitements n'ont pas eu d'effets sur les paramètres étudiés concernant la microglie (viabilité, prolifération, invasion). En revanche, la présence des sécrétions libérées par les CSC traitées par le MR438 semble impacter le recrutement de la microglie. De manière intéressante, l'inhibition de NRP1 sur l'ensemble des CSC et de la microglie semble inhiber l'effet cytotoxique de la microglie sur les CSC. Afin de mieux interpréter ces résultats, d'autres études seront nécessaires notamment pour caractériser le sécrétome des CSC de MB par des approches transcriptomiques ou de cytokines arrays par exemple, ou encore étudier l'effet de nos traitements sur l'activation de la microglie, via l'expression de marqueurs d'activation ainsi qu'évaluer la polarisation de la microglie afin de déterminer si le traitement influence vers un phénotype M1, antitumoral, ou M2 protumoral. L'ensemble de ces résultats démontrent l'importance du microenvironnement des tumeurs cérébrales telles que le MB. L'impact qu'ont ces populations non-tumorales, dans la réponse aux traitements, reste complexe notamment

comme nous avons pu le constater dans des expérimentations préliminaires combinant plusieurs types cellulaires du microenvironnement tumoral, comme la microglie et les astrocytes.

En conclusion, nos travaux réalisés *in vivo*, dans un modèle de xénogreffes orthotopiques de MB, mettent en évidence l'intérêt de cibler NRP1 en association avec de faibles doses cumulées de radiothérapie, sur une courte durée, pour limiter la progression de MB en ciblant les cellules souches cancéreuses. Cependant, une optimisation de ce traitement est indispensable, par exemple en testant une augmentation des injections du MR438 après radiothérapie, pour palier à un éventuel échappement des cellules souches tumorales. La combinaison entre plusieurs agents différenciant pourrait également être envisagée. Il serait également intéressant de vérifier par une étude comparant l'association du MR438 + RT à 1Gy/jour versus RT à 2Gy/jour sans MR438, si l'efficacité est identique, ce qui permettrait, en pratique clinique, de potentiellement diminuer les séquelles. De plus, le microenvironnement de la tumeur semble jouer un rôle dans la réponse aux traitements. Nos résultats de coculture 2D et 3D *in vitro* montrent un effet protumoral de la microglie et/ou des astrocytes mais aucun effet de l'inhibition de NRP1 associée ou non à la RT sur la croissance des cellules tumorales n'a été relevé. En revanche, nous avons observé que l'inhibition de NRP1 joue sur le recrutement de la microglie en présence de CSC et limite l'effet antitumoral de la microglie. D'autres études sont nécessaires pour explorer le mécanisme de régulation de NRP1 dans la progression de MB à travers les cellules souches ainsi que de déterminer comment intervient NRP1 dans les interactions entre le microenvironnement tumoral et les CSC.

# Bibliographie

Aasen, T., Leithe, E., Graham, S. V., Kameritsch, P., Mayán, M. D., Mesnil, M., Pogoda, K., & Taberero, A. (2019). Connexins in cancer : Bridging the gap to the clinic. *Oncogene*, 38(23), 4429-4451. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0741-6>

Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(1), 41-53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>

Akagi, M., Kawaguchi, M., Liu, W., McCarty, M. F., Takeda, A., Fan, F., Stoeltzing, O., Parikh, A. A., Jung, Y. D., Bucana, C. D., Mansfield, P. F., Hicklin, D. J., & Ellis, L. M. (2003). Induction of neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells. *British Journal of Cancer*, 88(5), 796-802. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600811>

Akkari, L., Bowman, R. L., Tessier, J., Klemm, F., Handgraaf, S. M., de Groot, M., Quail, D. F., Tillard, L., Gadiot, J., Huse, J. T., Brandsma, D., Westerga, J., Watts, C., & Joyce, J. A. (2020). Dynamic changes in glioma macrophage populations after radiotherapy reveal CSF-1R inhibition as a strategy to overcome resistance. *Science Translational Medicine*, 12(552), eaaw7843. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw7843>

Alfonso-Loeches, S., Ureña-Peralta, J. R., Morillo-Bargues, M. J., Oliver-De La Cruz, J., & Guerri, C. (2014). Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 216. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00216>

Alsawaftah, N., Farooq, A., Dhou, S., & Majdalawieh, A. F. (2021). Bioluminescence Imaging Applications in Cancer : A Comprehensive Review. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 14, 307-326. <https://doi.org/10.1109/RBME.2020.2995124>

Araujo, A. P. B., Carpi-Santos, R., & Gomes, F. C. A. (2019). The Role of Astrocytes in the Development of the Cerebellum. *Cerebellum (London, England)*, 18(6), 1017-1035. <https://doi.org/10.1007/s12311-019-01046-0>

Aspalter, I. M., Gordon, E., Dubrac, A., Ragab, A., Narloch, J., Vizán, P., Geudens, I., Collins, R. T., Franco, C. A., Abrahams, C. L., Thurston, G., Fruttiger, M., Rosewell, I., Eichmann, A., & Gerhardt, H. (2015). Alk1 and Alk5 inhibition by Nrp1 controls vascular sprouting downstream of Notch. *Nature Communications*, 6, 7264. <https://doi.org/10.1038/ncomms8264>

Auguste, P., Gürsel, D. B., Lemièrre, S., Reimers, D., Cuevas, P., Carceller, F., Di Santo, J. P., & Bikfalvi, A. (2001). Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor

receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Research*, 61(4), 1717-1726.

Aung, N. Y., Ohe, R., Meng, H., Kabasawa, T., Yang, S., Kato, T., & Yamakawa, M. (2016). Specific Neuropilins Expression in Alveolar Macrophages among Tissue-Specific Macrophages. *PLoS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147358>

Bagci, T., Wu, J. K., Pfannl, R., Ilag, L. L., & Jay, D. G. (2009). Autocrine semaphorin 3A signaling promotes glioblastoma dispersal. *Oncogene*, 28(40), 3537-3550. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.204>

Ball, S. G., Bayley, C., Shuttleworth, C. A., & Kielty, C. M. (2010). Neuropilin-1 regulates platelet-derived growth factor receptor signalling in mesenchymal stem cells. *Biochemical Journal*, 427(Pt 1), 29-40. <https://doi.org/10.1042/BJ20091512>

Bandopadhyay, P., Bergthold, G., Nguyen, B., Schubert, S., Gholamin, S., Tang, Y., Bolin, S., Schumacher, S. E., Zeid, R., Masoud, S., Yu, F., Vue, N., Gibson, W. J., Paoletta, B. R., Mitra, S. S., Cheshier, S. H., Qi, J., Liu, K.-W., Wechsler-Reya, R., ... Cho, Y.-J. (2014). BET bromodomain inhibition of MYC-amplified medulloblastoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(4), 912-925. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2281>

Banerjee, S., Sengupta, K., Dhar, K., Mehta, S., D'Amore, P. A., Dhar, G., & Banerjee, S. K. (2006). Breast cancer cells secreted platelet-derived growth factor-induced motility of vascular smooth muscle cells is mediated through neuropilin-1. *Molecular Carcinogenesis*, 45(11), 871-880. <https://doi.org/10.1002/mc.20248>

Ben, Q., Zheng, J., Fei, J., An, W., Li, P., Li, Z., & Yuan, Y. (2014). High neuropilin 1 expression was associated with angiogenesis and poor overall survival in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas*, 43(5), 744-749. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000117>

Bockmayr, M., Mohme, M., Klauschen, F., Winkler, B., Budczies, J., Rutkowski, S., & Schüller, U. (2018). Subgroup-specific immune and stromal microenvironment in medulloblastoma. *Oncoimmunology*, 7(9). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1462430>

Bolin, S., Borgenvik, A., Persson, C. U., Sundström, A., Qi, J., Bradner, J. E., Weiss, W. A., Cho, Y.-J., Weishaupt, H., & Swartling, F. J. (2018). Combined BET bromodomain and CDK2 inhibition in MYC-driven medulloblastoma. *Oncogene*, 37(21), 2850-2862. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0135-1>

Bourbié-Vaudaine, S., Blanchard, N., Hivroz, C., & Roméo, P.-H. (2006). Dendritic Cells Can Turn CD4+ T Lymphocytes into Vascular Endothelial Growth Factor-Carrying Cells by

Intercellular Neuropilin-1 Transfer. *The Journal of Immunology*, 177(3), 1460-1469.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.3.1460>

Brieger, J., Schroeder, P., Gosepath, J., & Mann, W. J. (2005). VEGF-subtype specific protection of SCC and HUVECs from radiation induced cell death. *International Journal of Molecular Medicine*, 15(1), 145-151.

Bruder, D., Probst-Kepper, M., Westendorf, A. M., Geffers, R., Beissert, S., Loser, K., Boehmer, H. von, Buer, J., & Hansen, W. (2004). Frontline : Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *European Journal of Immunology*, 34(3), 623-630.  
<https://doi.org/10.1002/eji.200324799>

Bumbaca, D., Xiang, H., Boswell, C. A., Port, R. E., Stainton, S. L., Mundo, E. E., Ulufatu, S., Bagri, A., Theil, F.-P., Fielder, P. J., Khawli, L. A., & Shen, B.-Q. (2012). Maximizing tumour exposure to anti-neuropilin-1 antibody requires saturation of non-tumour tissue antigenic sinks in mice. *British Journal of Pharmacology*, 166(1), 368-377.  
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01777.x>

Buonamici, S., Williams, J., Morrissey, M., Wang, A., Guo, R., Vattay, A., Hsiao, K., Yuan, J., Green, J., Ospina, B., Yu, Q., Ostrom, L., Fordjour, P., Anderson, D. L., Monahan, J. E., Kelleher, J. F., Peukert, S., Pan, S., Wu, X., ... Dorsch, M. (2010). Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Science Translational Medicine*, 2(51), 51ra70. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001599>

Cackowski, F. C., Xu, L., Hu, B., & Cheng, S.-Y. (2004). Identification of two novel alternatively spliced Neuropilin-1 isoforms. *Genomics*, 84(1), 82-94.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.02.001>

Cai, H., & Reed, R. R. (1999). Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein : A PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(15), 6519-6527.

Cao, Y., Wang, L., Nandy, D., Zhang, Y., Basu, A., Radisky, D., & Mukhopadhyay, D. (2008). Neuropilin-1 Upholds Dedifferentiation and Propagation Phenotypes of Renal Cell Carcinoma Cells by Activating Akt and Sonic Hedgehog Axes. *Cancer Research*, 68(21), 8667-8672. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2614>

Caponegro, M. D., Moffitt, R. A., & Tsirka, S. E. (2018). Expression of neuropilin-1 is linked to glioma associated microglia and macrophages and correlates with unfavorable prognosis in high grade gliomas. *Oncotarget*, 9(86), 35655-35665.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.26273>

Casazza, A., Laoui, D., Wenes, M., Rizzolio, S., Bassani, N., Mambretti, M., Deschoemaeker, S., Van Ginderachter, J. A., Tamagnone, L., & Mazzone, M. (2013). Impeding Macrophage Entry into Hypoxic Tumor Areas by Sema3A/Nrp1 Signaling Blockade Inhibits Angiogenesis and Restores Antitumor Immunity. *Cancer Cell*, 24(6), 695-709. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.11.007>

Catalano, A. (2010). The Neuroimmune Semaphorin-3A Reduces Inflammation and Progression of Experimental Autoimmune Arthritis. *The Journal of Immunology*, 185(10), 6373-6383. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903527>

Cavalli, F. M. G., Remke, M., Rampasek, L., Peacock, J., Shih, D. J. H., Luu, B., Garzia, L., Torchia, J., Nor, C., Morrissy, A. S., Agnihotri, S., Thompson, Y. Y., Kuzan-Fischer, C. M., Farooq, H., Isaev, K., Daniels, C., Cho, B.-K., Kim, S.-K., Wang, K.-C., ... Taylor, M. D. (2017). Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer cell*, 31(6), 737-754.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.05.005>

Chang, L., Graham, P. H., Hao, J., Ni, J., Bucci, J., Cozzi, P. J., Kearsley, J. H., & Li, Y. (2013). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance. *Cell Death & Disease*, 4, e875. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.407>

Chauvet, S., Cohen, S., Yoshida, Y., Fekrane, L., Livet, J., Gayet, O., Segu, L., Buhot, M.-C., Jessell, T. M., Henderson, C. E., & Mann, F. (2007). Gating of Sema3E/PlexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal repulsion to attraction during brain development. *Neuron*, 56(5), 807-822. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.019>

Chen, H., Chédotal, A., He, Z., Goodman, C. S., & Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron*, 19(3), 547-559. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80371-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80371-2)

Chen, H., Chong, Z. Z., De Toledo, S. M., Azzam, E. I., Elkabes, S., & Souayah, N. (2016). Delayed activation of human microglial cells by high dose ionizing radiation. *Brain Research*, 1646, 193-198. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.06.002>

Chen, X.-J., Wu, S., Yan, R.-M., Fan, L.-S., Yu, L., Zhang, Y.-M., Wei, W.-F., Zhou, C.-F., Wu, X.-G., Zhong, M., Yu, Y.-H., Liang, L., & Wang, W. (2019). The role of the hypoxia-Nrp-1 axis in the activation of M2-like tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment of cervical cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 58(3), 388-397. <https://doi.org/10.1002/mc.22936>

Chen, Z., Feng, X., Herting, C. J., Garcia, V. A., Nie, K., Pong, W. W., Rasmussen, R., Dwivedi, B., Seby, S., Wolf, S. A., Gutmann, D. H., & Hambardzumyan, D. (2017). Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. *Cancer Research*, 77(9), 2266-2278. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2310>

Children's Oncology Group. (2022). *A Phase 2 Study of Reduced Therapy for Newly Diagnosed Average-Risk WNT-Driven Medulloblastoma Patients* (Clinical trial registration N<sup>o</sup> NCT02724579). [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02724579>

Cho, Y.-J., Tsherniak, A., Tamayo, P., Santagata, S., Ligon, A., Greulich, H., Berhoukim, R., Amani, V., Goumnerova, L., Eberhart, C. G., Lau, C. C., Olson, J. M., Gilbertson, R. J., Gajjar, A., Delattre, O., Kool, M., Ligon, K., Meyerson, M., Mesirov, J. P., & Pomeroy, S. L. (2011). Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(11), 1424-1430. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.5148>

Choi, S., Yu, J., Park, A., Dubon, M. J., Do, J., Kim, Y., Nam, D., Noh, J., & Park, K.-S. (2019). BMP-4 enhances epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell properties of breast cancer cells via Notch signaling. *Scientific Reports*, 9(1), 11724. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48190-5>

Chu, Q., Orr, B. A., Semenkow, S., Bar, E. E., & Eberhart, C. G. (2013). Prolonged Inhibition of Glioblastoma Xenograft Initiation and Clonogenic Growth following In Vivo Notch Blockade. *Clinical Cancer Research*, 19(12), 3224-3233. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2119>

Chu, W., Song, X., Yang, X., Ma, L., Zhu, J., He, M., Wang, Z., & Wu, Y. (2014). Neuropilin-1 Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Stimulating Nuclear Factor-Kappa B and Is Associated with Poor Prognosis in Human Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101931>

Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H. M., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L., & Wahl, G. M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions : AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Research*, 66(19), 9339-9344. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3126>

Cong, L., Yi, J., Qiu, S., Wang, R., Jin, S., Jiang, R., & Cong, X. (2021). Effect of EG00229 on Radiation Resistance of Lung Adenocarcinoma Cells. *Journal of Cancer*, 12(20), 6105-6117. <https://doi.org/10.7150/jca.56123>

Craveiro, R. B., Ehrhardt, M., Holst, M. I., Pietsch, T., & Dilloo, D. (2014). In comparative analysis of multi-kinase inhibitors for targeted medulloblastoma therapy

pazopanib exhibits promising in vitro and in vivo efficacy. *Oncotarget*, 5(16), 7149-7161. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2240>

Cui, Y., Han, Z., Hu, Y., Song, G., Hao, C., Xia, H., & Ma, X. (2012). MicroRNA-181b and microRNA-9 mediate arsenic-induced angiogenesis via NRP1. *Journal of Cellular Physiology*, 227(2), 772-783. <https://doi.org/10.1002/jcp.22789>

Dang, M. T., Gonzalez, M. V., Gaonkar, K. S., Rathi, K. S., Young, P., Arif, S., Zhai, L., Alam, Z., Devalaraja, S., To, T. K. J., Folkert, I. W., Raman, P., Rokita, J. L., Martinez, D., Taroni, J. N., Shapiro, J. A., Greene, C. S., Savonen, C., Mafra, F., ... Haldar, M. (2021). Macrophages in SHH subgroup medulloblastoma display dynamic heterogeneity that varies with treatment modality. *Cell Reports*, 34(13), 108917. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108917>

Das, A., McDonald, D., Lowe, S., Bredlau, A.-L., Vanek, K., Patel, S. J., Cheshier, S., & Eskandari, R. (2017). Immunological low-dose radiation modulates the pediatric medulloblastoma antigens and enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Child's Nervous System: ChNS: Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 33(3), 429-436. <https://doi.org/10.1007/s00381-016-3305-x>

D'Asti, E., Kool, M., Pfister, S. M., & Rak, J. (2014). Coagulation and angiogenic gene expression profiles are defined by molecular subgroups of medulloblastoma: Evidence for growth factor-thrombin cross-talk. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 12(11), 1838-1849. <https://doi.org/10.1111/jth.12715>

De Vries, L., Lou, X., Zhao, G., Zheng, B., & Farquhar, M. G. (1998). GIPC, a PDZ domain containing protein, interacts specifically with the C terminus of RGS-GAIP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), 12340-12345.

Delgoffe, G. M., Woo, S.-R., Turnis, M. E., Gravano, D. M., Guy, C., Overacre, A. E., Bettini, M. L., Vogel, P., Finkelstein, D., Bonnevier, J., Workman, C. J., & Vignali, D. A. A. (2013). Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature*, 501(7466), 252-256. <https://doi.org/10.1038/nature12428>

Deng, J., Bai, X., Feng, X., Ni, J., Beretov, J., Graham, P., & Li, Y. (2019). Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway alleviates ovarian cancer chemoresistance through reversing epithelial-mesenchymal transition and decreasing cancer stem cell marker expression. *BMC Cancer*, 19(1), 618. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5824-9>

Desandes, E., Guissou, S., Chastagner, P., & Lacour, B. (2014). Incidence and survival of children with central nervous system primitive tumors in the French National Registry of

Childhood Solid Tumors. *Neuro-Oncology*, 16(7), 975-983.  
<https://doi.org/10.1093/neuonc/not309>

Diaz, R. J., Golbourn, B., Faria, C., Picard, D., Shih, D., Raynaud, D., Leadly, M., MacKenzie, D., Bryant, M., Bebenek, M., Smith, C. A., Taylor, M. D., Huang, A., & Rutka, J. T. (2015). Mechanism of action and therapeutic efficacy of Aurora kinase B inhibition in MYC overexpressing medulloblastoma. *Oncotarget*, 6(5), 3359-3374.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.3245>

Dieterich, L. C., Mellberg, S., Langenkamp, E., Zhang, L., Zieba, A., Salomäki, H., Teichert, M., Huang, H., Edqvist, P.-H., Kraus, T., Augustin, H. G., Olofsson, T., Larsson, E., Söderberg, O., Molema, G., Pontén, F., Georgii-Hemming, P., Alafuzoff, I., & Dimberg, A. (2012). Transcriptional profiling of human glioblastoma vessels indicates a key role of VEGF-A and TGF $\beta$ 2 in vascular abnormalization. *The Journal of Pathology*, 228(3), 378-390.  
<https://doi.org/10.1002/path.4072>

Ding, Y., Zhou, J., Wang, S., Li, Y., Mi, Y., Gao, S., Xu, Y., Chen, Y., & Yan, J. (2018). Anti-neuropilin-1 monoclonal antibody suppresses the migration and invasion of human gastric cancer cells via Akt dephosphorylation. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(2), 537-546. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6234>

Dong, J. C., Gao, H., Zuo, S. Y., Zhang, H. Q., Zhao, G., Sun, S. L., Han, H. L., Jin, L. L., Shao, L. H., Wei, W., & Jin, S. Z. (2015). Neuropilin 1 expression correlates with the Radio-resistance of human non-small-cell lung cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(9), 2286-2295. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12623>

Dong, Z., Zhang, H., Gong, X., Wei, W., Lv, Y., Chen, Z., Wang, R., Yi, J., Shen, Y., & Jin, S. (2019). The Role of the Tumor Microenvironment in Neuropilin 1-Induced Radiation Resistance in Lung Cancer Cells. *Journal of Cancer*, 10(17), 4017-4030.  
<https://doi.org/10.7150/jca.28163>

Douyère, M., Chastagner, P., & Boura, C. (2021). Neuropilin-1 : A Key Protein to Consider in the Progression of Pediatric Brain Tumors. *Frontiers in Oncology*, 11, 665634.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.665634>

Douyère, M., Gong, C., Richard, M., Pellegrini-Moise, N., Daouk, J., Pierson, J., Chastagner, P., & Boura, C. (2022). NRP1 inhibition modulates radiosensitivity of medulloblastoma by targeting cancer stem cells. *Cancer Cell International*, 22(1), 377.  
<https://doi.org/10.1186/s12935-022-02796-4>

Du, W., Liu, X., Chen, L., Dou, Z., Lei, X., Chang, L., Cai, J., Cui, Y., Yang, D., Sun, Y., Li, Y., & Jiang, C. (2015). Targeting the SMO oncogene by miR-326 inhibits glioma

biological behaviors and stemness. *Neuro-Oncology*, 17(2), 243-253. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou217>

Duarte, T. T., Teixeira, S. A., Gonzalez-Reyes, L., & Reis, R. M. (2021). Decoding the Roles of Astrocytes and Hedgehog Signaling in Medulloblastoma. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, 28(4), 3058-3070. <https://doi.org/10.3390/curroncol28040267>

Dubrovskaja, A., Kim, S., Salamone, R. J., Walker, J. R., Maira, S.-M., García-Echeverría, C., Schultz, P. G., & Reddy, V. A. (2009). The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(1), 268-273. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810956106>

Duchartre, Y., Kim, Y.-M., & Kahn, M. (2016). The Wnt signaling pathway in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 99, 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.12.005>

Dumond, A., & Pagès, G. (2020). Neuropilins, as Relevant Oncology Target : Their Role in the Tumoral Microenvironment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 662. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00662>

Dzaye, O., Hu, F., Derkow, K., Haage, V., Euskirchen, P., Harms, C., Lehnardt, S., Synowitz, M., Wolf, S. A., & Kettenmann, H. (2016). Glioma Stem Cells but Not Bulk Glioma Cells Upregulate IL-6 Secretion in Microglia/Brain Macrophages via Toll-like Receptor 4 Signaling. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 75(5), 429-440. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw016>

Eckerdt, F., Clymer, J., Bell, J. B., Beauchamp, E. M., Blyth, G. T., Goldman, S., & Platanius, L. C. (2019). Pharmacological mTOR targeting enhances the antineoplastic effects of selective PI3K $\alpha$  inhibition in medulloblastoma. *Scientific Reports*, 9(1), 12822. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49299-3>

Ehrhardt, M., Craveiro, R. B., Holst, M. I., Pietsch, T., & Dilloo, D. (2015). The PI3K inhibitor GDC-0941 displays promising in vitro and in vivo efficacy for targeted medulloblastoma therapy. *Oncotarget*, 6(2), 802-813. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2742>

Fan, X., Mikolaenko, I., Elhassan, I., Ni, X., Wang, Y., Ball, D., Brat, D. J., Perry, A., & Eberhart, C. G. (2004). Notch1 and notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Research*, 64(21), 7787-7793. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1446>

Fang, L., Cai, J., Chen, B., Wu, S., Li, R., Xu, X., Yang, Y., Guan, H., Zhu, X., Zhang, L., Yuan, J., Wu, J., & Li, M. (2015). Aberrantly expressed miR-582-3p maintains lung cancer

stem cell-like traits by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nature Communications*, 6(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms9640>

Fantin, A., Vieira, J. M., Plein, A., Denti, L., Fruttiger, M., Pollard, J. W., & Ruhrberg, C. (2013). NRP1 acts cell autonomously in endothelium to promote tip cell function during sprouting angiogenesis. *Blood*, 121(12), 2352-2362. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-424713>

Fernández, L., Portugal, R., Valentín, J., Martín, R., Maxwell, H., González-Vicent, M., Díaz, M. Á., de Prada, I., & Pérez-Martínez, A. (2013). In vitro Natural Killer Cell Immunotherapy for Medulloblastoma. *Frontiers in Oncology*, 3, 94. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00094>

Filocamo, G., Brunetti, M., Colaceci, F., Sasso, R., Tanori, M., Pasquali, E., Alfonsi, R., Mancuso, M., Saran, A., Lahm, A., Di Marcotullio, L., Steinkühler, C., & Pazzaglia, S. (2016). MK-4101, a Potent Inhibitor of the Hedgehog Pathway, Is Highly Active against Medulloblastoma and Basal Cell Carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(6), 1177-1189. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0371>

Frasson, C., Rampazzo, E., Accordi, B., Beggio, G., Pistollato, F., Basso, G., & Persano, L. (2015). Inhibition of PI3K Signalling Selectively Affects Medulloblastoma Cancer Stem Cells. *BioMed Research International*, 2015, 973912. <https://doi.org/10.1155/2015/973912>

Gajjar, A., Chintagumpala, M., Ashley, D., Kellie, S., Kun, L. E., Merchant, T. E., Woo, S., Wheeler, G., Ahern, V., Krasin, M. J., Fouladi, M., Broniscer, A., Krance, R., Hale, G. A., Stewart, C. F., Dauser, R., Sanford, R. A., Fuller, C., Lau, C., ... Gilbertson, R. J. (2006). Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma (St Jude Medulloblastoma-96): Long-term results from a prospective, multicentre trial. *The Lancet. Oncology*, 7(10), 813-820. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70867-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70867-1)

Garcia-Heredia, J. M., Lucena-Cacace, A., Verdugo-Sivianes, E. M., Pérez, M., & Carnero, A. (2017). The Cargo Protein MAP17 (PDZK1IP1) Regulates the Cancer Stem Cell Pool Activating the Notch Pathway by Abducting NUMB. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(14), 3871-3883. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2358>

Gaur, P., Bielenberg, D. R., Samuel, S., Bose, D., Zhou, Y., Gray, M. J., Dallas, N. A., Fan, F., Xia, L., Lu, J., & Ellis, L. M. (2009). Role of class 3 semaphorins and their receptors in tumor growth and angiogenesis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the*

*American Association for Cancer Research*, 15(22), 6763-6770. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1810>

Ge, X., Milenkovic, L., Suyama, K., Hartl, T., Purzner, T., Winans, A., Meyer, T., & Scott, M. P. (2015). Phosphodiesterase 4D acts downstream of Neuropilin to control Hedgehog signal transduction and the growth of medulloblastoma. *ELife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.07068>

Gibson, P., Tong, Y., Robinson, G., Thompson, M. C., Currle, D. S., Eden, C., Kranenburg, T. A., Hogg, T., Poppleton, H., Martin, J., Finkelstein, D., Pounds, S., Weiss, A., Patay, Z., Scoggins, M., Ogg, R., Pei, Y., Yang, Z.-J., Brun, S., ... Gilbertson, R. J. (2010). Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature*, 468(7327), 1095-1099. <https://doi.org/10.1038/nature09587>

Gill, K. P., & Denham, M. (2020). Optimized Transgene Delivery Using Third-Generation Lentiviruses. *Current Protocols in Molecular Biology*, 133(1), e125. <https://doi.org/10.1002/cpmb.125>

Ginhoux, F., & Merad, M. (2011). [Microglia arise from extra-embryonic yolk sac primitive progenitors]. *Medecine Sciences: M/S*, 27(8-9), 719-724. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011278013>

Glinka, Y., & Prud'homme, G. J. (2008). Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor  $\beta$ -1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(1), 302-310. <https://doi.org/10.1189/jlb.0208090>

Glinka, Y., Stoilova, S., Mohammed, N., & Prud'homme, G. J. (2011). Neuropilin-1 exerts co-receptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta. *Carcinogenesis*, 32(4), 613-621. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq281>

Gong, C., Valduga, J., Chateau, A., Richard, M., Pellegrini-Moïse, N., Barberi-Heyob, M., Chastagner, P., & Boura, C. (2018). Stimulation of medulloblastoma stem cells differentiation by a peptidomimetic targeting neuropilin-1. *Oncotarget*, 9(20), 15312-15325. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24521>

Gammel, D., Warmuth-Metz, M., von Bueren, A. O., Kool, M., Pietsch, T., Kretzschmar, H. A., Rowitch, D. H., Rutkowski, S., Pfister, S. M., & Schüller, U. (2012). Sonic hedgehog-associated medulloblastoma arising from the cochlear nuclei of the brainstem. *Acta Neuropathologica*, 123(4), 601-614. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-0961-0>

Griesinger, A. M., Birks, D. K., Donson, A. M., Amani, V., Hoffman, L. M., Waziri, A., Wang, M., Handler, M. H., & Foreman, N. K. (2013). Characterization of Distinct

Immunophenotypes Across Pediatric Brain Tumor Types. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *191*(9), 10.4049/jimmunol.1301966. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301966>

Gronseth, E., Gupta, A., Koceja, C., Kumar, S., Kutty, R. G., Rarick, K., Wang, L., & Ramchandran, R. (2020). Astrocytes influence medulloblastoma phenotypes and CD133 surface expression. *PLoS One*, *15*(7), e0235852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235852>

Grun, D., Adhikary, G., & Eckert, R. L. (2016). VEGF-A acts via neuropilin-1 to enhance epidermal cancer stem cell survival and formation of aggressive and highly vascularized tumors. *Oncogene*, *35*(33), 4379-4387. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.507>

Grun, D., Adhikary, G., & Eckert, R. L. (2018). NRP-1 interacts with GIPC1 and  $\alpha 6/\beta 4$ -integrins to increase YAP1/ $\Delta$ Np63 $\alpha$ -dependent epidermal cancer stem cell survival. *Oncogene*, *37*(34), 4711-4722. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0290-4>

Grun, D., Adhikary, G., & Eckert, R. L. (2019). NRP-1 interacts with GIPC1 and SYX to activate p38 MAPK signaling and cancer stem cell survival. *Molecular carcinogenesis*, *58*(4), 488-499. <https://doi.org/10.1002/mc.22943>

Gu, C., Limberg, B. J., Whitaker, G. B., Perman, B., Leahy, D. J., Rosenbaum, J. S., Ginty, D. D., & Kolodkin, A. L. (2002). Characterization of Neuropilin-1 Structural Features That Confer Binding to Semaphorin 3A and Vascular Endothelial Growth Factor 165. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(20), 18069-18076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201681200>

Guo, H.-F., & Vander Kooi, C. W. (2015). Neuropilin Functions as an Essential Cell Surface Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(49), 29120-29126. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.687327>

Guo, P., Hu, B., Gu, W., Xu, L., Wang, D., Huang, H.-J. S., Cavenee, W. K., & Cheng, S.-Y. (2003). Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. *The American Journal of Pathology*, *162*(4), 1083-1093. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63905-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63905-3)

Gururangan, S., Reap, E., Schmittling, R., Kocak, M., Reynolds, R., Grant, G., Onar-Thomas, A., Baxter, P., Pollack, I. F., Phillips, P., Boyett, J., Fouladi, M., & Mitchell, D. (2017). Regulatory T cell subsets in patients with medulloblastoma at diagnosis and during standard irradiation and chemotherapy (PBTC N-11). *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, *66*(12), 1589-1595. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2051-6>

Hambardzumyan, D., Becher, O. J., Rosenblum, M. K., Pandolfi, P. P., Manova-Todorova, K., & Holland, E. C. (2008). PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells

residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes & Development*, 22(4), 436-448. <https://doi.org/10.1101/gad.1627008>

Hambardzumyan, D., Gutmann, D. H., & Kettenmann, H. (2016). The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nature Neuroscience*, 19(1), 20-27. <https://doi.org/10.1038/nn.4185>

Hamerlik, P., Lathia, J. D., Rasmussen, R., Wu, Q., Bartkova, J., Lee, M., Moudry, P., Bartek, J., Fischer, W., Lukas, J., Rich, J. N., & Bartek, J. (2012). Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(3), 507-520. <https://doi.org/10.1084/jem.20111424>

Hammond, T. R., Dufort, C., Dissing-Olesen, L., Giera, S., Young, A., Wysoker, A., Walker, A. J., Gergits, F., Segel, M., Nemesh, J., Marsh, S. E., Saunders, A., Macosko, E., Ginhoux, F., Chen, J., Franklin, R. J. M., Piao, X., McCarroll, S. A., & Stevens, B. (2019). Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity*, 50(1), 253-271.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.004>

Hansen, W., Hutzler, M., Abel, S., Alter, C., Stockmann, C., Kliche, S., Albert, J., Sparwasser, T., Sakaguchi, S., Westendorf, A. M., Schadendorf, D., Buer, J., & Helfrich, I. (2012). Neuropilin 1 deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(11), 2001-2016. <https://doi.org/10.1084/jem.20111497>

Hayden Gephart, M. G., Sophie Su, Y., Bandara, S., Tsai, F.-C., Hong, J., Conley, N., Rayburn, H., Milenkovic, L., Meyer, T., & Scott, M. P. (2013). Neuropilin-2 contributes to tumorigenicity in a mouse model of Hedgehog pathway medulloblastoma. *Journal of neuro-oncology*, 115(2), 161-168. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1216-1>

Hendrikse, L. D., Haldipur, P., Saulnier, O., Millman, J., Sjoboen, A. H., Erickson, A. W., Ong, W., Gordon, V., Coudière-Morrison, L., Mercier, A. L., Shokouhian, M., Suárez, R. A., Ly, M., Borlase, S., Scott, D. S., Vladoiu, M. C., Farooq, H., Sirbu, O., Nakashima, T., ... Taylor, M. D. (2022). Failure of human rhombic lip differentiation underlies medulloblastoma formation. *Nature*, 609(7929), 1021-1028. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05215-w>

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., Franco, P., Mader, I., Schneider, M., Potthoff, A.-L., Delev, D., Hofmann, U. G., Fung, C., Beck, J., Sankowski, R., ... Schnell, O. (2019). Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive

environment in glioblastoma. *Nature Communications*, 10(1), 2541. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10493-6>

Henssen, A., Thor, T., Odersky, A., Heukamp, L., El-Hindy, N., Beckers, A., Speleman, F., Althoff, K., Schäfers, S., Schramm, A., Sure, U., Fleischhack, G., Eggert, A., & Schulte, J. H. (2013). BET bromodomain protein inhibition is a therapeutic option for medulloblastoma. *Oncotarget*, 4(11), 2080-2095. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1534>

Hirota, S., Clements, T. P., Tang, L. K., Morales, J. E., Lee, H. S., Oh, S. P., Rivera, G. M., Wagner, D. S., & McCarty, J. H. (2015). Neuropilin 1 balances  $\beta 8$  integrin-activated TGF $\beta$  signaling to control sprouting angiogenesis in the brain. *Development (Cambridge, England)*, 142(24), 4363-4373. <https://doi.org/10.1242/dev.113746>

Hovestadt, V., Smith, K. S., Bihannic, L., Filbin, M. G., Shaw, M. L., Baumgartner, A., DeWitt, J. C., Groves, A., Mayr, L., Weisman, H. R., Richman, A. R., Shore, M. E., Goumnerova, L., Rosencrance, C., Carter, R. A., Phoenix, T. N., Hadley, J. L., Tong, Y., Houston, J., ... Northcott, P. A. (2019). Resolving medulloblastoma cellular architecture by single-cell genomics. *Nature*, 572(7767), 74-79. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1434-6>

Hu, B., Guo, P., Bar-Joseph, I., Imanishi, Y., Jarzynka, M., Bogler, O., Mikkelsen, T., Hirose, T., Nishikawa, R., & Cheng, S. (2007). Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway. *Oncogene*, 26(38), 5577-5586. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210348>

Huang, G.-H., Xu, Q.-F., Cui, Y.-H., Li, N., Bian, X.-W., & Lv, S.-Q. (2016). Medulloblastoma stem cells : Promising targets in medulloblastoma therapy. *Cancer Science*, 107(5), 583. <https://doi.org/10.1111/cas.12925>

Huynh, C., Polisenio, L., Segura, M. F., Medicherla, R., Haimovic, A., Menendez, S., Shang, S., Pavlick, A., Shao, Y., Darvishian, F., Boylan, J. F., Osman, I., & Hernando, E. (2011). The Novel Gamma Secretase Inhibitor RO4929097 Reduces the Tumor Initiating Potential of Melanoma. *PLOS ONE*, 6(9), e25264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025264>

Hydbring, P., & Badalian-Very, G. (2013). Clinical applications of microRNAs. *F1000Research*, 2, 136. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-136.v3>

Ivanov, D. P., Coyle, B., Walker, D. A., & Grabowska, A. M. (2016). In vitro models of medulloblastoma : Choosing the right tool for the job. *Journal of Biotechnology*, 236, 10-25. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.028>

Jackson, S. R., Berrien-Elliott, M., Yuan, J., Hsueh, E. C., & Teague, R. M. (2014). Neuropilin-1 expression is induced on tolerant self-reactive CD8<sup>+</sup> T cells but is dispensable for

the tolerant phenotype. *PloS One*, 9(10), e110707.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110707>

Jarvis, A., Allerston, C. K., Jia, H., Herzog, B., Garza-Garcia, A., Winfield, N., Ellard, K., Aqil, R., Lynch, R., Chapman, C., Hartzoulakis, B., Nally, J., Stewart, M., Cheng, L., Menon, M., Tickner, M., Djordjevic, S., Driscoll, P. C., Zachary, I., & Selwood, D. L. (2010). Small molecule inhibitors of the neuropilin-1 vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) interaction. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(5), 2215-2226.  
<https://doi.org/10.1021/jm901755g>

Ji, J.-D., Park-Min, K.-H., & Ivashkiv, L. B. (2009). Expression and Function of Semaphorin 3A and Its Receptors in Human Monocyte-derived Macrophages. *Human immunology*, 70(4), 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.01.026>

Jia, H., Cheng, L., Tickner, M., Bagherzadeh, A., Selwood, D., & Zachary, I. (2010). Neuropilin-1 antagonism in human carcinoma cells inhibits migration and enhances chemosensitivity. *British Journal of Cancer*, 102(3), 541-552.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605539>

Katoh, M. (2013). Functional proteomics, human genetics and cancer biology of GIPC family members. *Experimental & Molecular Medicine*, 45(6), e26.  
<https://doi.org/10.1038/emm.2013.49>

Kawakami, T., Tokunaga, T., Hatanaka, H., Kijima, H., Yamazaki, H., Abe, Y., Osamura, Y., Inoue, H., Ueyama, Y., & Nakamura, M. (2002). Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, 95(10), 2196-2201. <https://doi.org/10.1002/cncr.10936>

Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., & Fujisawa, H. (1999). A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development (Cambridge, England)*, 126(21), 4895-4902.

Kawauchi, D., Ogg, R. J., Liu, L., Shih, D. J. H., Finkelstein, D., Murphy, B. L., Rehg, J. E., Korshunov, A., Calabrese, C., Zindy, F., Phoenix, T., Kawaguchi, Y., Gronych, J., Gilbertson, R. J., Lichter, P., Gajjar, A., Kool, M., Northcott, P. A., Pfister, S. M., & Roussel, M. F. (2017). Novel MYC-driven medulloblastoma models from multiple embryonic cerebellar cells. *Oncogene*, 36(37), 5231-5242. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.110>

Keane, L., Cheray, M., Blomgren, K., & Joseph, B. (2021). Multifaceted microglia—Key players in primary brain tumour heterogeneity. *Nature Reviews. Neurology*, 17(4), 243-259.  
<https://doi.org/10.1038/s41582-021-00463-2>

Kennis, B. A., Michel, K. A., Bruggmann, W. B., Laureano, A., Tao, R.-H., Somanchi, S. S., Einstein, S. A., Bravo-Alegria, J. B., Maegawa, S., Wahba, A., Kiany, S., Gordon, N., Silla, L., Schellingerhout, D., Khatua, S., Zaky, W., Sandberg, D., Cooper, L., Lee, D. A., ... Gopalakrishnan, V. (2019). Monitoring of intracerebellarly-administered natural killer cells with fluorine-19 MRI. *Journal of Neuro-Oncology*, *142*(3), 395-407. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03091-5>

Keysar, S. B., Le, P. N., Miller, B., Jackson, B. C., Eagles, J. R., Nieto, C., Kim, J., Tang, B., Glogowska, M. J., Morton, J. J., Padilla-Just, N., Gomez, K., Warnock, E., Reisinger, J., Arcaroli, J. J., Messersmith, W. A., Wakefield, L. M., Gao, D., Tan, A.-C., ... Jimeno, A. (2017). Regulation of Head and Neck Squamous Cancer Stem Cells by PI3K and SOX2. *Journal of the National Cancer Institute*, *109*(1). <https://doi.org/10.1093/jnci/djw189>

Khan, R. B., Patay, Z., Klimo, P., Huang, J., Kumar, R., Boop, F. A., Raches, D., Conklin, H. M., Sharma, R., Simmons, A., Sadighi, Z. S., Onar-Thomas, A., Gajjar, A., & Robinson, G. W. (2021). Clinical features, neurologic recovery, and risk factors of postoperative posterior fossa syndrome and delayed recovery: A prospective study. *Neuro-Oncology*, *23*(9), 1586-1596. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab030>

Kim, J., Lee, J. J., Kim, J., Gardner, D., & Beachy, P. A. (2010). Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(30), 13432-13437. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006822107>

Kitsukawa, T., Shimono, A., Kawakami, A., Kondoh, H., & Fujisawa, H. (1995). Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development (Cambridge, England)*, *121*(12), 4309-4318.

Koch, S., & Claesson-Welsh, L. (2012). Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(7), a006502. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006502>

Kofler, N., & Simons, M. (2016). The expanding role of Neuropilin: Regulation of vascular TGF $\beta$  and PDGF signaling. *Current opinion in hematology*, *23*(3), 260-267. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000233>

Kolodkin, A. L., Levengood, D. V., Rowe, E. G., Tai, Y. T., Giger, R. J., & Ginty, D. D. (1997). Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell*, *90*(4), 753-762. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80535-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80535-8)

Kool, M., Jones, D. T. W., Jäger, N., Northcott, P. A., Pugh, T. J., Hovestadt, V., Piro, R. M., Esparza, L. A., Markant, S. L., Remke, M., Milde, T., Bourdeaut, F., Ryzhova, M., Sturm, D., Pfaff, E., Stark, S., Hutter, S., Şeker-Cin, H., Johann, P., ... Pfister, S. M. (2014). Genome Sequencing of SHH Medulloblastoma Predicts Genotype-Related Response to Smoothed Inhibition. *Cancer cell*, *25*(3), 393-405. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.004>

Kuntzel, T., & Bagnard, D. (2022). Manipulating Macrophage/Microglia Polarization to Treat Glioblastoma or Multiple Sclerosis. *Pharmaceutics*, *14*(2), 344. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020344>

Lafay-Cousin, L., Smith, A., Chi, S. N., Wells, E., Madden, J., Margol, A., Ramaswamy, V., Finlay, J., Taylor, M. D., Dhall, G., Strother, D., Kieran, M. W., Foreman, N. K., Packer, R. J., & Bouffet, E. (2016). Clinical, Pathological, and Molecular Characterization of Infant Medulloblastomas Treated with Sequential High-Dose Chemotherapy. *Pediatric Blood & Cancer*, *63*(9), 1527-1534. <https://doi.org/10.1002/pbc.26042>

Lauth, M., Bergström, Å., Shimokawa, T., & Toftgård, R. (2007). Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(20), 8455-8460. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609699104>

Lee, C., Lee, J., Choi, S. A., Kim, S.-K., Wang, K.-C., Park, S.-H., Kim, S. H., Lee, J. Y., & Phi, J. H. (2018). M1 macrophage recruitment correlates with worse outcome in SHH Medulloblastomas. *BMC Cancer*, *18*, 535. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4457-8>

Lepelletier, Y., Smaniotto, S., Hadj-Slimane, R., Villa-Verde, D. M. S., Nogueira, A. C., Dardenne, M., Hermine, O., & Savino, W. (2007). Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(13), 5545-5550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700705104>

Leung, C., Lingbeek, M., Shakhova, O., Liu, J., Tanger, E., Saremaslani, P., Van Lohuizen, M., & Marino, S. (2004). *Bmi1* is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature*, *428*(6980), 337-341. <https://doi.org/10.1038/nature02385>

Li, Q., Cheng, Z., Zhou, L., Darmanis, S., Neff, N. F., Okamoto, J., Gulati, G., Bennett, M. L., Sun, L. O., Clarke, L. E., Marschallinger, J., Yu, G., Quake, S. R., Wyss-Coray, T., & Barres, B. A. (2019). Developmental Heterogeneity of Microglia and Brain Myeloid Cells Revealed by Deep Single-Cell RNA Sequencing. *Neuron*, *101*(2), 207-223.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.12.006>

Li, T., Kang, G., Wang, T., & Huang, H. (2018). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. *Oncology Letters*, *16*(1), 687-702. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8733>

Lin, Z., Li, S., Sheng, H., Cai, M., Ma, L. Y. S., Hu, L., Xu, S., Yu, L. S., & Zhang, N. (2016). Suppression of GLI sensitizes medulloblastoma cells to mitochondria-mediated apoptosis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *142*(12), 2469-2478. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2241-1>

Liu, C., Wang, Z., Wang, Y., & Gu, W. (2015). MiR-338 suppresses the growth and metastasis of OSCC cells by targeting NRP1. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *398*(1-2), 115-122. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2211-3>

Liu, H., Sun, Y., O'Brien, J. A., Franco-Barraza, J., Qi, X., Yuan, H., Jin, W., Zhang, J., Gu, C., Zhao, Z., Yu, C., Feng, S., & Yu, X. (2020). Necroptotic astrocytes contribute to maintaining stemness of disseminated medulloblastoma through CCL2 secretion. *Neuro-Oncology*, *22*(5), 625-638. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz214>

Liu, Y., Yuelling, L. W., Wang, Y., Du, F., Gordon, R. E., O'Brien, J. A., Ng, J. M. Y., Robins, S., Lee, E. H., Liu, H., Curran, T., & Yang, Z.-J. (2017). Astrocytes Promote Medulloblastoma Progression through Hedgehog Secretion. *Cancer Research*, *77*(23), 6692-6703. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1463>

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, *114*(2), 97-109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>

Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffiatti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Neuro-Oncology*, *23*(8), 1231-1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>

Luo, M., Hou, L., Li, J., Shao, S., Huang, S., Meng, D., Liu, L., Feng, L., Xia, P., Qin, T., & Zhao, X. (2016). VEGF/NRP-1axis promotes progression of breast cancer via enhancement of epithelial-mesenchymal transition and activation of NF- $\kappa$ B and  $\beta$ -catenin. *Cancer Letters*, *373*(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.010>

Luo, Z., Xia, M., Shi, W., Zhao, C., Wang, J., Xin, D., Dong, X., Xiong, Y., Zhang, F., Berry, K., Ogurek, S., Liu, X., Rao, R., Xing, R., Wu, L. M. N., Cui, S., Xu, L., Lin, Y., Ma,

W., ... Lu, Q. R. (2022). Human fetal cerebellar cell atlas informs medulloblastoma origin and oncogenesis. *Nature*, *612*(7941), 787-794. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05487-2>

MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling : Components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, *17*(1), 9-26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>

Manoranjan, B., Venugopal, C., Bakhshinyan, D., Adile, A. A., Richards, L., Kameda-Smith, M. M., Whitley, O., Dvorkin-Gheva, A., Subapanditha, M., Savage, N., Tatari, N., McKenna, D., Bassey-Archibong, B., Winegarten, N., Hallett, R., Provias, J. P., Yarascavitch, B., Ajani, O., Fleming, A., ... Singh, S. K. (2020). Wnt activation as a therapeutic strategy in medulloblastoma. *Nature Communications*, *11*(1), 4323. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17953-4>

Manoranjan, B., Venugopal, C., McFarlane, N., Doble, B. W., Dunn, S. E., Scheinemann, K., & Singh, S. K. (2013). Medulloblastoma stem cells : Modeling tumor heterogeneity. *Cancer Letters*, *338*(1), 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.07.010>

Margol, A. S., Robison, N. J., Gnanachandran, J., Hung, L. T., Kennedy, R. J., Vali, M., Dhall, G., Finlay, J. L., Erdreich-Epstein, A., Krieger, M. D., Drissi, R., Fouladi, M., Gilles, F. H., Judkins, A. R., Sposto, R., & Asgharzadeh, S. (2015). Tumor-associated macrophages in SHH subgroup of medulloblastomas. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *21*(6), 1457-1465. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1144>

Markant, S. L., Esparza, L. A., Sun, J., Barton, K. L., McCoig, L. M., Grant, G. A., Crawford, J. R., Levy, M. L., Northcott, P. A., Shih, D., Remke, M., Taylor, M. D., & Wechsler-Reya, R. J. (2013). Targeting sonic hedgehog-associated medulloblastoma through inhibition of Aurora and Polo-like kinases. *Cancer Research*, *73*(20), 6310-6322. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4258>

Markovic, D. S., Vinnakota, K., Chirasani, S., Synowitz, M., Raguet, H., Stock, K., Sliwa, M., Lehmann, S., Kälin, R., van Rooijen, N., Holmbeck, K., Heppner, F. L., Kiwit, J., Matyash, V., Lehnardt, S., Kaminska, B., Glass, R., & Kettenmann, H. (2009). Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(30), 12530-12535. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804273106>

Matsushita, A., Götze, T., & Korc, M. (2007). Hepatocyte growth factor-mediated cell invasion in pancreatic cancer cells is dependent on neuropilin-1. *Cancer Research*, *67*(21), 10309-10316. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3256>

Maximov, V., Chen, Z., Wei, Y., Robinson, M. H., Herting, C. J., Shanmugam, N. S., Rudneva, V. A., Goldsmith, K. C., MacDonald, T. J., Northcott, P. A., Hambarzumyan, D., & Kenney, A. M. (2019). Tumour-associated macrophages exhibit anti-tumoural properties in Sonic Hedgehog medulloblastoma. *Nature Communications*, *10*(1), 2410. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10458-9>

Memmi, E. M., Sanarico, A. G., Giacobbe, A., Peschiaroli, A., Frezza, V., Cicalese, A., Pisati, F., Tosoni, D., Zhou, H., Tonon, G., Antonov, A., Melino, G., Pelicci, P. G., & Bernassola, F. (2015). P63 sustains self-renewal of mammary cancer stem cells through regulation of Sonic Hedgehog signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(11), 3499-3504. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500762112>

Menyhárt, O., Giangaspero, F., & Györffy, B. (2019). Molecular markers and potential therapeutic targets in non-WNT/non-SHH (group 3 and group 4) medulloblastomas. *Journal of Hematology & Oncology*, *12*(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0712-y>

Merchant, T. E., Kun, L. E., Krasin, M. J., Wallace, D., Chintagumpala, M. M., Woo, S. Y., Ashley, D. M., Sexton, M., Kellie, S. J., Ahern, V., & Gajjar, A. (2008). Multi-institution prospective trial of reduced-dose craniospinal irradiation (23.4 Gy) followed by conformal posterior fossa (36 Gy) and primary site irradiation (55.8 Gy) and dose-intensive chemotherapy for average-risk medulloblastoma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, *70*(3), 782-787. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.07.2342>

Mercurio, A. M. (2019). VEGF/Neuropilin Signaling in Cancer Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030490>

Miao, H.-Q., Lee, P., Lin, H., Soker, S., & Klagsbrun, M. (2000). Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *The FASEB Journal*, *14*(15), 2532-2539. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0250com>

Miao, Z.-F., Xu, H., Xu, H.-M., Wang, Z.-N., Zhao, T.-T., Song, Y.-X., & Xu, Y.-Y. (2017). DLL4 overexpression increases gastric cancer stem/progenitor cell self-renewal ability and correlates with poor clinical outcome via Notch-1 signaling pathway activation. *Cancer Medicine*, *6*(1), 245-257. <https://doi.org/10.1002/cam4.962>

Middleton, K., Jones, J., Lwin, Z., & Coward, J. I. G. (2014). Interleukin-6: An angiogenic target in solid tumours. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *89*(1), 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.08.004>

Miele, E., Po, A., Begalli, F., Antonucci, L., Mastronuzzi, A., Marras, C. E., Carai, A., Cucchi, D., Abballe, L., Besharat, Z. M., Catanzaro, G., Infante, P., Di Marcotullio, L., Canettieri, G., De Smaele, E., Screpanti, I., Locatelli, F., & Ferretti, E. (2017).  $\beta$ -arrestin1-

mediated acetylation of Gli1 regulates Hedgehog/Gli signaling and modulates self-renewal of SHH medulloblastoma cancer stem cells. *BMC Cancer*, 17(1), 488. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3477-0>

Millard, N. E., & De Braganca, K. C. (2016). Medulloblastoma. *Journal of Child Neurology*, 31(12), 1341-1353. <https://doi.org/10.1177/0883073815600866>

Miyauchi, J. T., Caponegro, M. D., Chen, D., Choi, M. K., Li, M., & Tsirka, S. E. (2018). Deletion of Neuropilin 1 from Microglia or Bone Marrow-Derived Macrophages Slows Glioma Progression. *Cancer Research*, 78(3), 685-694. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1435>

Miyauchi, J. T., Chen, D., Choi, M., Nissen, J. C., Shroyer, K. R., Djordevic, S., Zachary, I. C., Selwood, D., & Tsirka, S. E. (2016). Ablation of Neuropilin 1 from glioma-associated microglia and macrophages slows tumor progression. *Oncotarget*, 7(9), 9801-9814. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6877>

Morabito, M., Larcher, M., Cavalli, F. M., Foray, C., Forget, A., Mirabal-Ortega, L., Andrianteranagna, M., Druillenec, S., Garancher, A., Masliah-Planchon, J., Leboucher, S., Debalkew, A., Raso, A., Delattre, O., Puget, S., Doz, F., Taylor, M. D., Ayrault, O., Bourdeaut, F., ... Pouponnot, C. (2019). An autocrine ActivinB mechanism drives TGF $\beta$ /Activin signaling in Group 3 medulloblastoma. *EMBO Molecular Medicine*, 11(8), e9830. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809830>

Mulhern, R. K., Palmer, S. L., Merchant, T. E., Wallace, D., Kocak, M., Brouwers, P., Krull, K., Chintagumpala, M., Stargatt, R., Ashley, D. M., Tyc, V. L., Kun, L., Boyett, J., & Gajjar, A. (2005). Neurocognitive consequences of risk-adapted therapy for childhood medulloblastoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(24), 5511-5519. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.00.703>

Murata, D., Mineharu, Y., Arakawa, Y., Liu, B., Tanji, M., Yamaguchi, M., Fujimoto, K.-I., Fukui, N., Terada, Y., Yokogawa, R., Yamaguchi, M., Minamiguchi, S., & Miyamoto, S. (2018). High programmed cell death 1 ligand-1 expression : Association with CD8+ T-cell infiltration and poor prognosis in human medulloblastoma. *Journal of Neurosurgery*, 128(3), 710-716. <https://doi.org/10.3171/2016.11.JNS16991>

Naik, A., Al-Yahyaee, A., Abdullah, N., Sam, J.-E., Al-Zeheimi, N., Yaish, M. W., & Adham, S. A. (2018). Neuropilin-1 promotes the oncogenic Tenascin-C/integrin  $\beta$ 3 pathway and modulates chemoresistance in breast cancer cells. *BMC Cancer*, 18. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4446-y>

Najjar, V. A., & Nishioka, K. (1970). « Tuftsin » : A natural phagocytosis stimulating peptide. *Nature*, 228(5272), 672-673. <https://doi.org/10.1038/228672a0>

Napolitano, V., & Tamagnone, L. (2019). Neuropilins Controlling Cancer Therapy Responsiveness. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8). <https://doi.org/10.3390/ijms20082049>

Nasarre, C., Roth, M., Jacob, L., Roth, L., Koncina, E., Thien, A., Labourdette, G., Poulet, P., Hubert, P., Crémel, G., Roussel, G., Aunis, D., & Bagnard, D. (2010). Peptide-based interference of the transmembrane domain of neuropilin-1 inhibits glioma growth in vivo. *Oncogene*, 29(16), 2381-2392. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.9>

Nedergaard, M., Ransom, B., & Goldman, S. A. (2003). New roles for astrocytes : Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences*, 26(10), 523-530. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.08.008>

Niland, S., & Eble, J. A. (2019). Neuropilins in the Context of Tumor Vasculature. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030639>

Nissen, J. C., Selwood, D. L., & Tsirka, S. E. (2013). Tuftsin signals through its receptor neuropilin-1 via the transforming growth factor beta pathway. *Journal of Neurochemistry*, 127(3), 394-402. <https://doi.org/10.1111/jnc.12404>

Nunes, T., Hamdan, D., Leboeuf, C., El Bouchtaoui, M., Gapihan, G., Nguyen, T. T., Meles, S., Angeli, E., Ratajczak, P., Lu, H., Di Benedetto, M., Bousquet, G., & Janin, A. (2018). Targeting Cancer Stem Cells to Overcome Chemoresistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19124036>

Oh, H., Takagi, H., Otani, A., Koyama, S., Kemmochi, S., Uemura, A., & Honda, Y. (2002). Selective induction of neuropilin-1 by vascular endothelial growth factor (VEGF) : A mechanism contributing to VEGF-induced angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 383-388. <https://doi.org/10.1073/pnas.012074399>

Olivares-Urbano, M. A., Griñán-Lisón, C., Marchal, J. A., & Núñez, M. I. (2020). CSC Radioresistance : A Therapeutic Challenge to Improve Radiotherapy Effectiveness in Cancer. *Cells*, 9(7), E1651. <https://doi.org/10.3390/cells9071651>

Osada, H., Tokunaga, T., Nishi, M., Hatanaka, H., Abe, Y., Tsugu, A., Kijima, H., Yamazaki, H., Ueyama, Y., & Nakamura, M. (2004). Overexpression of the neuropilin 1 (NRP1) gene correlated with poor prognosis in human glioma. *Anticancer Research*, 24(2B), 547-552.

Osman, A. M., Sun, Y., Burns, T. C., He, L., Kee, N., Oliva-Vilarnau, N., Alevyzaki, A., Zhou, K., Louhivuori, L., Uhlén, P., Hedlund, E., Betsholtz, C., Lauschke, V. M., Kele, J., & Blomgren, K. (2020). Radiation Triggers a Dynamic Sequence of Transient Microglial Alterations in Juvenile Brain. *Cell Reports*, *31*(9). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107699>

Ostrow, L. W., Suchyna, T. M., & Sachs, F. (2011). Stretch induced endothelin-1 secretion by adult rat astrocytes involves calcium influx via stretch-activated ion channels (SACs). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *410*(1), 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.109>

Overacre-Delgoffe, A. E., Chikina, M., Dadey, R. E., Yano, H., Brunazzi, E. A., Shayan, G., Horne, W., Moskovitz, J. M., Kolls, J. K., Sander, C., Shuai, Y., Normolle, D. P., Kirkwood, J. M., Ferris, R. L., Delgoffe, G. M., Bruno, T. C., Workman, C. J., & Vignali, D. A. (2017). Interferon- $\gamma$  drives Treg fragility to promote anti-tumor immunity. *Cell*, *169*(6), 1130-1141.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.005>

Packer, R. J., Gajjar, A., Vezina, G., Rorke-Adams, L., Burger, P. C., Robertson, P. L., Bayer, L., LaFond, D., Donahue, B. R., Marymont, M. H., Muraszko, K., Langston, J., & Sposto, R. (2006). Phase III study of craniospinal radiation therapy followed by adjuvant chemotherapy for newly diagnosed average-risk medulloblastoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *24*(25), 4202-4208. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.4980>

Pan, Q., Chantry, Y., Liang, W.-C., Stawicki, S., Mak, J., Rathore, N., Tong, R. K., Kowalski, J., Yee, S. F., Pacheco, G., Ross, S., Cheng, Z., Le Couter, J., Plowman, G., Peale, F., Koch, A. W., Wu, Y., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., & Watts, R. J. (2007). Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell*, *11*(1), 53-67. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.018>

Pan, Q., Chantry, Y., Wu, Y., Rathore, N., Tong, R. K., Peale, F., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., Koch, A. W., & Watts, R. J. (2007). Neuropilin-1 Binds to VEGF121 and Regulates Endothelial Cell Migration and Sprouting. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(33), 24049-24056. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703554200>

Panosyan, E. H., Laks, D. R., Masterman-Smith, M., Mottahedeh, J., Yong, W. H., Cloughesy, T. F., Lazareff, J. A., Mischel, P. S., Moore, T. B., & Kornblum, H. I. (2010). Clinical Outcome in Pediatric Glial and Embryonal Brain Tumors Correlates With In Vitro Multi-Passageable Neurosphere Formation. *Pediatric blood & cancer*, *55*(4), 644-651. <https://doi.org/10.1002/pbc.22627>

Parker, M. W., Guo, H.-F., Li, X., Linkugel, A. D., & Vander Kooi, C. W. (2012). Function of the Neuropilin Family as Essential Pleiotropic Cell Surface Receptors. *Biochemistry*, *51*(47), 9437-9446. <https://doi.org/10.1021/bi3012143>

Patnaik, A., LoRusso, P. M., Messersmith, W. A., Papadopoulos, K. P., Gore, L., Beeram, M., Ramakrishnan, V., Kim, A. H., Beyer, J. C., Mason Shih, L., Darbonne, W. C., Xin, Y., Yu, R., Xiang, H., Brachmann, R. K., & Weekes, C. D. (2014). A Phase Ib study evaluating MNRP1685A, a fully human anti-NRP1 monoclonal antibody, in combination with bevacizumab and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *73*(5), 951-960. <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2426-8>

Paul, M. R., Huo, Y., Liu, A., Lesperance, J., Garancher, A., Wechsler-Reya, R. J., & Zage, P. E. (2020). Characterization of G-CSF receptor expression in medulloblastoma. *Neuro-Oncology Advances*, *2*(1), vdaa062. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdaa062>

Pei, Y., Liu, K.-W., Wang, J., Garancher, A., Tao, R., Esparza, L. A., Maier, D. L., Udaka, Y. T., Murad, N., Morrissy, S., Seker-Cin, H., Brabetz, S., Qi, L., Kogiso, M., Schubert, S., Olson, J. M., Cho, Y.-J., Li, X.-N., Crawford, J. R., ... Wechsler-Reya, R. J. (2016). HDAC and PI3K Antagonists Cooperate to Inhibit Growth of MYC-driven Medulloblastoma. *Cancer cell*, *29*(3), 311-323. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.02.011>

Pei, Y., Moore, C. E., Wang, J., Tewari, A. K., Eroshkin, A., Cho, Y.-J., Witt, H., Korshunov, A., Read, T.-A., Sun, J. L., Schmitt, E. M., Miller, C. R., Buckley, A. F., McLendon, R. E., Westbrook, T. F., Northcott, P. A., Taylor, M. D., Pfister, S. M., Febbo, P. G., & Wechsler-Reya, R. J. (2012). An animal model of MYC-driven medulloblastoma. *Cancer Cell*, *21*(2), 155-167. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.12.021>

Peleli, M., Moustakas, A., & Papapetropoulos, A. (2020). Endothelial-Tumor Cell Interaction in Brain and CNS Malignancies. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(19), E7371. <https://doi.org/10.3390/ijms21197371>

Pellet-Many, C., Frankel, P., Jia, H., & Zachary, I. (2008). Neuropilins : Structure, function and role in disease. *The Biochemical Journal*, *411*(2), 211-226. <https://doi.org/10.1042/BJ20071639>

Pernot, M., Vanderesse, R., Frochot, C., Guillemin, F., & Barberi-Heyob, M. (2011). Stability of peptides and therapeutic success in cancer. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *7*(7), 793-802. <https://doi.org/10.1517/17425255.2011.574126>

Phoenix, T. N., Patmore, D. M., Boop, S., Boulos, N., Jacus, M. O., Patel, Y. T., Roussel, M. F., Finkelstein, D., Goumnerova, L., Perreault, S., Wadhwa, E., Cho, Y.-J., Stewart, C. F.,

& Gilbertson, R. J. (2016). Medulloblastoma Genotype Dictates Blood Brain Barrier Phenotype. *Cancer Cell*, 29(4), 508-522. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.002>

Pinel, S., Chastagner, P., Merlin, J.-L., Marchal, C., Taghian, A., & Barberi-Heyob, M. (2006). Topotecan can compensate for protracted radiation treatment time effects in high grade glioma xenografts. *Journal of Neuro-Oncology*, 76(1), 31-38. <https://doi.org/10.1007/s11060-005-3666-6>

Pistollato, F., Rampazzo, E., Persano, L., Abbadi, S., Frasson, C., Denaro, L., D'Avella, D., Panchision, D. M., Puppa, A. D., Scienza, R., & Basso, G. (2010). Interaction of HIF1 $\alpha$  and Notch Signaling Regulates Medulloblastoma Precursor Proliferation and Fate. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 28(11), 1918-1929. <https://doi.org/10.1002/stem.518>

Placone, A. L., Quiñones-Hinojosa, A., & Searson, P. C. (2016). The role of astrocytes in the progression of brain cancer : Complicating the picture of the tumor microenvironment. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(1), 61-69. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4242-0>

Plate, K. H., Breier, G., Weich, H. A., & Risau, W. (1992). Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*, 359(6398), Art. 6398. <https://doi.org/10.1038/359845a0>

Podojil, J. R., Chiang, M.-Y., Ifergan, I., Copeland, R., Liu, L. N., Maloveste, S., Langermann, S., Liebenson, D., Balabanov, R., Chi, H., Chen, L., Vignali, D. A. A., & Miller, S. D. (2018). B7-H4 Modulates Regulatory CD4<sup>+</sup> T Cell Induction and Function via Ligation of a Semaphorin 3a/Plexin A4/Neuropilin-1 Complex. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 201(3), 897-907. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700811>

Pollack, I. F., Agnihotri, S., & Broniscer, A. (2019). Childhood brain tumors : Current management, biological insights, and future directions. *Journal of neurosurgery. Pediatrics*, 23(3), 261-273. <https://doi.org/10.3171/2018.10.PEDS18377>

Pöschl, J., Bartels, M., Ohli, J., Bianchi, E., Kuteykin-Teplyakov, K., Grammel, D., Ahlfeld, J., & Schüller, U. (2014). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibits the Shh pathway and impairs tumor growth in Shh-dependent medulloblastoma. *Acta Neuropathologica*, 127(4), 605-607. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1258-2>

Potente, M., & Carmeliet, P. (2017). The Link Between Angiogenesis and Endothelial Metabolism. *Annual Review of Physiology*, 79(1), 43-66. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105134>

Powell, J., Mota, F., Steadman, D., Soudy, C., Miyauchi, J. T., Crosby, S., Jarvis, A., Reisinger, T., Winfield, N., Evans, G., Finniear, A., Yelland, T., Chou, Y.-T., Chan, A. W. E.,

O’Leary, A., Cheng, L., Liu, D., Fotinou, C., Milagre, C., ... Selwood, D. L. (2018). Small Molecule Neuropilin-1 Antagonists Combine Antiangiogenic and Antitumor Activity with Immune Modulation through Reduction of Transforming Growth Factor Beta (TGF $\beta$ ) Production in Regulatory T-Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, *61*(9), 4135-4154. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00210>

Priego, N., Zhu, L., Monteiro, C., Mulders, M., Wasilewski, D., Bindeman, W., Doglio, L., Martínez, L., Martínez-Saez, E., Ramón Y Cajal, S., Megías, D., Hernández-Encinas, E., Blanco-Aparicio, C., Martínez, L., Zarzuela, E., Muñoz, J., Fustero-Torre, C., Piñeiro-Yáñez, E., Hernández-Laín, A., ... Valiente, M. (2018). STAT3 labels a subpopulation of reactive astrocytes required for brain metastasis. *Nature Medicine*, *24*(7), 1024-1035. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0044-4>

Ramaswamy, V., Remke, M., Bouffet, E., Bailey, S., Clifford, S. C., Doz, F., Kool, M., Dufour, C., Vassal, G., Milde, T., Witt, O., von Hoff, K., Pietsch, T., Northcott, P. A., Gajjar, A., Robinson, G. W., Padovani, L., André, N., Massimino, M., ... Pomeroy, S. L. (2016). Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era : The current consensus. *Acta Neuropathologica*, *131*(6), 821-831. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1569-6>

Read, T.-A., Fogarty, M. P., Markant, S. L., McLendon, R. E., Wei, Z., Ellison, D. W., Febbo, P. G., & Wechsler-Reya, R. J. (2009). Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma. *Cancer Cell*, *15*(2), 135-147. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.12.016>

Reis, M., Czupalla, C. J., Ziegler, N., Devraj, K., Zinke, J., Seidel, S., Heck, R., Thom, S., Macas, J., Bockamp, E., Fruttiger, M., Taketo, M. M., Dimmeler, S., Plate, K. H., & Liebner, S. (2012). Endothelial Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibits glioma angiogenesis and normalizes tumor blood vessels by inducing PDGF-B expression. *The Journal of Experimental Medicine*, *209*(9), 1611-1627. <https://doi.org/10.1084/jem.20111580>

Remke, M., & Ramaswamy, V. (2018). Infant medulloblastoma—Learning new lessons from old strata. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *15*(11), 659-660. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0071-6>

Richard, M., Chateau, A., Jelsch, C., Didierjean, C., Manival, X., Charron, C., Maigret, B., Barberi-Heyob, M., Chapleur, Y., Boura, C., & Pellegrini-Moïse, N. (2016). Carbohydrate-based peptidomimetics targeting neuropilin-1 : Synthesis, molecular docking study and in vitro biological activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *24*(21), 5315-5325. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.08.052>

Rizzolio, S., Cagnoni, G., Battistini, C., Bonelli, S., Isella, C., Van Ginderachter, J. A., Bernards, R., Di Nicolantonio, F., Giordano, S., & Tamagnone, L. (2018). Neuropilin-1 upregulation elicits adaptive resistance to oncogene-targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(9), 3976-3990. <https://doi.org/10.1172/JCI99257>

Robinson, G. W., Orr, B. A., Wu, G., Gururangan, S., Lin, T., Qaddoumi, I., Packer, R. J., Goldman, S., Prados, M. D., Desjardins, A., Chintagumpala, M., Takebe, N., Kaste, S. C., Rusch, M., Allen, S. J., Onar-Thomas, A., Stewart, C. F., Fouladi, M., Boyett, J. M., ... Gajjar, A. (2015). Vismodegib Exerts Targeted Efficacy Against Recurrent Sonic Hedgehog-Subgroup Medulloblastoma : Results From Phase II Pediatric Brain Tumor Consortium Studies PBTC-025B and PBTC-032. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *33*(24), 2646-2654. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.1591>

Rodon, J., Tawbi, H. A., Thomas, A. L., Stoller, R. G., Turtschi, C. P., Baselga, J., Sarantopoulos, J., Mahalingam, D., Shou, Y., Moles, M. A., Yang, L., Granvil, C., Hurh, E., Rose, K. L., Amakye, D. D., Dummer, R., & Mita, A. C. (2014). A phase I, multicenter, open-label, first-in-human, dose-escalation study of the oral smoothed inhibitor Sonidegib (LDE225) in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *20*(7), 1900-1909. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1710>

Roy, S., Bag, A. K., Singh, R. K., Talmadge, J. E., Batra, S. K., & Datta, K. (2017). Multifaceted Role of Neuropilins in the Immune System : Potential Targets for Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01228>

Rudin, C. M., Hann, C. L., Laterra, J., Yauch, R. L., Callahan, C. A., Fu, L., Holcomb, T., Stinson, J., Gould, S. E., Coleman, B., LoRusso, P. M., Von Hoff, D. D., de Sauvage, F. J., & Low, J. A. (2009). Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *The New England Journal of Medicine*, *361*(12), 1173-1178. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0902903>

Sarkar, S., Mirzaei, R., Zemp, F. J., Wei, W., Senger, D. L., Robbins, S. M., & Yong, V. W. (2017). Activation of NOTCH Signaling by Tenascin-C Promotes Growth of Human Brain Tumor-Initiating Cells. *Cancer Research*, *77*(12), 3231-3243. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2171>

Sarris, M., Andersen, K. G., Randow, F., Mayr, L., & Betz, A. G. (2008). Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition. *Immunity*, *28*(3), 402-413. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.01.012>

Schuch, G., Machluf, M., Bartsch, G., Nomi, M., Richard, H., Atala, A., & Soker, S. (2002). In vivo administration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its antagonist, soluble neuropilin-1, predicts a role of VEGF in the progression of acute myeloid leukemia in vivo. *Blood*, *100*(13), 4622-4628. <https://doi.org/10.1182/blood.V100.13.4622>

Schüller, U., Heine, V. M., Mao, J., Kho, A. T., Dillon, A. K., Han, Y.-G., Huillard, E., Sun, T., Ligon, A. H., Qian, Y., Ma, Q., Alvarez-Buylla, A., McMahon, A. P., Rowitch, D. H., & Ligon, K. L. (2008). Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell*, *14*(2), 123-134. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.07.005>

Seike, T., Fujita, K., Yamakawa, Y., Kido, M. A., Takiguchi, S., Teramoto, N., Iguchi, H., & Noda, M. (2011). Interaction between lung cancer cells and astrocytes via specific inflammatory cytokines in the microenvironment of brain metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, *28*(1), 13-25. <https://doi.org/10.1007/s10585-010-9354-8>

Sengupta, S., Pomeranz Krummel, D., & Pomeroy, S. (2017). The evolution of medulloblastoma therapy to personalized medicine. *F1000Research*, *6*, 490. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10859.1>

Shao, L., Zhang, Y., Gong, X., Dong, Z., Wei, W., Sun, H., Sun, R., Cong, L., Cong, X., & Jin, S. (2021). Effects of MLL5 and HOXA regulated by NRP1 on radioresistance in A549. *Oncology Letters*, *21*(5), 403. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12664>

Shi, L., Fei, X., Wang, Z., & You, Y. (2015). PI3K inhibitor combined with miR-125b inhibitor sensitize TMZ-induced anti-glioma stem cancer effects through inactivation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, *51*(10), 1047-1055. <https://doi.org/10.1007/s11626-015-9931-x>

Shih, D. J. H., Northcott, P. A., Remke, M., Korshunov, A., Ramaswamy, V., Kool, M., Luu, B., Yao, Y., Wang, X., Dubuc, A. M., Garzia, L., Peacock, J., Mack, S. C., Wu, X., Rolider, A., Morrissy, A. S., Cavalli, F. M. G., Jones, D. T. W., Zitterbart, K., ... Taylor, M. D. (2014). Cytogenetic Prognostication Within Medulloblastoma Subgroups. *Journal of Clinical Oncology*, *32*(9), 886-896. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.9539>

Sigafoos, A. N., Paradise, B. D., & Fernandez-Zapico, M. E. (2021). Hedgehog/GLI Signaling Pathway : Transduction, Regulation, and Implications for Disease. *Cancers*, *13*(14), 3410. <https://doi.org/10.3390/cancers13143410>

Singh, S. K., Clarke, I. D., Hide, T., & Dirks, P. B. (2004). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, *23*(43), 7267-7273. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207946>

Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., & Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, *432*(7015), 396-401. <https://doi.org/10.1038/nature03128>

Skoda, A. M., Simovic, D., Karin, V., Kardum, V., Vranic, S., & Serman, L. (2018). The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer : A comprehensive review. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, *18*(1), 8-20. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2018.2756>

Smith, K. S., Bihannic, L., Gudenas, B. L., Haldipur, P., Tao, R., Gao, Q., Li, Y., Aldinger, K. A., Iskusnykh, I. Y., Chizhikov, V. V., Scoggins, M., Zhang, S., Edwards, A., Deng, M., Glass, I. A., Overman, L. M., Millman, J., Sjoboen, A. H., Hadley, J., ... Northcott, P. A. (2022). Unified rhombic lip origins of group 3 and group 4 medulloblastoma. *Nature*, *609*(7929), 1012-1020. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05208-9>

Snuderl, M., Batista, A., Kirkpatrick, N. D., de Almodovar, C. R., Riedemann, L., Walsh, E. C., Anolik, R., Huang, Y., Martin, J. D., Kamoun, W., Knevels, E., Schmidt, T., Farrar, C. T., Vakoc, B. J., Mohan, N., Chung, E., Roberge, S., Peterson, T., Bais, C., ... Jain, R. K. (2013). Targeting placental growth factor/neuropilin 1 pathway inhibits growth and spread of medulloblastoma. *Cell*, *152*(5), 1065-1076. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.036>

Sofroniew, M. V. (2014). Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, *20*(2), 160-172. <https://doi.org/10.1177/1073858413504466>

Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., & Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, *92*(6), 735-745. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81402-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81402-6)

Solomon, B. D., Mueller, C., Chae, W.-J., Alabanza, L. M., & Bynoe, M. S. (2011). Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(5), 2040-2045. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008721108>

Sreenivasan, L., Li, L. V., Leclair, P., & Lim, C. J. (2022). Targeting the gp130/STAT3 Axis Attenuates Tumor Microenvironment Mediated Chemoresistance in Group 3 Medulloblastoma Cells. *Cells*, *11*(3), 381. <https://doi.org/10.3390/cells11030381>

Starzec, A., Vassy, R., Martin, A., Lecouvey, M., Di Benedetto, M., Crépin, M., & Perret, G. Y. (2006). Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life Sciences*, *79*(25), 2370-2381. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.08.005>

Stepanova, O. I., Krylov, A. V., Lioudyno, V. I., & Kisseleva, E. P. (2007). Gene expression for VEGF-A, VEGF-C, and their receptors in murine lymphocytes and macrophages. *Biochemistry. Biokhimiia*, 72(11), 1194-1198. <https://doi.org/10.1134/s0006297907110041>

Stephenson, J. M., Banerjee, S., Saxena, N. K., Cherian, R., & Banerjee, S. K. (2002). Neuropilin-1 is differentially expressed in myoepithelial cells and vascular smooth muscle cells in preneoplastic and neoplastic human breast : A possible marker for the progression of breast cancer. *International Journal of Cancer*, 101(5), 409-414. <https://doi.org/10.1002/ijc.10611>

Stripay, J. L., Merchant, T. E., Roussel, M. F., & Tinkle, C. L. (2020). Preclinical Models of Craniospinal Irradiation for Medulloblastoma. *Cancers*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/cancers12010133>

Sun, K., Atoyan, R., Borek, M. A., Dellarocca, S., Samson, M. E. S., Ma, A. W., Xu, G.-X., Patterson, T., Tuck, D. P., Viner, J. L., Fattaey, A., & Wang, J. (2017). Dual HDAC and PI3K Inhibitor CUDC-907 Downregulates MYC and Suppresses Growth of MYC-dependent Cancers. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(2), 285-299. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0390>

Sun, L., Moritake, T., Ito, K., Matsumoto, Y., Yasui, H., Nakagawa, H., Hirayama, A., Inanami, O., & Tsuboi, K. (2017). Metabolic analysis of radioresistant medulloblastoma stem-like clones and potential therapeutic targets. *PloS One*, 12(4), e0176162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176162>

Susanto, E., Marin Navarro, A., Zhou, L., Sundström, A., van Bree, N., Stantic, M., Moslem, M., Tailor, J., Rietdijk, J., Zubillaga, V., Hübner, J.-M., Weishaupt, H., Wolfsberger, J., Alafuzoff, I., Nordgren, A., Magnaldo, T., Siesjö, P., Johnsen, J. I., Kool, M., ... Wilhelm, M. (2020). Modeling SHH-driven medulloblastoma with patient iPS cell-derived neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(33), 20127-20138. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920521117>

Takagi, S., Tsuji, T., Amagai, T., Takamatsu, T., & Fujisawa, H. (1987). Specific cell surface labels in the visual centers of *Xenopus laevis* tadpole identified using monoclonal antibodies. *Developmental Biology*, 122(1), 90-100. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90335-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90335-6)

Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L. H., Murakami, Y., Kalb, R. G., Fujisawa, H., & Strittmatter, S. M. (1999). Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell*, 99(1), 59-69. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80062-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80062-8)

Takamatsu, H., Takegahara, N., Nakagawa, Y., Tomura, M., Taniguchi, M., Friedel, R. H., Rayburn, H., Tessier-Lavigne, M., Yoshida, Y., Okuno, T., Mizui, M., Kang, S., Nojima, S., Tsujimura, T., Nakatsuji, Y., Katayama, I., Toyofuku, T., Kikutani, H., & Kumanogoh, A. (2010). Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. *Nature immunology*, *11*(7), 594-600. <https://doi.org/10.1038/ni.1885>

Takashima, S., Kitakaze, M., Asakura, M., Asanuma, H., Sanada, S., Tashiro, F., Niwa, H., Miyazaki, J., Hirota, S., Kitamura, Y., Kitsukawa, T., Fujisawa, H., Klagsbrun, M., & Hori, M. (2002). Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(6), 3657-3662. <https://doi.org/10.1073/pnas.022017899>

Tan, I.-L., Arifa, R. D. N., Rallapalli, H., Kana, V., Lao, Z., Sanghrajka, R. M., Sumru Bayin, N., Tanne, A., Wojcinski, A., Korshunov, A., Bhardwaj, N., Merad, M., Turnbull, D. H., Lafaille, J. J., & Joyner, A. L. (2021). CSF1R inhibition depletes tumor-associated macrophages and attenuates tumor progression in a mouse sonic Hedgehog-Medulloblastoma model. *Oncogene*, *40*(2), 396-407. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01536-0>

Taylor, M. D., Northcott, P. A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y.-J., Clifford, S. C., Eberhart, C. G., Parsons, D. W., Rutkowski, S., Gajjar, A., Ellison, D. W., Lichter, P., Gilbertson, R. J., Pomeroy, S. L., Kool, M., & Pfister, S. M. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: The current consensus. *Acta Neuropathologica*, *123*(4), 465-472. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0922-z>

Taylor, M., Rössler, J., Geoerger, B., Laplanche, A., Hartmann, O., Vassal, G., & Farace, F. (2009). High levels of circulating VEGFR2+ Bone marrow-derived progenitor cells correlate with metastatic disease in patients with pediatric solid malignancies. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(14), 4561-4571. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2363>

Teesalu, T., Sugahara, K. N., Kotamraju, V. R., & Ruoslahti, E. (2009). C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(38), 16157-16162. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908201106>

Teodorczyk, M., & Schmidt, M. H. H. (2015). Notching on Cancer's Door: Notch Signaling in Brain Tumors. *Frontiers in Oncology*, *4*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2014.00341>

Thompson, E. M., Keir, S. T., Venkatraman, T., Lascola, C., Yeom, K. W., Nixon, A. B., Liu, Y., Picard, D., Remke, M., Bigner, D. D., Ramaswamy, V., & Taylor, M. D. (2017). The role of angiogenesis in Group 3 medulloblastoma pathogenesis and survival. *Neuro-Oncology*, *19*(9), 1217-1227. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox033>

Thüringer, D., Boucher, J., Jego, G., Pernet, N., Cronier, L., Hammann, A., Solary, E., & Garrido, C. (2016). Transfer of functional microRNAs between glioblastoma and microvascular endothelial cells through gap junctions. *Oncotarget*, *7*(45), 73925-73934. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12136>

Tordjman, R., Lepelletier, Y., Lemarchandel, V., Cambot, M., Gaulard, P., Hermine, O., & Roméo, P.-H. (2002). A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nature Immunology*, *3*(5), 477-482. <https://doi.org/10.1038/ni789>

Toyofuku, T., Yabuki, M., Kamei, J., Kamei, M., Makino, N., Kumanogoh, A., & Hori, M. (2007). Semaphorin-4A, an activator for T-cell-mediated immunity, suppresses angiogenesis via Plexin-D1. *The EMBO Journal*, *26*(5), 1373-1384. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601589>

Triscott, J., Lee, C., Foster, C., Manoranjan, B., Pambid, M. R., Berns, R., Fotovati, A., Venugopal, C., O'Halloran, K., Narendran, A., Hawkins, C., Ramaswamy, V., Bouffet, E., Taylor, M. D., Singhal, A., Hukin, J., Rassekh, R., Yip, S., Northcott, P., ... Dunn, S. E. (2013). Personalizing the Treatment of Pediatric Medulloblastoma : Polo-like Kinase 1 as a Molecular Target in High-Risk Children. *Cancer Research*, *73*(22), 6734-6744. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4331>

Tsutsumi, K., Chiba, A., Tadaki, Y., Minaki, S., Ooshima, T., & Takahashi, H. (2021). Contribution of Neuropilin-1 in Radiation-Survived Subclones of NSCLC Cell Line H1299. *Current Issues in Molecular Biology*, *43*(3), 1203-1211. <https://doi.org/10.3390/cimb43030085>

Valdembri, D., Caswell, P. T., Anderson, K. I., Schwarz, J. P., König, I., Astanina, E., Caccavari, F., Norman, J. C., Humphries, M. J., Bussolino, F., & Serini, G. (2009). Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates alpha5beta1 integrin traffic and function in endothelial cells. *PLoS Biology*, *7*(1), e25. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000025>

Vandenbark, A. A., Offner, H., Matejuk, S., & Matejuk, A. (2021). Microglia and astrocyte involvement in neurodegeneration and brain cancer. *Journal of Neuroinflammation*, *18*(1), 298. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02355-0>

Vanner, R. J., Remke, M., Gallo, M., Selvadurai, H. J., Coutinho, F., Lee, L., Kushida, M., Head, R., Morrissy, S., Zhu, X., Aviv, T., Voisin, V., Clarke, I. D., Li, Y., Mungall, A. J., Moore, R. A., Ma, Y., Jones, S. J. M., Marra, M. A., ... Dirks, P. B. (2014). Quiescent sox2(+)

cells drive hierarchical growth and relapse in sonic hedgehog subgroup medulloblastoma. *Cancer Cell*, 26(1), 33-47. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.05.005>

Vermeulen, J. F., Van Hecke, W., Adriaansen, E. J. M., Jansen, M. K., Bouma, R. G., Villacorta Hidalgo, J., Fisch, P., Broekhuizen, R., Spliet, W. G. M., Kool, M., & Bovenschen, N. (2018). Prognostic relevance of tumor-infiltrating lymphocytes and immune checkpoints in pediatric medulloblastoma. *Oncoimmunology*, 7(3), e1398877. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1398877>

Virág, J., Kenessey, I., Haberler, C., Piurkó, V., Bálint, K., Döme, B., Tímár, J., Garami, M., & Hegedűs, B. (2014). Angiogenesis and angiogenic tyrosine kinase receptor expression in pediatric brain tumors. *Pathology Oncology Research: POR*, 20(2), 417-426. <https://doi.org/10.1007/s12253-013-9711-4>

von Wronski, M. A., Raju, N., Pillai, R., Bogdan, N. J., Marinelli, E. R., Nanjappan, P., Ramalingam, K., Arunachalam, T., Eaton, S., Linder, K. E., Yan, F., Pochon, S., Tweedle, M. F., & Nunn, A. D. (2006). Tuftsin binds neuropilin-1 through a sequence similar to that encoded by exon 8 of vascular endothelial growth factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5702-5710. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511941200>

Wang, F., Ma, L., Zhang, Z., Liu, X., Gao, H., Zhuang, Y., Yang, P., Kornmann, M., Tian, X., & Yang, Y. (2016). Hedgehog Signaling Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Stem-Like Cells. *Journal of Cancer*, 7(4), 408-417. <https://doi.org/10.7150/jca.13305>

Wang, J., Wang, C., Meng, Q., Li, S., Sun, X., Bo, Y., & Yao, W. (2012). SiRNA targeting Notch-1 decreases glioma stem cell proliferation and tumor growth. *Molecular Biology Reports*, 39(3), 2497-2503. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1001-1>

Wang, J., & Wechsler-Reya, R. J. (2014). The role of stem cells and progenitors in the genesis of medulloblastoma. *Experimental Neurology*, 260, 69-73. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.11.014>

Wang, L., Mukhopadhyay, D., & Xu, X. (2006). C terminus of RGS-GAIP-interacting protein conveys neuropilin-1-mediated signaling during angiogenesis. *The FASEB Journal*, 20(9), 1513-1515. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5504fje>

Wang, L., Zeng, H., Wang, P., Soker, S., & Mukhopadhyay, D. (2003). Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 48848-48860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310047200>

Wang, X., Venugopal, C., Manoranjan, B., McFarlane, N., O'Farrell, E., Nolte, S., Gunnarsson, T., Hollenberg, R., Kwiecien, J., Northcott, P., Taylor, M. D., Hawkins, C., & Singh, S. K. (2012). Sonic hedgehog regulates Bmi1 in human medulloblastoma brain tumor-initiating cells. *Oncogene*, *31*(2), 187-199. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.232>

Wang, Y., He, L., Du, Y., Zhu, P., Huang, G., Luo, J., Yan, X., Ye, B., Li, C., Xia, P., Zhang, G., Tian, Y., Chen, R., & Fan, Z. (2015). The long noncoding RNA lncTCF7 promotes self-renewal of human liver cancer stem cells through activation of Wnt signaling. *Cell Stem Cell*, *16*(4), 413-425. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.03.003>

Wang, Y., Wang, Y., Chen, H., & Liang, Q. (2017). Endothelial Cells Promote Formation of Medulloblastoma Stem-Like Cells via Notch Pathway Activation. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, *63*(2), 152-158. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0965-2>

Ward, R. J., Lee, L., Graham, K., Satkunendran, T., Yoshikawa, K., Ling, E., Harper, L., Austin, R., Nieuwenhuis, E., Clarke, I. D., Hui, C.-C., & Dirks, P. B. (2009). Multipotent CD15+ cancer stem cells in patched-1-deficient mouse medulloblastoma. *Cancer Research*, *69*(11), 4682-4690. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0342>

Weekes, C. D., Beeram, M., Tolcher, A. W., Papadopoulos, K. P., Gore, L., Hegde, P., Xin, Y., Yu, R., Shih, L. M., Xiang, H., Brachmann, R. K., & Patnaik, A. (2014). A phase I study of the human monoclonal anti-NRP1 antibody MNRP1685A in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*, *32*(4), 653-660. <https://doi.org/10.1007/s10637-014-0071-z>

Wei, J., Gabrusiewicz, K., & Heimberger, A. (2013). The controversial role of microglia in malignant gliomas. *Clinical & Developmental Immunology*, *2013*, 285246. <https://doi.org/10.1155/2013/285246>

West, D. C., Rees, C. G., Duchesne, L., Patey, S. J., Terry, C. J., Turnbull, J. E., Delehedde, M., Heegaard, C. W., Allain, F., Vanpouille, C., Ron, D., & Fernig, D. G. (2005). Interactions of multiple heparin binding growth factors with neuropilin-1 and potentiation of the activity of fibroblast growth factor-2. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(14), 13457-13464. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410924200>

Wey, J. S., Gray, M. J., Fan, F., Belcheva, A., McCarty, M. F., Stoeltzing, O., Somcio, R., Liu, W., Evans, D. B., Klagsbrun, M., Gallick, G. E., & Ellis, L. M. (2005). Overexpression of neuropilin-1 promotes constitutive MAPK signalling and chemoresistance in pancreatic cancer cells. *British Journal of Cancer*, *93*(2), 233-241. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602663>

Wild, J. R. L., Staton, C. A., Chapple, K., & Corfe, B. M. (2012). Neuropilins : Expression and roles in the epithelium. *International Journal of Experimental Pathology*, *93*(2), 81-103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2012.00810.x>

Wlodarczyk, A., Holtman, I. R., Krueger, M., Yogev, N., Bruttger, J., Khorooshi, R., Benmamar-Badel, A., de Boer-Bergsma, J. J., Martin, N. A., Karram, K., Kramer, I., Boddeke, E. W., Waisman, A., Eggen, B. J., & Owens, T. (2017). A novel microglial subset plays a key role in myelinogenesis in developing brain. *The EMBO Journal*, *36*(22), 3292-3308. <https://doi.org/10.15252/embj.201696056>

Wu, K., Ma, L., & Zhu, J. (2016). MiR-483-5p promotes growth, invasion and self-renewal of gastric cancer stem cells by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Molecular Medicine Reports*, *14*(4), 3421-3428. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5603>

Wu, Y.-Y., Chen, Y.-L., Jao, Y.-C., Hsieh, I.-S., Chang, K.-C., & Hong, T.-M. (2014). MiR-320 regulates tumor angiogenesis driven by vascular endothelial cells in oral cancer by silencing neuropilin 1. *Angiogenesis*, *17*(1), 247-260. <https://doi.org/10.1007/s10456-013-9394-1>

Xiong, K., Shao, L. H., Zhang, H. Q., Jin, L., Wei, W., Dong, Z., Zhu, Y. Q., Wu, N., Jin, S. Z., & Xue, L. X. (2018). MicroRNA-9 functions as a tumor suppressor and enhances radio-sensitivity in radio-resistant A549 cells by targeting neuropilin 1. *Oncology Letters*, *15*(3), 2863-2870. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7705>

Yang, L., Shi, P., Zhao, G., Xu, J., Peng, W., Zhang, J., Zhang, G., Wang, X., Dong, Z., Chen, F., & Cui, H. (2020). Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0110-5>

Yang, Z.-J., Ellis, T., Markant, S. L., Read, T.-A., Kessler, J. D., Bourbonlous, M., Schüller, U., Machold, R., Fishell, G., Rowitch, D. H., Wainwright, B. J., & Wechsler-Reya, R. J. (2008). Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell*, *14*(2), 135-145. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.07.003>

Yao, M., Ventura, P. B., Jiang, Y., Rodriguez, F. J., Wang, L., Perry, J. S. A., Yang, Y., Wahl, K., Crittenden, R. B., Bennett, M. L., Qi, L., Gong, C.-C., Li, X.-N., Barres, B. A., Bender, T. P., Ravichandran, K. S., Janes, K. A., Eberhart, C. G., & Zong, H. (2020). Astrocytic trans-Differentiation Completes a Multicellular Paracrine Feedback Loop Required for Medulloblastoma Tumor Growth. *Cell*, *180*(3), 502-520.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.024>

Yaqoob, U., Cao, S., Shergill, U., Jagavelu, K., Geng, Z., Yin, M., de Assuncao, T. M., Cao, Y., Szabolcs, A., Thorgeirsson, S., Schwartz, M., Yang, J. D., Ehman, R., Roberts, L., Mukhopadhyay, D., & Shah, V. H. (2012). Neuropilin-1 stimulates tumor growth by increasing fibronectin fibril assembly in the tumor microenvironment. *Cancer Research*, 72(16), 4047-4059. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3907>

Yin, H., Yang, J., Zhang, Q., Yang, J., Wang, H., Xu, J., & Zheng, J. (2017). IRGD as a tumor-penetrating peptide for cancer therapy (Review). *Molecular Medicine Reports*, 15(5), 2925-2930. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6419>

Yogi, K., Sridhar, E., Goel, N., Jalali, R., Goel, A., Moiyadi, A., Thorat, R., Panwalkar, P., Khire, A., Dasgupta, A., Shetty, P., & Shirsat, N. V. (2015). MiR-148a, a microRNA upregulated in the WNT subgroup tumors, inhibits invasion and tumorigenic potential of medulloblastoma cells by targeting Neuropilin 1. *Oncoscience*, 2(4), 334-348.

Younes, A., Berdeja, J. G., Patel, M. R., Flinn, I., Gerecitano, J. F., Neelapu, S. S., Kelly, K. R., Copeland, A. R., Akins, A., Clancy, M. S., Gong, L., Wang, J., Ma, A., Viner, J. L., & Oki, Y. (2016). Safety, tolerability, and preliminary activity of CUDC-907, a first-in-class, oral, dual inhibitor of HDAC and PI3K, in patients with relapsed or refractory lymphoma or multiple myeloma : An open-label, dose-escalation, phase 1 trial. *The Lancet. Oncology*, 17(5), 622-631. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00584-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00584-7)

Zeng, F., Luo, F., Lv, S., Zhang, H., Cao, C., Chen, X., Wang, S., Li, Z., Wang, X., Dou, X., Dai, Y., He, M., Zhang, Y., Lv, H., Yan, J., & Chen, Y. (2014). A monoclonal antibody targeting neuropilin-1 inhibits adhesion of MCF7 breast cancer cells to fibronectin by suppressing the FAK/p130cas signaling pathway. *Anti-Cancer Drugs*, 25(6), 663-672. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000091>

Zhang, C., Hai, L., Zhu, M., Yu, S., Li, T., Lin, Y., Liu, B., Zhou, X., Chen, L., Zhao, P., Zhou, H., Huang, Y., Zhang, K., Ren, B., & Yang, X. (2017). Actin cytoskeleton regulator Arp2/3 complex is required for DLL1 activating Notch1 signaling to maintain the stem cell phenotype of glioma initiating cells. *Oncotarget*, 8(20), 33353-33364. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16495>

Zhang, F., Sun, H., Zhang, S., Yang, X., Zhang, G., & Su, T. (2017). Overexpression of PER3 Inhibits Self-Renewal Capability and Chemoresistance of Colorectal Cancer Stem-Like Cells via Inhibition of Notch and  $\beta$ -Catenin Signaling. *Oncology Research*, 25(5), 709-719. <https://doi.org/10.3727/096504016X14772331883976>

Zhang, G., Chen, L., Khan, A. A., Li, B., Gu, B., Lin, F., Su, X., & Yan, J. (2018). MiRNA-124-3p/neuropilin-1(NRP-1) axis plays an important role in mediating glioblastoma

growth and angiogenesis. *International Journal of Cancer*, 143(3), 635-644. <https://doi.org/10.1002/ijc.31329>

Zhang, G., Chen, L., Sun, K., Khan, A. A., Yan, J., Liu, H., Lu, A., & Gu, N. (2016). Neuropilin-1 (NRP-1)/GPC1 pathway mediates glioma progression. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(10), 13777-13788. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5138-3>

Zhang, J., Yu, Y., Yin, X., Feng, L., Li, Z., Liu, X., Yu, X., & Li, B. (2022). A Circ-0007022/miR-338-3p/Neuropilin-1 Axis Reduces the Radiosensitivity of Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Activating Epithelial-To-Mesenchymal Transition and PI3K/AKT Pathway. *Frontiers in Genetics*, 13, 854097. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.854097>

Zhang, L., Wang, H., Li, C., Zhao, Y., Wu, L., Du, X., & Han, Z. (2017). VEGF-A/Neuropilin 1 Pathway Confers Cancer Stemness via Activating Wnt/ $\beta$ -Catenin Axis in Breast Cancer Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 44(3), 1251-1262. <https://doi.org/10.1159/000485455>

Zhang, S., Wang, Y., Mao, J.-H., Hsieh, D., Kim, I.-J., Hu, L.-M., Xu, Z., Long, H., Jablons, D. M., & You, L. (2012). Inhibition of CK2 $\alpha$  Down-Regulates Hedgehog/Gli Signaling Leading to a Reduction of a Stem-Like Side Population in Human Lung Cancer Cells. *PLOS ONE*, 7(6), e38996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038996>

Zhang, W., DeMattia, J. A., Song, H., & Couldwell, W. T. (2003). Communication between malignant glioma cells and vascular endothelial cells through gap junctions. *Journal of Neurosurgery*, 98(4), 846-853. <https://doi.org/10.3171/jns.2003.98.4.0846>

Zhao, Y., Tao, L., Yi, J., Song, H., & Chen, L. (2018). The Role of Canonical Wnt Signaling in Regulating Radioresistance. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 48(2), 419-432. <https://doi.org/10.1159/000491774>

Zhao, Z., Song, Z., Liao, Z., Liu, Z., Sun, H., Lei, B., Chen, W., & Dang, C. (2016). PKM2 promotes stemness of breast cancer cell by through Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(3), 4223-4234. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4121-8>

Zhou, K., Boström, M., Ek, C. J., Li, T., Xie, C., Xu, Y., Sun, Y., Blomgren, K., & Zhu, C. (2017). Radiation induces progenitor cell death, microglia activation, and blood-brain barrier

damage in the juvenile rat cerebellum. *Scientific Reports*, 7, 46181. <https://doi.org/10.1038/srep46181>

Zhu, C., Li, K., Jiang, M., & Chen, S. (2021). RBM5-AS1 promotes radioresistance in medulloblastoma through stabilization of SIRT6 protein. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01218-2>

Zhukova, N., Ramaswamy, V., Remke, M., Pfaff, E., Shih, D. J. H., Martin, D. C., Castelo-Branco, P., Baskin, B., Ray, P. N., Bouffet, E., von Bueren, A. O., Jones, D. T. W., Northcott, P. A., Kool, M., Sturm, D., Pugh, T. J., Pomeroy, S. L., Cho, Y.-J., Pietsch, T., ... Tabori, U. (2013). Subgroup-specific prognostic implications of TP53 mutation in medulloblastoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(23), 2927-2935. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.5052>

Zou, H., Poore, B., Broniscer, A., Pollack, I. F., & Hu, B. (2020). Molecular Heterogeneity and Cellular Diversity: Implications for Precision Treatment in Medulloblastoma. *Cancers*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/cancers12030643>

# Annexes



# Neuropilin-1: A Key Protein to Consider in the Progression of Pediatric Brain Tumors

Manon Douyère<sup>1</sup>, Pascal Chastagner<sup>1,2</sup> and Cédric Boura<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Lorraine, CNRS, CRAN, Nancy, France, <sup>2</sup> Service d'Onco-Hématologie Pédiatrique, CHRU-Nancy, Nancy, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Giuseppe Maria Milano,  
Bambino Gesù Children Hospital  
(IRCCS), Italy

### Reviewed by:

Alessandro Fantin,  
University of Milan, Italy  
Joshua John Breunig,  
Cedars Sinai Medical Center,  
United States  
Yves Lepelletier,  
Université Paris Descartes, France

### \*Correspondence:

Cédric Boura  
cedric.boura@univ-lorraine.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Pediatric Oncology,  
a section of the journal  
Frontiers in Oncology

**Received:** 08 February 2021

**Accepted:** 10 June 2021

**Published:** 01 July 2021

### Citation:

Douyère M, Chastagner P and  
Boura C (2021) Neuropilin-1:  
A Key Protein to Consider in  
the Progression of Pediatric  
Brain Tumors.  
*Front. Oncol.* 11:665634.  
doi: 10.3389/fonc.2021.665634

Neuropilins are transmembrane glycoproteins that play important roles in cardiovascular and neuronal development, as well as in immunological system regulations. NRP1 functions as a co-receptor, binding numerous ligands, such as SEMA 3 or VEGF and, by doing so, reinforcing their signaling pathways and can also interface with the cytoplasmic protein synectin. NRP1 is expressed in many cancers, such as brain cancers, and is associated with poor prognosis. The challenge today for patients with pediatric brain tumors is to improve their survival rate while minimizing the toxicity of current treatments. The aim of this review is to highlight the involvement of NRP1 in pediatric brain cancers, focusing essentially on the roles of NRP1 in cancer stem cells and in the regulation of the immune system. For this purpose, recent literature and tumor databases were analyzed to show correlations between NRP1 and CD15 (a stem cancer cells marker), and between NRP1 and PDL1, for various pediatric brain tumors, such as high- and low-grade gliomas, medulloblastomas, and ependymomas. Finally, this review suggests a relevant role for NRP1 in pediatric brain tumors progression and identifies it as a potential diagnostic or therapeutic target to improve survival and life quality of these young patients.

**Keywords:** neuropilins, pediatric brain tumor, cancer stem cells, immune system, glioma, medulloblastoma

**Abbreviations:** APC, antigen-presenting cells; BBB, blood-brain barrier; BTSC, brain tumor cancer stem cells; CSC, cancer stem cells; CNS, central nervous system; DC, dendritic cells; DIPG, diffuse intrinsic pontine glioma; EAE, autoimmune encephalomyelitis; ECS, epidermal cancer stem cells; EMT, epithelial-mesenchymal transition; EPN, ependymoma; FGF, fibroblast growth factor; GIPC1, GAIP-interacting protein C terminus member 1; HGF, hepatocyte growth factor; HGG, high-grade glioma; IL10, interleukin 10; K27M, mutations at position 27; LGG, low-grade glioma; LTreg, regulatory T lymphocytes; LT CD4+, T CD4+ lymphocyte; LT CD8+, T CD8+ lymphocyte; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MB, medulloblastoma; NRP, neuropilin; NRP1, neuropilin-1; NRP2, neuropilin-2; PA, pilocytic astrocytoma; PDGF, platelet-derived growth factor; PFS, progression-free survival; PIGF, placental growth factor; PMA pilomyxoid astrocytoma; PXA, pleomorphic xanthoastrocytoma; SEGA, subependymal giant cell astrocytoma; SEMA 3, semaphorin of class 3; SHH, sonic hedgehog; SI, immune system; TAMs, tumor-associated macrophages; TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ; TGF $\beta$ R, receptors of TGF- $\beta$ ; TMZ, temozolomide; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGF-R, receptor of vascular endothelial growth factor; WHO, World Health Organization.

## INTRODUCTION

Neuropilins (NRPs) are transmembrane glycoproteins found in all vertebrates and are highly conserved across species. Two homologous NRPs isoforms have been identified, namely neuropilin-1 (NRP1) and neuropilin-2 (NRP2). NRPs are non-tyrosine kinase surface proteins that play important roles in neuronal development, cardiovascular development, and in the immune system (1–3). NRPs are co-receptors involved in a wide variety of signaling pathways and have pleiotropic effects on axon guidance, immune responses, angiogenesis, cell survival, migration, and invasion (1–7). NRPs were originally discovered as surface proteins involved in neuronal development by participating to semaphorins axonal guidance (8, 9). They were later identified as a key protein in vascular development because of their interaction with vascular endothelial growth factor A (VEGFA or VEGF) (10). Studies over the past decades have revealed their involvement in a wide range of physiological activities; however, more recent studies have highlighted their role in pathological processes, such as cancers (6, 7, 11). NRPs are overexpressed in a wide variety of cancers, such as pediatric brain tumor, and their overexpression is correlated with a poor prognostic for those patients (12–16).

In children, primary tumors of the central nervous system (CNS) are the second most common cause of cancer after leukemia, accounting for approximately one fourth of all childhood cancers. There are approximately 5,000 new cases diagnosed each year in the United States among children younger than 18 years (17). Actually, this term encompasses a wide range of very different tumors, with different treatment and prognosis. Pediatric brain tumors are equally distributed between supra- and infra-tentorial regions. The most frequent tumors are represented by gliomas and embryonic tumors of the CNS. Although their outcomes have improved over the last few decades, thanks to the combined uses of surgery, radiotherapy, and chemotherapy, those tumors still represent the leading cause of disease-related death in children, and suboptimal long-term outcomes are still frequent, especially in young ages. Indeed, in comparison with age-matched patients who survived extra CNS malignancies, pediatric brain tumor survivors usually present severe cognitive, neurological, endocrine, social, and emotional impairments. It is a crucial need to find new diagnostic markers and new efficient therapeutic strategies by using recent tools to detect important genes and signaling pathways that serve to drive tumor proliferation and which could then be targeted by therapies.

Although the roles of NRP1 in tumor angiogenesis, tumor microenvironment, as well as its possible targeting in tumor progression, have recently been reviewed elsewhere (18–20), in this review, we summarize the up-to-date knowledge on NRP1 and its role in pediatric brain tumors progression. In particular, we detail the role of NRP1 in cancer stem cells and immune system cells during tumorigenesis.

## PEDIATRIC BRAIN TUMORS

### Gliomas

Gliomas are the most frequently pediatric brain tumors and represent 25% of all brain tumors. They are heterogeneous and

are divided into two main categories, low- and high-grade tumors, according to their aggressiveness and their prognosis. Low-grade gliomas (LGGs), such as pilocytic astrocytoma (PA), are usually curable while high-grade gliomas (HGGs), such as diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG), are consistently fatal.

LGGs, classified by the World Health Organization (WHO) as grade I or II, comprise several subgroups, including PA, pleomorphic xanthoastrocytomas (PXA), pilomyxoid astrocytomas (PMA), subependymal giant cell astrocytomas (SEGA), low-grade fibrillary astrocytomas, and diffuse astrocytomas. The most common LGG diagnosed in children aged 0 to 14 years is the PA, which accounts for 85% of all LGGs (21). Five-year overall survival is approximately 95% (22), with the exception of tumors with BRAF V600F mutants, which have a higher tumor progression potential and poorer outcome (23). The majority of LGGs exhibit alterations in the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, which has led to the targeting of this pathway by MAPK inhibitors. In addition, BRAF mutations are commonly found in LGGs, which has led much research into the therapeutic benefits of BRAF inhibitors. In contrast to LGGs in adults, IDH mutations are almost absent in childhood tumors, and malignant progression is rare (24, 25). The current treatment strategy for LGGs is mainly based on the surgical excision of the tumor, which may prove curative in case of total resection. In the cases of a tumor progression during partial surgical resections, chemotherapy treatments, such as vincristine and carboplatin combination or vinblastine monotherapy, are used. Chemotherapy leads to a progression-free survival (PFS) of 30% to 50% (25). BRAF V600E mutations and CDKN2A deletions are associated with a worse prognosis, with a 10-year PFS of 27% (26). New clinical trials are using molecular profiling to stratify patients and test the efficacy of MEK inhibitors for tumors with BRAF fusions, and of MEK, BRAF, or combined inhibitors for tumors with BRAF V600E mutations. The efficacy of mTOR inhibitors has now been clearly demonstrated in the treatment of SEGA (27). HGGs represent 8–12% of all childhood brain tumors. They are most often represented by diffuse midline gliomas and DIPGs, followed by hemispheric HGGs. Their prognosis remains bleak, with a long-term survival rate of less than 10%. Outcome does not appear to be correlated with the WHO grade of the pediatric tumors. HGGs are phenotypically similar to adult diseases, but molecular studies suggest that the molecular signatures are different (28, 29). The new generation of genomic sequencing has uncovered characteristic alterations in HGGs, such as mutations at position 27 (K27M) in the genes coding for histone 3, or G34R/V mutations (30, 31). The molecular alterations coding for the histone variants H3.3 and H3.1 are present in about 80% of midline gliomas. Other molecular characteristics in HGGs are TP53 mutations (> 85%) and MGMT promoter methylation (32). NTRK gene fusions have been analyzed, which could be targeted by selective TRK kinase inhibitors (33). Standard treatment of HGGs consists of total surgical resections when possible, associated with radiotherapy and chemotherapy. However, to date, the role of chemotherapy remains undefined (34). Patients with H3.1 mutant tumors have a better prognosis than those with

H3.3 mutant tumors (35). K27M mutant diffuse midline gliomas and DIPGs are still fatal because surgical resections, even partial, are mostly impossible, because radiation therapy offers only temporary improvement, and because no chemotherapy or targeted therapy has demonstrated a survival benefit.

## Medulloblastomas

Medulloblastoma (MB) is the most common malignant brain tumor of the posterior fossa in pediatric, accounting for 15% to 20% of all childhood brain tumors. The survival rate of patients with embryonal tumors of the central nervous system, such as MB, is 54% at 5 years. The prognosis is significantly worse before the age of 1 year: 62% survival rate at 5 years, compared to 81% for children aged 10 to 14 years (36, 37). Because of its embryonic origin, MB occurs more frequently in children than adults, and accounts for only 1% of all adult brain tumors. The 5-year overall survival rate of MB patients is estimated at 75% to 80% in the absence of metastases. Unfortunately, despite treatment, recurrences remain frequent, especially when metastases are present at the time of diagnosis (30% of cases). MB develops within the cerebellum, and some of these tumors will metastasize and disseminate mainly to the leptomeningeal surface of the brain and to the spinal cord. The WHO has defined a histopathological classification for MBs, distinguishing between four groups: classic MBs, desmoplastic/nodular MBs, MBs with extensive nodularity, and large cell/anaplastic MBs. However, this classification is not sufficient to determine the prognosis and the choice of treatment. The WHO studies have highlighted four subgroups of MBs: the WNT subgroup (approximately 10% of MBs), and the sonic hedgehog (SHH) subgroup (approximately 30%), associated with a better prognosis, in contrast to subgroups 3 (approximately 25%) frequently associated with metastasis, and 4 (about 35%) the most aggressive MBs, characterized by a high recurrence rate due to a high potential for metastatic dissemination (38). Current treatments are based on prognostic factors which have led to define four risk groups: low-risk group, associated with a survival rate above 90% (mainly MB of the WNT subgroup); standard-risk group, associated with a survival rate between 75% and 90% (SHH subgroup of MB and group 4 metastatic MB); high-risk group (survival rate between 50% and 75%) and very high-risk group (MYC-amplified group 3 patients with metastatic disease or SHH tumors with TP53 mutations), both associated with a survival rate of less than 50% (in particular group 3 and SHH MB with the TP53 mutation) (39). Treatment begins with surgical resection as complete as safely possible, followed by radiotherapy with or without (for children older than 5 years in the standard-risk group) chemotherapy. The conventional dose of the craniospinal radiotherapy is 36 Gy for high-risk group patients, and 24 Gy for standard-risk group patients, followed by a 54 Gy boost to tumor bed. For low-risk group patients, current clinical trials are designed to de-intensifying the dose of craniospinal radiotherapy in an attempt to reduce long-term side-effects. In patients younger than 3 to 5 years, radiotherapy tends to be avoided and replaced by an intensive chemotherapy (40). Significant side-effects, secondary to surgical resection, radiation therapy, and chemotherapy, are frequently observed and include cerebellar mutism, neurocognitive deficits, hearing loss, and endocrine pathologies (41).

## Ependymomas

Ependymomas (EPNs) are the third cause of malignant brain tumors in children. These tumors affect mainly the children younger than 5 years. EPNs are usually located in the posterior fossa (70% of cases), but they can develop anywhere within the central nervous system. The histological grade score of the tumor is not reproducible and has no prognostic impact. Recent advances in molecular biology confirm that, depending on their localization (spinal, supratentorial, or posterior fossa), EPNs are different diseases. These tumors have a worse prognosis in children than in adults (38, 42). EPNs are characterized by a fusion between the C11ORF95 and RELA genes in 72% of cases. This alteration leads to the sequestration of the fusion protein within the nucleus and results an aberrant activity of the oncogenic NF- $\kappa$ B signaling pathway (43). Pediatric supratentorial EPNs (ST-EPNs) are dominated by the subgroups ST-EPN-RELA and ST-EPN-YAP1, while the subgroups PF-EPN-A and PF-EPN-B are predominant in posterior fossa EPNs (PF-EPN). In supratentorial locations, YAP1-fused EPNs are correlated with a better prognosis (44). Conversely, a poor prognosis is frequently associated with PF-EPN-A (survival rate < 50%). PF-EPN-B occurs in older children and adults and has an excellent outcome (45). The current treatment strategy for EPNs is a surgical tumor resection, whose extensions is a major prognostic factor, always followed by radiotherapy (59 Gy to the tumor bed), except for children younger than 1 year. As with gliomas, the efficiency of chemotherapy is still debated and is the object of current clinical trials.

## Other Pediatric Brain Tumors

There is a wide diversity of pediatric brain tumors that are very rare, accounting for less than 30% of all tumors. Some of them, such as the choroid plexus papillomas, a benign (WHO grade I) neuroepithelial intraventricular tumor, have an excellent prognosis after complete surgical resection when they occur in children. Other tumors, such as craniopharyngiomas, arising from the sellar region, also have a very good overall survival after complete resection, but relapses may later occur that necessitate a complementary treatment by radiotherapy. The excellent overall survival of these tumors is unfortunately impaired by endocrine, and often visual, sequelae.

Other embryonal tumors of the CNS, like atypical teratoid and rhabdoid tumors, and embryonal tumors with multilayered rosettes, are highly aggressive, poorly differentiated, and occur predominately in young children. Their treatment is therefore very challenging, and their prognosis is still grim.

Unfortunately, despite the progress made in recent decades in the management of these cancer types, the effectiveness is still suboptimal and sequelae are frequent. Indeed, chemotherapy has been shown to provide significant toxicities and adverse side effects (46, 47). Similarly, radiotherapy induced many late side effects, especially for young patients, such as neurocognitive and neuroendocrine deficits, bone and soft tissue hypoplasia, and secondary benign or malignant tumors (47, 48). The current challenge is to improve the survival rate of patients with pediatric brain tumors while minimizing the toxicity of these treatments. There is, therefore, an urgent need to improve the treatments for brain tumors by finding new potential therapeutic targets. High

resolution genomic, epigenetic, and transcriptomic profiling define various sub-classifications, according to tumor location, patient age, and prognosis, and suggest the possibility to develop more adapted treatments.

## NEUROFILIN-1

### Physiological Functions and Structure

NRPs are transmembrane glycoproteins specific to vertebrates. There are two members in this family of proteins, NRP1 and NRP2, which are coded by two different genes located on two chromosomes (10p12 for NRP1 and 2q34 for NRP2). NRPs play an important role in biological processes, such as neuronal development, cardiovascular development, and immunological system (1–3). Overexpression of NRP1 causes fetal death in utero of chimeric mice, and the embryos show significant dysfunctions in neuronal development, with ectopic sprouts and defasciculation of nerve fibers (1). Likewise, NRP1 has been shown to be involved in cardiovascular and vascular development, because its abnormal expression in mouse embryos causes anomalies in the cardiovascular system and a dysfunction in blood vessels and capillary formation (1, 2). NRPs are expressed in various cell types, such as neuronal cells, endothelial cells, immune cells, smooth muscle cells, and also tumor cells (1, 3, 10). NRP1 is a multifunctional co-receptor capable of binding to different ligand families involved in diverse biological pathways (Figure 1). Initially, NRPs were mainly known for their key role in axonal guidance mediated by SEMA proteins with their receptors, plexins (2, 49). Subsequently, NRPs were identified as co-receptors of the

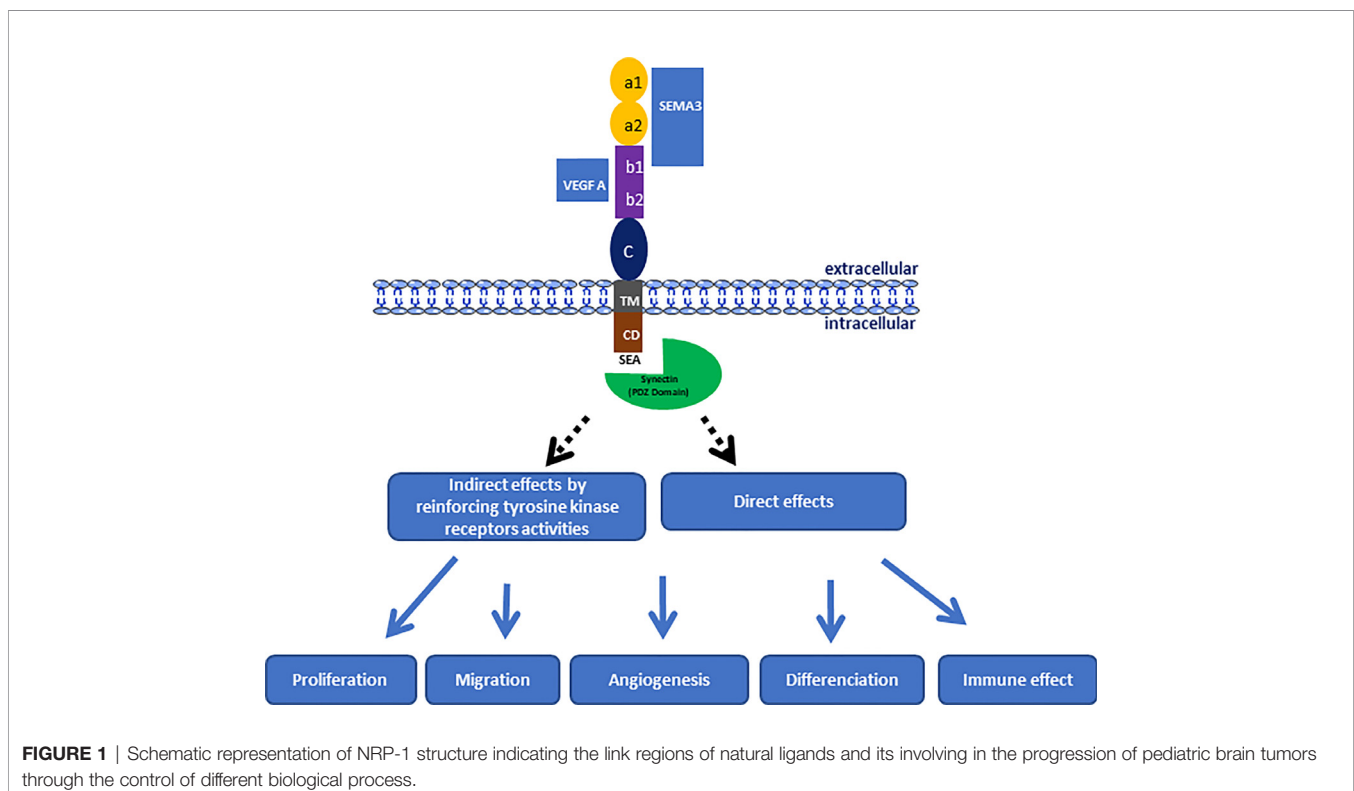
VEGF family and their receptors (VEGFRs), enhancing the signaling pathway and thus promoting angiogenesis (10, 50).

NRP1 measures 130 to 140 kDa, sharing 44% sequence homology with NRP2, and both glycoproteins have the same structural organization in three protein domains (Figure 1). NRPs are composed of N-terminal extracellular domains, a transmembrane domain and an intracellular domain. The extracellular domains are composed of three subdomains, namely a1a2 (CUB), b1b2, and c. The extracellular domains a and b are both involved in ligand binding, whereas domain c mediates the homo- and hetero-dimerization of NRPs, which seems essential for their functions. Moreover, it has been shown that the a1a2 domain of NRP1 corresponds to the binding domain of SEMA, while the b1b2 domain is able to bind ligands of the VEGF family (51) (Figure 1). NRP1 has no kinase activity of its own but enhances the kinase activity of co-receptors, such as VEGFRs or plexins. Moreover the intracellular domain ends with a consensus sequence (SEA) that allows it to interact with the PDZ protein domains of cytoplasmic proteins, such as synectin (52, 53). Indeed, synectin, also named GIPC1 (GAIP-interacting protein C terminus member 1), is required for stable receptors complex formation (54), and could act directly on different signaling pathways *via* the RhoA GTPase (55), as well as on cytoskeletal networks for the internalization of  $\alpha 5\beta 1$  integrins (56).

### NRP1 Ligands and Co-Receptors

#### Semaphorins and Plexins

NRP1 was originally identified for its role in the nervous system development, particularly through its function as a receptor for SEMA, especially SEMA 3 (49). SEMA are grouped into eight



**FIGURE 1** | Schematic representation of NRP-1 structure indicating the link regions of natural ligands and its involving in the progression of pediatric brain tumors through the control of different biological process.

numerically named classes, and only classes 3, 4, 6, and 7 are present in vertebrates. SEMA 3 is one of eight subgroups of the protein family that have a role in guiding axon growth as soluble chemorepellents, which is essential for the structuring of the nervous system (49, 51). They are also involved in cell apoptosis, cell migration, and tumor suppression (18, 51). They consist of seven soluble proteins, designated by the letters A to G, and are secreted by different cell lineages, such as neurons, epithelial cells, or tumor cells (51). Each of the SEMA 3 member has different binding affinities to NRP1, and therefore each SEMA 3 member has a distinct biological function. The binding of the SEMA to NRP1 is established through the a1, a2, and b1 domains (19, 51). This binding requires an association with another family of receptors: the plexins. Indeed, by acting as a co-receptor, NRP1 increases the binding affinity of plexins to SEMA 3. The tri-complex formed by NRP1, SEMAs, and the plexins enhances signal transductions during embryonic development, axon guidance, and immune responses. For example, the interaction between NRP1 and Sema3E/PlexinD1 transforms axonal repulsion into attraction during brain development (57). NRP1 has been found to bind preferentially to SEMA3A, while NRP2 usually binds to SEMA3C or to SEMA 3F (3, 51).

### VEGF and VEGFRs

In addition to binding to SEMA, NRP1 is now known to be a receptor for the VEGF family (10). The VEGF family consists of several growth factors, designated A, B, C, and D, as well as placental growth factor (PlGF), whose main role is to mediate angiogenesis and lymphangiogenesis. The classical VEGF receptors are tyrosine kinase receptors called VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3. These three VEGFR have different affinities with VEGF ligands and thereby different biological actions. For example, VEGFR-2, the most known VEGF receptor, binds preferentially to VEGF-A, is expressed mainly by vascular endothelial cells and therefore plays a key role in vasculogenesis and angiogenesis (50). NRP1 was initially identified as a specific receptor for the VEGF-A 165 isoform (10), and more recently, for other isoforms, such as VEGF-A 121 (58). It is the extracellular b1b2 domains of NRPs that are involved in this binding (59). NRP1 seems to act mainly as a co-receptor for VEGFR-1 and -2, an important actor of the angiogenesis, whereas NRP2 is a co-receptor for VEGFR-3, a critical receptor of lymphangiogenesis (50).

### Other Ligands of NRP1

NRP1 interacts with other proteins, such as the fibroblast growth factor (FGF) (60), the hepatocyte growth factor (HGF) (61, 62), the platelet-derived growth factor (PDGF) (63, 64) and the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (65, 66).

According to the studies of West et al., NRP1 binds to FGF isoforms (FGF-2, 4, and 7) and to their receptor FGFR-1, thus contributing to angiogenesis. The same team also showed that NRP1 binds to HGF, which is involved in various functions, such as cell proliferation, cell migration, and morphogenesis (60, 61). The binding of NRP1 to HGF potentiates the activity of the growth factor with its receptor, c-MET, which promotes cell survival and invasiveness. This potentiation of HGF activity by

NRP1 contributes to the development of certain cancers, such as gliomas and pancreatic ductal adenocarcinomas (61, 62). Moreover, the discovery of NRP1 binding to PDGF confers a new role to NRPs in the regulation of PDGF signaling within vascular smooth muscle cells. NRP1 and NRP2 are highly expressed in vascular smooth muscle cells, and their association with PDGF plays a role in the migration, proliferation, and survival of these cells (66), as well as in other cell types, such as in mesenchymal stem cells (67).

Other studies have described that NRP1 plays a critical role in vascular development and homeostasis *via* the regulation of TGF- $\beta$  in endothelial cells (65, 66, 68). Indeed, NRP1 binds to TGF- $\beta$  in its active and latent forms associated with the LAP protein (LAP-TGF- $\beta$ ) *via* the b1 domain. Moreover, these two forms of TGF- $\beta$  compete with VEGF 165 for binding to NRP1 (65). In addition to binding to TGF- $\beta$ , NRP1 can form complexes with all three forms of TGF- $\beta$  receptors (TGF $\beta$ R), but has a higher affinity for TGF $\beta$ R-1 (68). Another study showed that NRP1 in endothelial cells suppresses TGF- $\beta$  activation and signaling by forming protein complexes with the integrin  $\beta$ 8, suggesting an inhibitory role for NRP1 on TGF- $\beta$  signaling (69).

## Involvement of Neuropilin-1 in Pediatric Brain Cancers

The ability of NRP1 to bind to a variety of ligands and receptors involved in different signaling pathways, such as SEMA 3 or VEGF for example, suggests that NRPs are involved in many physiological and pathophysiological processes, such as cancer. Several studies have shown that NRP1 is expressed in tumor cells of many cancers, such as breast cancers (16), lung cancers (70), pancreatic cancers (15), oral cancers (71), or brain tumors, such as gliomas (12, 72) and medulloblastomas (14). Moreover, the overexpression of NRP1 in tumors is associated with poor prognosis for those patients. Indeed, several research teams have noted that, when NRP1 is overexpressed in tumor tissues, such as pediatric brain tumors, the prognosis for those patients was poor in contrast to the patients without an overexpression of the receptor. Therefore, NRP1 overexpression is described as a poor prognostic factor in various cancers, such as lung cancers (70), pancreatic cancers (15), liver cancers (13), breast cancers (16), gliomas (12), and medulloblastomas (14).

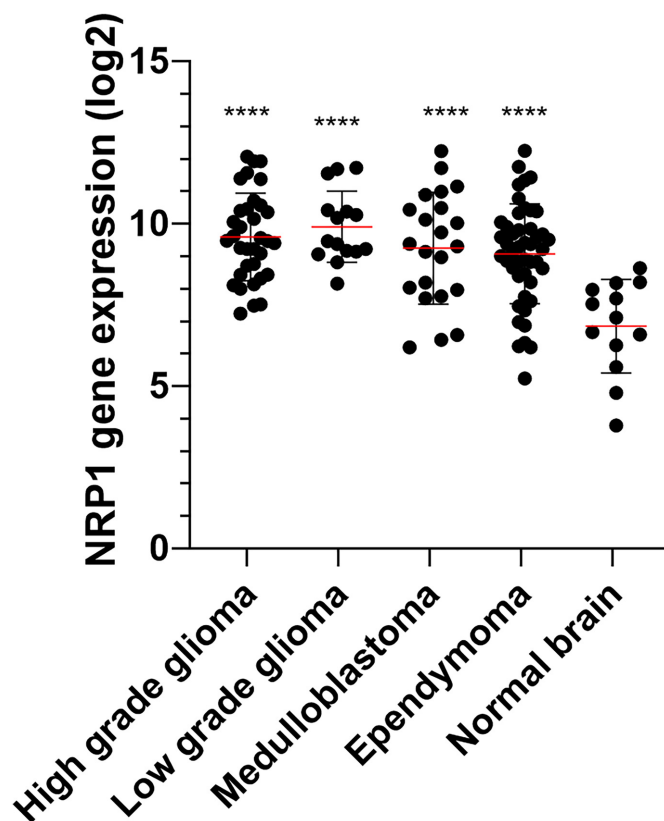
Furthermore, the poor prognosis of patients with NRP1 overexpression in their tumor cells is due to the involvement of NRP1 in tumor progression and tumor growth. Several studies have highlighted the link between NRPs and tumor progression in different cancer types, notably in brain cancers. More precisely, NRP1 was expressed in different cerebral tumors at a relatively high level of expression, no matter the type or the grade of the tumor (**Figure 2**), while the expression of NRP2 seems to be constantly low in all brain tumors (73, 74), demonstrating that its presence alone is correlated with poor prognosis (75). Thus, NRPs have been shown to play an important role in tumorigenesis, tumor development, tumor invasion, and tumor angiogenesis in adult brain tumors.

NRP1-mediated tumor invasion and growth has been described in several publications studying gliomas and glioblastomas. NRP1 appears to influence the tumor cell proliferation and migration by

interacting with various proteins and signaling pathways. Indeed, Zhang's team demonstrated that NRP1 mediates glioma progression through its interaction with the intracellular protein GIPC1 *via* the cytoplasmic C-terminal SEA motif (76). Inhibition of GIPC1 decreases glioma cell proliferation and invasion and increases apoptosis *in vitro* (76). NRP1/GIPC1-mediated proliferation, angiogenesis, and migration appear to be related to the activation of PI3K/Akt/NFκB signaling pathways (77). Another study suggested that NRP1, in combination with Plexin-A1, was correlated with poor prognosis in glioblastomas and may contribute to tumor growth. A peptide, specifically targeting Plexin-A1, has shown promising results in reducing proliferation and angiogenesis as well as blocking tumor cell spread following disruption of NRP1 and Plexin-A1 heterodimerization (78). On the other hand, some current treatments seem to have an impact on the expression of NRP1 and inversely. The use of temozolomide (TMZ) in combination with inhibition of VEGFR signaling appears to have beneficial effects in the treatment of glioblastomas as TMZ has been shown to reduce the expression of NRP1 and thus induce an increase in treatment cytotoxicity (79). More recently, a study of patient-derived glioblastoma multiforme xenografts in zebrafish and mouse models have reported that depletion of NRP1 inhibits

the growth of the tumor and substantially prolongs the survival rate of mice in comparison with VEGF-depletion, by improving sensitivity to TMZ (80). This work has shown that the ablation of NRP1 appears to improve the therapeutic response in glioblastomas (80). NRP1 appears to be a potential therapeutic target, especially as it is involved in the recurrence of tumors, such as GBM, by modulating TGF-β signaling after anti-angiogenic therapies. NRP1 regulates GBM growth and invasion by balancing tumor cell responses to VEGF-A and TGF-β (81). GBMs that recur after bevacizumab treatment show down-regulation of NRP1 expression. The altered balance between VEGF-A and TGF-β signaling mediated by NRP1 is a mechanism that promotes resistance to anti-angiogenic agents (81).

Unlike adult brain tumors, studies in pediatric brain tumors mainly focus on medulloblastomas. NRPs are overexpressed in MB and correlated with poor prognostic (14). Several studies show that targeting NRP1 reduces MB. Indeed, Snuderl et al. obtained MB regression in an intracerebral xenografted mouse model by targeting the PlGF/NRP1 signaling pathway. Inhibition of PlGF/NRP1 decreases tumor growth and metastasis in mice, and increases their survival rate (14). Recent studies have shown the benefit of NRP1 inhibition to decrease MB progression (82,



**FIGURE 2** | NRP1 expression (Log2) in normal brain and pediatric brain tumor samples. Microarray (Affymetrix HG-U133 plus 2) expression of 13 normal, 34 high grade glioma, 15 low grade glioma, 22 medulloblastoma and 46 ependymoma were extracted from the GSE50161 dataset (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE50161>). The significance was evaluated by a one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey for multiple comparisons. \*\*\*\* $P < 0.001$  versus normal brain.

83). Indeed, Gong et al. show that inhibition of NRP1 prevents the invasion and tumorigenicity of MB cells. This phenomenon is linked to decrease activation of the PI3K/Akt and MAPK pathway *in vitro* in the Daoy MB cell line (82). Furthermore, NRP1 also appears to be implicated in treatment resistance of pediatric brain tumors. Researchers have shown that targeting 4D phosphodiesterase, interacting directly with NRP1, inhibits tumor growth *in vivo*, even in mice resistant to vismodegib, an anti-SMO treatment (84). Concerning NRP2, few studies have described its involvement in pediatric brain tumors. It seems to be particularly implicated in SHH subgroup of MBs, because NRPs are involved in Hh signal transduction. This study shows that a knockdown of NRP2 has more anti-tumor effects than a knockdown of NRP1, as loss of NRP2 decreases cell proliferation while loss of NRP1 influences cell migration (85).

Intriguingly, the findings of Ishizuka et al. suggest that NRP1 has a tumor suppressive effect on neuroblastomas, a childhood extra-cranial solid malignant tumor (86). In neuroblastomas, a higher level of NRP1 expression was associated with a longer survival time (86). These findings are in contradiction with the findings of the previous reports on NRP1 in other cancer types described previously in this review.

As detailed above, NRP1 is involved in tumorigenesis in multiple ways, as it is played a role in different signaling pathways. Its best known involvement is in angiogenesis (18, 19), but this review focuses on the role of NRP1 in cancer stem cells (CSC) and in immune system (SI) during brain cancers development.

## NEUROFILIN-1 AND BRAIN TUMOR STEM CELLS

### Cancer Stem Cells in Brain Tumor

Tumor recurrence and the spread of metastases are among the major challenges in the treatment of brain tumors. These events are complicated by the heterogeneity of tumor cells present in all solid tumors, such as brain tumors. Solid cancers are organized in a hierarchical manner, it is suggested that a small number of cells are able to drive tumor growth, this population of cells is called CSCs or initiating cells tumor. Indeed, the CSC hypothesis is that not all the cells in the tumor have the same ability to proliferate and to maintain the growth of the tumor. There are two theoretical models to explain the presence of these CSCs in tumors: the stochastic model, where each cancer cell has the capacity to dedifferentiate into a CSC, and the hierarchical model where CSCs are considered the progenitors of differentiated cancer cells, with the capacity of self-renewal, differentiating, and expanding the pool of CSCs (87–89).

Furthermore, secondary resistances almost constantly occur in cancer, and CSC are suggested as a potential source of this chemoresistance and a lower survival rate. Indeed, CSCs survive chemo-radiotherapy and therefore contribute to multiple drug resistance mechanisms (90). Many mechanisms have been suggested for CSC resistance, such as drug efflux through ABC transporters, over-activation of the DNA damage response, apoptosis evasion, pro-survival pathways activation, cell cycle

promotion, and/or cell metabolic alterations (91, 92). CSCs have also been found to be associated with tumor dissemination through the epithelial-mesenchymal transition (EMT), a biological process which increases the invasion and the motility of cancer cells that are essential for distant colonization (93). These CSCs thus contribute to the poor prognosis of cancers (88, 89). CSCs have been characterized in multiple cancer types, including breast (94), colon (95), brain (96), and ovarian cancers (97).

Multiple pediatric brain tumors have been reported to harbor CSCs, including MBs (98, 99) and gliomas (99, 100). Most reports have identified CSCs by isolating the cells which are able to self-renew, differentiate, re-form the initial tumor, and present stem markers (99). In addition, those properties must be demonstrated *in vitro*, but the CSCs must also present the capacity to develop a tumor *in vivo*. In a SHH MB model, Zhang et al. unexpectedly found by using single-cell transcriptomics that progenitors of the glial lineage are the cells that propagate rapidly during the initial phase of tumorigenesis, although in complete tumors these cells are quiescent and have stem-like properties. Moreover, these authors showed that MB progenitors are enriched in recurrent and treatment-resistant tumors to cisplatin and cyclophosphamide and may serve as a niche for tumor initiation (101).

Great advances in sorting and identifying CSCs in brain tumors by using various markers have been made during the last decade. The first marker of CSCs in brain tumors was described in a study by Singh et al. (98). They have identified a new population of CSCs: the brain tumor cancer stem cells (BTSC). These cells express the neural stem cell marker CD133, do not present the differentiated cell markers and have the stem cell properties *in vitro*. The study showed that the CD133 cells have the capacity to form cell clusters derived from clones, such as neurospheres. BTSC renew themselves, proliferate, and differentiate by reproducing the phenotype of the original tumor (98). Their research team have published data showing that BTSC have the capacity to initiate the tumor *in vivo* (100) and further exploration have shown that CD133+ cells are able to initiate a new tumor in immunodeficient mice, whereas CD133– cells could not (98). Nevertheless, CD133 seems to be not an ideal cancer stem cell marker for pediatric brain tumors. Since then, mouse models have been developed that can classify pediatric brain tumor CSCs based on their expression of CD15 (102), Nestin (103), or Sox2 (104). CD15 (FUT4, SSEA-1) has shown a particular interest as a cancer stem cells marker for pediatric brain tumors as HGGs and LGGs (105) or MBs (106).

### NRP1 Signaling Pathway in CSC

Several studies have shown that NRPs signaling promotes CSC survival and tumor aggressiveness (55, 88, 107, 108). Because of their difference in expression, NRP1 and NRP2 are probably different in their ability to promote the functionality of CSCs. Moreover, it seems that they also differ in their signaling properties. Indeed, Grun et al. found that the VEGF/NRP1 signaling pathway was involved in the survival of epidermal cancer stem cells (ECS), contributing to tumor aggressiveness (55). VEGF-A is required to maintain the ECS phenotype and this process does not involve the classical VEGF receptors, but NRP1. Inhibition of NRP1 expression in ECSs reduces spheroids

formation, their invasion and migration, and thus decreases tumor development (55). This has been described as well as for breast cancer CSCs (107, 108). Breast cancer CSCs overexpress VEGF-A and NRP1. Zhang et al. demonstrated, using a CSC KO model for NRP1 or VEGF-A, that this signaling axis was necessary to ensure the specific traits of CSCs *in vitro* and *in vivo*, and that the VEGF-A/NRP1 axis conferred the stem phenotype to breast cancer cells by activating the WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway (108). In the same way, Liu et al. have shown that NRP1 expression is induced by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mammary stem cells, and its suppression leads to decreased tumorigenesis *in vivo* models (107). Furthermore, analysis of pediatric brain tumors databases shows a significant correlation between NRP1 and CD15 for the four analyzed tumor types. This correlation seems especially high for high grade gliomas, and so reinforces the possible role of NRP1 in tumor progression (Figure 3).

However, it appears that the interaction between NRP1 and VEGF is not the only factor of survival for CSCs. Indeed, some studies have shown that the interaction between NRP1 and GIPC1 is also involved in this phenomenon. In epidermal stem cells, NRP1 forms a complex with GIPC-1 and the integrin  $\alpha$ 6/ $\beta$ 4 to activate the FAK/Src signaling pathway that will then allow the stabilization of YAP1/ $\Delta$ Np63 $\alpha$  which, consequently, leads to enhanced ECS survival, invasion, and angiogenesis (109). NRP1/GIPC1 is also a key signal in the deformation character of ECS when it forms a complex with Syx, the guanine-RhoA exchange factor involved in angiogenesis. This interaction improves the spheroid formation, invasion, migration, and angiogenic potential of the cells *in vitro*. The formation of this complex leads to an increase in the activity of the p38 MAPK pathway, which is dependent on RhoA (109). In combination, when NRP1 or GIPC-1 expression is suppressed, both RhoA and p38 MAPK activity is decreased, leading to the loss of the ECS phenotype and reduce tumor growth (109).

Some studies also attest that NRP2 contributes to CSC function and tumor formation. Its involvement in CSC has been mainly described in breast cancers (110, 111). NRP2 is expressed in CSC of breast cancers and Goel et al. have described that VEGF/NRP2 signaling is important in tumor initiation. Indeed, NRP2 maintains the tumor-initiating cells by stimulating  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 integrin, this interaction inducing the FAK/Ras pathway and thus leading to the activation of GLI1. GLI1 also induces BMI-1, a key stem cells factor, which enhances NRP2 expression (111). Another study demonstrates that VEGF/NRP2 signaling pathway contributes to the mammosphere formation (110). This occurs through the inhibition of Rac GTPase-activating protein  $\beta$ 2 chimaerin mediated by activation of TAZ, a terminal effector of Hippo signaling associated to breast cancer stem cells (110). This result shows that NRP2 also plays a role in the acquisition of CSC properties in breast cancers (110).

Thirant et al. have isolated cells with the same properties as stem cells in different brain tumors that were associated with poor prognosis. In adult brain tumors, these stem-like cells were isolated only in HGGs. In contrast, stem-like cells have been isolated from different subtypes and grades in pediatric brain

tumors (112). Several studies have therefore focused on the function and the target of these brain cancer stem cells *via* NRPs. Hamerlik et al., working on gliomas, have highlighted that the viability and self-renewal of stem cells, and therefore their tumorigenicity, relies on the VEGF/VEGFR2/NRP1 signaling pathway (72). Their results suggest that inhibiting VEGFR2 or NRP1 in these cells could be a safe therapy in contrast to bevacizumab, a monoclonal antibody targeting VEGF, which remains ineffective against glioma CSCs (72). Recently, a study on glioblastomas has shown that Sema 3C, secreted by glioblastoma stem cells, forms a complex with PlexinA2/D1 and NRP1, promoting glioblastoma self-renewal and sphere formation. This complex is only functional in presence of NRP1 and allows the activation of Rac 1, which is an actor of tumor cells survival (113).

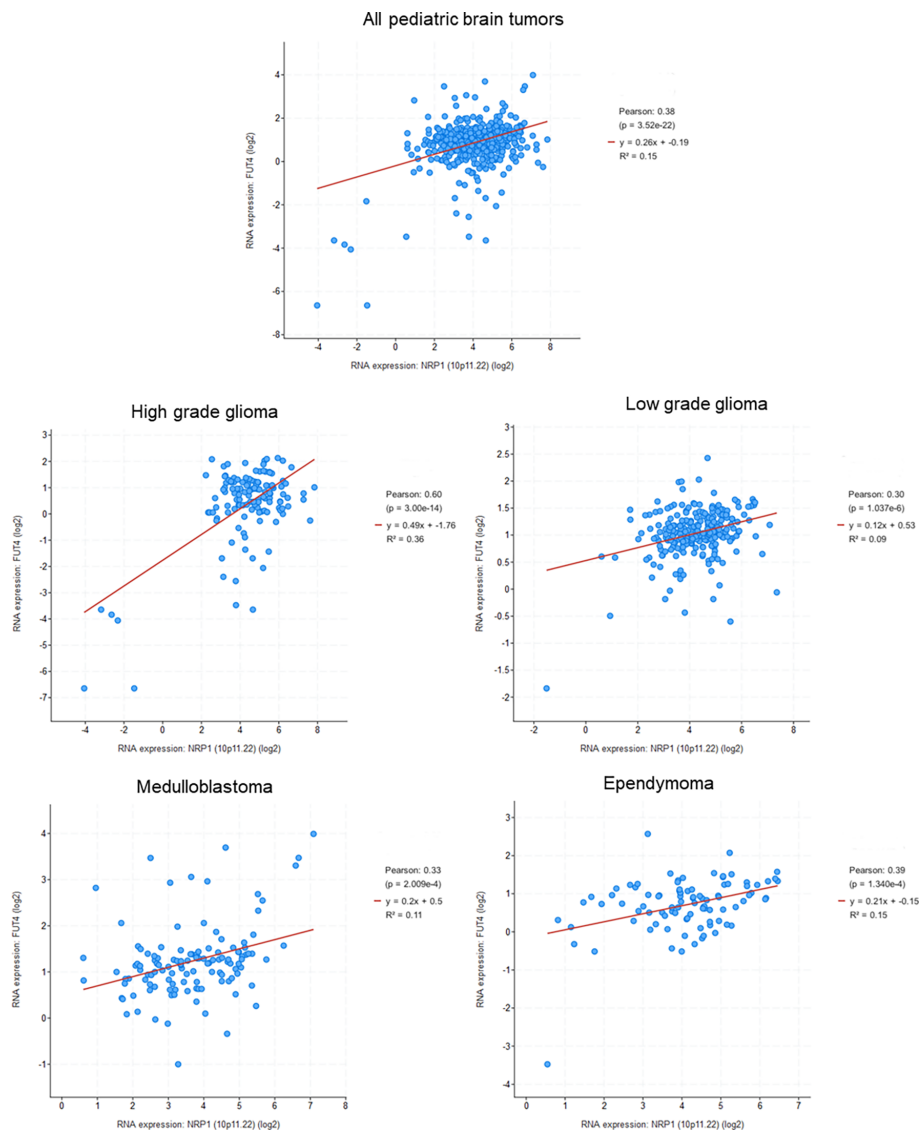
Currently, few studies have investigated the relationship between NRPs and CSCs in pediatric brain tumors. A study conducted by Gong et al. found that NRP1 plays a key role in the undifferentiated phenotype of MB CSC (82). First, they note that NRP1 is over-expressed in MB CSC. Secondly, their results show that, by inhibiting NRP1 *via* a peptidomimetic specifically targeting the protein, stem cells lose their stem characteristics, such as Sox 2 or CD15. Finally, the loss of NRP1 expression decreases the invasiveness capacity of MB CSC. This study suggests that the use of a molecule targeting NRP1 may have a relevant to target CSC in the case of MBs. This targeting of CSC could prove to be even more effective on survival rates, since several studies have shown that CSC are involved in the dissemination of metastases and tumor recurrence (114). Garg et al. have shown that MBSC CD133+ cells are associated with an increased metastasis and poor clinical outcome (115).

## NEUROFILIN-1 AND THE IMMUNE SYSTEM OF PEDIATRIC BRAIN TUMORS

### NRP1 Plays a Major Role in the Immune System

Interestingly, NRP1 also plays an important role in cellular immunity, whether in physiological or pathophysiological conditions, such as cancer. However, currently little knowledge of the molecular pathways involved in these functions. The expression of NRP1 has been characterized in different immune cell types, such as macrophages, dendritic cells (DCs), and lymphocytes, in particular regulatory T lymphocytes (LTreg) (116–121) and the NRP1 involvement in immune responses to cancer is summarized in Table 1.

Some research teams working on autoimmune diseases have shown that NRP1 plays a critical role in the regulation of immune responses. Solomon et al. investigated multiple sclerosis with an autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of mice deficient in NRP1 on their T CD4+ lymphocytes (LT CD4+) and showed that mice presented aggravated EAE in contrast to mice over-expressing NRP1 on their LT CD4+, which did not develop EAE (133). This suggests an anti-



**FIGURE 3** | Correlation between NRP1 and CD15 (FUT4) expression in pediatric brain tumors (Genomic characterization has obtained with cBioPortal provided by the Children's Brain Tumor Tissue Consortium Database; Pediatric High Grade Gliomas: 133 samples; Pediatric Low Grade Gliomas: 261 samples; Medulloblastoma: 130 samples; Ependymoma Tumor: 97 samples). Pearson's correlation coefficient and corresponding p value were given for each tumor types.

inflammatory role of NRP1, which has also been highlighted in a model of rheumatoid arthritis *via* the SEMA 3A/NRP1 signaling pathway (117). We know that NRP1 is a functional receptor for semaphorins and is expressed on LTs (117, 131). Although NRP1 is weakly expressed on Tregs isolated from human blood and cannot be used as an identifying marker for circulating human Tregs, it has recently been shown that in humans, NRP1 is expressed on CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), including Tregs (141). Furthermore, SEMA 4A/Plexin A4/NRP1 signaling has been implicated in the increased number of LTreg cells that are essential for the maintenance of peripheral tolerance and regulation of immune responses, and in the potentiation of their function. Moreover, the formation of the SEMA 4A/Plexin A4/NRP1 complex is linked to an increase in

the secretion of interleukin 10 (IL10), an anti-inflammatory interleukin, thus contributing to the regulation of the immune response (136). More recently, it has been shown that the B7-H4 ig protein binds to the SEMA 3A/Plexin A4/NRP1 complex to modulate the Treg response. Since the B7-H4ig protein is associated with the regulation of immunity by reducing CD4+ LT inflammatory responses, this suggests an immune-regulatory role for the SEMA 3A/Plexin A4/NRP1 complex (137). NRP2 is also expressed in T cells (120, 132), and it has been shown that NRP2/plexinA1 interacts with Sema 3F to inhibit mTOR and PI3K signaling in T cells (120). Furthermore, NRP2 co-immunoprecipitated with PTEN, a pro-tumor protein, required by SEMA 3F for the inhibition of mTOR and PI3K pathway (120).

**TABLE 1** | Summary NRP1 involvement in the immune system.

| Expression                   | Effects  | Signaling pathway  | Related disease  | Reference  |
|------------------------------|--|--|--|--|
| <b>Dendritic cells (DC)</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Migration</li> <li>• Reorganization of F-actin cytoskeleton</li> <li>• Recognition of pathogenic antigens, Formation of immunological synapse with T cells by interaction between NRP1 on DC and T cells</li> <li>• NRP1 transfer from DC to LT</li> </ul>  | • SEMA3A/SEMA3C/PlexinA1   |  | (118, 122)<br>(118)<br>(123, 124*)                                       |
| <b>Macrophages/microglia</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Promotion of macrophages type M2</li> <li>• Migration tumor-associated macrophages (TAM)</li> <li>• Infiltration within tumor</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• VEGF-A</li> <li>• SEMA 3A</li> <li>• SEMA 3A</li> <li>• SEMA 3A</li> </ul>                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cancer</li> <li>• Cancer</li> <li>• Cancer</li> </ul> | (125)<br>(119, 121*, 126)<br>(127*)<br>(127*, 128–130)                   |
| <b>Lymphocytes</b>           |  |  |  |  |
| • Thymocytes                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Decrease adhesion capacity, Migration by repulsive effect</li> </ul>  | • SEMA 3A  |  | (131, 132)   |
| • Lymphocytes T CD4+         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Suppression of T cell proliferation and their cytokines production</li> </ul>   |  | • Autoimmune disease   | (117, 133*)  |
| • Lymphocytes T CD8+         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition of migration within tumor, Inhibition of tumor cell lyse function</li> </ul>   | • SEMA 3A  | • Cancer   | (134, 135)   |
| • Lymphocytes Treg           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunosuppression and induction of tolerance</li> <li>• Increase the number of LT cells, Increase of IL10 secretion</li> <li>• Prolongation of interaction between LTreg and DC</li> <li>• Stability and function of LTreg</li> <li>• Infiltration of LTreg within tumor, and tumor immune escape function</li> <li>• Treg activation and increase of TGFβ production by LTreg</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• SEMA 4A/PlexinA4, B7-H4/SEMA 3A/Plexin A4</li> <li>• SEMA 4A</li> <li>• VEGF-A</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cancer</li> <li>• Cancer</li> </ul>                   | (136–138*)<br>(136, 137)<br>(124*)<br>(136, 137, 139)<br>(138*)<br>(140) |

\*References with a murine model.

In addition to playing an immune-regulatory role, NRPs are also involved in the immune cell migration. For example, a study showed that SEMA 3A decreases the adhesion capacity of thymocytes expressing NRP1 and induces their migration by a repulsive effect (131). In the same way, the SEMA 3F/NRP2 pathway controls the migration of human T cell precursors (132). In addition, NRP1 and NRP2 are expressed by dendritic cells and play a role in their migration (118, 122). NRP1 forms a complex with Plexin A1, which is known to play a crucial role in DC trafficking. The formation of this complex on the surface of DCs allows the binding of SEMA 3A present in the lymphatic vessels, which then leads to the migration of DCs into the lymphatics (122). Curreli et al. showed that SEMA 3A, 3C, and 3F promote DCs migration and that the function of SEMA 3F on DC migration is related to this binding of NRP2 (118).

Importantly, NRP1 is expressed on the surface of DCs involved in an important step for the initiation of immunity: the recognition of pathogenic antigens. Indeed, DCs are antigen-presenting cells (APCs), which have the ability, *via* MHC-I and MHC-II molecules, to present an antigen. APCs present antigen by forming an immunological synapse with LTs and thus stimulate their responses. NRP1 is expressed on both the surface of DCs and LTs and appears essential in their interaction to initiate the immune response (123). In particular, in murine model, NRP1 is expressed by LTreg, which improves and prolongs their interaction with DCs during the immunological synapse, thus conferring them a higher sensitivity to antigens (124). Moreover, another study points to NRP1 may be transferred from DCs to LTs within this immunological synapse, allowing them to bind to VEGF-165. These results suggest that NRP1-

expressing LTs may be involved in vessel remodeling in secondary lymphoid organs during inflammation (125).

Macrophages, another important player in immunity, also express NRPs (121, 126). They are immune cells present in all tissues and play a role in immune surveillance, inflammation response and resolution, and also contribute to wound healing. They originate from monocytes and NRP1 appears to play a role in their differentiation. Indeed, the expression of SEMA-3A and its receptor, NRP1, significantly increases during the monocyte differentiation into macrophages, and specifically during the monocyte differentiation under conditions favoring the macrophages of M2 phenotypes, which are characterized by anti-inflammatory and pro-angiogenic phenotype. The expression of NRP1 appears to decrease during the monocyte differentiation when conditions are in favor of macrophages with pro-inflammatory M1 phenotype (119). Macrophages also express NRP2 and it appears to be involved in monocyte differentiation into macrophages, but not to the same extent as NRP1 (119, 121).

## NRP1 Decreases Efficiency of the Immune System in Cancer

The immune system plays an essential role in our organism, especially during cancer when its immunological surveillance system is essential to control the tumor development and eliminate tumor cells. However, an important aspect of tumor progression is the ability of cancer cells to evade the monitoring and clearance by the immune system. Indeed, tumors cells avoid the immune system by different mechanisms, such as reducing

the immune recognition, increasing the resistance to immune attacks, or creating an immunosuppressive microenvironment and recruiting specific immune cells that favor tumor growth and progression (142, 143). Because of their expression in many immune cells and its involvement in the function of immune cells, NRPs have been the subject of some studies concerning its involvement in the deregulation of anti-tumor immunity. However, many unknowns remain to be clarified, and the involvement of NRPs in the antitumor immunity seems to be unclear. MBs had the lowest amount of PD-L1 and cytotoxic lymphocytes of all pediatric brain tumors and, overall, a very small amount of infiltrating immune cells (144). This suggests that the tumor either actively modulates the immune response or simply has little immunogenicity, as it is suggested by the relatively low mutational burden (144). Analysis of pediatric brain tumors database shows a significant correlation between NRP1 and PDL-1 for three tumor types, such as HGGs or LGGs, as well as EPNs, and a weak correlation for MBs (Figure 4). This correlation highlights the possible role of NRP1 in the regulation of tumor immune system.

In the context of cancer, LTreg infiltration is a critical step in tumor development and progression. NRP1 is expressed by LTreg and promotes their immunosuppressive effect by at least two pathways. First, NRP1, by acting as a VEGF co-receptor, will guide the LTreg within the tumor. Data from Hansen et al. show, in a mouse model of melanomas, that this infiltration of LTreg through NRP1 induces a decrease of the anti-tumor immune response and an improvement in tumor progression (138). In a second step, NRP1 maintains the stability and intratumoral function of LTreg cells *via* the SEMA-4A signaling pathway (136), and the inhibition of NRP1 in intratumoral LTregs promotes the production of interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), which leads to the fragility of surrounding LTregs, thereby enhancing anti-tumor immunity and facilitating tumor clearance (139).

Recently, NRP1 was found to modulate tumor-specific CD8+ T lymphocytes (LT CD8+) cell responses (134, 135). Indeed, Leclerc et al. demonstrated that NRP1 interacts with SEMA 3A by inhibiting the migration of cytotoxic LT CD8+ within the tumor and inhibiting their tumor cell lysis function (135). Data show that neutralizing NRP1 with a specific antibody improves the migration of LT CD8+ infiltrating the tumor and their cytotoxicity (135). This finding with NRP1 neutralization in an *in vivo* melanoma model would allow for synergistic action with anti-PD1 therapies in controlling tumor growth (135). However, the role of NRP1 on LT CD8+ is still unclear and controversial. Another study has shown that NRP1 allows cross-presentation: a necessary process against tumors allowing the recognition and destruction of tumor cells by LT CD8+ (134). Indeed, NRP1, expressed on the surface of breast cancer tumor cells, allows the internalization of neutrophil elastase, which results in the cross-presentation of the PR1 antigen and which is necessary for the specific lysis of tumor cells by cytotoxic T lymphocytes (134).

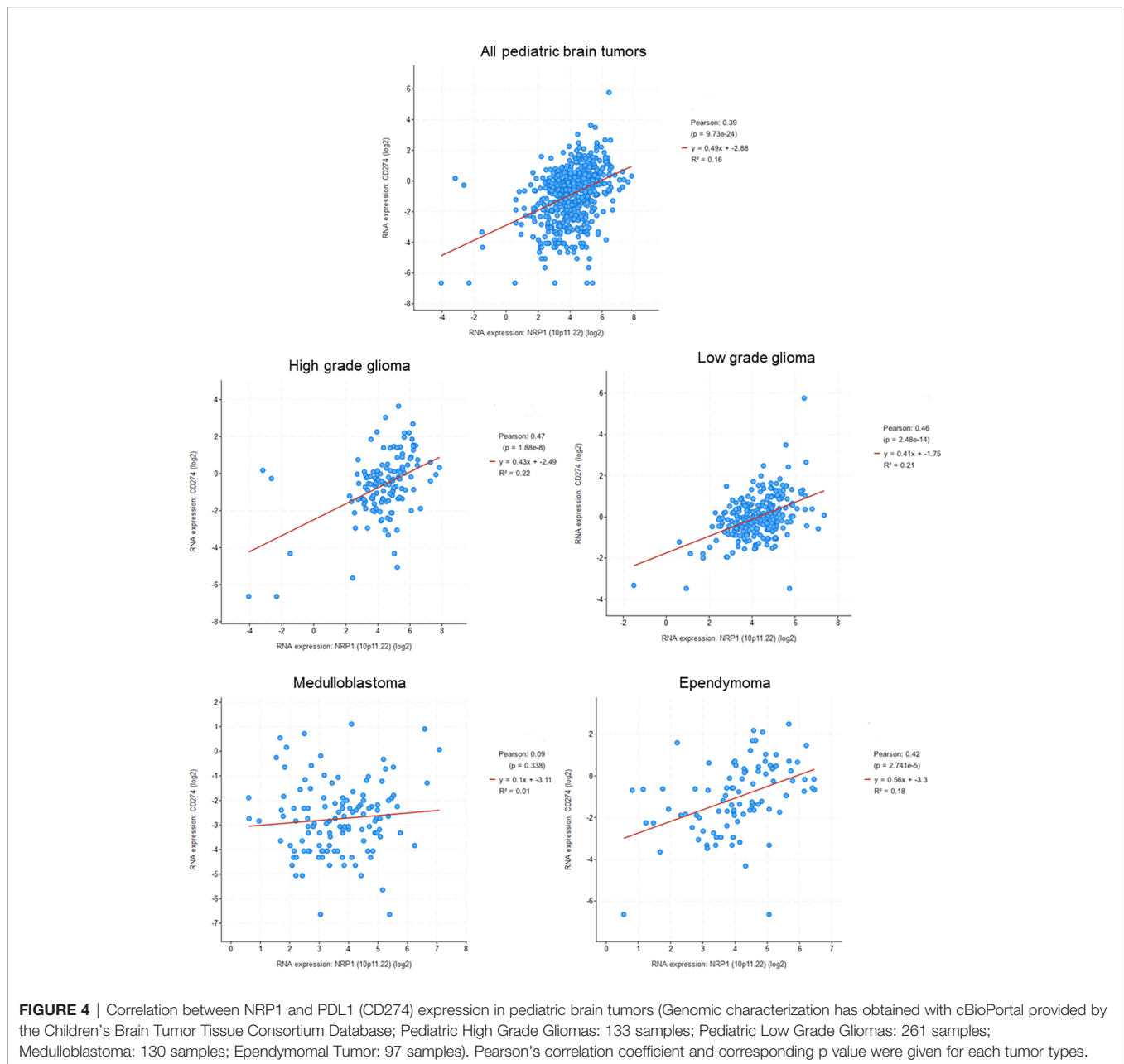
Another immune cell involved in anti-tumor immunity is the macrophage. Tumor-associated macrophages (TAMs) are strongly associated with tumorigenicity. NRP1, *via* its interaction with SEMA 3A, is involved in their migration.

Indeed, the work of Casazza et al. shows that NRP1 controls the recruitment of TAMs within tumors. Its inhibition within macrophages causes a reduction of their pro-angiogenic and immunosuppressive effects and leads to an inhibition of tumor growth and metastasis (127). A recent study demonstrates another mechanism of action of NRPs on macrophages in a tumor context. Thus, NRP2, expressed during macrophage differentiation, is induced by tumor cells and regulates macrophage phagocytosis. NRP2 promotes efferocytosis in macrophages, a phagocytosis that eliminates apoptotic cells in an immunologically silent manner (128). In this study, NRP2 inhibition, in a pancreatic cancer model, results in delayed clearance of apoptotic cells, and lead to increased LT CD8+ and NK cell infiltration within the tumor, consequently decreased in tumor growth. Inhibition of NRP2 may have a direct effect on the ability of TAMs to express their immunosuppressive functions *via* the expression of IL10 or TGF- $\beta$  for example (128).

NRPs are, therefore, involved in anti-tumor immunity and it is questionable whether the same is true for brain tumors. The central nervous system was classically considered as an “immune-privileged site,” being immunologically inert and separated from the peripheral immune system by the blood-brain barrier (BBB). However, brain tumors represent a particular case in which the BBB is disrupted to various degrees, and therefore, acquired an innate immunity that may play a role in the development and growth of brain cancers. Most studies have focused on adult gliomas, and very few so far have focused on pediatric brain tumors. Several studies led by Miyauchi et al. have shown that NRP1 is expressed by macrophages and microglia associated with gliomas (129, 130). In their NRP1-deficient mouse model, they suggest that the loss of NRP1 expression by macrophages and/or microglia is associated with delayed tumor growth (129, 130). Another study describes the role of NRP1 on LTreg in glioma and shows that a small molecule antagonist of NRP1 is able to block a glioma-conditioned medium-induced increase in TGF- $\beta$  production in LTreg (140).

## CONCLUSION

NRP1 were known since the end of the 1990s to play a role in axonal guidance and vascular biology, acting as a co-receptor for plexin and VEGF receptors families respectively. Furthermore, this co-receptor is also expressed by tumor cells and may be involved in the progression of tumors. In this review, we have discussed the involvement of NRP1 in pediatric brain tumors, such as gliomas, MBs, or EPNs. Indeed, the NRP1 signaling pathway is clearly involved in the cancer stem cells maintenance in pediatric tumors, and a significant correlation between NRP1 and CD15 (stem cancer cells marker) has been observed in pediatric tumors database. Moreover, NRP1 is involved in the activation of the immune cells, in particular in the interaction between T cells and DCs. NRP1 may also play a role in the



regulation of immunogenicity of tumor cells, highlighted by the correlation between NRP1 and PDL-1. This role is not yet fully investigated, but we will focus our future research on this aspect. Numerous peptides or biological molecules that target NRP1 and whose efficacy has been tested *in vitro* and *in vivo* have been developed (19). For the moment, only clinical phase I trials have been performed against NRP1 with monoclonal antibodies. The first has been performed with MNRP-1685A for patients with solid tumors (145) and more recently, with TB-403, targeting the PIGF-NRP-1 axis, in pediatric subjects with relapsed MB (146). To conclude, NRP1, through its different action ways, could be a key protein in the progression of pediatric brain cancers, and could be envisaged as a therapeutic target for these tumors.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MD, PC, and CB contributed to redaction of this review. MD wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr Hélène Dubois-Pot-Schneider for her help in tumor databases analysis and Dr William Géhin for reviewing the English language of this review.

## REFERENCES

- Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H. Overexpression of a Membrane Protein, Neuropilin, in Chimeric Mice Causes Anomalies in the Cardiovascular System, Nervous System and Limbs. *Dev Camb Engl* (1995) 121(12):4309–18. doi: 10.1242/dev.121.12.4309
- Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, et al. A Requirement for Neuropilin-1 in Embryonic Vessel Formation. *Dev Camb Engl* (1999) 126(21):4895–902. doi: 10.1242/dev.126.21.4895
- Roy S, Bag AK, Singh RK, Talmadge JE, Batra SK, Datta K. Multifaceted Role of Neuropilins in the Immune System: Potential Targets for Immunotherapy. *Front Immunol* (2017) 8:1228. doi: 10.3389/fimmu.2017.01228
- Lampropoulou A, Ruhrberg C. Neuropilin Regulation of Angiogenesis. *Biochem Soc Trans* (2014) 42(6):1623–8. doi: 10.1042/BST20140244
- Plein A, Fantin A, Ruhrberg C. Neuropilin Regulation of Angiogenesis, Arteriogenesis, and Vascular Permeability. *Microcirc N Y N* 1994 (2014) 21(4):315–23. doi: 10.1111/micc.12124
- Chaudhary B, Khaled YS, Ammori BJ, Elkord E. Neuropilin 1: Function and Therapeutic Potential in Cancer. *Cancer Immunol Immunother CII* (2014) 63(2):81–99. doi: 10.1007/s00262-013-1500-0
- Ellis LM. The Role of Neuropilins in Cancer. *Mol Cancer Ther* (2006) 5(5):1099–107. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0538
- Takagi S, Tsuji T, Amagai T, Takamatsu T, Fujisawa H. Specific Cell Surface Labels in the Visual Centers of *Xenopus laevis* Tadpole Identified Using Monoclonal Antibodies. *Dev Biol* (1987) 122(1):90–100. doi: 10.1016/0012-1606(87)90335-6
- Chen H, Chédotal A, He Z, Goodman CS, Tessier-Lavigne M. Neuropilin-2, a Novel Member of the Neuropilin Family, Is a High Affinity Receptor for the Semaphorins Sema E and Sema IV But Not Sema III. *Neuron* (1997) 19(3):547–59. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80371-2
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 Is Expressed by Endothelial and Tumor Cells as an Isoform-Specific Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor. *Cell* (1998) 92(6):735–45. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81402-6
- Klagsbrun M, Takashima S, Mamluk R. The Role of Neuropilin in Vascular and Tumor Biology. *Adv Exp Med Biol* (2002) 515:33–48. doi: 10.1007/978-1-4615-0119-0\_3
- Osada H, Tokunaga T, Nishi M, Hatanaka H, Abe Y, Tsugu A, et al. Overexpression of the Neuropilin 1 (NRP1) Gene Correlated With Poor Prognosis in Human Glioma. *Anticancer Res* (2004) 24(2B):547–52.
- Yaquob U, Cao S, Shergill U, Jagavelu K, Geng Z, Yin M, et al. Neuropilin-1 Stimulates Tumor Growth by Increasing Fibronectin Fibril Assembly in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res* (2012) 72(16):4047–59. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3907
- Snuderl M, Batista A, Kirkpatrick ND, de Almodovar CR, Riedemann L, Walsh EC, et al. Targeting Placental Growth Factor/Neuropilin 1 Pathway Inhibits Growth and Spread of Medulloblastoma. *Cell* (2013) 152(5):1065–76. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.036
- Ben Q, Zheng J, Fei J, An W, Li P, Li Z, et al. High Neuropilin 1 Expression was Associated With Angiogenesis and Poor Overall Survival in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas* (2014) 43(5):744–9. doi: 10.1097/MPA.0000000000000117
- Luo M, Hou L, Li J, Shao S, Huang S, Meng D, et al. Vegf/Nrp-1axis Promotes Progression of Breast Cancer Via Enhancement of Epithelial-Mesenchymal Transition and Activation of NF- $\kappa$ B and  $\beta$ -Catenin. *Cancer Lett* (2016) 373(1):1–11. doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.010
- Segal D, Karajannis MA. Pediatric Brain Tumors: An Update. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* (2016) 46(7):242–50. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.04.004
- Niland S, Eble JA. Neuropilins in the Context of Tumor Vasculature. *Int J Mol Sci* (2019) 20(3):639. doi: 10.3390/ijms20030639
- Dumond A, Pagès G. Neuropilins, as Relevant Oncology Target: Their Role in the Tumoral Microenvironment. *Front Cell Dev Biol* (2020) 8:662. doi: 10.3389/fcell.2020.00662
- Graziani G, Lecal PM. Neuropilin-1 as Therapeutic Target for Malignant Melanoma. *Front Oncol* (2015) 5:125. doi: 10.3389/fonc.2015.00125
- Johnson KJ, Cullen J, Barnholtz-Sloan JS, Ostrom QT, Langer CE, Turner MC, et al. Childhood Brain Tumor Epidemiology: A Brain Tumor Epidemiology Consortium Review. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* (2014) 23(12):2716–36. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0207
- Stokland T, Liu J-F, Ironside JW, Ellison DW, Taylor R, Robinson KJ, et al. A Multivariate Analysis of Factors Determining Tumor Progression in Childhood Low-Grade Glioma: A Population-Based Cohort Study (CCLG CNS9702). *Neuro-Oncol* (2010) 12(12):1257–68. doi: 10.1093/neuonc/12(12):1257-68
- Mistry M, Zhukova N, Merico D, Rakopoulos P, Krishnatry R, Shago M, et al. BRAF Mutation and CDKN2A Deletion Define a Clinically Distinct Subgroup of Childhood Secondary High-Grade Glioma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* (2015) 33(9):1015–22. doi: 10.1200/JCO.2014.58.3922
- Cacciotti C, Fleming A, Ramaswamy V. Advances in the Molecular Classification of Pediatric Brain Tumors: A Guide to the Galaxy. *J Pathol* (2020) 251(3):249–61. doi: 10.1002/path.5457
- Sturm D, Pfister SM, Jones DTW. Pediatric Gliomas: Current Concepts on Diagnosis, Biology, and Clinical Management. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* (2017) 35(21):2370–7. doi: 10.1200/JCO.2017.73.0242
- Lassaletta A, Zapotocky M, Mistry M, Ramaswamy V, Honnorat M, Krishnatry R, et al. Therapeutic and Prognostic Implications of BRAF V600E in Pediatric Low-Grade Gliomas. *J Clin Oncol* (2017) 35(25):2934–41. doi: 10.1200/JCO.2016.71.8726
- French JA, Lawson JA, Yapici Z, Ikeda H, Polster T, Nabbout R, et al. Adjunctive Everolimus Therapy for Treatment-Resistant Focal-Onset Seizures Associated With Tuberous Sclerosis (EXIST-3): A Phase 3, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Lancet Lond Engl* (2016) 388(10056):2153–63. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31419-2
- Bax DA, Mackay A, Little SE, Carvalho D, Viana-Pereira M, Tamber N, et al. A Distinct Spectrum Of Copy Number Aberrations In Paediatric High Grade Gliomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2010) 16(13):3368–77. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0438
- Zarghooni M, Bartels U, Lee E, Buczkowicz P, Morrison A, Huang A, et al. Whole-Genome Profiling of Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas Highlights Platelet-Derived Growth Factor Receptor  $\alpha$  and Poly (ADP-Ribose) Polymerase as Potential Therapeutic Targets. *J Clin Oncol* (2010) 28(8):1337–44. doi: 10.1200/JCO.2009.25.5463
- Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu X-Y, Jones DTW, Pfaff E, Jacob K, et al. Driver Mutations in Histone H3.3 and Chromatin Remodelling Genes in Paediatric Glioblastoma. *Nature* (2012) 482(7384):226–31. doi: 10.1038/nature10833
- Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfors J, et al. Somatic Histone H3 Alterations in Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas and Non-Brainstem Glioblastomas. *Nat Genet* (2012) 44(3):251–3. doi: 10.1038/ng.1102
- Korshunov A, Capper D, Reuss D, Schrimpf D, Ryzhova M, Hovestadt V, et al. Histologically Distinct Neuroepithelial Tumors With Histone 3 G34 Mutation Are Molecularly Similar and Comprise a Single Nosologic Entity. *Acta Neuropathol (Berl.)* (2016) 131(1):137–46. doi: 10.1007/s00401-015-1493-1
- Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, et al. Entrectinib in Patients With Advanced or Metastatic NTRK Fusion-Positive Solid Tumours: Integrated Analysis of Three Phase 1-2 Trials. *Lancet Oncol* (2020) 21(2):271–82. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30691-6
- Gottardo NG, Gajjar A. Chemotherapy for Malignant Brain Tumors of Childhood. *J Child Neurol* (2008) 23(10):1149–59. doi: 10.1177/0883073808321765
- Khuong-Quang D-A, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu X-Y, Fontebasso AM, Bouffet E, et al. K27M Mutation in Histone H3.3 Defines Clinically and Biologically Distinct Subgroups of Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas. *Acta Neuropathol (Berl.)* (2012) 124(3):439–47. doi: 10.1007/s00401-012-0998-0
- Pollack IF, Agnihotri S, Broniscer A. Childhood Brain Tumors: Current Management, Biological Insights, and Future Directions. *J Neurosurg Pediatr* (2019) 23(3):261–73. doi: 10.3171/2018.10.PEDS18377
- Millard NE, De Braganca KC. Medulloblastoma. *J Child Neurol* (2016) vol:1341–53. doi: 10.1177/0883073815600866

38. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Acta Neuropathol (Berl.)* (2016) 131(6):803–20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1
39. Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, Bailey S, Clifford SC, Doz F, et al. Risk Stratification of Childhood Medulloblastoma in the Molecular Era: The Current Consensus. *Acta Neuropathol (Berl.)* (2016) 131(6):821–31. doi: 10.1007/s00401-016-1569-6
40. Remke M, Ramaswamy V. Infant Medulloblastoma - Learning New Lessons From Old Strata. *Nat Rev Clin Oncol* (2018) 15(11):659–60. doi: 10.1038/s41571-018-0071-6
41. Mulhern RK, Palmer SL, Merchant TE, Wallace D, Kocak M, Brouwers P, et al. Neurocognitive Consequences of Risk-Adapted Therapy for Childhood Medulloblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* (2005) 23(24):5511–9. doi: 10.1200/JCO.2005.00.703
42. Mack SC, Taylor MD. Put Away Your Microscopes: The Ependymoma Molecular Era has Begun. *Curr Opin Oncol* (2017) 29(6):443–7. doi: 10.1097/CCO.0000000000000411
43. Parker M, Mohankumar KM, Punchihewa C, Weinlich R, Dalton JD, Li Y, et al. C11orf95-RELA Fusions Drive Oncogenic NF- $\kappa$ B Signaling in Ependymoma. *Nature* (2014) 506(7489):451–5. doi: 10.1038/nature13109
44. Pajtler KW, Witt H, Sill M, Jones DTW, Hovestadt V, Kratochwil F, et al. Molecular Classification of Ependymal Tumors Across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. *Cancer Cell* (2015) 27(5):728–43. doi: 10.1016/j.ccell.2015.04.002
45. Zapotocky M, Beera K, Adamski J, Laperriere N, Guger S, Janzen L, et al. Survival and Functional Outcomes of Molecularly Defined Childhood Posterior Fossa Ependymoma: Cure at a Cost. *Cancer* (2019) 125(11):1867–76. doi: 10.1002/cncr.31995
46. Mostoufi-Moab S, Grimberg A. Pediatric Brain Tumor Treatment: Growth Consequences and Their Management. *Pediatr Endocrinol Rev PER* (2010) 8(1):6–17.
47. Sengupta S, Pomeranz Krummel D, Pomeroy S. The Evolution of Medulloblastoma Therapy to Personalized Medicine. *F1000Research* (2017) 6:490. doi: 10.12688/f1000research.10859.1
48. Jussila M-P, Remes T, Anttonen J, Harila-Saari A, Niinimäki J, Pokka T, et al. Late Vertebral Side Effects in Long-Term Survivors of Irradiated Childhood Brain Tumor. *PLoS One* (2018) 13(12):e0209193. doi: 10.1371/journal.pone.0209193
49. Kolodkin AL, LeVengood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD. Neuropilin Is a Semaphorin III Receptor. *Cell* (1997) 90(4):753–62. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80535-8
50. Koch S, Claesson-Welsh L. Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2012) 2(7):a006502. doi: 10.1101/cshperspect.a006502
51. Gaur P, Bielenberg DR, Samuel S, Bose D, Zhou Y, Gray MJ, et al. Role of Class 3 Semaphorins and Their Receptors in Tumor Growth and Angiogenesis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2009) 15(22):6763–70. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1810
52. Pellet-Many C, Frankel P, Jia H, Zachary I. Neuropilins: Structure, Function and Role in Disease. *Biochem J* (2008) 411(2):211–26. doi: 10.1042/BJ20071639
53. Wild JRL, Staton CA, Chapple K, Corfe BM. Neuropilins: Expression and Roles in the Epithelium. *Int J Exp Pathol* (2012) 93(2):81–103. doi: 10.1111/j.1365-2613.2012.00810.x
54. Prahst C, Héroult M, Lanahan AA, Uziel N, Kessler O, Shraga-Heled N, et al. Neuropilin-1-Vegfr-2 Complexing Requires the PDZ-Binding Domain of Neuropilin-1. *J Biol Chem* (2008) 283(37):25110–4. doi: 10.1074/jbc.C800137200
55. Grun D, Adhikary G, Eckert RL. VEGF-a Acts Via Neuropilin-1 to Enhance Epidermal Cancer Stem Cell Survival and Formation of Aggressive and Highly Vascularized Tumors. *Oncogene* (2016) 35(33):4379–87. doi: 10.1038/onc.2015.507
56. Valdembri D, Caswell PT, Anderson KI, Schwarz JP, König I, Astanina E, et al. Neuropilin-1/Gip1 Signaling Regulates  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Integrin Traffic and Function in Endothelial Cells. *PLoS Biol* (2009) 7(1):e25. doi: 10.1371/journal.pbio.1000025
57. Chauvet S, Cohen S, Yoshida Y, Fekrane L, Livet J, Gayet O, et al. Gating of Sema3E/PlexinD1 Signaling by Neuropilin-1 Switches Axonal Repulsion to Attraction During Brain Development. *Neuron* (2007) 56(5):807–22. doi: 10.1016/j.neuron.2007.10.019
58. Pan Q, Chathery Y, Wu Y, Rathore N, Tong RK, Peale F, et al. Neuropilin-1 Binds to VEGF121 and Regulates Endothelial Cell Migration and Sprouting. *J Biol Chem* (2007) 282(33):24049–56. doi: 10.1074/jbc.M703554200
59. Gu C, Limberg BJ, Whitaker GB, Perman B, Leahy DJ, Rosenbaum JS, et al. Characterization of Neuropilin-1 Structural Features That Confer Binding to Semaphorin 3A and Vascular Endothelial Growth Factor 165. *J Biol Chem* (2002) 277(20):18069–76. doi: 10.1074/jbc.M201681200
60. West DC, Rees CG, Duchesne L, Patey SJ, Terry CJ, Turnbull JE, et al. Interactions of Multiple Heparin Binding Growth Factors With Neuropilin-1 and Potentiation of the Activity of Fibroblast Growth Factor-2. *J Biol Chem* (2005) 280(14):13457–64. doi: 10.1074/jbc.M410924200
61. Hu B, Guo P, Bar-Joseph I, Imanishi Y, Jarzynka M, Bogler O, et al. Neuropilin-1 Promotes Human Glioma Progression Through Potentiating the Activity of the HGF/SF Autocrine Pathway. *Oncogene* (2007) 26(38):5577–86. doi: 10.1038/sj.onc.1210348
62. Matsushita A, Götz T, Korc M. Hepatocyte Growth Factor-Mediated Cell Invasion in Pancreatic Cancer Cells Is Dependent on Neuropilin-1. *Cancer Res* (2007) 67(21):10309–16. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3256
63. Banerjee S, Sengupta K, Dhar K, Mehta S, D'Amore PA, Dhar G, et al. Breast Cancer Cells Secreted Platelet-Derived Growth Factor-Induced Motility of Vascular Smooth Muscle Cells Is Mediated Through Neuropilin-1. *Mol Carcinog* (2006) 45(11):871–80. doi: 10.1002/mc.20248
64. Kofler N, Simons M. The Expanding Role of Neuropilin: Regulation of Vascular Tgfb and PDGF Signaling. *Curr Opin Hematol* (2016) 23(3):260–7. doi: 10.1097/MOH.0000000000000233
65. Glinka Y, Prud'homme GJ. Neuropilin-1 Is a Receptor for Transforming Growth Factor  $\beta$ -1, Activates Its Latent Form, and Promotes Regulatory T Cell Activity. *J Leukoc Biol* (2008) 84(1):302–10. doi: 10.1189/jlb.0208090
66. Kofler N, Simons M. The Expanding Role of Neuropilin: Regulation of Transforming Growth Factor- $\beta$  and Platelet-Derived Growth Factor Signaling in the Vasculature. *Curr Opin Hematol* (2016) 23(3):260–7. doi: 10.1097/MOH.0000000000000233
67. Ball SG, Bayley C, Shuttleworth CA, Kielty CM. Neuropilin-1 Regulates Platelet-Derived Growth Factor Receptor Signalling in Mesenchymal Stem Cells. *Biochem J* (2010) 427(Pt 1):29–40. doi: 10.1042/BJ20091512
68. Glinka Y, Stoilova S, Mohammed N, Prud'homme GJ. Neuropilin-1 Exerts Co-Receptor Function for TGF-Beta-1 on the Membrane of Cancer Cells and Enhances Responses to Both Latent and Active TGF-Beta. *Carcinogenesis* (2011) 32(4):613–21. doi: 10.1093/carcin/bgq281
69. Hirota S, Clements TP, Tang LK, Morales JE, Lee HS, Oh SP, et al. Neuropilin 1 Balances  $\beta$ 8 Integrin-Activated Tgfb Signaling to Control Sprouting Angiogenesis in the Brain. *Dev Camb Engl* (2015) 142(24):4363–73. doi: 10.1242/dev.113746
70. Kawakami T, Tokunaga T, Hatanaka H, Kijima H, Yamazaki H, Abe Y, et al. Neuropilin 1 and Neuropilin 2 Co-Expression Is Significantly Correlated With Increased Vascularity and Poor Prognosis in Non-small Cell Lung Carcinoma. *Cancer* (2002) 95(10):2196–201. doi: 10.1002/cncr.10936
71. Chu W, Song X, Yang X, Ma L, Zhu J, He M, et al. Neuropilin-1 Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Stimulating Nuclear Factor-Kappa B and Is Associated With Poor Prognosis in Human Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One* (2014) 9(7):e101931. doi: 10.1371/journal.pone.0101931
72. Hamerlik P, Lathia JD, Rasmussen R, Wu Q, Bartkova J, Lee M, et al. Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 Signaling Promotes Glioma Stem-Like Cell Viability and Tumor Growth. *J Exp Med* (2012) 209(3):507–20. doi: 10.1084/jem.2011424
73. Baumgarten P, Blank A-E, Franz K, Hattingen E, Dunst M, Zeiner P, et al. Differential Expression of Vascular Endothelial Growth Factor A, Its Receptors VEGFR-1, -2, and -3 and Co-Receptors Neuropilin-1 and -2 Does Not Predict Bevacizumab Response in Human Astrocytomas. *Neuro-Oncol* (2016) 18(2):173–83. doi: 10.1093/neuonc/nov288
74. Clemesly M, Janzer RC, Lhermitte B, Gasc J-M, Juillerat-Jeanneret L. Expression of Dual Angiogenic/Neurogenic Growth Factors in Human Primary Brain Tumors. *J Neurooncol* (2012) 107(1):29–36. doi: 10.1007/s11060-011-0715-1
75. Zhao H, Hou C, Hou A, Zhu D. Concurrent Expression of VEGF-C and Neuropilin-2 Is Correlated With Poor Prognosis in Glioblastoma. *Tohoku J Exp Med* (2016) 238(2):85–91. doi: 10.1620/tjem.238.85

76. Zhang G, Chen L, Sun K, Khan AA, Yan J, Liu H, et al. Neuropilin-1 (Nrp-1)/GIPC1 Pathway Mediates Glioma Progression. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* (2016) 37(10):13777–88. doi: 10.1007/s13277-016-5138-3
77. Zhang G, Chen L, Khan AA, Li B, Gu B, Lin F, et al. miRNA-124-3p/Neuropilin-1(NRP-1) Axis Plays an Important Role in Mediating Glioblastoma Growth and Angiogenesis. *Int J Cancer* (2018) 143(3):635–44. doi: 10.1002/ijc.31329
78. Jacob L, Sawma P, Garnier N, Meyer LAT, Fritz J, Husenet T, et al. Inhibition of PlexA1-mediated Brain Tumor Growth and Tumor-Associated Angiogenesis Using a Transmembrane Domain Targeting Peptide. *Oncotarget* (2016) 7(36):57851–65. doi: 10.18632/oncotarget.11072
79. Lee J, Kim E, Ryu S-W, Choi C, Choi K. Combined Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Signaling With Temozolomide Enhances Cytotoxicity Against Human Glioblastoma Cells Via Downregulation of Neuropilin-1. *J Neurooncol* (2016) 128(1):29–34. doi: 10.1007/s11060-016-2091-3
80. Angom RS, Mondal SK, Wang F, Madamsetty VS, Wang E, Dutta SK, et al. Ablation of Neuropilin-1 Improves the Therapeutic Response in Conventional Drug-Resistant Glioblastoma Multiforme. *Oncogene* (2020) 39(48):7114–26. doi: 10.1038/s41388-020-01462-1
81. Kwiatkowski SC, Guerrero PA, Hirota S, Chen Z, Morales JE, Aghi M, et al. Neuropilin-1 Modulates Tgfb $\beta$  Signaling to Drive Glioblastoma Growth and Recurrence After Anti-Angiogenic Therapy. *PLoS One* (2017) 12(9):e0185065. doi: 10.1371/journal.pone.0185065
82. Gong C, Valduga J, Chateau A, Richard M, Pellegrini-Moise N, Barberi-Heyob M, et al. Stimulation of Medulloblastoma Stem Cells Differentiation by a Peptidomimetic Targeting Neuropilin-1. *Oncotarget* (2018) 9(20):15312–25. doi: 10.18632/oncotarget.24521
83. Yogi K, Sridhar E, Goel N, Jalali R, Goel A, Moiyadi A, et al. MiR-148a, a microRNA Upregulated in the WNT Subgroup Tumors, Inhibits Invasion and Tumorigenic Potential of Medulloblastoma Cells by Targeting Neuropilin 1. *Oncoscience* (2015) 2(4):334–48. doi: 10.18632/oncoscience.137
84. Ge X, Milenkovic L, Suyama K, Hartl T, Purzner T, Winans A, et al. Phosphodiesterase 4D Acts Downstream of Neuropilin to Control Hedgehog Signal Transduction and the Growth of Medulloblastoma. *eLife* (2015) 4:e07068. doi: 10.7554/eLife.07068
85. Hayden Gephart MG, Sophie Su Y, Bandara S, Tsai F-C, Hong J, Conley N, et al. Neuropilin-2 Contributes to Tumorigenicity in a Mouse Model of Hedgehog Pathway Medulloblastoma. *J Neurooncol* (2013) 115(2):161–8. doi: 10.1007/s11060-013-1216-1
86. Ishizuka Y, Koshinaga T, Hirano T, Nagasaki-Maeoka E, Watanabe Y, Hoshi R, et al. NRP1 Knockdown Promotes the Migration and Invasion of Human Neuroblastoma-Derived SK-N-AS Cells Via the Activation of  $\beta$ 1 Integrin Expression. *Int J Oncol* (2018) 53(1):159–66. doi: 10.3892/ijo.2018.4397
87. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res* (2006) 66(19):9339–44. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3126
88. Mercurio AM. Vegf/Neuropilin Signaling in Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci* (2019) 20(3):490. doi: 10.3390/ijms20030490
89. Nunes T, Hamdan D, Leboeuf C, El Bouchtaoui M, Gapihan G, Nguyen TT, et al. Targeting Cancer Stem Cells to Overcome Chemoresistance. *Int J Mol Sci* (2018) 19(12):4036. doi: 10.3390/ijms19124036
90. Cojoc M, Mäbert K, Muders MH, Dubrovskaya A. A Role for Cancer Stem Cells in Therapy Resistance: Cellular and Molecular Mechanisms. *Semin Cancer Biol* (2015) 31:16–27. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.06.004
91. Garcia-Mayea Y, Mir C, Masson F, Paciucci R, Leonart ME. Insights Into New Mechanisms and Models of Cancer Stem Cell Multidrug Resistance. *Semin Cancer Biol* (2020) 60:166–80. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.07.022
92. Yang L, Shi P, Zhao G, Xu J, Peng W, Zhang J, et al. Targeting Cancer Stem Cell Pathways for Cancer Therapy. *Signal Transduct Target Ther* (2020) 5(1):8. doi: 10.1038/s41392-020-0110-5
93. Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton ENG, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells With Properties of Stem Cells. *Cell* (2008) 133(4):704–15. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027
94. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100(7):3983–8. doi: 10.1073/pnas.0530291100
95. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and Expansion of Human Colon-Cancer-Initiating Cells. *Nature* (2007) 445(7123):111–5. doi: 10.1038/nature05384
96. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vronionis FD, Steindler DA. Human Cortical Glial Tumors Contain Neural Stem-Like Cells Expressing Astroglial and Neuronal Markers *In Vitro*. *Glia* (2002) 39(3):193–206. doi: 10.1002/glia.10094
97. Bapat SA, Mali AM, Koppikar CB, Kurrey NK. Stem and Progenitor-Like Cells Contribute to the Aggressive Behavior of Human Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Res* (2005) 65(8):3025–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3931
98. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of Human Brain Tumour Initiating Cells. *Nature* (2004) 432(7015):396–401. doi: 10.1038/nature03128
99. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al. Cancerous Stem Cells can Arise From Pediatric Brain Tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100(25):15178–83. doi: 10.1073/pnas.2036535100
100. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. Cancer Stem Cells in Nervous System Tumors. *Oncogene* (2004) 23(43):7267–73. doi: 10.1038/sj.onc.1207946
101. Zhang L, He X, Liu X, Zhang F, Huang LF, Potter AS, et al. Single-Cell Transcriptomics in Medulloblastoma Reveals Tumor-Initiating Progenitors and Oncogenic Cascades During Tumorigenesis and Relapse. *Cancer Cell* (2019) 36(3):302–18.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2019.07.009
102. Read T-A, Fogarty MP, Markant SL, McLendon RE, Wei Z, Ellison DW, et al. Identification of CD15 as a Marker for Tumor-Propagating Cells in a Mouse Model of Medulloblastoma. *Cancer Cell* (2009) 15(2):135–47. doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.016
103. Hambarzumyan D, Becher OJ, Rosenblum MK, Pandolfi PP, Manova-Todorova K, Holland EC. PI3K Pathway Regulates Survival of Cancer Stem Cells Residing in the Perivascular Niche Following Radiation in Medulloblastoma *In Vivo*. *Genes Dev* (2008) 22(4):436–48. doi: 10.1101/gad.1627008
104. Vanner RJ, Remke M, Gallo M, Selvadurai HJ, Coutinho F, Lee L, et al. Quiescent sox2(+) Cells Drive Hierarchical Growth and Relapse in Sonic Hedgehog Subgroup Medulloblastoma. *Cancer Cell* (2014) 26(1):33–47. doi: 10.1016/j.ccr.2014.05.005
105. Friedman GK, Raborn J, Kelly VM, Cassady KA, Markert JM, Gillespie GY. Pediatric Glioma Stem Cells: Biologic Strategies for Oncolytic HSV Virotherapy. *Front Oncol* (2013) 3:28. doi: 10.3389/fonc.2013.00028
106. Manoranjan B, Venugopal C, McFarlane N, Doble BW, Dunn SE, Scheinmann K, et al. Medulloblastoma Stem Cells: Modeling Tumor Heterogeneity. *Cancer Lett* (2013) 338(1):23–31. doi: 10.1016/j.canlet.2012.07.010
107. Liu W, Wu T, Dong X, Zeng YA. Neuropilin-1 Is Upregulated by Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Is Important for Mammary Stem Cells. *Sci Rep* (2017) 7(1):10941. doi: 10.1038/s41598-017-11287-w
108. Zhang L, Wang H, Li C, Zhao Y, Wu L, Du X, et al. Vegf-A/Neuropilin 1 Pathway Confers Cancer Stemness Via Activating Wnt/ $\beta$ -Catenin Axis in Breast Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* (2017) 44(3):1251–62. doi: 10.1159/000485455
109. Grun D, Adhikary G, Eckert RL. NRP-1 Interacts With GIPC1 and  $\alpha$ 6/ $\beta$ 4-Integrins to Increase YAP1/ $\Delta$ np63 $\alpha$ -Dependent Epidermal Cancer Stem Cell Survival. *Oncogene* (2018) 37(34):4711–22. doi: 10.1038/s41388-018-0290-4
110. Elaimy AL, Guru S, Chang C, Ou J, Amante JJ, Zhu LJ, et al. VEGF-Neuropilin-2 Signaling Promotes Stem-Like Traits in Breast Cancer Cells by TAZ-mediated Repression of the Rac Gap  $\beta$ 2-Chimaerin. *Sci Signal* (2018) 11(528):ea06897. doi: 10.1126/scisignal.a06897
111. Goel HL, Pursell B, Chang C, Shaw LM, Mao J, Simin K, et al. GLI1 Regulates a Novel Neuropilin-2/ $\alpha$ 6 $\beta$ 1 Integrin Based Autocrine Pathway That Contributes to Breast Cancer Initiation. *EMBO Mol Med* (2013) 5(4):488–508. doi: 10.1002/emmm.201202078
112. Thirant C, Bessette B, Varlet P, Puget S, Cadusseau J, Tavares SDR, et al. Clinical Relevance of Tumor Cells With Stem-Like Properties in Pediatric Brain Tumors. *PLoS One* (2011) 6(1):e16375. doi: 10.1371/journal.pone.0016375
113. Man J, Shoemaker J, Zhou W, Fang X, Wu Q, Rizzo A, et al. Sema3c Promotes the Survival and Tumorigenicity of Glioma Stem Cells Through Rac1 Activation. *Cell Rep* (2014) 9(5):1812–26. doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.055

114. Mitra A, Mishra L, Li S. Emt, CTCs and CSCs in Tumor Relapse and Drug-Resistance. *Oncotarget* (2015) 6(13):10697–711. doi: 10.18632/oncotarget.4037
115. Garg N, Bakhshinyan D, Venugopal C, Mahendram S, Rosa DA, Vijayakumar T, et al. CD133+ Brain Tumor-Initiating Cells Are Dependent on STAT3 Signaling to Drive Medulloblastoma Recurrence. *Oncogene* (2017) 36(5):606–17. doi: 10.1038/ncr.2016.235
116. Bruder D, Probst-Kepfer M, Westendorf AM, Geffers R, Beisert S, Loser K, et al. Frontline: Neuropilin-1: A Surface Marker of Regulatory T Cells. *Eur J Immunol* (2004) 34(3):623–30. doi: 10.1002/eji.200324799
117. Catalano A. The Neuroimmune Semaphorin-3a Reduces Inflammation and Progression of Experimental Autoimmune Arthritis. *J Immunol* (2010) 185(10):6373–83. doi: 10.4049/jimmunol.0903527
118. Curreli S, Wong BS, Latinovic O, Konstantopoulos K, Stamatou NM. Class 3 Semaphorins Induce F-Actin Reorganization in Human Dendritic Cells: Role in Cell Migration. *J Leukoc Biol* (2016) 100(6):1323–34. doi: 10.1189/jlb.2A1114-534R
119. Ji J-D, Park-Min K-H, Ivashkiv LB. Expression and Function of Semaphorin 3A and Its Receptors in Human Monocyte-Derived Macrophages. *Hum Immunol* (2009) 70(4):211–7. doi: 10.1016/j.humimm.2009.01.026
120. Nakayama H, Bruneau S, Kochupurakkal N, Coma S, Briscoe DM, Klagsbrun M. Regulation of Mtor Signaling by Semaphorin 3f-Neuropilin 2 Interactions *In Vitro* and *In Vivo*. *Sci Rep* (2015) 5:11789. doi: 10.1038/srep11789
121. Stepanova OI, Krylov AV, Lioudyno VI, Kisseleva EP. Gene Expression for VEGF-A, Vegf-C, and Their Receptors in Murine Lymphocytes and Macrophages. *Biochem Biokhimiia* (2007) 72(11):1194–8. doi: 10.1134/s0006297907110041
122. Takamatsu H, Takegahara N, Nakagawa Y, Tomura M, Taniguchi M, Friedel RH, et al. Semaphorins Guide the Entry of Dendritic Cells Into the Lymphatics by Activating Myosin II. *Nat Immunol* (2010) 11(7):594–600. doi: 10.1038/ni.1885
123. Tordjman R, Lepelletier Y, Lemarchandel V, Cambot M, Gaulard P, Hermine O, et al. A Neuronal Receptor, Neuropilin-1, Is Essential for the Initiation of the Primary Immune Response. *Nat Immunol* (2002) 3(5):477–82. doi: 10.1038/ni789
124. Sarris M, Andersen KG, Randow F, Mayr L, Betz AG. Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions With Dendritic Cells During Antigen Recognition. *Immunity* (2008) 28(3):402–13. doi: 10.1016/j.immuni.2008.01.012
125. Bourbié-Vaudaine S, Blanchard N, Hivroz C, Roméo P-H. Dendritic Cells Can Turn Cd4+ T Lymphocytes Into Vascular Endothelial Growth Factor-Carrying Cells by Intercellular Neuropilin-1 Transfer. *J Immunol* (2006) 177(3):1460–9. doi: 10.4049/jimmunol.177.3.1460
126. Aung NY, Ohe R, Meng H, Kabasawa T, Yang S, Kato T, et al. Specific Neuropilins Expression in Alveolar Macrophages Among Tissue-Specific Macrophages. *PLoS One* (2016) 11(2):e0147358. doi: 10.1371/journal.pone.0147358
127. Casazza A, Laoui D, Wenes M, Rizzolio S, Bassani N, Mambretti M, et al. Impeding Macrophage Entry Into Hypoxic Tumor Areas by Sema3A/Nrp1 Signaling Blockade Inhibits Angiogenesis and Restores Antitumor Immunity. *Cancer Cell* (2013) 24(6):695–709. doi: 10.1016/j.ccr.2013.11.007
128. Roy S, Bag AK, Dutta S, Polavaram NS, Islam R, Schellenburg S, et al. Macrophage-Derived Neuropilin-2 Exhibits Novel Tumor-Promoting Functions. *Cancer Res* (2018) 78(19):5600–17. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0562
129. Miyauchi JT, Chen D, Choi M, Nissen JC, Shroyer KR, Djordjevic S, et al. Ablation of Neuropilin 1 From Glioma-Associated Microglia and Macrophages Slows Tumor Progression. *Oncotarget* (2016) 7(9):9801–14. doi: 10.18632/oncotarget.6877
130. Miyauchi JT, Caponegro MD, Chen D, Choi MK, Li M, Tzirka SE. Deletion of Neuropilin 1 From Microglia or Bone Marrow-Derived Macrophages Slows Glioma Progression. *Cancer Res* (2018) 78(3):685–94. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1435
131. Lepelletier Y, Smaniotto S, Hadj-Slimane R, Villa-Verde DMS, Nogueira AC, Dardenne M, et al. Control of Human Thymocyte Migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-Mediated Interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* (2007) 104(13):5545–50. doi: 10.1073/pnas.0700705104
132. Mendes-da-Cruz DA, Brignier AC, Asnafi V, Baleyrier F, Messias CV, Lepelletier Y, et al. Semaphorin 3F and Neuropilin-2 Control the Migration of Human T-Cell Precursors. *PLoS One* (2014) 9(7):e103405. doi: 10.1371/journal.pone.0103405
133. Solomon BD, Mueller C, Chae W-J, Alabanza LM, Bynoe MS. Neuropilin-1 Attenuates Autoreactivity in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2011) 108(5):2040–5. doi: 10.1073/pnas.1008721108
134. Kerros C, Tripathi SC, Zha D, Mehrens JM, Sergeeva A, Philips AV, et al. Neuropilin-1 Mediates Neutrophil Elastase Uptake and Cross-Presentation in Breast Cancer Cells. *J Biol Chem* (2017) 292(24):10295–305. doi: 10.1074/jbc.M116.773051
135. Leclerc M, Voilin E, Gros G, Cognac S, de Montpréville V, Validire P, et al. Regulation of Antitumor CD8 T-Cell Immunity and Checkpoint Blockade Immunotherapy by Neuropilin-1. *Nat Commun* (2019) 10(1):3345. doi: 10.1038/s41467-019-11280-z
136. Delgoffe GM, Woo S-R, Turnis ME, Gravano DM, Guy C, Overacre AE, et al. Regulatory T Cell Stability Is Maintained by a Neuropilin-1:semaphorin-4a Axis. *Nature* (2013) 501(7466):252–6. doi: 10.1038/nature12428
137. Podojil JR, Chiang M-Y, Ifergan I, Copeland R, Liu LN, Maloveste S, et al. B7-H4 Modulates Regulatory Cd4+ T Cell Induction and Function Via Ligation of a Semaphorin 3a/Plexin A4/Neuropilin-1 Complex. *J Immunol Baltim Md 1950* (2018) 201(3):897–907. doi: 10.4049/jimmunol.1700811
138. Hansen W, Hutzler M, Abel S, Alter C, Stockmann C, Kliche S, et al. Neuropilin 1 Deficiency on CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells Impairs Mouse Melanoma Growth. *J Exp Med* (2012) 209(11):2001–16. doi: 10.1084/jem.20111497
139. Overacre-Delgoffe AE, Chikina M, Dadey RE, Yano H, Brunazzi EA, Shayan G, et al. Interferon- $\gamma$  Drives Treg Fragility to Promote Anti-Tumor Immunity. *Cell* (2017) 169(6):1130–41.e11. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.005
140. Powell J, Mota F, Steadman D, Soudy C, Miyauchi JT, Crosby S, et al. Small Molecule Neuropilin-1 Antagonists Combine Antiangiogenic and Antitumor Activity With Immune Modulation Through Reduction of Transforming Growth Factor Beta (Tgfb) Production in Regulatory T-Cells. *J Med Chem* (2018) 61(9):4135–54. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00210
141. Chaudhary B, Elkord E. Novel Expression of Neuropilin 1 on Human Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer Liver Metastases. *Expert Opin Ther Targets* (2015) 19(2):147–61. doi: 10.1517/14728222.2014.977784
142. Candeias SM, Gaipal US. The Immune System in Cancer Prevention, Development and Therapy. *Anticancer Agents Med Chem* (2016) 16(1):101–7. doi: 10.2174/1871520615666150824153523
143. Muenst S, Läubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The Immune System and Cancer Evasion Strategies: Therapeutic Concepts. *J Intern Med* (2016) 279(6):541–62. doi: 10.1111/joim.12470
144. Bockmayr M, Mohme M, Klauschen F, Winkler B, Budczies J, Rutkowski S, et al. Subgroup-Specific Immune and Stromal Microenvironment in Medulloblastoma. *Oncimmunology* (2018) 7(9):e1462430. doi: 10.1080/2162402X.2018.1462430
145. Weekes CD, Beeram M, Tolcher AW, Papadopoulos KP, Gore L, Hegde P, et al. A Phase I Study of the Human Monoclonal Anti-NRP1 Antibody MNRP1685A in Patients With Advanced Solid Tumors. *Invest New Drugs* (2014) 32(4):653–60. doi: 10.1007/s10637-014-0071-z
146. Lassen U, Nielsen DL, Sørensen M, Winstedt L, Niskanen T, Stenberg Y, et al. A Phase I, Dose-Escalation Study of TB-403, a Monoclonal Antibody Directed Against PlGF, in Patients With Advanced Solid Tumours. *Br J Cancer* (2012) 106(4):678–84. doi: 10.1038/bjc.2011.609

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

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

RESEARCH

Open Access



# NRP1 inhibition modulates radiosensitivity of medulloblastoma by targeting cancer stem cells

Manon Douyère<sup>1†</sup>, Caifeng Gong<sup>1,2†</sup>, Mylène Richard<sup>3</sup>, Nadia Pellegrini-Moïse<sup>3</sup>, Joël Daouk<sup>1</sup>, Julien Pierson<sup>1</sup>, Pascal Chastagner<sup>1,4</sup> and Cédric Boura<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Medulloblastoma (MB) is the most common pediatric malignant brain tumor. Despite current therapies, the morbidity and recurrent risk remains significant. Neuropilin-1 receptor (NRP1) has been implicated in the tumor progression of MB. Our recent study showed that NRP1 inhibition stimulated MB stem cells differentiation. Consequently, we hypothesized that targeting NRP1 in medulloblastoma could improve current treatments.

**Methods:** NRP1 inhibition with a novel peptidomimetic agent, MR438, was evaluated with radiotherapy (RT) in MB models (DAOY, D283-Med and D341-Med) in vitro on cancer stem-like cells as well as in vivo on heterotopic and orthotopic xenografts.

**Results:** We show that NRP1 inhibition by MR438 radiosensitizes MB stem-like cells in vitro. In heterotopic DAOY models, MR438 improves RT efficacy as measured by tumor growth and mouse survival. In addition, clonogenic assays after tumor dissociation showed a significant reduction in cancer stem cells with the combination treatment. In the same way, a benefit of the combined therapy was observed in the orthotopic model only for a low cumulative irradiation dose of 10 Gy but not for 20 Gy.

**Conclusions:** Finally, our results demonstrated that targeting NRP1 with MR438 could be a potential new strategy and could limit MB progression by decreasing the stem cell number while reducing the radiation dose.

**Keywords:** Medulloblastoma, Neuropilin-1, Cancer stem cells, Radiotherapy

## Background

Medulloblastoma (MB) is a serious childhood malignant brain tumor, accounting for approximately 20% of all pediatric central nervous system tumors. Cranio-spinal irradiation is usually one of the most important effective therapies combined with surgical excision and chemotherapy [1]. However, these combined therapeutic approaches are mainly non-specific and aggressive,

inducing severe damage to the developing brain, especially for young patients [2]. Moreover, approximately one-third of the patients still die due to tumor recurrence [3]. It is urgent to find new therapies, especially for patients with high risk of recurrence.

The identification of four MB subgroups (WNT, SHH, Group 3, and Group 4) based on their respective molecular characteristics has provided a better understanding of tumor development and progression [4–6]. Recently, features of the subgroups revealed that each contains variant subtypes that helped risk stratification of MB patients [7, 8]. TP53 mutated SHH subgroup as well as subgroup 3 with MYC amplification have the worst prognosis with

<sup>†</sup>Manon Douyère and Caifeng Gong have contributed equally to this work

\*Correspondence: cedric.boura@univ-lorraine.fr

<sup>1</sup> Université de Lorraine, CNRS, CRAN, UMR 7039, 54000 Nancy, France  
Full list of author information is available at the end of the article



a 5-year survival rate <50% [9]. Tumor heterogeneity is also considered an important prognostic factor, which indicates that a small special cell population could survive after chemoradiotherapy and induce recurrences. It has been suggested that cancer stem cells (CSCs) are probably at the origin of the tumorigenesis as previously shown in medulloblastoma patients [10–12], and may be involved in resistance to therapy and recurrence [13–16]. Indeed, Blazek et al. found that CD133+MB cells were more radioresistant than CD133- MB cells [17]. The identification of new molecular targets specific for MB stem cells is a major challenge to improve the management of this pathology. Human MBs are propagated by cells expressing the progenitor marker CD15/SSEA [18]. CD15 is a carbohydrate antigen that is expressed on both progenitors and stem cells in the embryonic and adult central nervous systems [19, 20]. CD15 is considered an important marker for medulloblastoma propagating cells, also named medulloblastoma stem-like cells [18, 21].

Neuropilin-1 (NRP1) has the functions of development of neuronal and vascular systems [22, 23], which is known as a co-receptor by complexation with other transmembrane receptors such as VEGFR [24, 25]. The overexpressed of NRP1 in various cancers, including MB, has been reported to have been correlated with poor prognosis with upregulation of cell proliferation or migration [26–28]. Indeed, our previous work showed that NRP1 was overexpressed in MB and related to the undifferentiated status of MB and that a novel NRP1 inhibitor (MR438) can stimulate the differentiation of MB stem-like cells [29]. As CSCs are related to radioresistance, the differentiation induced effect might enhance the efficiency of RT with MR438 as a radiosensitizer, to decrease tumor growth, control recurrence, and limit brain damage due to a lower dose of RT. Tuftsin (TKPR: Thr-Lys-Pro-Arg) is a natural peptide antagonist of NRP-1 was used in our work to compare the effect of MR438 [29, 30]. In our work, we hypothesize that NRP1 inhibition with this new peptidomimetic compound could improve radiotherapy treatment by targeting medulloblastoma stem-like cells, and we evaluated the effect of NRP1 inhibition with MR438 concomitant with RT in 3 subgroup MB models (DAOY, D283-Med and D341-Med) by in vitro experiments on stem-like cells, as well as on in vivo heterotopic and orthotopic xenografts.

## Materials and methods

### Cell culture and drug solutions

The MB cell lines of DAOY, D283-Med and D341-Med were purchased from ATCC cell biology collection (Manassas VA, USA). MB stem-like cells cultures were grown in DMEM/F12 medium (Gibco, Life Technologies Corporation, UK) containing B27 and N2 supplement

(Gibco, LifeTechnologies Corporation, USA), 40 µg/ml heparin, 1% insulin, 20 ng/mL human recombinant epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) (EGF and FGF from Miltenyi Biotec, Germany). After a 3-day culture in hydrophobic flasks at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> in a humidifier atmosphere, spheres were obtained. MB stem-like cells were dissociated from spheres using Accumax (Gibco, Life Technologies Corporation, UK) and seeded in 25 cm<sup>2</sup> flasks depending on the experiment.

For in vitro experiments, the stem like cells were exposed to MR438 [31] (molecular weight: 527.20 g/mol, supplied by L2CM-UMR 7053 in powder form) and the natural ligand (tetrapeptide: TKPR) known to target NRP1 named tuftsin [30, 32] (molecular weight: 500.60 g/mol, BACHEM, Switzerland) at 25 µmol/L for 72 h. MR438 and tuftsin were each dissolved in PBS and stored in aliquots at –20 °C.

### Radiosensitivity of medulloblastoma stem like cells exposed to MR438

RT was performed using a X-RAD 320 Irradiator (Precision X Ray, USA). For in vitro radiosensitivity, MB stem cells were obtained as previously described. MB cells were seeded onto 6 well plates (20 000 cells/well for DAOY-MS and 50 000 cells/well for D283-MS and D341-MS) were suspended in 2 ml of DMEM/F12 containing 1% methylcellulose (SIGMA, USA). Cells were pretreated with MR438 and tuftsin (25 µM) for 72 h before RT. Cells were then exposed to a 15 × 15 cm<sup>2</sup> radiation field with doses of 0, 2, 4, 6, and 10 Gy at room temperature. Following irradiation, all cell samples were returned to a 5% CO<sub>2</sub> incubator for 2 weeks. Then, cell colonies were incubated with 0.5% MTT solution (thiazolblue tetrazolium bromide, 98%, Acros Organics™), and colonies larger than 30 µm in diameter were quantified using GelCount™ (Oxford Optronix, UK). Each experiment was repeated 6 times with 3 independent wells. From data, different radiosensitivity parameters were calculated such as SF2 (survival fraction at 2 Gy) and DMF2 (dose modified factor at 2 Gy) and alpha value. SF2 is calculated by using 0 Gy as reference, DMF2 is the ratio of the dose required to obtain SF2 in the presence of MR438 at 2 Gy. The alpha values were obtained by fitting a linear quadratic model to the clonogenic assay curves with the different irradiation doses. Alpha value represents the intrinsic radiosensitivity of the irradiated cells: cells with a higher alpha are more sensitive to radiation.

### Animal models

Immunodeficient mice (NMRI-nu, Janvier Labs, France) xenografted heterotopically with MB cells were used within the agreement of the French Minister of

Research (agreement n°APAFiS #8731). DAOY, D283-Med and D341-Med cells were re-suspended in PBS, and mixed 1:1 with Matrigel (BD Biosciences). The cells ( $2 \times 10^6$  cells/200  $\mu$ L) were injected subcutaneously into the right and left flanks of 6-week-old nude mice. When tumors reached a volume of 1000 mm<sup>3</sup>, the tumors were divided into small pieces of 2–3 mm<sup>3</sup> and re-planted subcutaneously in the inguinal region near the femoral vessel of mice. When palpable tumors reached a volume of 250 mm<sup>3</sup>, the mice were subjected to radiation as described below. Tumor size was monitored every 2 days by measuring two dimensions and the volume was calculated by calculating  $(\text{length} \times \text{width}^2)/2$ . Tumor growth was normalized by taking tumor volume at the start of treatment as a reference. The mice were followed for at least 60 days or until the tumor size reached approximately 1000 mm<sup>3</sup> (end point). Mice were then euthanized, and the tumors were harvested for the other experiments.

Orthotopic xenograft models in nude mice (NMRI-nu, Janvier Labs, France) were used within the agreement of the French Minister of Research (agreement n°APAFiS #20085). Mice were anesthetized by intraperitoneal injection (4  $\mu$ L/g of weight) of solution mixture of xylazine/ketamine (90 and 8 mg/kg, respectively). The heads of the mice were fixed in a stereotaxic instrument (KOPF®). DAOY-luc cells (Lentivirus-LV-CMV-Firefly luciferase (CMV, puromycin)) were prepared from fresh culture to ensure optimal viability. MB cells (cell suspension:  $1.10^5$  cells/ $\mu$ L) were stereotaxically implanted into the cerebellum by using the following coordinates: 2 mm right and bottom to the lambda suture and 2 mm ventral from the surface of the skull. Cell suspensions were injected by HAMILTON syringe with an infusion rate of 0.5  $\mu$ L/min for 5  $\mu$ L total. Twenty-one days following tumor transplantation, the animals were randomly divided into four groups: control (CTL), MR438, radiotherapy (RT) and RT + MR438.

Tumor growth was followed by bioluminescence imaging using OptiMAX (Precision X-Ray Inc, North Branford, CT) once a week. An intraperitoneal injection was carried out to administer a solution of D-Luciferin (D-Luciferin Firefly, PerkinElmer® #122799) diluted in a sterile PBS solution (at 15 mg/ml and 10  $\mu$ L/g body weight). Then, the animals were anesthetized with an intraperitoneal injection a xylazine/ketamine mixture (90 and 8 mg/kg, respectively). Mice are imaged, positioned on their backs, 15–20 min after the luciferin injection. The intensity of bioluminescence was determined with Image J® software by drawing a constant region of interest over the tumor regions and measuring the intensity of the signal in number of total photons/areas.

### **In vivo combined therapy using radiotherapy and NRP1 inhibition**

For tumor RT in vivo, animals were anesthetized with a mix of xylazine/ketamine (90 and 8 mg/kg, respectively) and positioned such that the apex of each flank tumor was at the center of a  $3 \times 3$  cm<sup>2</sup> or  $1 \times 1$  cm<sup>2</sup> radiation field for heterotopic or orthotopic xenograft treatment, respectively, with the rest of the mice shielded from radiation by using the protective baffle. Tumors were exposed to RT at a dose of 2 Gy per fraction for 5 days (D1–D5) with/without MR438 or tuftsin administration. Molecular treatments were carried out 2 h before RT with 2 I.V. administrations at D1 and D3 at a dose of 10 mg/kg (4  $\mu$ L/g body weight) for the heterotopic model, and with 3 I.V. administrations at D1, D3 and D5 at a dose of 10 mg/kg (4  $\mu$ L/g body weight) for the orthotopic model, for 1 or 2 weeks.

### **Medulloblastoma stem like cells harvested from tumors**

When the heterotopic tumor volume reached 1000 mm<sup>3</sup>, the mice were sacrificed, and the tumors were harvested for dissociation. A part of the tumor was separated into 1–2 mm<sup>3</sup> small pieces, and digested for 75 min in 7.65 ml dissociation buffer including HBSS (6 mL, Hank's Balanced Salt Solution, Sigma, USA), collagenase type IV (0.6 WU/mL, Gibco, USA), Dispase II (1 mg/mL, Sigma, USA), DNase I (200 U/mL, Roche, Germany), CaCl<sub>2</sub> (75  $\mu$ M) and MgCl<sub>2</sub> (125  $\mu$ M). Buffer DNase I (200 U/mL) was then used to remove DNA interference with other living cells so that the cells do not aggregate easily. Cells were re-suspended in HBSS after eliminating the red blood cells by lysis buffer of NH<sub>4</sub>Cl (0.15 M), KHCO<sub>3</sub> (10 mM), and EDTA (100  $\mu$ M). Cell suspensions were then rapidly stained with the same volume of 0.4% trypan-blue solution and deposited in counting chamber slides (TC20, Biorad). The number of surviving cells was counted twice before the cells were seeded for clonogenic assays. Cells were seeded into 6 well plates at a density of 100 000 cells/well for DAOY tumors and 200 000 cells/well for D283-Med tumors and D341-Med tumors and cultivated for 2 weeks in serum free condition. Viable medulloblastoma stem cells were evaluated by metabolic activity (MTT assay). For each tumor, the experiments were performed in 3 independent wells considered as a single statistical value.

### **Histological analysis**

All tumors were collected and kept within a 4% formaldehyde solution for 48 h (1 week for brain tumors). Then, the samples were transferred into an inclusion cassette within a 70% alcohol solution. The cassettes were transferred to an automated dehydration machine

(HISTO-PRO 300) overnight for paraffin inclusion. A microtome (LEICA RM 2135) was used to cut the paraffin blocks into 5  $\mu\text{m}$  thick slices. Then, the sections were fixed over the slides for staining. The staining step was achieved either by a manual procedure or an automated machine with a fixed protocol. H&E staining was used for microscopic observations.

Samples were incubated with primary antibodies against Ki67 (Abcam, ab16667, dilution of 1/1500), NRP1 (Abcam, ab81321, dilution of 1/1500), CD15 (Sigma-Aldrich, SAB5500041, dilution of 1/500) and ColIV (Novotec, dilution 1/3200). A Nikon Eclipse E600 equipped with a camera microscope (Nikon-DS Fi1) was used to take pictures. The histological sample slides were analyzed with the free QuPath software by using the vector staining tool to count the total number of cells by staining cell nuclei with hematoxylin and the positive cells expressing the interest proteins by staining with the brown chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidine).

#### Gene expression of stem cell markers by qRT-PCR

The gene expression of stem cell markers (Table 1) was analyzed by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). After extraction with an All Prep-DNA RNA-Mini Kit (Omega), Total RNA was reverse-transcribed with the iScript™ cDNA synthesis Kit (BioRad) following the manufacturer's protocol. Real-time PCR was performed with SyberGreen PCR Supermix (BioRad) using the CFX96 Real-Time System (BioRad). The qPCR conditions were 95 °C for 2 min and 39 cycles of 95 °C for 5 s and 63 ~ 68 °C for 30 s, and the hybridization temperature was dependent on the primers (Table 1). All values were normalized to RPL13A and TBP, and the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method was used to estimate the fold change expression over control samples.

**Table 1** Sequences and annealing temperatures of primers used in qRT-PCR

| Gene   | Primer sequence (5'-3')     | Tm (°C) |
|--------|-----------------------------|---------|
| CD133  | Fwd: TCCGGGTTTTGGATACACCCTA | 68 °C   |
|        | Rev: CTGCAGGTGAAGAGTGCCGTAA |         |
| Sox 2  | Fwd: TTTTACGTTTGCAACTGTCC   | 63 °C   |
|        | Rev: AGTCTCCAAGCGACGAAAAA   |         |
| RPL13A | Fwd: GTTCTGCTGCCCTCAAG      | 60 °C   |
|        | Rev: GTCACCTGCCTGGTACTTCC   |         |
| TBP    | Fwd: GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC  | 60 °C   |
|        | Rev: TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG |         |

#### Statistical analysis

All results are given as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Nonparametric Mann-Whitney test and Student's T-test for two-by-two comparisons were employed to determine the statistical significance using GraphPad Prism (GraphPad Prism 8.0, USA) with a minimum of 6 repetitions for in vitro and in vivo experiments. For all figures,  $p < 0.05$  was considered significant. For in vivo experiments, the time growth of tumors to reach 1000  $\text{mm}^3$  (set end point) served to build the Kaplan-Meier curves and log-rank test was used to compare survival curves.

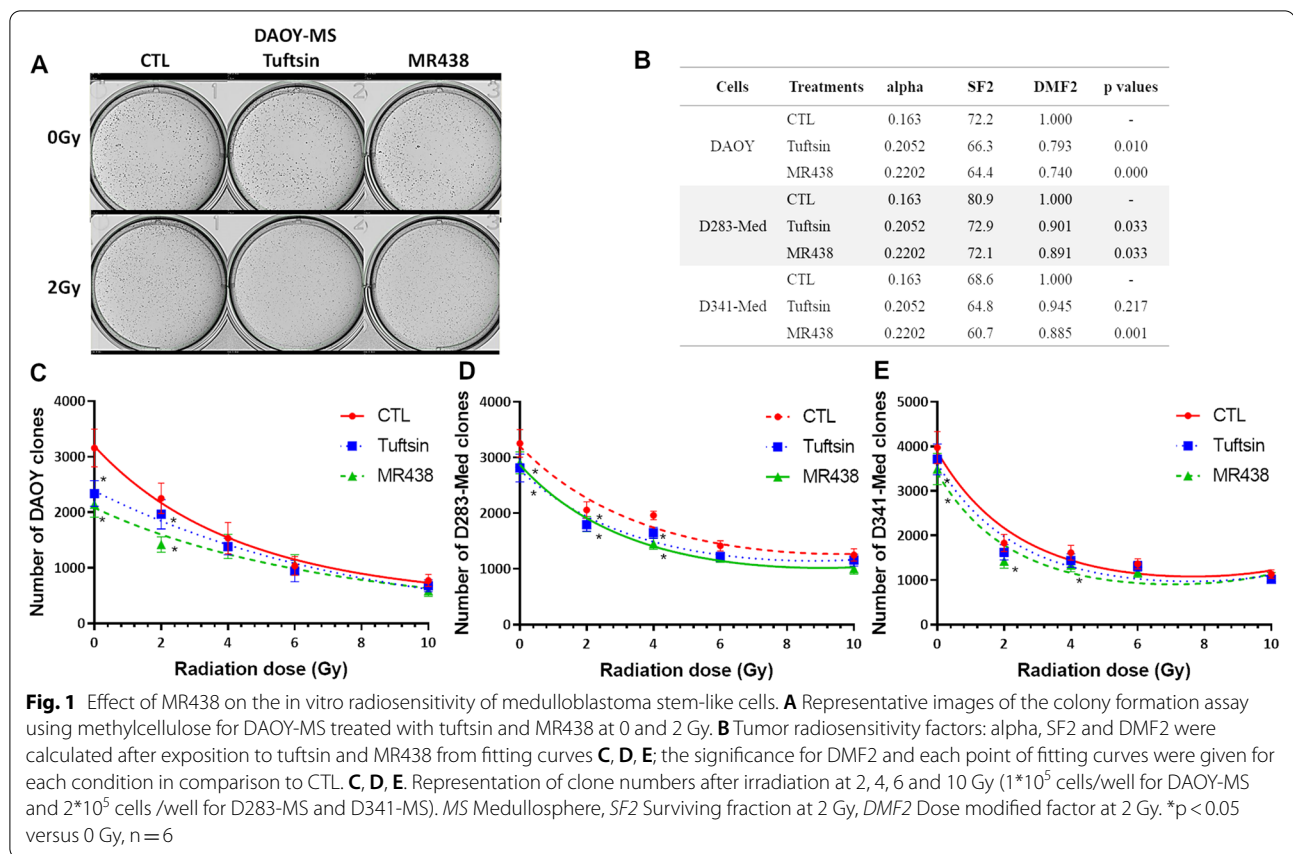
## Results

### Radiosensitivity of medulloblastoma stem like cells to MR438

The effect of MR438 on radiosensitivity of medulloblastoma stem-like cells was assessed by using the colony formation assay (Fig. 1). Cells were pre-treated with 25  $\mu\text{M}$  tuftsin and MR438 for 72 h before RT exposure. After irradiation, the number of clones was evaluated. For DAOY-MS cells, the number of clones was significantly decreased after exposure to NRP1 targeting compounds at 2 Gy, especially after exposure to MR438 (Fig. 1A, B and C). D341-Med cells were the most sensitive to irradiation, but MR438 still had a radiosensitive effect at 2 Gy (Fig. 1E). It is interesting to observe a reduction of approximately 25% of DMF2 (dose modified factor at 2 Gy corresponding to the relative dose of irradiation required for a given effect in the drug-treated group as compared with a radiation-only group) for DAOY and approximately of 10% for D283-Med and D341-Med stem cells (Fig. 1B).

### Radiosensitivity of heterotopic medulloblastoma models with MR438

Based on the results of our previous work [29] and of in vitro radiation assays, heterotopic xenograft models were used to confirm whether MR438 could also improve the radiosensitivity of MB in vivo. MR438 alone (Fig. 2) had no significant effect on tumor growth and mouse survival with DAOY and D341-Med tumors, but it seemed to have a significant effect on the survival of mice bearing D283-Med tumors. When combined with RT, MR438 decreased the tumor growth of DAOY compared to RT alone or compared to RT + Tuftsin (Fig. 2A). Similarly, the survival of mice bearing DAOY tumors treated with RT + MR438 was significantly improved, with a median survival of 65 days compared to that of mice treated with RT alone (53 days). D283-Med and D341-Med tumors are more sensitive to fractionated irradiation at the beginning of the treatment according to our



in vitro results. Despite a median survival improvement of 3 and 1 days respectively, for D283-Med and D341-Med tumors, the combination of RT with MR438 did not significantly improve the radio-sensitivity of these tumors.

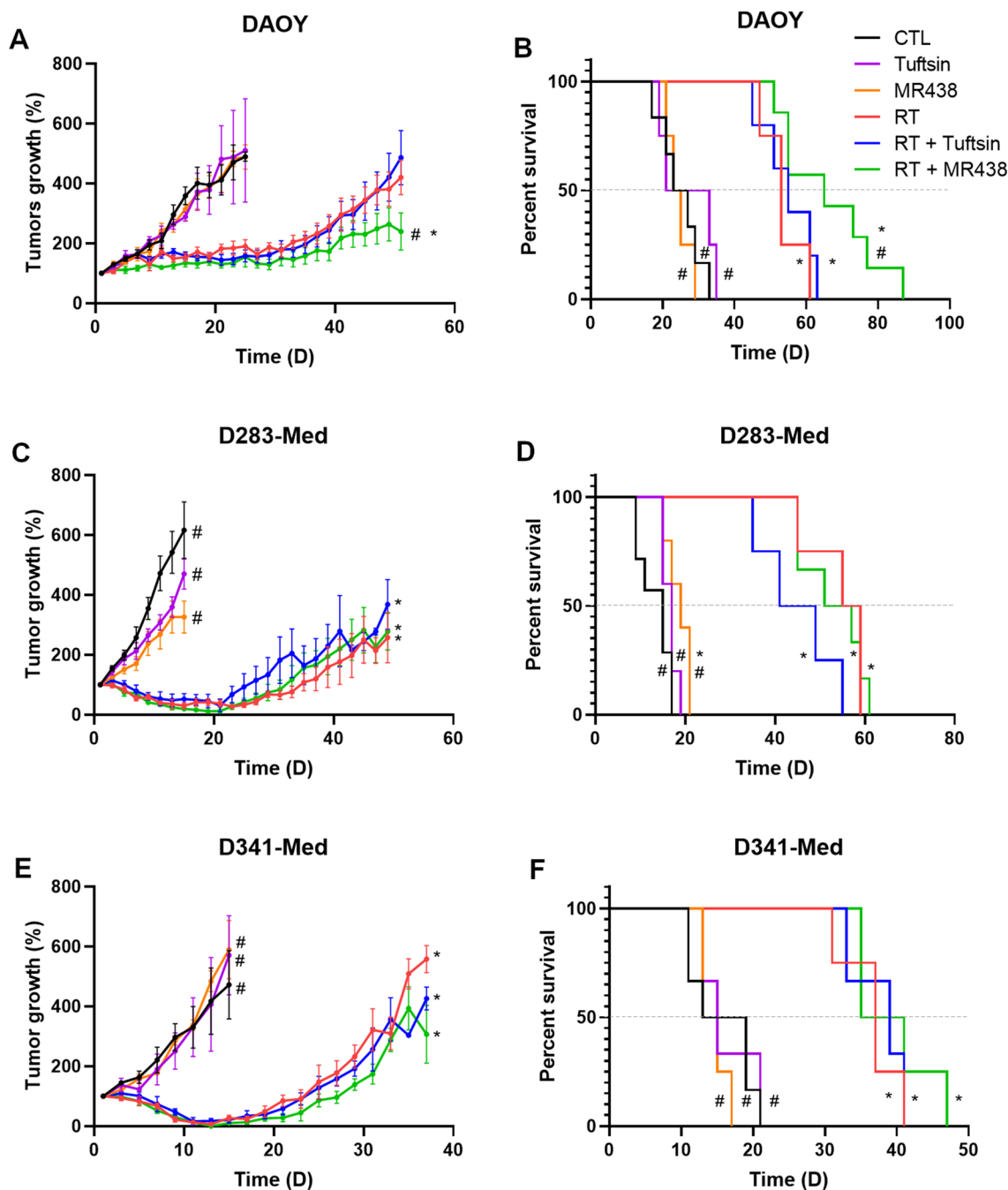
#### Effect of combined RT and MR438 on NRP1 expression in heterotopic medulloblastoma models

To evaluate the effect of MR438 on the expression of NRP1 immunohistochemistry analysis of tumors after treatments was performed. DAOY tumors more strongly expressed NRP1 protein than D283-Med or D341-Med (Fig. 3A and B). For DAOY tumors treated with MR438 combined with RT, NRP1 protein expression decreased significantly compared to RT alone. Strangely, tuftsin or RT alone increased NRP1 protein expression in DAOY tumors. For D283-Med or D341-Med tumors, no effect was observed on NRP1 protein expression. Moreover, the mRNA expression of NRP1 was also evaluated, and no change was noted regardless of the treatment conditions or the tumor model (data not shown). We studied the expression of Ki67, a proliferation marker, by immunohistochemical analysis of tumors to assess the effect of our treatment on cell proliferation within the tumors

(Additional file 1: Figure S1). No effect was observed on Ki67 protein expression for D283-Med and D341-Med in comparison to the CTL group or the RT group (Additional file 1: Figure S1B). Interestingly, the Ki67 protein expression was significantly decreased in the RT + MR438 group compared to the RT group for DAOY tumors (Additional file 1: Figure S1B).

#### Effects of combined RT and MR438 on medullosphere formation and the expression of stem cell markers from heterotopic medulloblastoma models

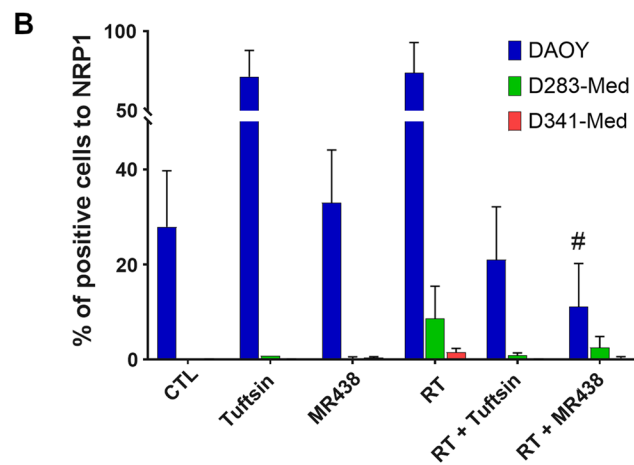
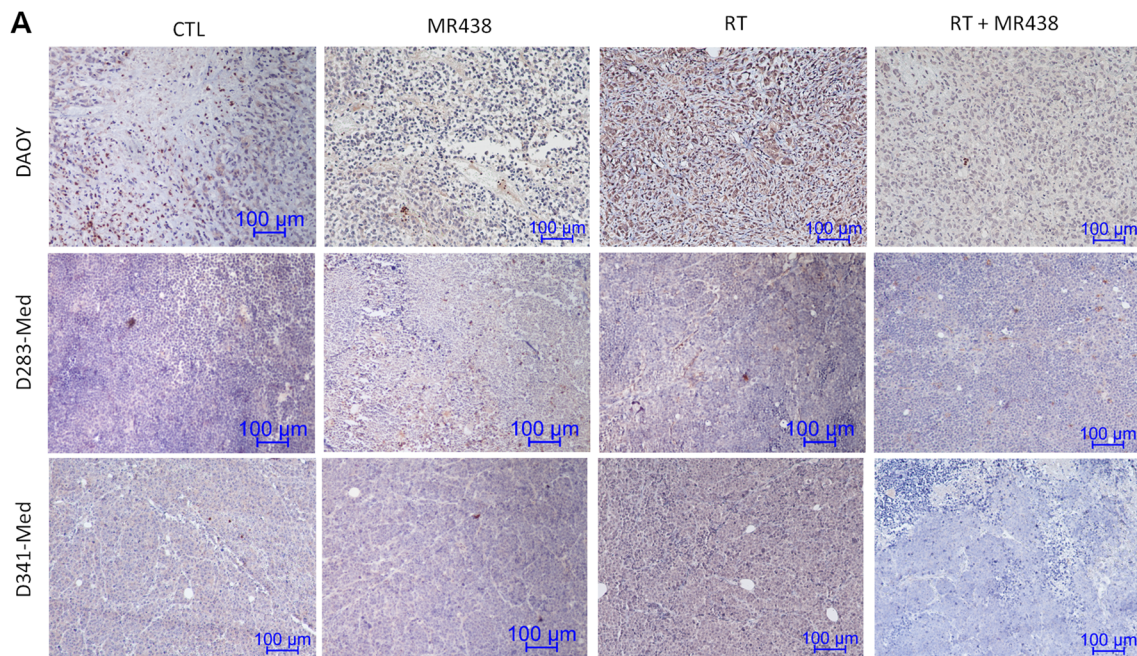
To confirm the effects of NRP1 inhibition with MR438 on medulloblastoma stem cells, we evaluated the expression of stem cell markers (CD15, CD133 and Sox2) as well as the self-renewal ability of medulloblastoma cells to form medullospheres after tumor dissociation (Fig. 4). CD15, as a CSCs marker for MB, was observed in less than 1% of DAOY cells while it was found in 17 and 48% of D283-Med and D341-Med cells, respectively. MR438 significantly decreased the expression of CD15 protein in D341-Med tumors; nevertheless, mRNA expression was not modified by the different treatment conditions (data not shown). mRNA expression of other markers of stem cells, such



**Fig. 2** Effect of MR438 on tumor growth and mouse survival after irradiation with heterotopic xenografts. The percentage of tumor growth of DAOY **A**, D283-Med **C** and D341-Med **E** after radiation ( $5 \times 2$  Gy) and/or administration of MR438 or tuftsin (10 mg/kg) was calculated from tumor size before treatment as a reference. Survival fractions were represented for DAOY **B**, D283-Med **D** and D341-Med **F** using the maximal tumor size of  $1000 \text{ mm}^3$  as endpoint. \* $p < 0.05$  versus CTL and # $p < 0.05$  versus RT,  $n = 6$

as CD133 and Sox2, has been studied. MR438 alone and RT + MR438 significantly decreased Sox2 mRNA expression for D341-Med but not for the other cell lines (Fig. 4D). A decrease in CD133 was shown with treatment association only for D283-Med (Fig. 4C).

Interestingly, RT + MR438 strongly and significantly decreased the clone number of medulloblastoma stem cells from DAOY, and D341-Med tumors (Fig. 4E).

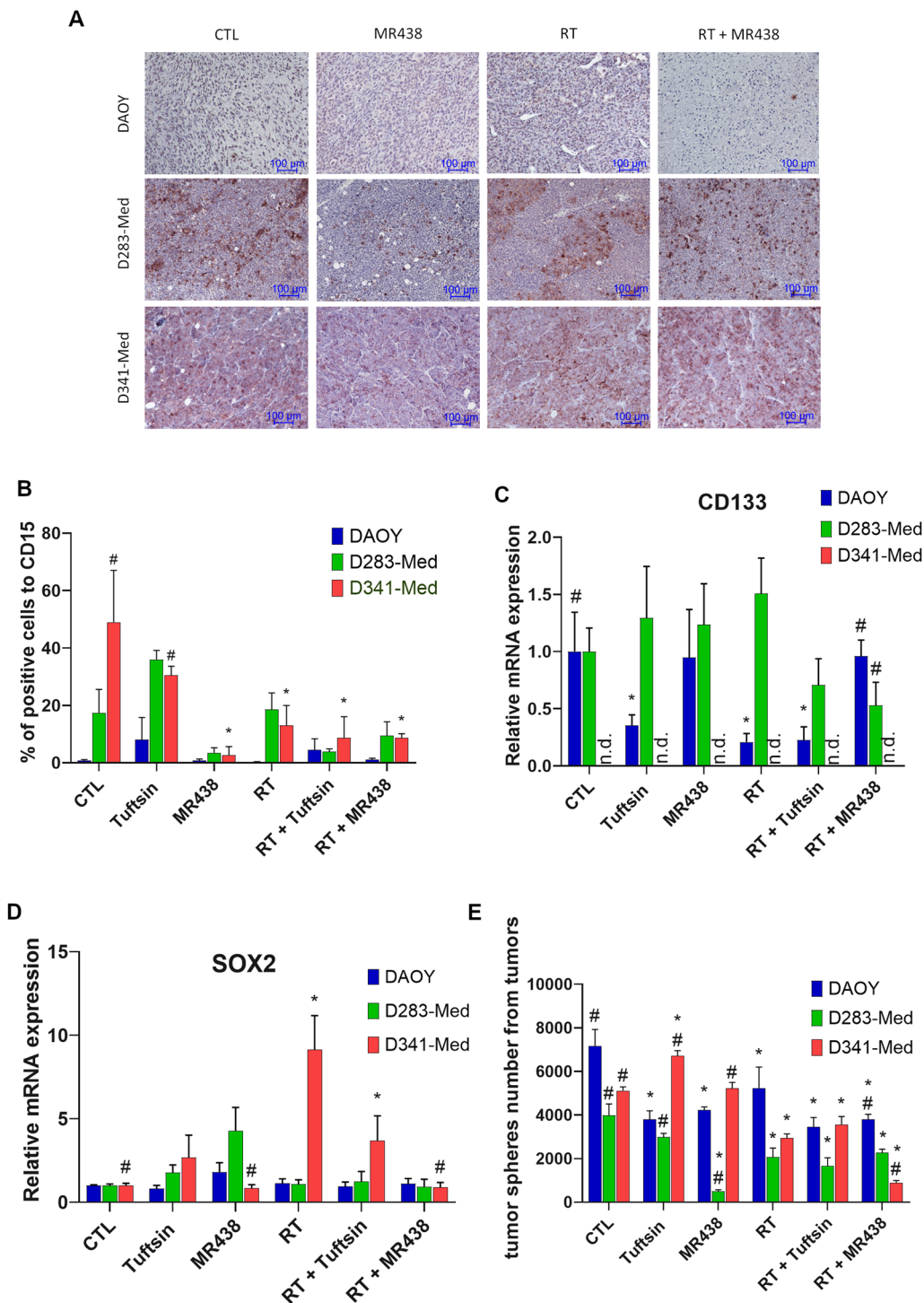


**Fig. 3** Effect of MR438 on NRP1 expression in heterotopic xenografts in nude mice. Representative images of NRP1 expression in tumors after irradiation and/or MR438 treatments **A**; scale bars represent 100 µm. The percentage of cells positive for NRP1 **B** for each condition was calculated with QuPath open software from approximately 5000 cells for 3 different images with wide field of observation from 3 different tumors. The analysis were performed at the experimental endpoint (corresponding to an average of 19 ± 3 days for mice of non-irradiated groups and 51 ± 8 days for mice of irradiated groups). \*p < 0.05 versus CTL and #p < 0.05 versus RT; n = 6

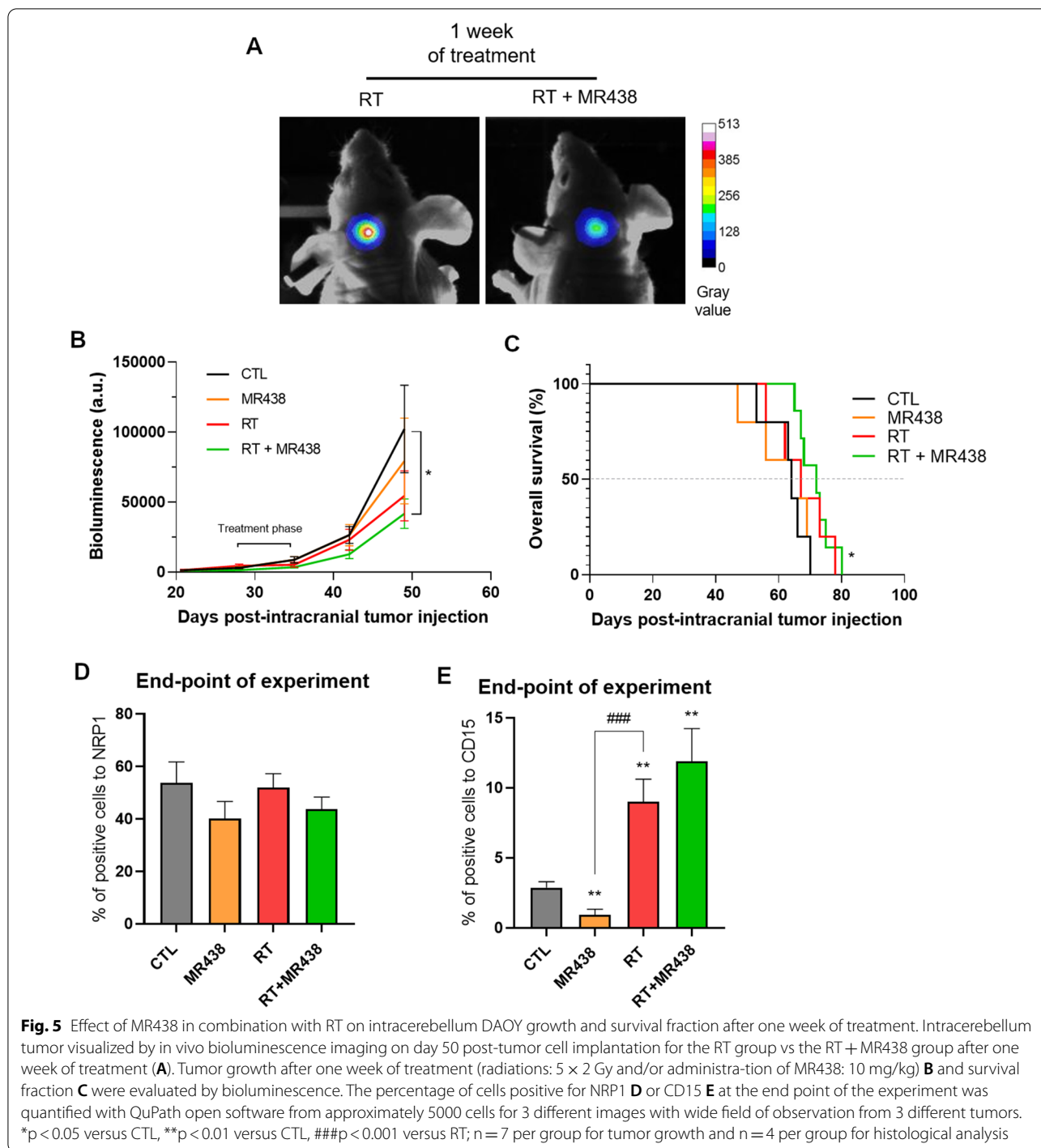
**MR438 is effective at a low cumulative RT dose in orthotopic medulloblastoma models**

The effects of NRP1 inhibition in combination with radiotherapy were studied in an orthotopic medulloblastoma model by using medulloblastoma cells expressing luciferase transplanted into the right cerebellum. Mice were treated for 1 or 2 weeks (5 × 2 Gy per week), observed daily, and sacrificed at the first clinical symptom. In the case of 1 week of treatment (Fig. 5),

a significant slowdown in tumor growth was observed for the RT + MR438 group compared to the nontreated group. The median survival (Fig. 5B) was significantly improved for the RT + MR438 group as compared to the control group, contrary to the RT group (72 days for RT + MR438, 64 days for CT or MR438 and 67 days for RT alone). The effects of the combination of MR438 and RT on the NRP1 and CD15 expression were evaluated by immunohistochemistry analysis. Contrary to

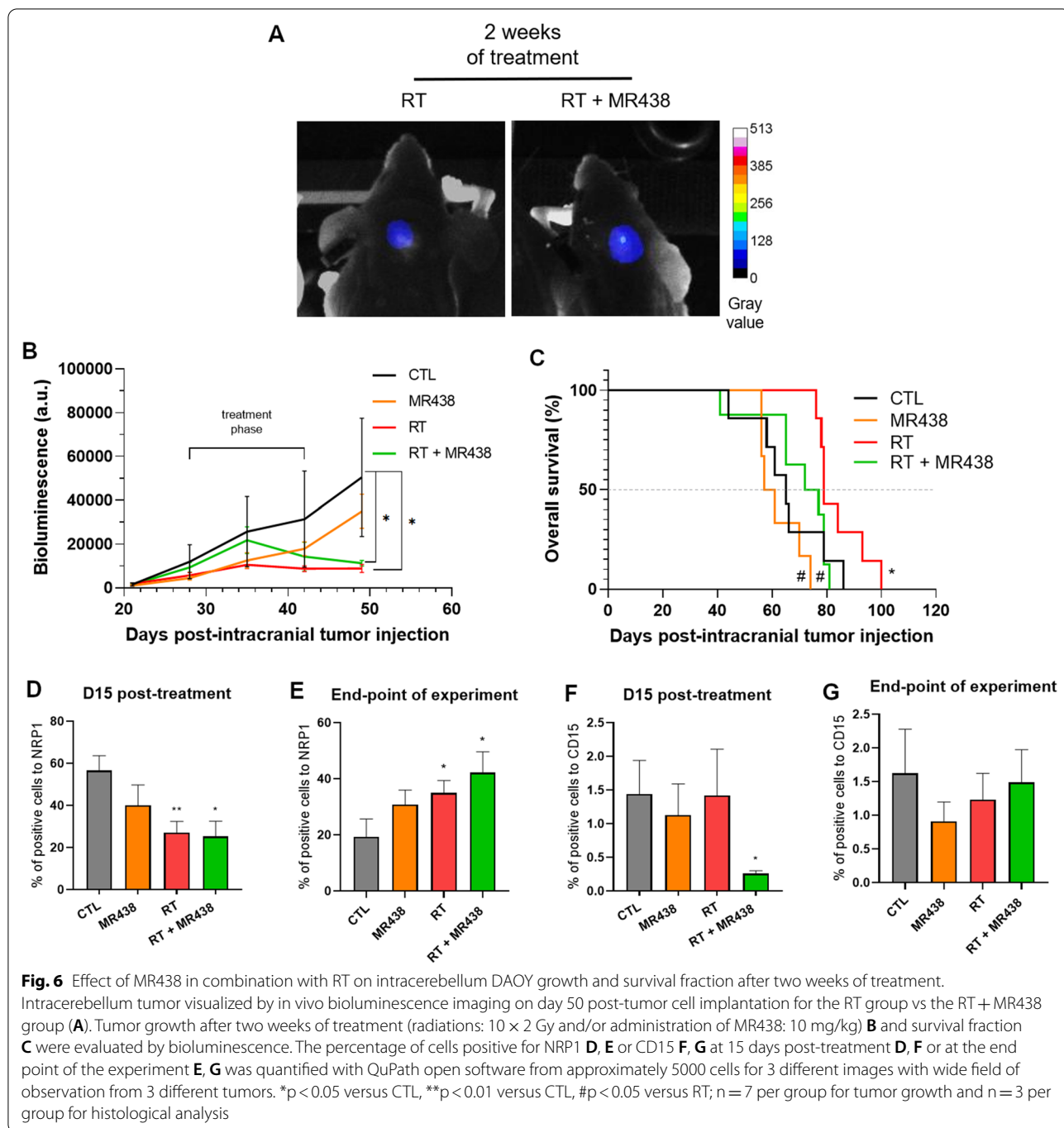


**Fig. 4** Effect of MR438 on the expression of stem cell markers and tumors spheres number of medulloblastoma stem-like cells after tumors dissociation. Representative images of CD15 expression in tumors after irradiation and/or MR438 treatments **A**; scale bars represent 100  $\mu$ m. The percentage of cells positive for CD15 **B** was calculated with QuPath open software from approximately 5000 cells for 3 different images with wide field of observation from 3 different tumors. The gene ex-pression of CD133 **C** and Sox2 **D** was analyzed by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). Tumor spheres number of medulloblastoma stem cells cultivated in serum free condition after tumors dissociation of DAOY, D283-Med and D341-Med tumors **E**. The analysis were performed at the experimental endpoint (corresponding to an average of  $19 \pm 3$  days for mice of non-irradiated groups and  $51 \pm 8$  days for mice of irradiated groups). \* $p < 0.05$  versus CTL and # $p < 0.05$  versus RT,  $n = 6$



the heterotopic model, the number of NRP1 + cells did not change significantly after 1 week of treatment with MR438 or RT + MR438 (Fig. 5D). However, the number of CD15 + cells was significantly decreased in the MR438-treated tumors compared to the control tumors (Fig. 5E). To evaluate the eventual benefit of a longer

period of treatment, experiments were performed with a 2 week treatment schedule (Fig. 6). This schedule did not appear to delay tumor growth (Fig. 6B) or to improve the median survival for the RT + MR438 group (Fig. 6C) compared to the RT group (74.5 days for RT + MR438, 79 days for RT alone 65 days for CTL, 59 days for MR438).



To observe the early effect of the 2 weeks of combined treatment, histological analysis was performed at D15 post-treatment (Fig. 6D and F). We observed a decrease of NRP1+ cells for the two groups treated with RT (Fig. 6D), which correlated with a significant decrease in CD15+ cells only in the RT + MR438 group (Fig. 6F). Nevertheless, this longer treatment time significantly increased the number of NRP1+ cells for RT group

and RT + MR438 group at the end of the experiment (Fig. 6E). This increase also seems to be correlated with the increase in CD15+ cells (Fig. 6G). In addition, we studied the expression of Ki67 and type IV collagen (Col IV) and to investigate the effect of MR438 combined with radiotherapy on cell proliferation and vascularization on intracerebellum DAOY tumors respectively (Additional file 2: Figure S2 and Additional file 3: Figure S3).

Concerning cell proliferation, treatment did not affect the percentage for Ki67 cells positive either after 1 or 2 weeks of treatment (Additional file 2: Figure S2). For tumor vascularization, after 1 week of treatment, no significance was showed for vessels number and area (Additional file 3: Figure S3B) but after 2 weeks of treatment the vessels area was significantly increase with RT + MR438 compared to CTL (Additional file 3: Figure S3C).

## Discussion

Radiation therapy (RT) is commonly accepted as one of the most essential treatments for medulloblastoma after total resection of the tumor. RT can improve survival and reduce recurrence but remains aggressive with severe cognitive and endocrinal long term side effects, especially for young patients [2]. Therefore, it is necessary to develop new therapeutic modalities, that are more adapted to the biological nature of this tumor to improve not only the outcomes but also the quality of life of young patients. Recent studies have concentrated on targeted therapies mainly related to signaling pathways of the main 4 molecular subgroups: WNT, SHH, Group 3 and Group 4 [8]. The WNT and SHH pathways are better understood [33], while subgroups 3 and 4 are considered non-WNT non-SHH subgroups. Patients in the 3 and 4 subgroups or SHH subgroup with TP53 mutation have a higher risk of recurrence and a lower median survival [34–36]. It is even more urgent to find new therapies for these subgroups. In this work, we envisaged targeting MB stem cells more specifically by using combined treatment with radiotherapy and a peptidomimetic inhibiting NRP1 (MR438).

We have previously shown that medulloblastoma stem-like cells could overexpressed NRP1 in vitro in relation to the expression of CSCs markers such as CD15 or CD133, and that inhibition of NRP1 induced a differentiated status of this specific tumoral population [29]. Moreover, many studies suggested that CSCs are involved in resistance to radiotherapy and recurrence [13, 37, 38] and it was shown that medulloblastoma stem-like cells were more radioresistant than differentiated medulloblastoma cells [17]. We observe that the compound MR438 can radiosensitize medulloblastoma stem cells in vitro. Nevertheless, medulloblastoma stem cells from DAOY cells which belong to SHH mutated TP53 subgroup, are more radio-sensitive than medulloblastoma stem cells from D283-Med or D341-Med cells considered from subgroups 3 and 4 which are wild-type for TP53. TP53 is one of the most mutated genes in cancer and known to have functional role in the modulation of DNA repair and cell death after radiotherapy. Usually, loss of p53 function is correlated with increased radiation resistance in medulloblastoma cell lines as well as in medulloblastoma

patients [35]. Nevertheless, it has been recently shown that TP53 mutated DAOY cells are radio-sensitized by a arsenic trioxide while TP53 wild-type medulloblastoma cells stay non-sensitive to radiation [39]. In vitro radiosensitivity with MR438 could dependent not only on NRP1 expression but also to DNA repair mechanisms probably due to genetic alterations linked to medulloblastoma subgroups.

In vivo, MR438 was able to radiosensitize the DAOY tumors, which presented a high level of NRP1 positive cells as compared to other tumor models. It was previously shown by Nasarre et al. that an antagonist peptide of NRP1 can decrease tumor growth in a glioma model by directly targeting tumor cells or blood vessels cells [40]. But contrary to this work, we did not observe an anti-proliferative effect with the compound alone on differentiated tumor cells or a vascular effect through endothelial cells [31]. Similarly, in our work, no effect on proliferation and vascularization have been observed with the compound alone in vivo. MR438 downregulated the expression of NRP1 in vitro [29], probably through a process of internalization/degradation of the NRP1 receptor after binding. This NRP1 downregulation exists in heterotopic tumor but is less evident in intracerebral tumors probably to specific mechanisms of NRP1 regulation not yet elucidated. Moreover, tuftsin, which is a natural ligand of NRP1, did not obtain the same effect as MR438 due to rapid degradation of the peptide, contrary to the peptidomimetic MR438.

This role of NRP1 in the sensitivity of cancer stem-like cells has been recently shown in glioblastoma multiform treated with chemotherapy (temozolomide) by using knockdown models [41]. The use of MR438 also led to decrease the number of MB stem-like cells as well as the decrease of stem cell markers, which led to a delay of growth for DAOY tumor when is associated with RT, as well as an increase in mouse survival, and a slight increase in the D283-Med mouse survival with MR438 used alone. Similarly, knockdown of NRP1 showed an increase in the radiosensitivity of human non-small-cell lung cancer cells (NSCLC), not only in vitro, but also in vivo, perhaps via the VEGF-PI3K-NF-kappa $\beta$  pathway [42]. We have previously shown that MR438 bound specifically to NRP1 but not to VEGFR2 [31] and this binding led to a downregulation of PI3K/AKT et MAPK pathways [29].

The NRP1 inhibition efficiency associated with RT was evaluated in an orthotopic xenograft model to take into consideration the influence of the tumor microenvironment. The treatment combination showed a benefit in terms of tumor growth or median survival with a total dose of 10 Gy. Unfortunately, when the duration of treatment is increased (2 weeks), the therapeutic combination

is less efficient than RT alone (total dose of 20 Gy) probably due to the aggressivity of radiotherapy. Therefore, our combined treatment must be optimized perhaps by a longer administration of MR438 before or after radiotherapy. Nevertheless, NRP1 expression is clearly modified by the association of MR438 and RT at a higher dose with an early decrease followed by a late increase in our SHH orthotopic model. NRP1 overexpression has been recently observed in survived subclones of cell line H1299 after a single high irradiation dose of 10 Gy by Tustsumi et al. [43], that could explain the increase of NRP1 positive cells through a clonal selection in tumors at the end of the experiment for the longer treatment. Interestingly, the expression of the CD15 stem cell marker decreased strongly after the administration of MR438 demonstrating that it can target specifically medulloblastoma stem cells in vivo. CD15 seems to be directly correlated with NRP1 expression as recently published for pediatric brain tumor patients by our group (For more detailed information on NRP1 and cancer stem cells in pediatric brain tumors see reference [44]). Although NRP1 appears to be connected to the expression of stem cell markers [29, 41], no clear mechanism of regulation of this pathway has been yet identified. Several response mechanisms can take place, and it will be interesting to explore the mechanism recently proposed that NRP1 inhibition appeared to regulate RAD51 expression through the VEGFR2-independent ABL-1 pathway, and then increased radiation sensitivity [45]. Several authors demonstrated that NRP1 depletion did not only affect cell proliferation but did affect other cell functions, such as cell differentiation [41, 46], which strengthens our therapeutic approach based on the targeting of medulloblastoma stem-like cells. To develop more effective therapeutics strategies in the treatment of medulloblastoma, further studies of the molecular mechanisms in NRP1 signaling in cancer stem cells is needed to elucidate the rebound of NRP1 positive cells observed with 2 weeks of treatment. We can speculate that the non-response with the 2 weeks treatment is possibly due to a selection of resistant tumor cells to NRP1 inhibition or to other mechanisms of escape involving vascularization which are well-known to targeted therapies promoting other signaling pathways.

## Conclusions

In conclusion, the inhibition of NRP1 via MR438 could increase the radiosensitivity of medulloblastoma stem-like cells, especially at low doses. Finally, this work highlights the interest in targeting NRP1 in association with low cumulative doses of radiotherapy to limit MB progression by targeting stem-like cell numbers. Further studies are needed to explore the mechanism of

regulation of NRP1 in MB progression through stem-like cells.

## Abbreviations

bFGF: Basic fibroblast growth factor; CSC: Cancer stem cells; CTL: Control; EGF: Epidermal growth factor; MB: Medulloblastoma; MS: Medullosphere; NRP1: Neuropilin-1; qRT-PCR: Quantitative reverse transcription PCR; RT: Radiotherapy.

## Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02796-4>.

**Additional file 1: Figure S1.** Effect of MR438 on Ki67 expression in heterotopic xenografts in nude mice, at the endpoint of the experiment.

**Additional file 2: Figure S2.** Effect of MR438 on Ki67 expression on intracerebellum DAOY tumors at the endpoint of experiment, after one week and two weeks of treatment.

**Additional file 3: Figure S3.** Effect of MR438 on the vascularization on intracerebellum DAOY tumors at the endpoint of the experiment, after one week and two weeks of treatment.

## Acknowledgements

The authors thank the Société Française de Lutte contre les Cancers et Leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent (SFCE) and la Ligue Contre le Cancer for their financial support through research funds. The authors also thank Dr Paul Rétif for their technical assistance with the radiotherapy experiments.

## Author contributions

CB, NPM and PC designed the study. CG and MD conducted the main experiments. JP, JD, and MR carried out partial experiments. CB, CG, and MD carried out data analyses. CB, CG, and MD wrote the manuscript draft. CB, MD, CG, and JD revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

This research was funded by the Société Française de Lutte contre les Cancers et Leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent (SFCE), Association pour la Recherche dans les Maladies Infantiles Graves (AREMIG), Fédération Enfants et Santé and la Ligue Contre le Cancer and the Association des chefs de services du CHRU de Nancy.

## Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

## Declarations

### Ethics approval and consent to participate

All animal experiments were performed at University of Lorraine and Nancy University Hospital with the approval of the institutional Animal Care and Use Committee (agreement nAPAFIS #8731 and #20085).

### Consent for publication

The publication of this manuscript has been approved by all authors.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Author details

<sup>1</sup>Université de Lorraine, CNRS, CRAN, UMR 7039, 54000 Nancy, France. <sup>2</sup>Department of Medical Oncology, National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Bei-Jing 100021, China. <sup>3</sup>Université de Lorraine, CNRS, L2CM, UMR 7053, Campus Science, 54500 Vandœuvre-Lès-Nancy,

France. <sup>4</sup>Service d'Onco-Hématologie Pédiatrique, CHRU-Nancy, 54000 Nancy, France.

Received: 23 September 2022 Accepted: 18 November 2022

Published online: 01 December 2022

## References

- Siegel MJ, Finlay JL, Zacharoulis S. State of the art chemotherapeutic management of pediatric brain tumors. *Expert Rev Neurother*. 2006;6(5):765–79.
- Mulhern RK, Palmer SL, Merchant TE, Wallace D, Kocak M, Brouwers P, et al. Neurocognitive consequences of risk-adapted therapy for childhood medulloblastoma. *J Clin Oncol*. 2005;23(24):5511–9.
- Small NR. Relative survival of childhood and adult medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumors (PNETs). *Cancer*. 2012;118(5):1313–22.
- Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol*. 2011;29(11):1408–14.
- Northcott PA, Shih DJH, Remke M, Cho YJ, Kool M, Hawkins C, et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol*. 2012;123(4):615–26.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803–20.
- Schwalbe EC, Lindsey JC, Nakjang S, Crosier S, Smith AJ, Hicks D, et al. Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study. *Lancet Oncol*. 2017;18(7):958–71.
- Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol*. 2012;123(4):465–72.
- Menyhárt O, Györfy B. Molecular stratifications, biomarker candidates and new therapeutic options in current medulloblastoma treatment approaches. *Cancer Metastasis Rev*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09854-1>.
- Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(25):15178.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432(7015):396–401.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003;63(18):5821–8.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756–60.
- Cojoc M, Mäbert K, Muders MH, Dubrovskaya A. A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms. *Semin Cancer Biol*. 2015;31:16–27.
- García-Mayea Y, Mir C, Masson F, Paciucci R, Lleonart ME. Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance. *Semin Cancer Biol*. 2020;60:166–80.
- Zhang L, He X, Liu X, Zhang F, Huang LF, Potter AS, et al. Single-cell transcriptomics in medulloblastoma reveals tumor-initiating progenitors and oncogenic cascades during tumorigenesis and relapse. *Cancer Cell*. 2019;36(3):302–318.e7.
- Blazek ER, Foutch JL, Maki G. Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;67(1):1–5.
- Read TA, Fogarty MP, Markant SL, McLendon RE, Wei Z, Ellison DW, et al. Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma. *Cancer Cell*. 2009;15(2):135–47.
- Capela A, Temple S. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells. Identifying Them as Nonependymal Neuron. 2002;35(5):865–75.
- Capela A, Temple S. LeX is expressed by principle progenitor cells in the embryonic nervous system, is secreted into their environment and binds Wnt-1. *Dev Biol*. 2006;291(2):300–13.
- Singh AR, Joshi S, Zulcic M, Alcaraz M, Garlich JR, Morales GA, et al. PI-3K inhibitors preferentially target CD15+ cancer stem cell population in SHH driven medulloblastoma. *PLoS ONE*. 2016;11(3):e0150836.
- Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development*. 1995;121(12):4309–18.
- Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, et al. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development*. 1999;126(21):4895–902.
- Koch S, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(7):a006502.
- Chauvet S, Cohen S, Yoshida Y, Fekrane L, Livet J, Gayet O, et al. Gating of Sema3E/PlexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal repulsion to attraction during brain development. *Neuron*. 2007;56(5):807–22.
- Luo M, Hou L, Li J, Shao S, Huang S, Meng D, et al. VEGF/NRP-1 axis promotes progression of breast cancer via enhancement of epithelial-mesenchymal transition and activation of NF- $\kappa$ B and  $\beta$ -catenin. *Cancer Lett*. 2016;373(1):1–11.
- Osada H, Tokunaga T, Nishi M, Hatanaka H, Abe Y, Tsugu A, et al. Overexpression of the neuropilin 1 (NRP1) gene correlated with poor prognosis in human glioma. *Anticancer Res*. 2004;24(2B):547–52.
- Ben Q, Zheng J, Fei J, An W, Li P, Li Z, et al. High neuropilin 1 expression was associated with angiogenesis and poor overall survival in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas*. 2014;43(5):744–9.
- Gong C, Valduga J, Chateau A, Richard M, Pellegrini-Moïse N, Barberi-Heyob M, et al. Stimulation of medulloblastoma stem cells differentiation by a peptidomimetic targeting neuropilin-1. *Oncotarget*. 2018;9(20):15312–25.
- von Wronski MA, Raju N, Pillai R, Bogdan NJ, Marinelli ER, Nanjappan P, et al. Tuftsin binds neuropilin-1 through a sequence similar to that encoded by exon 8 of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 2006;281(9):5702–10.
- Richard M, Chateau A, Jelsch C, Didierjean C, Manival X, Charron C, et al. Carbohydrate-based peptidomimetics targeting neuropilin-1: synthesis, molecular docking study and in vitro biological activities. *Bioorg Med Chem*. 2016;24(21):5315–25.
- Vander Kooi CW, Jusino MA, Perman B, Neau DB, Bellamy HD, Leahy DJ. Structural basis for ligand and heparin binding to neuropilin B domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(15):6152–7.
- Remke M, Ramaswamy V, Taylor MD. Medulloblastoma molecular dissection: the way toward targeted therapy. *Curr Opin Oncol*. 2013;25(6):674–81.
- Zou H, Poore B, Broniscer A, Pollack IF, Hu B. Molecular heterogeneity and cellular diversity: implications for precision treatment in medulloblastoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):643.
- Zhukova N, Ramaswamy V, Remke M, Pfaff E, Shih DJH, Martin DC, et al. Subgroup-specific prognostic implications of TP53 mutation in medulloblastoma. *J Clin Oncol*. 2013;31(23):2927–35.
- Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, Faria CC, Perreault S, Cho YJ, et al. Recurrence patterns across medulloblastoma subgroups: an integrated clinical and molecular analysis. *Lancet Oncol*. 2013;14(12):1200–7.
- Chang L, Graham P, Hao J, Ni J, Deng J, Buccì J, et al. Cancer stem cells and signaling pathways in radioresistance. *Oncotarget*. 2016;7(10):11002–17.
- Jamal M, Rath BH, Tsang PS, Camphausen K, Tofilon PJ. The brain micro-environment preferentially enhances the radioresistance of CD133(+) glioblastoma stem-like cells. *Neoplasia*. 2012;14(2):150–8.
- Dos Santos Klinger PH, Delsin LEA, Cruzeiro GAV, Andrade AF, Lira RCP, de Andrade PV, et al. Arsenic Trioxide exerts cytotoxic and radiosensitizing effects in pediatric medulloblastoma cell lines of SHH Subgroup. *Sci Rep*. 2020;10(1):6836.
- Nasarre C, Roth M, Jacob L, Roth L, Koncina E, Thien A, et al. Peptide-based interference of the transmembrane domain of neuropilin-1 inhibits glioma growth in vivo. *Oncogene*. 2010;29(16):2381–92.
- Angom RS, Mondal SK, Wang F, Madamsetty VS, Wang E, Dutta SK, et al. Ablation of neuropilin-1 improves the therapeutic response in conventional drug-resistant glioblastoma multiforme. *Oncogene*. 2020;39(48):7114–26.

42. Dong JC, Gao H, Zuo SY, Zhang HQ, Zhao G, Sun SL, et al. Neuropilin 1 expression correlates with the Radio-resistance of human non-small-cell lung cancer cells. *J Cell Mol Med*. 2015;19(9):2286–95.
43. Tsutsumi K, Chiba A, Tadaki Y, Minaki S, Ooshima T, Takahashi H. Contribution of neuropilin-1 in radiation-survived subclones of NSCLC cell line H1299. *Curr Issues Mol Biol*. 2021;43(3):1203–11.
44. Douyère M, Chastagner P, Boura C. Neuropilin-1: a key protein to consider in the progression of pediatric brain tumors. *Front Oncol*. 2021;11:665634.
45. Hu C, Zhu P, Xia Y, Hui K, Wang M, Jiang X. Role of the NRP-1-mediated VEGFR2-independent pathway on radiation sensitivity of non-small cell lung cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;144(7):1329–37.
46. Kim YJ, Jung K, Baek DS, Hong SS, Kim YS. Co-targeting of EGF receptor and neuropilin-1 overcomes cetuximab resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma with integrin  $\beta$ 1-driven Src-Akt bypass signaling. *Oncogene*. 2017;36(18):2543–52.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



## RESUME

Le médulloblastome (MB) est la tumeur maligne cérébrale la plus commune chez les enfants. Le standard thérapeutique repose sur la chirurgie suivie d'une radiothérapie (RT) accompagnée ou non d'une chimiothérapie. La RT occupe une place importante, améliorant significativement le pronostic global. Néanmoins, sa toxicité vis-à-vis du parenchyme cérébral sain entraîne des séquelles irréversibles sur le système neuroendocrinien des enfants et son efficacité relative conduit à 30% de récurrences. La neuropiline-1 (NRP1) est un récepteur corrélé à un mauvais pronostic chez les patients atteints de MB et surexprimé par les cellules souches cancéreuses (CSC) de MB. NRP1 est donc considéré comme une cible thérapeutique pertinente pour améliorer les traitements contre le MB. De plus, NRP1 est exprimée par les cellules du système immunitaire et semble jouer un rôle dans la modulation du microenvironnement tumoral. Le peptidomimétique MR438, ciblant spécifiquement NRP1, a été synthétisé pour répondre à ces enjeux. Les suivis de croissance tumorale par imagerie de bioluminescence, chez la souris nude xéno greffée en orthotopique par un modèle de MB humain, ont permis de mettre en évidence un retard de croissance et une augmentation de la survie des animaux liés à l'inhibition de NRP1 associée à de faibles doses cumulatives de RT. La diminution précoce, mais non permanente, de l'expression de NRP1 et du CD15, marqueurs de CSC, pourrait expliquer la reprise des tumeurs après traitement. Nous avons également montré que l'inhibition de NRP1, exprimée par les cellules du microenvironnement immunitaire, comme la microglie, semble jouer un rôle dans le recrutement de la microglie au sein d'un modèle *in vitro* de CSC tridimensionnel (médullosphères) sans augmenter l'effet antitumoral des cellules de la microglie, en association ou non avec la RT. En conclusion, l'inhibition de NRP1 en association avec la RT pourrait être envisagée pour ralentir la progression du MB pour ses effets sur les CSC et sur la microglie qui restent cependant à être confirmés.

**Mots clés :** Médulloblastome ; Neuropiline-1 ; Radiothérapie ; Cellules souches cancéreuses ; Microenvironnement tumoral

## ABSTRACT

Medulloblastoma (MB) is the most common malignant brain tumor in children. The therapeutic standard is based on surgery and then radiotherapy (RT) with or without chemotherapy. RT occupies an important place, significantly improving the overall prognosis. Nevertheless, its toxicity on the healthy cerebral parenchyma leads to irreversible sequelae on the neuroendocrine system of children and its relative effectiveness leads to 30% of recurrences. Neuropilin-1 (NRP1) is a receptor correlated with poor prognosis in MB patients and is overexpressed by MB cancer stem cells (CSC). NRP1 is therefore considered as a relevant therapeutic target to improve treatments against MB. Moreover, NRP1 is expressed by cells of the immune system and appears to play a role in modulating the tumor microenvironment. The peptidomimetic MR438, specifically targeting NRP1, was synthesized to address these issues. Tumor growth monitoring by bioluminescence imaging, in nude mice orthotopically xenografted by a model of human MB, demonstrated a delay in growth and an increase in survival of the animals linked to the inhibition of NRP1 associated at low cumulative doses of RT. The early, but not permanent, decrease in the expression of NRP1 and CD15, markers of CSC, could explain the recurrence of tumors after treatment. We have also demonstrated that the inhibition of NRP1, manifested by cells of the immune microenvironment, such as microglia, seems to play a role in the recruitment of microglia within an *in vitro* model of three-dimensional CSC (medullospheres) without increase the antitumor effect of microglia cells, in combination or not with RT. In conclusion, the inhibition of NRP1 in association with RT could be likely to slow down the progression of MB for its effects on CSCs and on microglia, which however remain to be confirmed.

**Keywords:** Medulloblastoma; Neuropilin-1; Radiotherapy; Cancer stem cells; Tumoral microenvironment