



Titre de la Thèse

Le Microenvironnement Tumoral et la Question de la Causalité

Title of the thesis in English

“The Tumor Microenvironment and the Question of Causality”

THÈSE DE DOCTORAT

Andreas BIKFALVI

INSERM U1312 – Bordeaux Institut d’Oncologie (BRIC) et

Institut de l’Histoire et Philosophie des Sciences et des Techniques (IHPST)

Pour l’obtention du grade de
DOCTEUR EN PHILOSOPHIE

Soutenue le 2 décembre 2025 devant le jury d’examen constitué de :

Stéphane TIRARD, Professeur, Centre François Viète d'épistémologie et d'histoire des sciences et des techniques, Nantes, Président du jury et Rapporteur

Hervé CHNEIWEISS, UMR 8265 – Directeur de Recherche Émérite ; Neurosciences, Institut de Biologie Paris-Seine ; Rapporteur

Isabelle DROUET, Maître de Conférences ; Sciences, Normes, Démocratie (UMR 8011), Sorbonne Université, Examinatrice

Lucie LAPLANE, Chargé de Recherche CNRS ; Institut Gustave Roussy, Examinatrice

Michel MORANGE, Professeur Émérite ; Institut d’Histoire et de Philosophie des Sciences et des Techniques (IHPST), Paris et Sorbonne Université, Directeur de Thèse

Thomas PRADEU, Directeur de Recherche CNRS ; ImmunoConcept, UMR5164, CNRS & Université Bordeaux, Co-Directeur de Thèse

Résumé condensé (Français)

Cette thèse explore la nature complexe de la causalité en biologie du cancer, en particulier au sein microenvironnement tumoral (TME), en intégrant des perspectives philosophiques, la modélisation mathématique et des données expérimentales. Elle retrace l'évolution des théories du cancer, passant de modèles centrés sur la cellule à des modèles axés sur le micro-environnement, et met en avant la complexité accrue de l'interprétation causale en raison de l'hétérogénéité tumorale. Le cadre conceptuel des « Hallmarks of Cancer » est discuté comme un outil descriptif qui manque de clarté causale, ce qui conduit à l'emploi de modèles causaux multiéchelles et formels. Deux grandes approches théoriques — la théorie des mutations somatiques et la théorie du champ d'organisation tissulaire — sont comparées et intégrées, des modèles probabilistes illustrant l'influence variable des facteurs génétiques, de l'environnement cellulaire et des facteurs micro-environnementaux. Des études de cas sur les gliomes diffus et le carcinome rénal à cellules claires démontrent comment la modélisation causale avancée (utilisant des DAG, des SEM et des approches bayésiennes) permet de clarifier les interactions entre invasion, immunité, métabolisme et mutations génétiques. La recherche identifie également des voies moléculaires clés, telles qu'IL34 et leur signification causale. Sur le plan méthodologique, ce travail met en lumière les défis liés à la validation de réseaux causaux complexes et plaide pour l'intégration systématique de l'analyse causale dans la recherche biomédicale. La thèse conclut qu'une approche holistique et interdisciplinaire est essentielle pour faire progresser à la fois la compréhension fondamentale et les applications cliniques en oncologie. Elle montre également comment la recherche biomédicale peut enrichir l'analyse conceptuelle en philosophie et inversement.

Mots clés : Microenvironnement tumoral, théories philosophiques de causalité, modélisation causale, approche holistique de la causalité en oncologie

Condensed Abstract (English)

This thesis explores the complex nature of causality in cancer biology, particularly within the tumor microenvironment (TME), integrating philosophical perspectives, mathematical modeling, and experimental data. It traces the evolution of cancer theories from cell-based to microenvironment-focused models, highlighting increased complexity in causal interpretation due to tumor heterogeneity. The "Hallmarks of Cancer" framework is discussed as a descriptive tool that lacks causal clarity, prompting the use of multi-scale and formal causal models.

Two main theoretical approaches—Somatic Mutation Theory and Tissue Organization Field Theory—are compared and integrated, with probabilistic models illustrating the variable influence of genetics, cellular environment, and microenvironmental factors. Case studies on diffuse gliomas and clear cell renal carcinoma demonstrate how advanced causal modeling (using DAGs, SEM, and Bayesian approaches) can clarify the interplay among invasion, immunity, metabolism, and genetic mutations. The research also identifies key molecular pathways and therapeutic targets, such as IL34 in renal carcinoma.

Methodologically, the work highlights the challenges of validating complex causal networks and advocates for systematically integrating causal analysis in biomedical research. The thesis concludes that a holistic, interdisciplinary approach is essential for advancing both fundamental understanding and clinical applications in oncology. Additionally, it is shown how biomedical research can enhance philosophical conceptual analysis and philosophical concepts biomedical research.

Key words: Tumor microenvironment, philosophical theories of causality, causal modeling, holistic approach to causality in oncology

Abréviations :

Angio, Angiogenèse
 AtXN10, *olivopontocerebellar ataxia 1, autosomal dominant, ataxin 1*
 BCR/ABL, *Breakpoint cluster region/c-ABL fusion*
 ccRCC, Carcinome rénal à cellules claires (« *Clear cell renal cell carcinoma* »)
 CFR1, *Colony-stimulating factor receptor-1*
 CI, Cellules immunitaires
 CP, Fromage causal (« *causal pie* »)
 CTLA-4, Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
 DAG, Graphique Acyclique Orienté (« *Directed Acyclic Graph* »)
 DC, Cellules dendritiques (« *dendritic cells* »)
 DLL4, Delta-like 4
 EGF, Facteur de croissance épidermique (« *Epidermal growth factor* »)
 EIF4H, eukaryotic translation initiation factor 4H
 EM, Matrice extracellulaire (« *Extracellular Matrix* »)
 FGF, Facteur de croissance des fibroblastes (« *Fibroblast growth factor* »)
 FN, facteurs neuronaux,
 FS, Facteurs solubles
 GB, Glioblastome
 GBM, Glioblastome multiforme
 GLRLM, Matrice de longueur de course des niveaux de gris
 HEV, Veinules endothéliales hautes (« *High Endothelial Venules* »)
 HRT, Théorie des Régularités de Hume (« *Humean Regularity Theory* »)
 HTLV, « *Human T cell lymphotropic virus* »
 IL34, Interleukine-34
 INUS, « *A cause of an event is insufficient but necessary (non-redundant) part of unnecessary but sufficient condition of this event* »
 IRM, Imagerie par Résonance Magnétique
 ITGAV, Intégrine α_v
 KRT19, Kératine 19
 LN1, laminine-111
 LAM, leucémie aiguë myéloïde
 LAL, Leucémie aiguë lymphoblastique
 LPM, Leucémie promyélocytaire
 MDSC, *Myeloid-derived Suppressor Cells*
 MEC, Matrice extracellulaire
 Microg, Microglie
 MYC, Homologue de l'oncogène viral myélomateux (« *Myelocytomatosis viral oncogene homolog* »)
 NCAM1, Molécule d'adhésion cellulaire 1 (« *Neural Cell Adhesion Molecule 1* »)
 Neur, Neuronal
 NOTCH, Protéine homologue du locus neurogène Notch 1
 PD-L1, Ligand de la mort cellulaire, programmé (« *Programmed cell Death-Ligand 1* »)
 PD-1, Mort cellulaire, programmé-1 (« *Programmed cell Death-1* »)
 RAS, Homologue de l'oncogène viral du sarcome de Kirsten (« *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* »)
 RCC, Carcinome Rénal (« *Renal Cell Carcinoma* »)
 RUNX3, Facteur de transcription 3 lié à Runt (« *Runt related transcription factor 3* »)
 SASP, Protéine sécrétée associée à la sénescence (« *Senescence-associated secretory protein* »)
 SCRT2, Facteur de transcription 2 de la famille Scratch (« *Scratch family transcriptional repressor 2* »)
 SIDA, Syndrome d'immunodéficience acquise
 SMT, Théorie de la mutation somatique (« *Somatic Mutation Theory* »)
 TEP, Tomographie à émission de positrons (« *Positron emission tomography* », PET)
 Th1, Lymphocytes auxiliaires Th1
 TME, Microenvironnement tumoral

TOFT, Théorie de champs organisationnel tissulaire (« *Tissue Organization Field Theory* »)

ST, Spatio-temporel.

TS, Théorie de la singularité de la causalité (« *Causal Singularist Theory* »)

TE, Environnement tumoral

TCTC, Environnement « cellule tumorale à cellule tumorale »

proxTE, TE proximal

pTE, TE périphérique

TOE, Environnement tumoral de l'organisme

VEGF, Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (« *Vascular endothelial growth factor* »)

VEGF, Facteur de croissance vasculaire endothélial (« *Vascular Endothelial Growth Factor* »)

VOI, Volume d'intérêt (« *Volume of interest* »)

Remerciements

Je souhaite remercier Michel Morange et Thomas Pradeu pour avoir accepté la direction de cette thèse, leurs conseils, leur regard critique et leur soutien lors de sa réalisation. Je souhaite également exprimer ma reconnaissance à Stéphane Tirard, Hervé Chneiweiss, Isabelle Drouet et Lucie Laplane d'avoir accepté de participer au jury. Je remercie la Direction de l'IHPST, notamment Pierre Wagner et Francesca Merlin, d'avoir accepté la réalisation de ce travail au sein de leur institut, ainsi que la direction de l'école doctorale de philosophie de l'université de la Sorbonne/Paris-1, en particulier Denis Forest puis Laurent Jaffro.

La confiance exprimée par les membres de mon unité INSERM à Bordeaux, que j'ai dirigée pendant plus de vingt ans, a contribué à la conduite des recherches et à des publications qui ont servi de base à l'analyse philosophique et conceptuelle de cette thèse. Mes remerciements vont en particulier à Sophie Javerzat, Martin Hagedorn, Patrick Auguste, Michel Moenner, Clotilde Billottet, Lucie Brisson, Thomas Mathivet, Wilfried Souleyreau, ainsi qu'aux étudiants et post-doctorants que j'ai encadrés ou co-encadrés en particulier Alexandre Dubrac, Thomas Daubon, Laetitia Andrique, Andrea Emanuelli, Kevin Boyé, Lior Zilberberg, Mathilde Poulet, Ahmad Charanek, et Tiffanie Chouleur.

Plusieurs collaborations nationales et internationales ont également participé aux travaux réalisés. Je remercie Michel Tremblay (Université McGill, Canada), Lorenzo Bello (Université de Milan, Italie), Wen Guay Wu et Shi-Che Sue (NTHU Taiwan), Pierre Nassoy (Institut Optique), Isabel Alves (CBMN, Bordeaux), Hervé Prats (INSERM Toulouse), Barbara Garmy-Susini (INSERM Toulouse), Anne Eichmann (Université de Yale, USA), Francesco Falciani (Université de Liverpool, UK), Roy Bicknell (Université de Birmingham, UK) et Rolf Bjerkvig (Université Bergen, Norvège).

Je remercie mes mentors, dont Daniel B Rifkin (NYU, USA), Yves Courtois, directeur de recherche émérite INSERM (Centre de recherches des Cordeliers, Paris), Jean Brière (Hôpital Beaujon, Paris) et Jacques Philippe Caen, ancien directeur de l'Institut des Vaisseaux et du Sang à Paris, pour leur soutien et conseils qui ont eu un impact décisif sur ma carrière.

Je souhaite également remercier Gérard Tobelem, mon directeur de thèse de Science à l'INSERM U150 à Paris, ainsi que Laszlo Beress (Université de Kiel, Allemagne), pour l'aide apportée lors de la préparation de ma thèse de médecine.

Mon intérêt pour la philosophie s'est développé lors de ma scolarité au « Kolleg St. Blasien » (Allemagne), notamment grâce à Père Pflüger SJ, Père Gritschneider SJ et Père Kiefel SJ. Les échanges avec Kenneth Gemes (UCL, Londres, UK), Wolfgang Deppert (Département de Philosophie, Université de Kiel, Allemagne) ainsi que les discussions avec Thomas Pradeu, Lucie

Laplane, Pierre Nassoy et Thierry Michon, ont aussi contribué à enrichir ma réflexion dans ce domaine. Je les remercie tous. Mes remerciements vont aussi à Adalbert Kemna dont l'aide a été essentielle lors de ma scolarité.

Je voudrais remercier Joe Sill (Washington, USA) et Loïc Paulève (Labri, Bordeaux) pour l'aide apportée dans quelques modélisations (TGF β , Sill page 141 et Annexe page 295 ; compaction-diffusion, Paulève, Figures 32 et 33, pages 163-165 et Annexes pages 296-297).

Enfin, mes pensées vont à ma famille — mes parents Andras et Ildiko, mes enfants Marianne et Alexis, ainsi qu'à mes sœurs Ildiko et Barbara — je les remercie pour leur affection et leur soutien qui m'ont aidé à traverser des périodes difficiles de ma vie.

« Comme expérimentateur, j'évite donc les systèmes philosophiques, mais je ne saurais pour cela repousser cet esprit philosophique qui, sans être nulle part, est partout, et qui, sans appartenir à aucun système, doit régner non-seulement sur toutes les sciences, mais sur toutes les connaissances humaines.

j'aime beaucoup les philosophes et je me plais infiniment dans leur commerce. En effet, au point de vue scientifique, la philosophie représente l'aspiration éternelle de la raison humaine vers la connaissance de l'inconnu. Dès lors les philosophes se tiennent toujours dans les questions en controverse et dans les régions élevées, limites supérieures des sciences. Par là ils communiquent à la pensée scientifique un mouvement qui la vivifie et l'ennoblit ; ils fortifient l'esprit en le développant par une gymnastique intellectuelle générale en même temps qu'ils le reportent sans cesse vers la solution inépuisable des grands problèmes ; ils entretiennent ainsi une sorte de soif de l'inconnu et le feu sacré de la recherche qui ne doivent jamais s'éteindre chez un savant ».

Claude Bernard, « Introduction à l'étude de la médecine expérimentale », Paris J.B. Baillière et Fils, 1865

Table des Matières

Sections	Sous-sections	Page
1. Introduction et objectifs		11
	1.1 Contexte philosophique et scientifique de la causalité	11
	1.2 Problématique : place de la causalité dans la biologie des cancers	13
	1.3 Objectifs de la thèse et approche méthodologique et conceptuelle	18
2. Le chemin vers la compréhension causale du cancer : Évolution des différentes théories		21
	2.1 Théories anciennes	21
	2.2 Théorie lymphatique	21
	2.3 Théorie du blastème	21
	2.4 Théories parasitaires, infectieuses et virales	22
	2.5 Génétique tumorale et oncogènes	23
	2.6 Théories environnementales et microenvironnement tumoral	24
	2.7 Plasticité phénotypique/souche	26
	2.8 Analyse critique de l'évolution des théories biologiques du cancer	27
3. Concepts théoriques généraux concernant les mécanismes biologiques des cancers et leur lien à la causalité		30
	3.1 Les « Hallmarks » du cancer et leur niveau explicatif	30
	3.2 « Hallmarks » 2000	31
	3.3 « Hallmarks » 2011	33
	3.4 « Hallmarks » 2022	36
	3.5 Forces et faiblesses des « Hallmarks »	41
4. Causalité comme cadre théorique, « nature versus nurture »		47
	4.1 Théorie somatique mutationnelle (SMT) versus théorie de l'organisation des champs tissulaires (TOFT)	47
	4.2 Théorie de la « <i>self-organized criticality</i> » (SOC)	56
5. Théories de la causalité		59
	5.1 Concepts anciens : Aristote	60
	5.2 Théories modernes de la causalité	60
	5.2.1 Modèles de régularité (« <i>causal regularity models</i> »)	61

	5.2.2 Théorie contrefactuelle	64
	5.2.3 Modèle interventionniste	66
	5.2.4 Théorie de singularité	67
	5.2.5 Modèle de causalité de Granger	69
	5.2.6 Inférence de la meilleure explication (IBE)	70
	5.2.7 « <i>Causal Pie Model</i> »	71
	5.2.8 « <i>Causal Graphs</i> » et « <i>Networks</i> »	72
	5.2.9 Théorie de Nancy Cartwright	74
	5.3 Utilité des concepts philosophiques dans la conceptualisation du cancer	76
	5.3.1 Considérations générales	76
	5.3.2 Caractéristiques et propriétés additionnelles du concept de causalité	79
6. Causalité et micro-environnement tumoral : étude de cas		112
	6.1 Considérations générales	112
	6.2 Gliomes Diffus (Prototype I)	113
	6.2.1 Facteurs causaux intrinsèques des gliomes	113
	6.2.2 Gliomes IDH WT : le Glioblastome	116
	6.2.2.1 Article 1 : Les Glioblastomes, focus sur le microenvironnement tumoral (TME)	116
	6.2.2.2 Analyse causale des glioblastomes	119
	6.2.2.2.1 fromage causal	119
	6.2.2.2.2 Graphique acyclique (DAG)	124
	6.2.2.2.3 Modélisation par SEM et simulation	125
	6.2.2.2.4 Contribution du cadre causal	131
	6.2.2.3 Articles 2&3 : Thrombospondine-1 et invasion	132
	6.2.2.3.1 Généralités	132
	6.2.2.3.2 Analyse causale, articles 2&3	135
	6.2.2.3.3 Contribution du cadre causal	144
	6.2.3 Les Gliomes IDH mutés	146
	6.2.3.1 Article 4 : Gliomes IDH mutés et microenvironnement tumoral (TME)	146
	6.2.3.2 Analyse causale	148
	6.2.3.2.1 Généralités	148
	6.2.3.2.2 Scénarios et modélisation	151
	6.2.3.2.3 Modélisation des signatures moléculaires	154
	6.2.3.2.4 Causalité et signatures radiomiques	157
	6.2.3.2.5 Contribution du cadre causal	159
	6.2.4 Modélisation causale réductionniste	161
	6.2.4.1 Généralités – comparaison gliomes IDHWT et IDH mutés	161
	6.2.4.2 Modélisation	162
	6.2.4.3 Contribution de l'analyse causale	171
	6.3 Carcinome rénal (RCC, Prototype II)	173
	6.3.1 Mécanismes et facteurs causaux	173
	6.3.2 Analyse causale du sous-type ccRCC	174

	<i>6.3.2.1 Généralités</i>	174
	<i>6.3.2.2 Modélisation du ccRCC (SEM et probabilités conditionnelles)</i>	181
	6.3.3 Analyse causale générale	183
	6.3.4 Article 5 : Rôle de IL34 dans l'invasion du RCC	185
	<i>6.3.4.1 Analyse causale, article 5</i>	187
	6.4 Discussion générale	191
7. Impact de l'analyse conceptuelle sur la recherche biomédicale et la pratique médicale		198
	7.1 Causalité et conceptualisation mécanistique	199
	7.2 Causalité dans la pratique de la recherche biomédicale	201
	7.3 Conséquences des facteurs sociétaux sur la recherche des causalités du cancer	203
	7.4 Impact sur la pratique médicale	205
8. Conclusion et perspectives		208
9. Annexe		216
	9.1 Articles discutés	216
	9.2 Liste des articles conceptuels sur le cancer	293
	9.3 Codes et scripts	293
	9.4 Résumés détaillés – « <i>detailed Abstracts</i> »	298
	9.5 Index thématique	302
Nombre de figures	49	
Nombre de tableaux	16	

1. Introduction et objectifs

1.1 Contexte philosophique et scientifique de la causalité

Cette thèse porte sur la causalité en lien avec la biologie des cancers. Par le passé, en philosophie et dans les sciences, le concept de causalité a été critiqué. Des figures telles que Francis Galton, Ernst Mach, Karl Pearson, Ronald Fisher, Bertrand Russell ou Rudolf Wittgenstein considéraient la causalité comme non essentielle à l'explication des phénomènes naturels. Même plus récemment, Norton ¹ disait « le discours causal n'est guère plus qu'un hymne de louange fervent à une idole imaginaire ; il apporte un grand réconfort aux croyants, mais il n'appelle aucune force ni aucun pouvoir » (« *Causal talk amounts to little more than an earnest hymn of praise to some imaginary idol ; it gives great comfort to the believers, but it calls up no forces or powers* »). Cependant, d'importants progrès ont été réalisés au cours des quarante dernières années dans le domaine de la causalité. Une vaste littérature existe à ce sujet, provenant de la philosophie ainsi que d'autres domaines tels que l'informatique, l'économie, l'épidémiologie, les sciences sociales et le domaine biomédical².

Philosophiquement, la causalité comporte deux aspects principaux : le premier est métaphysique et ontologique, qui explore la nature fondamentale de la causalité en cherchant à répondre à la question « qu'est-ce que la causalité ? ». Le second est méthodologique, qui examine comment la causalité peut être utilisée pour résoudre divers problèmes scientifiques, pratiques ou même conceptuels. Bien que distincts, ces deux aspects interagissent intimement, car la compréhension ontologique de la causalité influence directement les outils et les approches méthodologiques choisis pour analyser les phénomènes complexes. En effet, une conceptualisation claire de la causalité est essentielle pour établir des modèles explicatifs robustes, qu'il s'agisse de décrypter les mécanismes, de faire des prédictions ou encore de définir des interventions ciblées.

La causalité est donc un élément essentiel de l'analyse conceptuelle. Cependant, l'analyse conceptuelle a une signification plus large et inclut également l'examen des concepts scientifiques, tels que : comment ces concepts et théories s'établissent dans les sciences ? Quelles sont leurs forces et faiblesses ? Contiennent-ils des contradictions internes ou bien restent-ils cohérents, et sont-ils compatibles avec d'autres concepts visant à expliquer les mêmes phénomènes ? L'analyse conceptuelle permet d'identifier les limites et les intersections des

¹ Norton, John D., 2003, "Causation as Folk Science", *Philosopher's Imprint*, 3(4): 22 pages. [[Norton 2003 available online](#)].

² Pearl J, Causality. Cambridge University Press; 2nd edition (September 14, 2009) 484 pages ISBN-10 : 052189560X.

théories scientifiques. Comment donc la causalité s'intègre-t-elle dans l'analyse conceptuelle ? L'analyse de la causalité s'intègre dans l'analyse conceptuelle de deux manières. Soit comme l'analyse de la relation entre cause et effet en tant que relation unidirectionnelle entre variables ($X \rightarrow Y$), soit comme un cadre conceptuel général (cadre causal). Ce dernier inclut une affirmation principale : un phénomène s'explique mieux dans le cadre causal A que dans le cadre causal B, comme discuté au **chapitre IV** pour la « somatic mutation theory » (SMT) et la « tissue organization field theory » (TOFT).

Ce rôle est donc particulièrement significatif dans les sciences du vivant, où l'analyse des mécanismes causaux influence directement la manière dont les théories sont construites. Cela inclut des questions telles que : pourquoi et comment une altération génétique peut-elle déclencher un processus tumoral ? Ou encore, pourquoi et comment les facteurs environnementaux interagissent-ils avec les dynamiques cellulaires pour favoriser la progression du cancer ? Ces interrogations ne sont pas simplement descriptives, mais visent à mettre en lumière les interactions causales complexes.

Ainsi, il est donc impératif de considérer la causalité comme une pierre angulaire dans les concepts scientifiques. Par exemple, dans les études sur le métabolisme, la causalité apporte une compréhension profonde des relations dynamiques entre les différents composants d'une cellule ou d'un tissu. Intégrer cette approche dans l'analyse conceptuelle permettrait d'élaborer des outils prédictifs et des interventions qui repoussent les limites des méthodes traditionnelles. L'analyse de la causalité ne se limite pas à établir des corrélations, mais vise également à identifier des mécanismes explicatifs précis.

Cependant, tous les aspects des sciences ne sont pas expliqués par la causalité. Par exemple, la structure chimique du glucose avec ses six carbones est une donnée descriptive qui ne requiert pas de raisonnement causal. Mais pour comprendre et expliquer un phénomène dynamique, tel que le métabolisme du glucose dans les cellules ou les interactions biochimiques qui en découlent, la causalité devient essentielle. Elle permet de relier des facteurs entre eux, de comprendre les mécanismes sous-jacents et de prédire les conséquences de diverses modifications dans un système donné.

La causalité traite de plusieurs aspects, notamment l'inférence, l'explication, la prédiction, le contrôle et le raisonnement causal^{3,4}. L'inférence causale permet de déterminer si un lien de cause à effet existe entre deux phénomènes. L'explication causale cherche à fournir une compréhension des mécanismes sous-jacents d'un phénomène observable. La prédiction causale utilise les relations de cause à effet pour prédire les événements induits. Le contrôle causal consiste à intervenir sur les variables causales pour éliminer les facteurs confondants. Enfin, le raisonnement causal aide à établir des conclusions logiques basées sur des relations de causalité.

L'étude de la causalité soulève des questions fondamentales sur la manière dont les phénomènes naturels peuvent être décomposés et analysés. En effet, les avancées dans les sciences ont permis d'explorer des mécanismes complexes, mais aussi de confronter diverses approches conceptuelles pour interpréter les données. Cette réflexion s'articule autour de la recherche de liens explicatifs solides et du dépassement des modèles purement descriptifs, en s'appuyant sur des théories émergentes et des outils méthodologiques innovants, tels que les approches probabilistes ou les modèles interactifs.

1.2 Place de la causalité dans la biologie des cancers

Dans le contexte de la recherche sur le cancer, la notion de causalité permet non seulement de relier des facteurs exogènes à l'émergence de tumeurs, mais aussi d'explorer comment les interactions dynamiques entre l'environnement tissulaire et les cellules tumorales influencent la progression de la maladie. Les avancées scientifiques dans le domaine de la cancérologie des deux dernières décennies illustrent bien son importance. Partant du postulat de Theodore Boveri⁵ d'une altération génétique au sein de la cellule tumorale puis la découverte des gènes suppresseurs des tumeurs et des oncogènes⁶ et la découverte de la signalisation dans les cellules tumorales, la situation s'est complexifiée avec la découverte du rôle central du micro-environnement (TME) dans le développement tumoral et la formation des métastases. Ce TME fait partie de l'environnement tumoral (TE), ce dernier est composé de différentes sous-entités incluant « tumor cell to tumor cell » (TCTC) environnement, la niche, le TME proper, l'environnement proximal (proxTE) le TE périphérique (pTE) et l'environnement tumoral de

³ Illari P, Russo F. Causality: Philosophical Theory meets Scientific Practice. Oxford University Press 2014, 328 pages, ISBN-10 : 0199662673.

⁴ Drouet I. Causes, probabilités, inférences. – Big Book, 27 Jan. 2012.

⁵ Theodor Boveri, Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Gustav Fischer, Jena, 1914.

⁶ Klaus Bister. Discovery of oncogenes: The advent of molecular cancer research. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015, 112(50): 15259–15260.

l'organisme (TOE)⁷. Le TME (ou TME proper), quant à lui, est composé de multiples éléments qui incluent le système vasculaire (cellules endothéliales, péricytes, cellules musculaires lisses, etc.), les cellules de support (cellules stromales), la matrice extracellulaire, les cellules inflammatoires de l'immunité innée et adaptative, et les neurones et terminaisons axonales. Ces éléments sont présents dès l'initiation de la tumorigenèse et la transformation des cellules tumorales, et participent à tous les stades du développement tumoral. Le réseau de communication entre ces différents types cellulaires est complexe et implique des médiateurs solubles (cytokines, facteurs de croissance), des composantes matricielles (protéoglycanes, protéines matricielles, etc.), des récepteurs de signalisation (pour des médiateurs solubles et des composantes matricielles et des systèmes moléculaires d'adhésion intercellulaire (p.ex. connexines etc.)). Un aspect important est l'hétérogénéité tumorale qui opère à plusieurs niveaux, le niveau interindividus (pour un même type de tumeur), le niveau intertumeurs (dans le cadre de différentes tumeurs) et le niveau intratumeur (dans une même tumeur). Ceci amène une complexification importante pour comprendre les séquences causales dans le développement tumoral. En intégrant la causalité dans l'analyse conceptuelle, des modèles plus robustes et des interventions thérapeutiques mieux ciblées pourraient être élaborés.

Ces avancées démontrent que les relations causales ne sont pas statiques, mais évoluent avec l'acquisition de nouvelles connaissances (nous en verrons un exemple dans le **chapitre II** sur la chronologie et l'évolution des concepts du cancer et dans le **chapitre III** sur les « Hallmarks » du cancer). Ainsi, l'analyse causale dans ce contexte va au-delà des simples corrélations et s'enrichit progressivement de mécanismes explicatifs pour relier de manière cohérente les causes aux effets. Ces efforts permettent le développement de modèles prédictifs plus robustes et l'identification d'interventions potentielles dans la perspective de la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Si les connaissances sur les causes du cancer se sont considérablement enrichies, notre compréhension est cependant encore fragmentaire en raison des interactions causales complexes, non seulement au sein de la cellule tumorale, mais aussi au niveau du TME. Nous sommes loin d'une vision unifiée des interactions cellulaires et moléculaires. Pour progresser dans ce sens, il est opportun d'utiliser des concepts venant de la philosophie et des autres domaines des sciences. Comme déjà mentionné, non seulement une littérature très importante concernant la causalité a été développée par la tradition philosophique, mais d'autres domaines comme l'informatique,

⁷ Laplane L, Duluc D, Larmonier N, Pradeu T, Bikfalvi A. The Multiple Layers of the Tumor Environment. Trends Cancer. 2018, 4(12) : 802-809.

l'intelligence artificielle et les sciences économiques s'y sont aussi intéressés ⁸. Ceci a conduit, selon l'expression de Judah Pearl, à une révolution causale qui est en plein essor ⁹.

Un certain nombre de concepts de causalité ont été développés tant au niveau métaphysique, que méthodologique tels que l'inférence causale inductive, la randomisation mendélienne (MR), l'inférence à la meilleure explication (« Inference to the best explanation », IBE), la causalité de Granger, la causalité contrefactuel (Lewis) et l'approche interventionniste de Woodward ¹⁰. Un outil très important développé par le généticien Sewall Wright ¹¹ dans les années 30, et raffiné ultérieurement, est représenté par les diagrammes causaux (« Causal Path Diagrams »). Ces diagrammes établissent des liens unidirectionnels entre deux variables, symbolisés par une flèche droite ou courbée à laquelle un coefficient de signification ou de voie (« path coefficient » reflétant une probabilité) est associé (Figure 1). En dehors de la description des aspects généraux de la causalité dans les interactions moléculaires et phénotypiques liées au cancer, cette thèse propose également d'utiliser cet outil pour mieux comprendre les liens causaux entre le cancer et son environnement tumoral, en particulier le micro-environnement tumoral (TME).

Par ailleurs, l'application des concepts philosophiques de la causalité à la recherche biomédicale, notamment en oncologie, pourrait ouvrir la voie à une perspective interdisciplinaire. En articulant les théories philosophiques avec les recherches scientifiques actuelles, il devient envisageable de clarifier les relations causales et d'apporter une contribution significative à la compréhension et au traitement du cancer.

Enfin, cette réflexion basée sur la causalité ne se limite pas uniquement à l'analyse théorique. Elle s'incarne dans des outils pratiques tels que les graphiques acycliques, les coefficients de chemin (« path coefficients ») et les simulations interventionnistes ou contrefactuelles. Ces derniers permettraient aux chercheurs de tester des hypothèses en modélisant des scénarios alternatifs et en évaluant les impacts potentiels d'interventions diverses. Ce cadre, combiné aux avancées expérimentales et technologiques, permettrait d'enrichir la recherche en cancérologie, pour mieux répondre aux défis médicaux contemporains.

⁸ Pearl J, Causality. Cambridge University Press; 2nd edition (September 14, 2009) 484 pages ISBN-10: 052189560X.

⁹ Pearl J. The Book of Why: The New Science of Cause and Effect, May 15, 2018, Basic Books; 1st edition (May 15, 2018) 432 pages, ISBN-10: 046509760X.

¹⁰ Woodward J. Causation with a Human Face: Normative Theory and Descriptive Psychology, Oxford University Press, Oxford, 2021, 432 pp, ISBN: 9780197585412.

¹¹ Wright S. The Relative Importance of Heredity and Environment in Determining the Piebald Pattern of Guinea-Pigs. Proc Natl Acad Sci, 1920, 6 (6): 320-332.

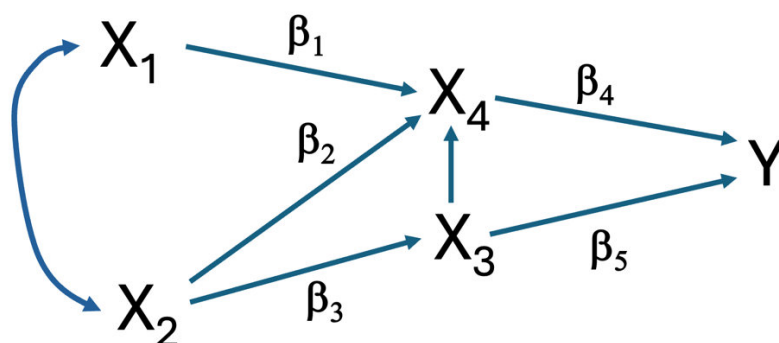


Fig. 1 : Graphique acyclique représentant la connexion entre différentes variables X convergentes vers Y . Les coefficients de voie (« path coefficients ») sont aussi indiqués (β).

Judah Pearl a défini trois marches de l'échelle de causalité : Association (voir), Intervention (faire) et Contrefactuel (imaginer) (Figure 2). L'association est représentée par les approches de statistique classique (Pearson, Fisher) et correspond à l'approche fréquentiste, l'intervention par l'approche bayésienne, et le contrefactuel par l'imagination de situations potentielles autres et leurs conséquences dans des conditions données. L'approche corrélative (« fréquentiste ») à elle seule ne tient pas compte de la causalité, car elle est uniquement basée sur des corrélations dont le sens n'est pas déterminé. Elle répond seulement à la question du « Comment » (« How ») et non à la question du « Pourquoi » (« Why »). L'approche bayésienne introduit seulement une probabilité estimée (supposée) qui peut être raffinée en confrontant celle-ci à la réalité. Ici aussi l'orientation de la relation entre les variables n'est pas fixée et donc le sens de l'occurrence des événements n'est pas déterminé. Le problème de causalité peut seulement être résolu, selon Pearl, par introduction du contrefactuel, ce qui est contesté par certains (p.ex. Nancy Cartwright¹²). Dans un langage plus moderne, on peut définir la causalité ou mieux l'étude de la relation causale comme une combinaison entre l'approche bayésienne et une relation unidirectionnelle entre deux variables.

¹² Cartwright, N. (2007). Counterfactuals in Economics: A Commentary. In J. Keim Campbell, M. O'Rourke, & H. Silverman (Eds.), *Causation and explanation* (191-216). Massachusetts Institute of Technology Press.

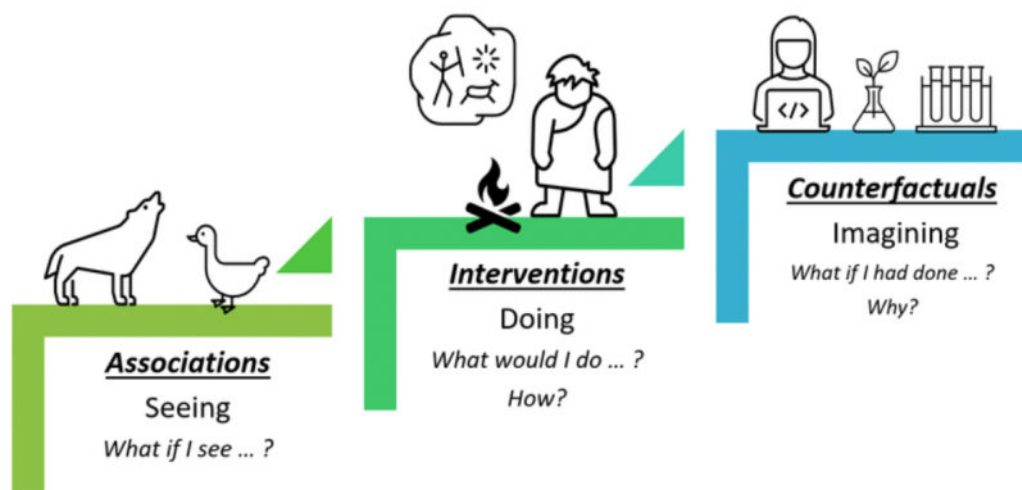


Fig. 2 : Échelle causale selon Judah Pearl¹³

Les philosophes se sont intéressés depuis plusieurs années non seulement à différents domaines de la biologie et notamment à l'évolution, mais aussi à différents aspects de la recherche biomédicale. Plus récemment, le cancer a été l'objet d'une attention particulière des philosophes et de nombreux articles et livres ont été publiés à ce sujet^{14,15,16,17}. Cependant, les scientifiques et les médecins ne sont que très peu concernés et familiers avec ces travaux qui n'ont pratiquement aucun impact sur la recherche sur le cancer. Ceci est dû, d'une part, au fait que les philosophes n'ont souvent pas une compréhension détaillée, voire ont une compréhension abstraite, de la recherche sur le cancer, car ils n'ont jamais conduit une recherche expérimentale véritable. Leurs concepts sont aussi souvent formulés dans un langage peu compréhensible pour les scientifiques et médecins, car utilisant une terminologie hermétique étrangère au langage habituel des sciences. D'autre part, les scientifiques et les médecins n'ont pas de notions de philosophie des sciences et sont très peu familiers avec ses concepts. Par ailleurs, l'hyperspécialisation de la recherche biomédicale a conduit à la formation de chercheurs et médecins seulement spécialistes de leur domaine ayant une culture philosophique et humaniste restreinte. Dans ce contexte, l'éditeur en chef du magazine « Science » Holden Thorp a récemment publié une tribune dans laquelle il recommande l'enseignement de la philosophie des sciences aux scientifiques¹⁸.

¹³ Pearl J. The Book of Why: The New Science of Cause and Effect, May 15, 2018, Basic Books; 1st edition (May 15, 2018) 432 pages, ISBN-10 : 046509760X.

¹⁴ Bertolaso M. Philosophy of Cancer: A Dynamic and Relational. Ed: Springer; reprint of the original 1st ed. 2016 édition, 2018, 208 pages, ISBN-10 : 9402414215.

¹⁵ Morange M. Les secrets du vivant. Contre la pensée unique en biologie, Poche / Sciences humaines et sociales 2012 Ed. La Découverte, 232 pages.

¹⁶ Laplane L. Cancer Stem Cells: Philosophy and Therapies Hardcover, 2016, 222 pages, Harvard University Press.

¹⁷ Plutynski A. Explaining Cancer : Finding Order in Disorder. 2022, 278 pages Oxford University Press.

¹⁸ Thorpe H. Teach philosophy of science. Science. 2024, 384 (6692) : 141.

Cette thèse de philosophie, écrite par un médecin et scientifique, vise justement à combler les lacunes existantes et se veut donc à la fois intéressante et compréhensible pour le scientifique, le médecin et le philosophe. Par ailleurs, la thèse a l'ambition d'apporter une contribution véritable à la philosophie des sciences et à la biologie et à la médecine. Je me place donc résolument dans la perspective de la philosophie « dans » les sciences¹⁹. L'approche dans l'écriture de cette thèse est originale, car, en dehors des discussions très générales, dans certaines sections de cette thèse, mes travaux scientifiques (et de mon équipe) précèdent la discussion philosophique (**chapitre VI**). Seulement des travaux récents où j'étais investigateur principal (PI, « lead author ») et auteur correspondant sont inclus, les premiers auteurs étant mes étudiants ou postdoctorants. La discussion philosophique cherche à illuminer les résultats empiriques obtenus en les plaçant dans le contexte de la causalité. Ceci est très différent des travaux philosophiques standards où la science empirique n'est pas explicitée et seulement mentionnée pour soutenir ou réfuter une théorie ou hypothèse. Je suis convaincu que cette façon de faire est innovante et ancre la réflexion philosophique fermement dans la science expérimentale^{20 21}.

1.3 Objectifs de la thèse et approche méthodologique et conceptuelle

1.3.1 Objectifs généraux de la thèse

- (1) Faire état des connaissances actuelles de relations causales du TME et d'en effectuer une analyse critique
- (2) Confronter les perspectives “biologiques” de causalité du cancer avec les théories et concepts de causalité issus de la philosophie
- (3) Identifier les concepts et outils qui peuvent être utiles pour illuminer divers aspects de causalité dans le cadre du cancer
- (4) Conceptualiser et redéfinir les relations causales dans le micro-environnement tumoral (TME) en tenant compte du micro-environnement de la tumeur et en utilisant des outils adaptés (diagrammes de cheminement causal (DAG), modèles d'équations structurelles (SEM), probabilités conditionnelles, simulations d'estimation des coefficients de voie, etc.)

¹⁹ Pradeu T, Lemoine M, Khelfaoui M, Gingras Y (2024) Philosophy in Science : Can Philosophers of Science Permeate through Science and Produce Scientific Knowledge? The British Journal for the Philosophy of Science 75 :375–416.

²⁰ Perets EA. What Would It Take to Put a Philosopher in Every Scientific Laboratory? In: Hyun I, Lunshof JE (eds) Human Brain Organoid s: Scientific and Ethical Considerations. Springer Nature Switzerland, Cham, 2024 pp 71–94.

²¹ Laplane L. PhiLabo : la philosophie dans le laboratoire. Critique, 2025, 935 :48–61.

- (5) Réaliser des études de cas de travaux scientifiques et analyser la causalité à l'aide d'outils adaptés (DAG, SEM, probabilités conditionnelles, simulations, estimation des coefficients de voie, etc.)
- (6) Évaluer l'impact de ces analyses sur la recherche en oncologie et la pratique médicale

1.3.2 Approche méthodologique et conceptuelle

Dans la **Partie II**, je discuterai les concepts théoriques concernant les mécanismes biologiques des cancers d'un point-de-vue de leur évolution historique en relation avec la dépendance de ces concepts aux facteurs micro-environnementaux dans le contexte de la causalité.

J'aborderai ensuite les concepts théoriques généraux concernant les mécanismes biologiques des cancers et leur lien à la causalité. Ceci inclut une discussion critique sur le pouvoir explicatif et la pertinence des « *Hallmarks* » du cancer comme cadre causal (**Partie III**)^{22, 23,24}. En dehors de leurs mérites, les limites heuristiques des « *Hallmarks* » seront ici démontrées.

Dans la **Partie IV**, deux visions opposées de la causalité du cancer sont exposées et discutées : l'une centrée sur la cellule tumorale, l'autre sur le micro-environnement. Les limitations des versions extrêmes (*Somatic mutation Theory*, SMT pour théories centrées sur la cellule tumorale ; *Tissue Field Organization Theory*, TOFT pour la version extrême de la position micro-environnementale) sont ensuite analysées en détail et leur insuffisance comme cadre théorique causal démontré.

Dans la **Partie V**, je résumerai ensuite les différents concepts philosophiques de causalité et discuterai leur utilité en tant que cadre explicatif dans le contexte du cancer. J'identifierai des éléments de ces concepts qui pourront être utilisés dans le cadre de ce travail. Je confronterai aussi les concepts de causalité dans la littérature philosophique et biomédicale.

Dans la **Partie VI**, des travaux scientifiques concrets sont d'abord exposés puis confrontés à l'analyse causale²⁵. Dans ce but, deux types de tumeurs sont choisis ayant un comportement biologique totalement différent reflétant l'hétérogénéité et la variabilité causale du TME. L'une présente seulement un développement locorégional, les gliomes diffus (Prototype I) et l'autre est une tumeur qui dissémine à distance et présente donc un pouvoir métastatique, le cancer du rein (Prototypes II). J'utiliserai, à cette fin, des travaux issus de mes propres recherches. Ces exemples illustreront les différents scénarios causaux et leur complexité. Ces relations causales

²² Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 2000, 100 (1): 57 – 70.

²³ Hanahan D, Robert A Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation *Cell*, 2011 Mar 4;144(5):646-74.

²⁴ Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.*, 2022, 12(1): 31-46.

²⁵ Note : Certaines modélisations et équations ont été amendées et corrigées utilisant l'IA.

seront formalisées en utilisant des outils adaptés comme les graphiques acycliques (« *path diagrams* »), les coefficients de voie (« *path coefficient* ») ou fromage causal (« *causal Pies* » etc.). Différents scénarios que nous appelons « différents mondes » seront construits. Ceux-ci représentent des scénarios comportant différentes combinaisons d'interactions entre les variables auparavant définies. Ces « mondes » seront corrigés, si possible, par des données venant du monde réel. Dans la **Partie VII**, j'aborderai la signification de mes analyses pour la recherche biomédicale, et en proposant que tout article scientifique doive comporter à la fin de l'article un chapitre contenant une analyse causale. Par ailleurs, la pratique clinique et thérapeutique représente une sorte d'approche de causalité interventionniste, car elle agit, au moins en ce qui concerne la thérapie ciblée, au niveau d'un nœud causal spécifique. Cette partie est suivie par une conclusion (**Partie VIII**) et des annexes (**Partie IX**).

2. Le chemin vers la compréhension causale du cancer : Chronologie et évolution des différentes théories

2.1 Théories anciennes

Différentes théories biologiques de la carcinogenèse ont été proposées dans le passé. Dans l'antiquité puis au Moyen Âge (Aglançon, Galien), le foie produit de la bile noire au lieu du sang lorsque sa température s'élève. La rate étant incapable de résorber l'excès de bile, le sang s'épaissit, se trouble, et sa stagnation dans un organe quelconque entraîne le développement de la maladie néoplasique. Le processus tumoral devient la conséquence directe d'un excès de bile noire, laquelle se solidifie à l'endroit où doit apparaître la maladie. Les hémorroïdes, l'absence de menstruations sont considérées comme des facteurs favorisant la rétention d'atrabile et donc la genèse de la tumeur.

2.2 Théorie lymphatique

On croyait que la vie consistait en un mouvement continu et approprié des parties fluides du corps à travers les parties solides. De tous les fluides, le sang et la lymphe étaient considérés comme les plus importants. La théorie lymphatique est juste une version modifiée de la théorie humorale dans laquelle la lymphe joue un rôle prédominant. Stahl et Hoffman ²⁶ pensaient que le cancer était composé de lymphe, mais une lymphe dont la qualité a été modifiée par fermentation conduisant à la modification de la densité et de l'acidité puis à la dégénérescence. Au 17^e et 18^e siècle, la théorie lymphatique du cancer était largement diffusée et a obtenu le soutien du chirurgien écossais, John Hunter²⁷. Par ailleurs, Broca a décrit l'invasion des lymphatiques péritumorales par des cellules tumorales ²⁸.

2.3 Théorie du Blastème

En 1838, le pathologiste allemand Johannes Muller a démontré que le cancer est constitué de cellules et non de lymphe, mais il pensait que les cellules cancéreuses ne provenaient pas des cellules normales ²⁹. Muller a proposé que les cellules cancéreuses se développent à partir

²⁶ Morton LT and Moore RJ. A Chronology of Medicine and Related Sciences. Aldershot, England: Scholar Press, 1997.

²⁷ Olson JS. The History of Cancer: An Annotated Bibliography. Ed: Greenwood, Publication date: June 26, 1989, 434 pages, ISBN-10 : 0313258899.

²⁸ Broca P, Traité des tumeurs 1866-1869P. Asselin, Paris, 1866-18.

²⁹ Howard W. Haggard and G. M. Smith. Johannes Müller and the Modern Conception of Cancer. Yale J Biol Med. May 1938; 10(5): 419-436.

d'éléments secondaires (blastème) présents dans les tissus normaux. Rudolph Virchow (1821-1902) a déterminé que toutes les cellules, y compris les cellules cancéreuses, sont dérivées d'autres cellules ³⁰.

2.4 Théories parasitaires, infectieuses et virales

Au 19^e et au début du 20^e siècle, de nombreuses observations font état de la présence de micro-organismes au sein des tissus tumoraux et sont à l'origine de théories dites « infectieuses » du cancer. Les travaux de Fibiger marquent l'apogée de ce courant ³¹. Selon les résultats qu'il a publiés en 1913, ce pathologiste danois aurait obtenu expérimentalement chez le rat des tumeurs gastriques malignes à l'aide d'une alimentation parasitée par un nématode, le *Spiroptera Neoplástica*. Le prix Nobel de médecine lui est décerné en 1927. Mais personne n'avait pu reproduire ses expériences, et la théorie parasitaire de la carcinogenèse a été rapidement abandonnée. Cependant, plus récemment, un lien avec les agents infectieux et le cancer a été proposé par la découverte du rôle du microbiote et la détection d'agents infectieux au sein des tumeurs (bactéries, levures, etc.). Ce microbiote semble agir au sein de la tumeur (microbiote local) ou à distance de la tumeur (microbiote à action distale)^{32 33}. De même, des levures ont été détectées dans les tumeurs³⁴. Ce microbiote pourrait agir de différentes manières soit en stimulant l'inflammation et/ou immunité protumorale, soit en produisant des facteurs stimulateurs de l'angiogenèse comme l'homologue du VEGF qui a été décrit comme étant présent dans les bactéries. Par ailleurs, la colonisation bactérienne pourrait créer un micro-environnement favorable à la réponse à l'immunothérapie³⁵. Mais le problème est la pléthore des agents microbiotiques décrits, ce qui pose le problème du rôle causal qui, à mon avis, n'est pas clairement établi.

La théorie virale du cancer a été le cheval de bataille de l'ère Nixon, elle n'a abouti qu'à la découverte de la famille des rétrovirus du SIDA (HTLV1 etc.) et de certains leucémies et

³⁰ David H. Rudolf Virchow and modern aspects of tumor pathology. Path. Res. Pract. 1988, 183: 356-364.

³¹ Fibiger J. Investigations on Spiroptera carcinoma and the experimental induction of cancer Nobel Lecture, December 12, 1927 <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/fibiger-lecture.pdf>.

³² Roje B, Zhang B, Mastroilli E, Kovačić A, Sušak L, Ljubenkov I, Čosić E, Vilović K, Meštrović A, Vukovac EL, Bučević-Popović V, Puljiz Ž, Karaman I, Terzić J, Zimmermann M. Gut microbiota carcinogen metabolism causes distal tissue tumors. Nature. 2024, 632(8027):1137-1144.

³³ Galeano Niño JL, Wu H, LaCourse KD, Kempchinsky AG, Baryames A, Barber B, Futran N, Houlton J, Sather C, Sicinska E, Taylor A, Minot SS, Johnston CD, Bullman S. Effect of the intratumoral microbiota on spatial and cellular heterogeneity in cancer. Nature. 2022, 611(7937):810-817.

³⁴ Roje B, Zhang B, Mastroilli E, Kovačić A, Sušak L, Ljubenkov I, Čosić E, Vilović K, Meštrović A, Vukovac EL, Bučević-Popović V, Puljiz Ž, Karaman I, Terzić J, Zimmermann M. The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL. Nature, 2019, 574 (7777): 264-267.

³⁵ Lim SK, Lin WC, Huang SW, Pan YC, Hu CW, Mou CY, Hu CMJ. Bacteria colonization in tumor microenvironment creates a favorable niche for immunogenic chemotherapy. EMBO Mol Med, 2024, 16: 416 - 428.

lymphomes (« T-cell leukemia/lymphoma ») géographiquement fréquents comme dans des régions spécifiques du Japon (Kyushu)³⁶. D'une manière indirecte, cela a abouti à la découverte des oncogènes comme src, ras, et caetera, et paradoxalement cela a conduit à renforcer les théories génétiques (plutôt qu'infectieuses) à appuyer les théories génétiques du développement tumoral³⁷.

2.5 Génétique tumorale et oncogènes

Theodore Boveri fut le premier à formuler clairement le paradigme génétique du cancer³⁸.

Boveri a suggéré que la perte de facteurs clés inhibiteurs (qui représentent en fait des gènes suppresseurs de la tumeur) serait l'un des événements déclencheurs dans le développement du cancer. Par ailleurs, il a suggéré que l'hérédité jouerait un rôle dans la susceptibilité de développer un cancer. Il a également postulé que l'instabilité chromosomique (génomique) serait une caractéristique décisive du cancer. Par ailleurs, il a suggéré que l'information génétique pourrait être contenue dans des particules distinctes (gènes) qui sont disposés linéairement le long des chromosomes. Boveri proposait que le cancer prenait son origine d'une seule cellule, ce qui anticipait en quelque sorte le concept de monoclonalité dans la genèse du cancer³⁹.

La découverte des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs a révolutionné la compréhension de la genèse des cancers à la fois du point de vue initiation tumorale et au niveau de la progression²⁴. Les oncogènes sont des homologues de gènes cellulaires mutés ou altérés par recombinaison ou délétion de domaines de modules de régulation cellulaire se situant à différents niveaux de la chaîne de signalisation comme l'oncogène ras ou la forme tronquée du récepteur à l'EGF (EGFRVI). L'Équipe de Robert Weinberg a montré qu'il fallait la combinaison de deux oncogènes pour aboutir à la transformation cellulaire⁴⁰. Le rôle essentiel des gènes suppresseurs de tumeurs est démontré par le gène RB dans le rétinoblastome et par P53 dans les tumeurs de Wilms ou le syndrome de Li-Fraumeni, dont les formes mutées perdent leur capacité de répression. Le concept de carcinogenèse « multi-étapes » (i.e. le cancer du côlon, tumeurs cérébrales ...) définit une séquence de multiples événements séquentiels contribuant à la

³⁶ Bangham CRM. HTLV-1 persistence and the oncogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2023, 141(19):2299-2306.

³⁷ Bister K. Discovery of oncogenes: The advent of molecular cancer research. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 112(50): 15259–15260.

³⁸ Boveri T. *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren* [Concerning the Origin of Malignant Tumours] 1914, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2008, 82 pages, ISBN-10 : 0879697881.

³⁹ Hansford S, Huntsman D.G. Boveri at 100: Theodor Boveri and genetic predisposition to cancer. *J Pathol.*, 2014, 234(2):142-5.

⁴⁰ Hartmut Land, Luis F. Parada & Robert A. Weinberg Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 1983, 304: 596–602.

transformation complète et à la progression tumorale⁴¹. Le concept que la génétique tumorale est le promoteur clé du développement tumoral, est renforcé par des concepts évolutionnistes du développement tumoral comme le concept de compétition clonale (voir aussi plus loin dans la discussion)⁴². Dans ce cas, l'environnement tumoral a seulement un rôle accessoire de « *bystander* », et est donc exclu de la causalité du cancer. On peut aussi voir, dans ce cas, l'environnement tumoral comme une variable confondante qu'il faut identifier et contrôler, mais il ne fait pas partie de la chaîne causale.

2.6 Théories du micro-environnement tumoral

L'affirmation que le micro-environnement dans la tumeur joue un rôle dans le contrôle du développement tumoral est dérivée de trois champs différents de recherche : l'angiogenèse, la matrice extracellulaire, et le système immunitaire. L'angiogenèse tumorale a pris une importance comme cadre conceptuel d'explication de la progression tumorale avec les travaux originaux de Juda Folkman et la découverte des facteurs angiogéniques, du switch angiogénique et des inhibiteurs/modulateurs de l'angiogenèse tumorale⁴³. L'hypothèse centrale a été qu'une tumeur (solide) ne pourrait pas progresser sans l'activation de l'angiogenèse et restera donc à un état dormant⁴⁴. La sortie de l'état dormant est effectuée soit par une activation de la production de facteurs angiogéniques, soit par une perte d'inhibiteurs, soit par les deux. L'ensemble est la conséquence d'un commutateur (« switch ») angiogénique qui déclencherait ces événements pour aboutir à la progression tumorale. Le rôle de la vascularisation a été aussi renforcé par le concept de la cooption vasculaire par les cellules tumorales⁴⁵. Dans ce contexte, les vaisseaux préexistants sont non seulement un terrain pour la formation des niches tumorales, mais représentent aussi des voies sur lesquelles les cellules tumorales migrent pour envahir les tissus sains environnants. La cooption semble avoir une relation inversée avec l'angiogenèse et semble participer à la résistance thérapeutique⁴⁶. Si l'angiogenèse est inhibée, la cellule tumorale cherche une voie de contournement et s'engage donc dans le processus de cooption vasculaire³².

⁴¹ Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.*, 1993, 9(4):138-41.

⁴² Herms A, Fernandez-Antoran D, Alcolea MP, Kalogeropoulou A, Banerjee U, Piedrafita G, Abby E, Valverde-Lopez JA, Ferreira IS, Casada I, Bejar MT, Dentro SC, Vidal-Notari S, Ong SH, Colom B, Murai K, King C, Mahbubani K, Saeb-Parsy K, Lowe AR, Gerstung M, Jones PH. Self-sustaining long-term 3D epithelioid cultures reveal drivers of clonal expansion in esophageal epithelium. *Nat Genet.* 2024, 56(10): 2158-2173.

⁴³ Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971 Nov 18;285(21):1182-6.

⁴⁴ Indraccolo S, Laura Stievano L, Minuzzo S, Amadori A. Interruption of tumor dormancy by a transient angiogenic burst within the tumor microenvironment. *Proc Natl Acad Sci.*, 2006, 103 (11): 4216-4221.

⁴⁵ Seano, G., Jain, R.K. Vessel co-option in glioblastoma: emerging insights and opportunities. *Angiogenesis*, 2020, 23: 9–16.

⁴⁶ Pichol-Thievent, C., Anezo, O., Pettiwala, A.M. *et al.* VC-resist glioblastoma cell state: vessel co-option as a key driver of chemoradiation resistance. *Nat Commun*, 2024, 15: 3602.

Ce concept a été le terrain fécond pour une pléthore de travaux établissant le rôle de la vascularisation dans la progression tumorale. Néanmoins, les études cliniques utilisant des inhibiteurs de l'angiogenèse ont été décevantes, car uniquement probantes dans quelques types de tumeurs avec une réponse thérapeutique hétérogène dans les cohortes de patients. Ceci a donc diminué l'importance de l'angiogenèse comme paradigme de la progression du cancer.

La lymphangiogenèse est à rapprocher de l'angiogenèse proprement dite. Le système lymphatique est un système ouvert qui sert à drainer le fluide interstitiel et les cellules immunitaires de l'espace extracellulaire. Il a été clairement montré que la dissémination métastatique dépend de l'étendue de la pénétration lymphatique comme cela a été montré pour le mélanome⁴⁷. La lymphangiogenèse est donc une variable causale pour la dissémination métastatique. Un autre type de vaisseau a une relation étroite avec le système immunitaire. Il s'agit des vaisseaux HEV (« *high endothelial venules* »)⁴⁸. Ces vaisseaux permettent la pénétration des cellules immunitaires dans la tumeur et contribuent principalement à l'immunité antitumorale par l'influx de cellules T8 cytotoxiques. Les HEV ont aussi une relation étroite avec les autres composantes du système vasculaire et notamment avec le système lymphatique.

La matrice extracellulaire est composée de divers constituants qui incluent notamment diverses isoformes de collagène (type I, IV, etc.), de fibronectine et la laminine. Cette matrice est à la fois un support structural, en tant que réservoir de facteurs morphogéniques, mais peut aussi directement influencer la signalisation cellulaire. La matrice exerce des forces physiques au niveau cellulaire qui participe à la « *tensegrity* »⁴⁹. D'autre part, la matrice peut stocker et libérer des facteurs de croissance comme le facteur de croissance des fibroblastes ou le « *Transforming growth factor- β* » (TGF β) qui ont une action morphogénique importante⁵⁰. Finalement, la matrice peut induire une signalisation cellulaire comme c'est le cas pour la laminine et la fibronectine et leur interaction avec les intégrines⁵¹. Ces dernières représentent des modules d'adhésion localisés à la surface cellulaire.

⁴⁷ Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, Ellwanger U, Garbe C, Mihm MC, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol.* 2003, 162(6):1951-60.

⁴⁸ Vella G, Hua Y, Bergers G, High endothelial venules in cancer: Regulation, function, and therapeutic implication, *Cancer Cell*, 2023, 41(3): 527-545.

⁴⁹ Ingber DE, Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2008, 97 (2-3): 163-179.

⁵⁰ Broekelmann, Thomas J. et al. Identification of the growth factor-binding sequence in the extracellular matrix protein MAGP-1 *J Biol Chem*, 2020, 295(9): 2687–2697.

⁵¹ Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R, Laminin-induced signaling in tumor cells, *Cancer Let*, 2005, 223(1): 1- 10.

Par ailleurs, le système immunitaire est un constituant essentiel du TME⁵². En général, l'immunité innée et adaptative est présente dans le TME, mais à des degrés variables. Certains types tumoraux (p.ex. carcinome colique, mélanome, etc.) ont une immunité adaptative importante, tandis que d'autres types tumoraux (p.ex. gliomes) ont une immunité adaptative réduite et possèdent surtout une immunité innée. Ces différences entre types tumoraux sont aussi conservées si le contexte tissulaire change. Par exemple, les lésions métastatiques cérébrales des mélanomes gardent toujours une immunité adaptative significative, tandis que certaines formes de tumeurs primitives du cerveau (p.ex. gliomes diffus) ont une immunité adaptative très diminuée (gliomes diffus IDH1/2 WT) voir éteinte (gliomes diffus IDH1/2 mutés), et sont donc essentiellement décorées d'une immunité innée⁵³. Par ailleurs, un sous-groupe de patients, avec des métastases cérébrales, présente une infiltration de cellules T potentiellement hautement réactives envers les cellules tumorales (pTRT)⁴⁰. Ceci montre donc qu'il y a dominance du tissu tumoral par rapport au tissu sain environnant qui dicte donc au TME la nature du répertoire immunitaire local. Cependant, quand on implante des cellules de gliomes au niveau du tissu sous-cutané l'immunité adaptative est de nouveau plus importante. Ceci indique qu'il y a un facteur confondant qui est probablement constitué d'éléments matriciels.

2.7 Plasticité phénotypique/souche

Les cellules tumorales ne sont pas identiques pour une tumeur donnée et présentent des hétérogénéités en fonction du sous-type tumoral, au niveau de l'identité tumorale ou au niveau locorégional. Ceci est très bien illustré dans le cas des glioblastomes. Le premier point est l'hétérogénéité transcriptionnelle qui permet de distinguer les GB en quatre types⁵⁴. Le deuxième est l'hétérogénéité pour une tumeur GB donnée, mise en évidence par séquençage sur cellule unique avec également quatre sous-types (« *Astocytic like* », « *Oligodendocytic like* », ...), ce qui permet une plasticité au cours de l'évolution tumorale⁵⁵. Le troisième est locorégional entraînant une hétérogénéité spatiale. Ceci constitue un ensemble métastable gravitant autour du phénotype souche et des « *attractor states* »⁵⁶.

⁵² Binnewies, M., Roberts, E.W., Kersten, K. et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med.* 2018, 24:541–550.

⁵³ Wischniewski, V., Maas, R.R., Aruffo, P.G. et al. Phenotypic diversity of T cells in human primary and metastatic brain tumors revealed by multiomic interrogation. *Nat Cancer*, 2023, 4: 908–924.

⁵⁴ Verhaak, Roel G.W. et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 2010, 17(1): 98–110.

⁵⁵ Neftel, C et al. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma, *Cell*, 2019, 178(4): 835–849.e21.

⁵⁶ Prager BC, Bhargava S, Mahadev V, Hubert CG, Rich JN. Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. *Trends Cancer*. 2020, 6(3):223–235.

Cela a des conséquences pour la causalité de ces différents sous-types, car cela implique que les facteurs causaux (« réseaux causaux ») soient distincts pour ces différents états phénotypiques de plasticité. Par ailleurs, les facteurs causaux qui poussent les cellules dans ces différents états (« *attractor states* ») ne sont pas connus.

2.8 Analyse critique de l'évolution des différentes théories biologiques du cancer

Les causes du cancer ont été différemment appréhendées au cours de l'histoire des connaissances. Les théories anciennes voyaient un déséquilibre du milieu interne (une sorte de macro-environnement tumoral) comme agent causal. Dans la théorie lymphatique, la qualité de la lymphe (ici acidité) jouait un rôle causal direct en induisant la transformation tumorale. Ces deux théories sont à rapprocher des théories modernes proposant un rôle décisif du macro et micro-environnement, représentant ainsi une sorte de précurseur ancestral de ces dernières, même si ces théories sont conceptuellement erronées.

Avec l'avancée des sciences biologiques, la compréhension du cancer a évolué vers des modèles plus intégrés et complexes. À partir du postulat de Bovari, les recherches sur la génétique des tumeurs — incluant mutations, oncogènes, gènes suppresseurs de tumeur et le concept de carcinogenèse multiétape — ont mis en évidence l'importance des cellules tumorales dans le développement du cancer⁵⁷. La suprématie est donnée dans ce cas aux événements localisés dans la cellule tumorale où l'environnement ne jouerait qu'un rôle passif de support. La causalité est donc ici inversée et restreinte très étroitement. Ceci a contribué à une vision réductionniste de la causalité du cancer, car ancrant cette causalité uniquement dans la cellule tumorale. Cependant, les recherches sur le rôle de la vascularisation, de la matrice extracellulaire et du système immunitaire ont ouvert la voie à une réévaluation du rôle de l'environnement tumoral⁵⁸. Au début, la validité de ces recherches a été cependant contestée. Loin d'être de simples spectateurs passifs, l'environnement tumoral interagit activement avec les cellules cancéreuses, influençant ainsi leur croissance, leur capacité à envahir et même leur réponse aux traitements. Ces axes de recherche (vascularisation, matrice et système immunitaire) présentaient chacun une vue très réductionniste, car la primauté mécanistique était centrée sur chacun d'entre eux

⁵⁷ Chaffer CL, Weinberg RA. How does multistep tumorigenesis really proceed ? Cancer Discov. 2015, 5(1) :22-4. Doi : 10.1158/2159-8290.CD-14-0788.

⁵⁸ Rondeau E, Larmonier N, Pradeu T, Bikfalvi A. Characterizing causality in cancer. Elife. 2019, 8 : e53755.

indépendamment. Ceci a contribué à une complexification causale du cancer qui, néanmoins, possède un fort caractère réductionniste.

Les théories parasitaires et infectieuses ont été en vogue pendant un certain temps, puis abandonnées, mais finalement redécouvertes à l'époque actuelle (en tout cas pour les microbes et levures). Elles font partie également de la causalité micro-environnementale, mais dans ce cas leur rôle n'est pas initiateur, mais seulement promoteur. Dans le langage philosophique, un promoteur correspond à une condition par distinct de la causalité (cf. la discussion au chapitre 5.3. 2, section : (3) Idée de la granulation de la causalité et du contexte causal).

Les différentes caractéristiques (centrées sur la cellule tumorale ou le TME) ont été néanmoins intégrées dans les « Hallmarks » du cancer, ce que nous verrons en détail dans le **chapitre III**. Ces « Hallmarks » font donc une synthèse entre les facteurs génétiques et environnementaux sans pour autant les articuler véritablement par des liens de causalité. La dichotomie entre la théorie somatique mutationnelle (SMT) forte et un micro-environnement tumoral (TME) fort persiste à ce jour, car les différents programmes de recherche s'orientent dans des directions divergentes et évoluent donc dans des mondes séparés. Les « Hallmarks » ont essayé de concilier ces deux visions semblant incompatibles sans vraiment y parvenir, car elles ne sont pas réellement articulées dans des séquences causales. Cependant, si on donne une valeur causale identique à ces programmes divergents sans tenir compte de leur interpénétration véritable, nous sommes amenés à postuler un pluralisme causal composé de différentes strates à pouvoir explicatif (« *explanandum/explanans* ») identique (voir plus loin pour la discussion). Même à l'intérieur du cadre conceptuel « TME », il y a des directions de recherche divergentes, qui toutes ont postulé un « *explanandum/explanans* » cohérent de la progression du cancer. Par conséquent, la dispersion causale devient encore plus flagrante.

Ceci est discuté plus spécifiquement dans le **chapitre III**. Nous allons discuter dans le chapitre suivant les « Hallmarks » du cancer comme proposés par Robert Weinberg et Douglas Hanahan dans des publications entre 2000 et 2022^{59 60 61}. Les « Hallmarks du cancer » ont tenté de synthétiser ces différents aspects. Leurs « piliers » conceptuels offrent une vision globale intégrant les interactions entre facteurs génétiques et environnementaux, bien que les liens de causalité entre ces deux domaines restent encore partiellement élucidés. Ce cadre théorique met

⁵⁹ Hanahan, D, Weinberg RA, The Hallmarks of Cancer. Cell, 2000, 100(1): 57 – 70.

⁶⁰ Hanahan D, Robert A Weinberg RA, Hallmarks of cancer: the next generation Cell, 2011, 144(5):646-74.

⁶¹ Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discov., 2022, 12(1):31-46.

en lumière la complexité du cancer, tout en inspirant de nouvelles approches pour son traitement, notamment en ciblant à la fois les mécanismes cellulaires intrinsèques et les dynamiques du micro-environnement tumoral.

Ainsi, les théories anciennes et modernes de la causalité du cancer, bien que différentes dans leur approche et de leur véracité, oscillent entre la dépendance à l'environnement et l'idée plus centrée sur la cellule tumorale. La dépendance (micro) environnementale était soulignée dans les théories anciennes, puis au fur et à mesure abandonnée pour être remplacée par des théories causales centrées sur la cellule tumorale. Finalement, depuis le 20^e siècle, on assiste à un retour de l'environnement, puis à une synthèse entre ces deux cadres explicatifs du cancer. Ceci a amené une complexité causale qui conduit à la nécessité d'une recherche interdisciplinaire pour relever les défis qu'il pose.

Dans le chapitre suivant, nous discuterons d'abord les « Hallmarks » du cancer et ensuite l'opposition entre les deux cadres causaux déjà mentionnés : la théorie tumeur centrée appelée « *somatic-mutation theory* » (SMT) et la théorie micro-environnement-centrée appelée « *Tissue organization field theory* » (TOFT).

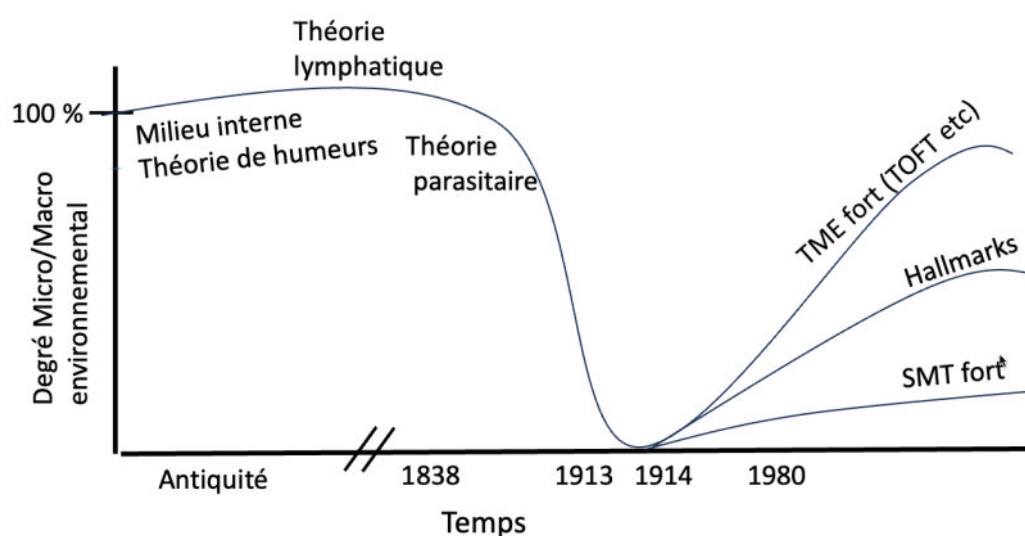


Fig. 3 : Schéma de l'évolution historique des concepts de causalité du cancer. Depuis l'antiquité, l'attention était portée sur des facteurs externes de la tumeur (le concept de cellule n'a pas encore été formulé). Au début du 20^e siècle, l'attention s'était tournée vers la cellule tumorale elle-même et sa génétique et l'environnement tumoral était regardé comme passif. Cependant entre 1920 à 1980, certains laboratoires commençaient à regarder de nouveau l'environnement tumoral, même si les concepts génétiques étaient le paradigme dominant et a été appuyé par de nombreuses recherches. Ceci a été facilité par la découverte des facteurs de croissance (EGF, NGF, FGF, PDGF etc..), l'identification des différentes composantes stromales aboutissent à l'émergence de trois sous-domaines : l'angiogenèse tumorale, théorie matricielle (matrice extracellulaire) du cancer et l'immunité tumorale. Cependant, la « trichotomie » entre SMT forte, « Hallmarks » et TME fort persiste à ce jour, car les différents programmes de recherche s'orientent dans des directions divergentes et évoluent donc dans des mondes séparés. Si on donne une valeur causale identique à ces 3 programmes, on est amené à postuler un pluralisme causal (voir plus loin pour la discussion).

3. Concepts théoriques généraux concernant les mécanismes biologiques des cancers et leur lien à la causalité

3.1. Les « Hallmarks » du cancer et leur niveau explicatif

La recherche sur le cancer a subi des bouleversements fulgurants dans les 40 dernières années. Pendant longtemps, le processus tumoral a été décrit comme un processus cellulaire autonome intrinsèque à la cellule cancéreuse qui a gagné son indépendance par rapport aux interactions avec l'environnement tissulaire normal. Cependant, de plus en plus d'études ont montré que le développement du cancer dépend de changements dans les interactions hétérotypiques entre les cellules tumorales naissantes et leurs voisines normales⁶². Ces bouleversements conceptuels sont dus à la découverte que des facteurs produits par les cellules tumorales pouvaient induire des modifications du TME qui, à leur tour, avaient un effet de régulateur sur la cellule tumorale. Ceci représente donc non seulement une complexification des régulations dans le tissu tumoral, mais constitue une véritable révolution « copernicienne » dans la compréhension du cancer. Un exemple « princeps » est la découverte que la vascularisation jouerait un rôle important dans le développement des cancers. En effet, Judah Folkman et d'autres ont montré que la vascularisation était importante pour l'expansion tumorale et qu'il y avait une phase préangiogénique comportant des cellules dormantes et angiogéniques qui représenterait la phase active de la croissance tumorale⁶³. Des facteurs solubles ainsi que leurs récepteurs furent identifiés, et il a été démontré qu'ils jouaient un rôle clé dans l'angiogenèse des tumeurs (VEGF, VEGFR1,2, etc.)⁶⁴. Ceci a permis d'ouvrir un nouveau champ d'études du cancer « l'angiogenèse tumorale ». Par la suite, d'autres composantes cellulaires et facteurs impliqués dans l'interaction entre la cellule tumorale et le microenvironnement (macrophages, cellules immunitaires, fibroblastes et d'autres cellules de support) ont été identifiés⁶⁵. Par ailleurs, des événements moléculaires dans la cellule tumorale non-suffisamment explorés comme l'apoptose, la transition épithélio-mésenchymateuse, le stress cellulaire ou l'autophagie se sont rajoutés à cette complexification pour la compréhension du cancer.

⁶² Laplane L, Duluc D, Larmonier N, Pradeu T, Bikfalvi A. The Multiple Layers of the Tumor Environment. *Trends Cancer*, 2018, 4(12) :802-809.

⁶³ Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.*, 1971, 285(21):1182-6.

⁶⁴ Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004, 25(4):581- 611.

⁶⁵ Karin E. de Visser, KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*, 2023, 41(3):374-403.

Pour unifier ces différents éléments, le concept des « Hallmarks du cancer » a été proposé par Douglas Hanahan et Robert Weinberg en 2000 ⁶⁶ et révisé deux fois en 2011⁶⁷ et 2022⁶⁸ dus à une complexité croissante. Ces « Hallmarks » incluent des événements moléculaires qui ont lieu dans la cellule tumorale, mais aussi dans l'environnement extracellulaire incluant les éléments de la matrice et les divers composants cellulaires.

3.2 « Hallmarks » 2 000

Les « Hallmarks » de 2 000⁴⁹ avaient mis l'accent sur une modification/complexification de la causalité du cancer : son développement dépend à la fois des altérations au sein de la cellule tumorale et des interactions hétérotypiques entre les cellules tumorales et leurs voisines normales et leur modulation. Cette reconceptualisation a entraîné une modification du paradigme du développement des cancers avec d'importantes conséquences pour la recherche expérimentale sur la biologie du cancer. Ceci a conduit à des approches plus intégrées *in vitro* et *in vivo* comme les organoïdes, de culture d'organes hétérotypiques et de modèles animaux génétiquement modifiés de plus en plus complexes.

Les « Hallmarks » représentent en fait des facteurs causaux du développement tumoral. Dans la version initiale de 2 000 des « Hallmarks », les variables causales intervenantes étaient plus réduites et comportaient seulement six : « évitement de l'apoptose », « autonomie pour la signalisation (croissance) », « désensibilisation aux facteurs inhibiteurs », « stimulation de l'angiogenèse », « invasion et métastase » (Figure 4). Il a été aussi proposé que les différents “Hallmarks” étaient actionnés d'une manière séquentielle.

⁶⁶ Hanahan, D, Weinberg RA, The Hallmarks of Cancer. Cell, 2000, 100(1): 57–70.

⁶⁷ Hanahan D, Weinberg RA, Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 2011, 144(5):646-74.

⁶⁸ Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discov., 2022, 12(1):31-46.

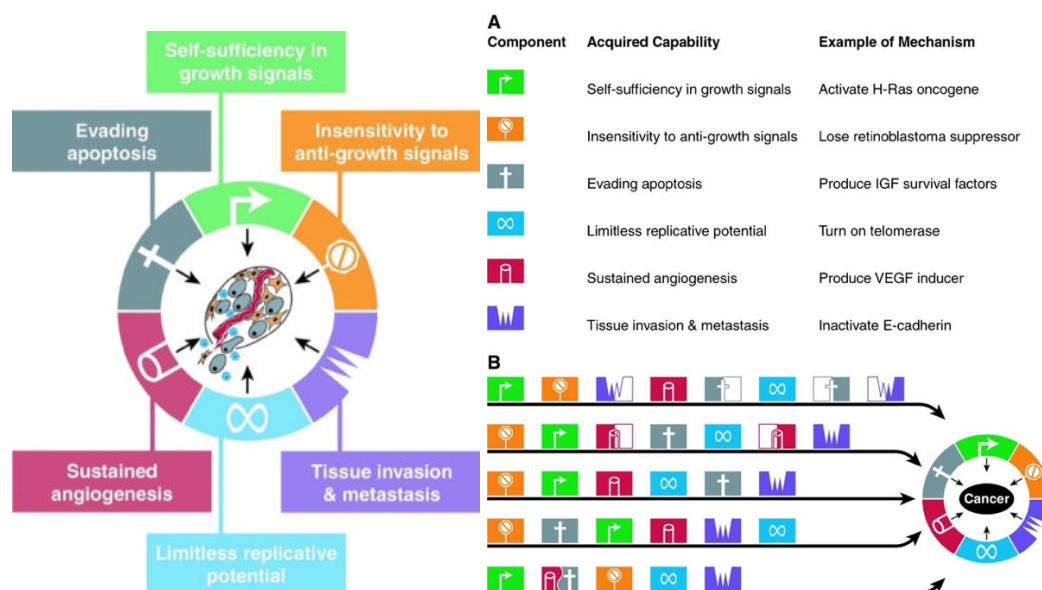


Fig. 4 : Components des « Hallmarks ». Initialement, l'existence de 6 composants/événements a été postulé (Fig.4A). Ces différents composants pourraient intervenir d'une manière séquentielle de 5 manières différentes (Fig.4B). Cependant, d'autres combinaisons additionnelles sont possibles. Par ailleurs, la trajectoire et la cinétique de ces « événements » sont aussi à considérer, mais cela échappe pour l'instant aux investigations (Figure de Hanahan et Weinberg, 2000). Permission de reproduire : Copyright Clearance Center.

Les auteurs des « Hallmarks » 2000 avaient spéculé que les nouveaux systèmes expérimentaux aideront à l'avenir à cartographier complètement les réseaux de signalisation dans le cancer incluant tous les signaux échangés entre les différents types de cellules du TME. Cependant, toutes les approches proposées, même en intégrant des composantes du TME, ont un caractère réductionniste qui est difficilement compatible avec une connaissance pleinement intégrative du cancer.

La proposition des auteurs voulait les « Hallmarks » 2000 universels et de portée générale pouvant être appliquée à tous les types de cellules tumorales, car régis par un ensemble de règles communes. Mais cette ambition semblait démesurée en raison de la variabilité des cellules tumorales et du tissu hôte. Par ailleurs, les « Hallmarks » 2000 restent descriptifs et ne permettent pas une compréhension intégrative du cancer.

Par ailleurs, avec l'acquisition de connaissances nouvelles venant des sciences expérimentales, d'autres « Hallmarks » sont apparues, et l'importance de certains « Hallmarks » 2000 a été amoindrie (voir plus loin). Ceci indique que les concepts élaborés à une certaine période sont non seulement enrichis, mais ont une stabilité épistémique relative. Il y a donc une certaine fluidité de ces concepts car ceux-ci sont modulés, enrichis, modifiés et révisés successivement. Cela a entraîné une transformation du pouvoir explicatif vers la complexification, ce qui pointe vers la

direction opposée du rasoir d'Occam. Nous traiterons cet aspect plus en détail un peu plus loin dans le contexte du « développement des concepts » scientifique et leur relation avec la notion de vérité.

Par ailleurs, les auteurs des « Hallmarks 2000 » postulaient que la biologie du cancer, représentant actuellement un patchwork de biologie cellulaire, de génétique, d'histopathologie, de biochimie, d'immunologie et de pharmacologie, deviendrait une science avec une structure conceptuelle et une cohérence logique qui rivalisera avec celles de la chimie ou de la physique. À mon avis, nous en sommes encore très loin. Nous discuterons ce point à la fin de ce chapitre.

3.3 « Hallmarks » 2011

Les « Hallmarks » dans la version de 2011⁶⁹ ont été considérablement enrichies. Ce sont rajoutés les éléments suivants : la dérégulation du métabolisme énergétique, l'échappement des cellules tumorales du système immunitaire, la stimulation par l'inflammation et l'instabilité génétique. Au total, les composants sont de dix dans les « Hallmarks » 2011, et incluent maintenant : Signalisation soutenue de prolifération, échappement aux inhibiteurs, évitement de la destruction immunitaire, promotion de l'immortalisation répllicative, l'inflammation protumorale, activation de l'invasion et des métastases, induction de l'angiogenèse, instabilité génomique, résistance à la mort cellulaire, dérégulation du métabolisme.

Dans les « Hallmarks » 2011, le catalogue des modules moléculaires s'était donc grandement enrichi et est caractérisé par une amplification des réseaux moléculaires physiologiques avec des circuits, nœuds et branchements.

Les catégories conceptuelles (« Hallmarks » /Facilitateurs) ont été superposées à ces circuits et démarquent donc les territoires de régulation reliés à des caractéristiques phénotypiques. Il s'agit donc d'une forme de régionalisation ou segmentation qui tente d'associer des propriétés spécifiques à des circuits moléculaires distincts. Ceci ressemble en quelque sorte à des circuits électroniques compartimentés. Cependant, il n'y a pas de démarcation stricte entre ces territoires, et un circuit moléculaire peut être associé à différents propriétés/territoires (et *vice versa*). Il y a donc une certaine redondance à cet égard. On peut en donner quelques exemples. Des facteurs de croissance comme les facteurs de croissance des fibroblastes affectent la survie cellulaire, la prolifération et la migration cellulaire ⁷⁰. Ils jouent aussi un rôle important dans la maintenance

⁶⁹ Hanahan D., Weinberg RA, Hallmarks of cancer: the next generation Cell, 2011, 144(5):646-74.

⁷⁰ Ornitz DM, Nobuyuki Itoh N. New developments in the biology of fibroblast growth factors. Wires Mechanisms of Disease, 2022, 14(4): e1549.

de l'état de cellules souches. Des oncogènes comme la forme mutante de RAS et MYC ont un effet sur plusieurs caractéristiques incluant la signalisation proliférative, le métabolisme énergétique, l'angiogenèse, l'invasion et la survie cellulaire⁷¹. Cependant, il doit y avoir des relais supplémentaires qui dictent « l'orientation phénotypique » et confèrent donc une certaine orientation (p.ex. spécificité) du signal vers une propriété phénotypique donnée.

Il y a un point important qui concerne l'assemblage spatial des différents modules de signalisation et la distribution régionale au niveau cellulaire et tissulaire et l'activation de ces modules en fonction du temps (« Biologie temporo-spatiale »). Ceci sera discuté plus loin.

Les « Hallmarks » 2011 distinguent trois différents niveaux des composantes : Les « Hallmarks » établis, les « Hallmarks » en devenir (« *emerging Hallmarks* ») et les caractéristiques promotrices (« *enabling characteristics* »). La dernière distinction pourrait paraître superflue, car appartenant comme les autres composantes aux « Hallmarks » (voir la discussion à la fin de ce chapitre concernant causes et conditions facilitatrices).

Les Hallmarks 2011 distinguent aussi le stroma tissulaire normal, le stroma tumoral naissant, le stroma tumoral facilitateur, et ceci concerne à la fois les tumeurs primaires et les métastases. Cependant, elles ne font pas état du rôle des forces physiques exercées par des composantes matricielles (« *matrix stiffness* »).

⁷¹ Rak J et al. Oncogenes and Tumor Angiogenesis: Differential Modes of Vascular Endothelial Growth Factor Up-Regulation in ras-transformed Epithelial Cells and Fibroblasts. *Cancer Res.*, 2000, 60 (2): 490–498.

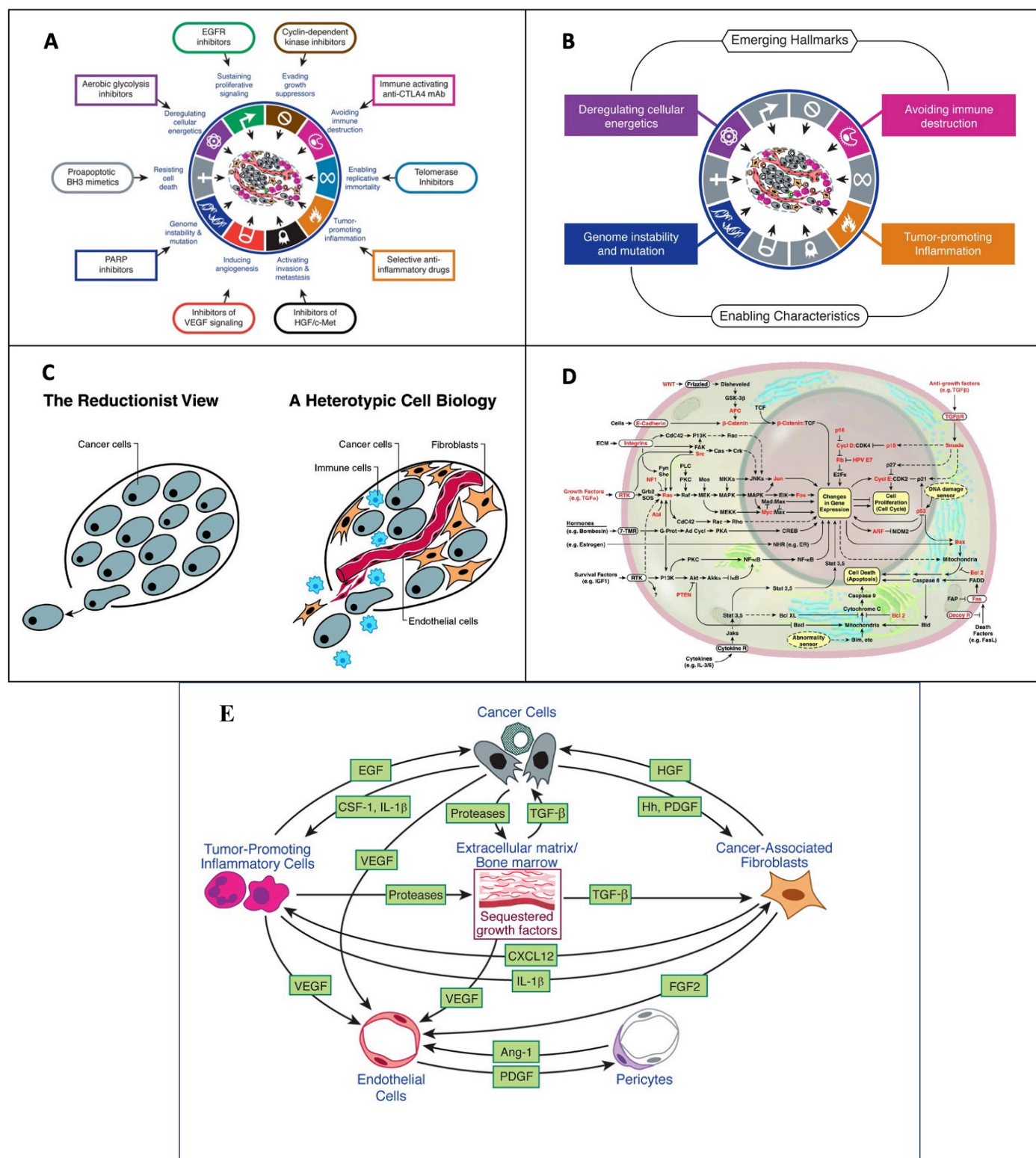


Fig. 5 : « Hallmarks » 2011. A, Caractéristiques « actionnables » du cancer et de son environnement. B, « Hallmarks » émergents et caractéristiques facilitatrices. C, Vision réductionniste et complexe du cancer. D, Voies moléculaires intracellulaires. E, Voies moléculaires impliquées dans la communication intercellulaire dans le TME (figure de Hanahan et Weinberg, 2011). Permission de reproduire : Copyright Clearance Center.

3.4 « Hallmarks » 2022

Les « Hallmarks » 2022, ont été publiés par Douglas Hanahan dans « Cancer Discovery » en 2022. Avant 2022, les composantes du cancer étaient de dix incluant six « Hallmarks », deux caractéristiques émergentes et deux caractéristiques facilitatrices. Les deux « caractéristiques émergentes » introduites en 2011 (« reprogrammation du métabolisme cellulaire » et « échappement à la destruction immunitaire ») sont considérées depuis 2022 comme « Hallmarks » à part entière. Le rôle des vaisseaux sanguins a été élargi aux vaisseaux préexistants qui sont cooptés par les cellules tumorales pour permettre l'émergence de la niche tumorale et l'invasion locorégionale. L'implication de la vascularisation dans le cancer est donc maintenant double, la formation de néovaisseaux (angiogenèse) et la cooption (émergence de la niche, voie pour l'invasion locorégionale).

L'inflammation protumorale » et « l'instabilité et la mutation du génome » ont été rajoutées car fondamentalement impliquées dans le développement et la progression tumorale. Sont également intégrés maintenant : « la modulation de la plasticité phénotypique », « la reprogrammation épigénétique non mutationnelle », « le microbiomes polymorphes » et « la senescence cellulaire ». La notion de « plasticité phénotypique » contient plusieurs événements : (i) la dédifférenciation des cellules matures en cellules progénitrices/souches, (ii) la différenciation terminale à partir des cellules progénitrices, et (iii) la transdifférenciation en différents types cellulaires. Ces trois modalités de différenciation aberrante font partie intégrante de la pathogenèse du cancer. L'altération du processus de différenciation normale des cellules progénitrices en cellules matures contribue à la plasticité cellulaire au cours du développement et de la progression tumorale.

On peut se demander comment les régulateurs de la plasticité sont liés aux autres régulateurs comme les oncogènes, les facteurs de croissance, les régulateurs de l'apoptose ou de l'autophagie par exemple. Il semble que les régulateurs de la plasticité cellulaire sont partiellement distincts de ces facteurs. Ces régulateurs sont associés aux stades « souche » ou progéniteurs observés dans le tissu normal correspondant. La perturbation de la différenciation reflète une variété de caractéristiques. Il peut s'agir d'un blocage de la différenciation comme observé dans les leucémies ou d'une réversion de l'état différencié à l'état souche. Les caractéristiques du blocage sont bien illustrées par la leucémie aiguë myéloïde (LAM), lymphoblastique (LAL) ou

promyélocytaire (LPM) ⁷². Dans ces cas, la prolifération n'est pas stimulée, mais le blocage de la différenciation a lieu à différents niveaux des voies de différenciation, soit précoce (LAM, LAL) ou plus tardive (LPM). Dans le cas de la dédifférenciation, celle-ci est plus observée dans les tumeurs solides. Il s'agit de l'acquisition d'un phénotype « Souche-like » qui a des caractéristiques de la transition épithélio-mésenchymateuse. Cela implique une activation des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT (Slg, Twist etc. ...). Par ailleurs, des résultats ont été publiés concernant la transdifférenciation des cellules cancéreuses en cellules du stroma tumorales ⁷³. Ceci a été publié pour les tumeurs cérébrales où la différenciation vers la lignée endothéliale ou péricytaire a été observée. Une forme de plasticité est le « *senescence associated secretory phenotype* » (SASP) qui peut avoir lieu dans la cellule tumorale ou au niveau du stroma tumoral⁷⁴.

La plasticité cellulaire n'est donc pas une propriété spécifique de la cellule tumorale, mais plutôt un détournement des capacités latentes que diverses cellules normales utilisent pour l'homéostasie, et la réparation tissulaire. On assiste donc à une sorte de décontextualisation ou transposition de la plasticité cellulaire quand celle-ci est utilisée par la cellule cancéreuse. On serait tenté d'utiliser les concepts de Thomas Kuhn ⁷⁵ qui parle « *acquired similarity relations* » et « *similar exemplar* », mais qui seraient, cette fois-ci, appliqués au comportement de la cellule cancéreuse. Ceci est différent de la notion kuhnienne de généralisation symbolique, qui se réfère plutôt à la transposition nominale et non relationnelle. Une autre notion à rapprocher est celle de Kernel, comme défini par Hinman & Davidson (2007)⁷⁶. Un Kernel est un nœud, ou mieux, un module qui a la même fonction générale, mais qui s'adapte à des contextes différents. Cela comporte, en fait, le même relationnel entre ses composantes, mais acquiert différentes caractéristiques en fonction d'un contexte biologique donné. Un bon exemple est la morphogenèse de l'arbre vasculaire et bronchique qui, contextualisée au niveau des organismes vertébrés ou invertébrés, revêt différents habillages (selon les vertébrés ou invertébrés). Les relations causales sont identiques, mais le rôle biologique est différent. Dans un cas (vertébrés),

⁷² Thé H, Pandolfi PP, Chen Z. Acute Promyelocytic Leukemia: A Paradigm for Oncoprotein-Targeted Cure. *Cancer Cell*. 2017, 32(5):552-560.

⁷³ Soda Y. et al. Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, 108(11):4274-80.

⁷⁴ Wiley CD, Campisi J. The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nat Metab*. 2021 Oct;3(10):1290-1301.

⁷⁵ Kuhn TS. *The Structure of Scientific Revolutions*. University of Chicago Press; New revised edition (1996) 240 pages.

⁷⁶ Hinman, V.F. & Davidson, E.H. Evolutionary plasticity of developmental gene regulatory network architecture. *Proc Natl Acad Sci*. 2007, 104: 19404-19409.

la vascularisation est stimulée, dans l'autre (invertébrés) la formation trachéale à partir de bourgeons trachéaux. Dans le premier cas (système vasculaire des vertébrés), VEGF/Notch/Delta est requis, dans le deuxième cas (morphogenèse trachéale chez la drosophile) le système FGF/NOTCH/ Delta. Ceci correspond à ce qu'on peut appeler "Kernel" qui représente un module ou nœud régulateur qui a une structure similaire dans différents contextes, mais composé d'éléments de nature moléculaire différente, mais assurant la même fonction.

En fait, la plasticité cellulaire, dans le contexte de la perturbation de la différenciation, constitue une capacité distincte des autres « Hallmarks » et des caractéristiques fondamentales du cancer.

Un autre aspect est la reprogrammation non-mutationnelle via des mécanismes épigénétiques. Ces facteurs sont indépendants des mutations et de l'instabilité génomique et ont été cooptés à partir des mécanismes de régulations développementales.

Le microbiome, la sénescence cellulaire et le système nerveux — capable d'influencer la tumeur aussi bien localement qu'à distance, par exemple via le comportement ou le stress psychologique — sont des caractéristiques du cancer plus récentes. Deux de ces composantes sont mentionnées dans les « Hallmarks 2022 », la troisième (système nerveux) a été rajoutée ultérieurement. Les facteurs comportementaux et psychologiques ne constituent pas (encore) un « Hallmark » dans le sens propre du terme, mais je discuterai leur rôle causal néanmoins à la fin de cette section.

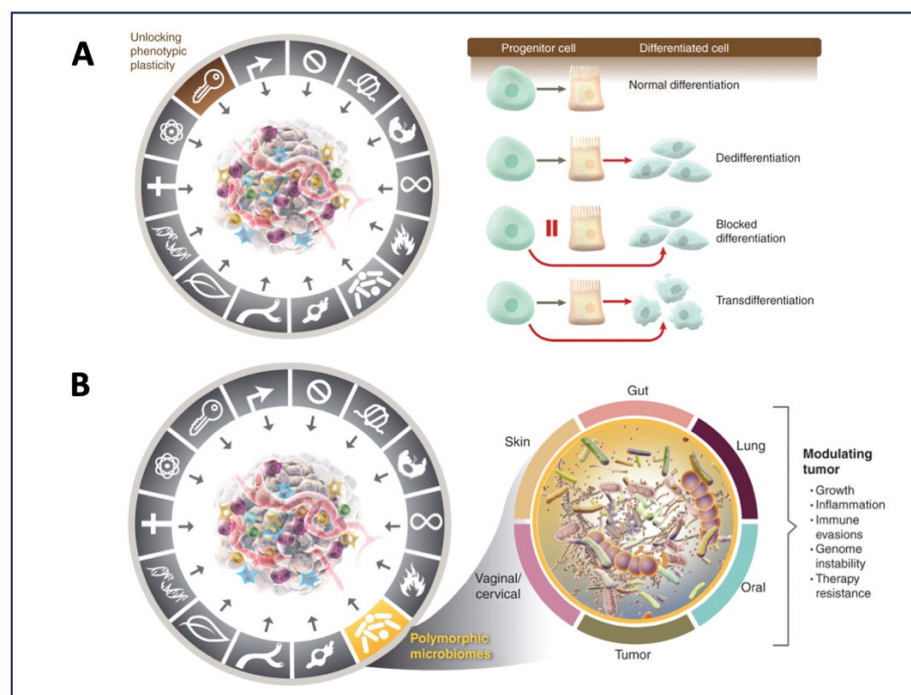


Fig. 6 : Nouveautés des « Hallmarks » 2022. A, plasticité phénotypique ; B, Effet du microbiome. (Figure de Hanahan, 2022). Permission de reproduire : Copyright Clearance Center.

> *Microbiome*

Un nombre important de travaux semble montrer que le microbiome qui réside dans le côlon et d'autres muqueuses peut influencer le développement des cancers et leur réponse à la thérapie ⁷⁷. Ceci concerne non seulement les tumeurs intestinales, mais aussi des tumeurs à distance (sein, pancréas, etc.). Par ailleurs, des microorganismes ont été détectés au sein de tumeurs ⁶³, allant des bactéries aux levures. Un « explanans » mécanistique a été proposé, il inclut une régulation indirecte de l'immunité tumorale par relargage de facteurs de la « DNA damage response (DDR) ». Un rôle du microbiote dans la réponse aux traitements anticancéreux a aussi été proposé comme illustré par l'augmentation d'efficacité de la chimiothérapie après transplantation fécale⁷⁸.

> *Sénescence cellulaire*

Les cellules sénescentes font partie intégrante du micro-environnement tumoral. Les cellules sénescences créent un environnement favorable pour la progression tumorale en relarguant des médiateurs solubles (cytokines, chimiokines, interleukines et notamment interleukine-6, etc.). Ceci est représenté par le « *senescence-associated-secretory phenotype (SASP)* »⁷⁹. Le SASP constitue une cible thérapeutique en soi, éliminant les cellules en sénescence ou en reprogrammant les cellules sénescences.

> *Système nerveux*

Des recherches récentes ont documenté que le système nerveux jouerait un rôle important dans le développement, non seulement des tumeurs du système nerveux central, mais aussi dans les tumeurs périphériques^{80 81}. En effet, les neurones et les cellules de gliome établissent une communication électrochimique via de véritables synapses neurones-gliomes dépendantes des récepteurs du glutamate, ce qui a un impact sur la croissance tumorale ⁸². Ceci est illustré par l'influence de l'activité neuronale sur la prolifération normale et néoplasique des cellules gliales.

⁷⁷ Cullin, N et al. Microbiome and cancer. *Cancer Cell*, 2021, 39:

⁷⁸ Blake, S.J., Wolf, Y., Boursi, B. *et al.* Role of the microbiota in response to and recovery from cancer therapy. *Nat Rev Immunol.*, 2024, 24:308–325.

⁷⁹ Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, and Campisi J The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2010, 5:99–118.

⁸⁰ Winkler F, et al. Cancer neuroscience: State of the field, emerging directions. *Cell*. 2023, 186(8):1689-1707.

⁸¹ Amit M, et al. Next Directions in the Neuroscience of Cancers Arising outside the CNS. *Cancer Discov.*, 2024 14(4):669-673.

⁸² Venkataramani V, et al. Glioblastoma hijacks neuronal mechanisms for brain invasion. *Cell*, 2022, 185(16):2899-2917.e31.

Dans le système nerveux central (SNC), où l'activité neuronale glutamatergique favorise la prolifération des cellules précurseurs gliales, l'activité des neurones glutamatergiques entraîne de la même manière la croissance de gliomes malins dans des modèles expérimentaux ⁶⁸. Les mécanismes sous-jacents impliquent à la fois la signalisation paracrine et la communication électrochimique directe. La sécrétion neuronale de facteurs de croissance, dépendante de l'activité, provenant des neurones et des cellules gliales détectant l'activité, favorise la progression du gliome. De plus, les cellules malignes semblent être capables de s'intégrer électriquement dans les circuits neuronaux via de véritables synapses neurone-gliome.

Le système nerveux intervient aussi au niveau des tumeurs périphériques par l'intermédiaire du système nerveux autonome, ceci a été bien décrit pour le cancer de la prostate ⁸³.

> Facteurs comportementaux et psychologiques

Des études utilisant des modèles expérimentaux indiquent que le stress chronique peut aggraver le développement des cancers et promouvoir la formation des métastases⁸⁴. Il y a plusieurs exemples qui montrent que l'isolement des souris de leurs congénères augmenterait le stress et favoriserait le développement tumoral et la formation des métastases, ces résultats restant cependant non confirmés⁸⁵.

Certaines hormones comme les Catécholamines, libérées sous condition de stress, stimuleraient la progression tumorale par l'activation du récepteur D2 de la dopamine et d'une voie HIF1 α - indépendante de l'oxygène ce qui stimulerait l'angiogenèse et la formation des métastases ^{86 87}. Dans certains cas, ces hormones pourraient agir sur le système immunitaire en favorisant une immunité protumorale agissant sur l'immunité innée ou adaptative ^{88 89}. Un autre mécanisme a été décrit en faisant appel à l'intervention directe du système nerveux central ou périphérique ⁶⁹. L'intervention d'autres hormones de stress comme les glucocorticoïdes a également été décrite pour contribuer au développement tumoral⁷⁰. Le stress chronique modifierait le rythme circadien

⁸³ Ayala G. Neuroepithelial Interactions in Cancer. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2023, 18:493-514.

⁸⁴ Yan He XY. Chronic stress increases metastasis via neutrophil-mediated changes to the microenvironment. Cancer Cell, 2024, 42(3):474-486.e121.

⁸⁵ Farbstein, D. Social isolation in mice: behavior, immunity, and tumor growth. Stress, 2020, 24(2): 229–238.

⁸⁶ Liu H, et al. et al Psychological stress drives progression of malignant tumors via DRD2/HIF-1 α signaling. Cancer Res. 2021 ;81 :5353–65.

⁸⁷ Bernabé DG. Catecholamines Mediate Psychologic Stress–Induced Cancer Progression Cancer Res., 2021, 81 (20): 5144–5146.

⁸⁸ Ma, Y., Kroemer, G. The cancer-immune dialogue in the context of stress. Nat Rev Immunol 2024, 24:264–281.

⁸⁹ Mohammadpour, H. et al. β 2-adrenergic receptor signaling regulates metabolic pathways critical to myeloid-derived suppressor cell function within the TME. Cell Reports, 2021, 37(4):109883.

normal et augmenterait la formation des « *neutrophil extracellular traps* (NET) » par le relargage des glucocorticoïdes ⁷⁰.

Bien que certaines études aient signalé une diminution de la survie chez les personnes atteintes de cancer qui subissent le stress, la preuve clinique selon laquelle le stress affecte directement le développement tumoral et la survie des patients n'a pas, pour l'instant, été apportée. Le débat reste donc ouvert.

3.5 Force et faiblesse des « Hallmarks » telles que définies entre 2000 et 2022

Les différentes « Hallmarks » et leurs caractéristiques se sont avérées fructueuses pour la recherche sur le cancer, car elles ont constitué des cadres adaptés pour conceptualiser le développement du cancer.

Quels sont leurs mécanismes causaux sous-jacents, et comment ces régulations sont mises en place ? Certaines « Hallmarks » et caractéristiques sont sous la dépendance d'effecteurs/modules moléculaires multiples. Certains effecteurs/modules affecteront plusieurs composantes. Leurs régulations sont au moins partiellement interconnectées, ont une portée plus générale et concernent de nombreux cancers. Plusieurs caractéristiques phénotypiques sont modulées de manière coordonnée dans différents types de tumeurs par des facteurs oncogéniques canoniques, notamment. L'oncogène ras, par exemple, est un « driver » dans le cancer du poumon et du pancréas et représente donc un facteur causal plus général. Néanmoins, il y a aussi des spécificités dans les régulations et celles-ci ont donc une portée plus restreinte. Ceci est le cas de modules moléculaires liés à l'apoptose, l'autophagie ou le métabolisme, même s'il y a des interconnexions dans certains cas.

La force des « Hallmarks » est qu'elles constituent des cadres généraux et proposent une cartographie assez complète des événements cellulaires et moléculaires se déclenchant au cours du développement tumoral. Il y a dans ces « Hallmarks » une intégration entre événements cellulaires (liés au phénotype) et moléculaires qui représentent deux différents niveaux d'explication causale. Le rattachement de certains circuits moléculaires à divers « Hallmarks » constitue une avancée conceptuelle, certes imparfaite, mais utile. Ceci ne masque cependant pas les défauts, car la complexité des relations causales n'est pas élucidée, et on assiste plutôt à « un patchwork » d'événements intervenants sans lien véritable entre elles et sans connexion causale explicitée. On peut donc résumer la critique comme suit :

(1) La distinction entre « Hallmarks » et les caractéristiques facilitatrices est floue, et ces deux concepts se chevauchent

Les caractéristiques facilitatrices pourraient représenter, soit des mécanismes sous-jacents aux « Hallmarks », soit des caractéristiques distinctes qui interagissent directement avec elles. Par conséquent, il devient difficile de les définir comme des entités indépendantes. Ces caractéristiques, plutôt que d'être isolées, semblent s'intégrer dans un réseau complexe où elles agissent comme des catalyseurs ou des contributeurs aux processus phénotypiques et moléculaires du cancer.

Ce chevauchement soulève des questions importantes sur la validité de maintenir cette distinction dans la conceptualisation du cancer. Si les caractéristiques facilitatrices sont effectivement des mécanismes de support ou des versions spécialisées des « Hallmarks », il pourrait être plus pertinent de les redéfinir comme des sous-catégories ou des extensions des « Hallmarks » principales. Une telle clarification permettrait d'harmoniser ces concepts et d'améliorer leur utilité dans la recherche et l'élaboration de stratégies thérapeutiques.

Pour aller plus loin, une approche systématique consistant à cartographier les interactions et les dépendances entre les « Hallmarks » et les caractéristiques facilitatrices pourrait offrir un cadre conceptuel plus robuste. Cette cartographie mettrait en évidence les interconnexions clés agissant en synergie pour influencer la progression tumorale.

Dans un langage philosophique, les « Hallmarks » représenteraient des variables causales et les caractéristiques facilitatrices les conditions facilitatrices (« *enabling conditions* »). Ces conditions facilitatrices sont distinctes des variables causales, car, en elles-mêmes, elles n'induisent pas l'effet (dépendant de la cause). Les notions de cause et de condition facilitatrice ont été discutées extensivement dans la littérature philosophique⁹⁰, et la relation avec les « Hallmarks » est abordée aux **Chapitres IV et V** plus en détail.

(2) Les diverses « Hallmarks » et caractéristiques sont assemblées d'une manière indépendante, non connectée, ce qui n'a pas de grande valeur heuristique

Au niveau phénotypique, les différentes « Hallmarks » et caractéristiques ont été décrites en détail, mais elles ne sont pas suffisamment articulées les unes aux autres, même s'il existe quelques exemples comme la relation entre angiogenèse et cooption. Cette dernière présente une

⁹⁰ Woodward, J, 'Causes, Conditions, and the Pragmatics of Causal Explanation', in Gregory J. Morgan (ed.), *Philosophy of Science Matters: The Philosophy of Peter Achinstein* (2011; online edn, Oxford Academic, 1 May 2011).

réciprocité inversée, mais orientée (c.à.d. : si l'angiogenèse tumorale est inhibée, la cooption est stimulée, mais pas l'inverse). On peut exprimer la relation de réciprocity orientée entre l'angiogenèse tumorale (A) et la cooption (C) de la manière suivante : $\neg A \Rightarrow C$, mais $\neg C \not\Rightarrow A$, soit $(\neg A \rightarrow C) \wedge \neg (\neg C \rightarrow A)$ et en langage probabiliste par : $P(C | \neg A) > P(C | A)$, où P désigne la probabilité, $\neg A$ l'absence d'angiogenèse, et C la survenue de la cooption. Cette formulation indique que la probabilité d'observer la cooption est plus élevée en l'absence d'angiogenèse qu'en sa présence.

Une réciprocity inversée est également observée entre la prolifération cellulaire et la migration, qui, théoriquement, sont exclusives : soit prolifération, soit migration, mais pas les deux simultanément. La relation d'exclusivité entre la prolifération (P) et la migration (M) peut être représentée selon la logique mathématique par : $(P \vee M) \wedge \neg (P \wedge M)$. Autrement dit, une cellule tumorale manifeste soit la prolifération, soit la migration, mais pas simultanément les deux phénotypes. Cependant, ces deux phénomènes s'intègrent dans l'espace et le temps, alternant très rapidement selon les besoins de la tumeur. Notamment, les cellules tumorales, ne subissant pas l'inhibition de contact, ne connaissent pas de repos dans ces processus. Cela soulève des questions importantes : comment cette intégration spatio-temporelle est-elle réalisée ? Quels mécanismes gouvernent cette alternance ? Ces zones d'ombre mettent en lumière le manque de connexion et d'intégration des différentes caractéristiques décrites dans les « Hallmarks », ce qui empêche de dépasser la dispersion et la fragmentation actuelle.

Un autre point central à explorer réside dans l'étude des interconnexions dynamiques entre ces phénomènes. Une analyse multiéchelle, intégrant les interactions moléculaires, cellulaires et environnementales dans des modèles temporels précis, pourrait offrir des pistes innovantes pour comprendre ces mécanismes complexes. Cette démarche systématique contribuerait à poser les bases d'une vision unifiée et cohérente, en surmontant les défis liés à la redondance et à la multiplicité des voies impliquées dans la progression tumorale. Un tel cadre permettrait, par ailleurs, de développer des stratégies thérapeutiques mieux ciblées, adaptées à chaque contexte tumoral.

(3) Les événements moléculaires sous-jacents ont une valeur explicative limitée, car il y a redondance entre divers événements moléculaires (e.g. intervention des mêmes événements dans différents « Hallmarks », etc.).

Il n'y a pas « d'explanans » concernant la correspondance/spécificité entre un phénotype et les mécanismes moléculaires. Les voies de signalisation ont des propriétés phénotypiques très larges et manquent de spécificité. Par exemple, les ERK kinases sont à la fois impliquées dans la

prolifération et la migration. Or, la migration et la prolifération sont des événements exclusifs et il manque donc une véritable « explication causale » qui permet l'orientation vers l'une ou l'autre voie.

En outre, cette fragmentation des mécanismes moléculaires complexifie encore la compréhension systématique du développement tumoral. Elle pose également des défis au niveau thérapeutique, où la cible potentielle d'un traitement peut être compromise par la multiplicité et la redondance des voies impliquées. Par exemple, une inhibition ciblée sur une voie comme celle des ERK kinases pourrait mener à des effets compensatoires sur d'autres voies, limitant ainsi l'efficacité du traitement.

Pour aller au-delà de cette limitation, une approche intégrative et multiéchelle pourrait être envisagée. Cela inclurait l'étude des interactions dynamiques entre les différents événements moléculaires et phénotypiques dans le temps et dans l'espace, tout en tenant compte des spécificités contextuelles propres à chaque type de cancer. Cette stratégie permettrait de mieux articuler les relations entre les « Hallmarks » et leurs mécanismes facilitateurs, et pourrait ouvrir la voie à des cadres théoriques plus cohérents et unifiés.

Ainsi, bien que les « Hallmarks » aient apporté une avancée conceptuelle indéniable, il reste impératif de surmonter les lacunes liées à leur fragmentation pour développer une compréhension globale et des stratégies thérapeutiques plus efficaces dans la lutte contre le cancer.

Pour pallier ces limites, il serait pertinent de développer des modèles capables de simuler les interactions complexes entre les événements moléculaires, phénotypiques et micro-environnementaux. Ces modèles pourraient intégrer des données multiéchelles sur les variations génétiques, l'expression génique et les comportements cellulaires, afin de proposer une vision systématique et holistique du développement tumoral.

Par ailleurs, l'avènement des technologies de séquençage et des outils de bio-informatique ouvre la voie à une cartographie précise des réseaux moléculaires et des interactions dans le micro-environnement tumoral. Ces avancées permettent d'identifier des points de convergence entre les différentes caractéristiques facilitatrices et les « Hallmarks » principaux, offrant des opportunités inédites pour cibler simultanément plusieurs mécanismes dans les stratégies thérapeutiques.

Enfin, le dialogue entre biologie moléculaire, médecine et philosophie pourrait enrichir le cadre théorique en explorant des concepts tels que la causalité descendante (« *downward causation* ») et les dépendances contextuelles. Une telle interdisciplinarité enrichirait l'explication des mécanismes du cancer par davantage de diversité, de complexité et de cohérence.

(4) Les différentes caractéristiques et événements moléculaires sont connectés par des relations causales, mais la connaissance des liens causaux des diverses caractéristiques phénotypiques est fragmentaire comme l'est la connexion entre événements moléculaires et phénotypes.

Il n'y a pas de hiérarchie causale des événements, et on a l'impression de l'existence d'un « patchwork » comportant des éléments désarticulés d'où le pouvoir explicatif limité (Figure 7). Il manque d'articulation, de cohérence et de consistance malgré l'effort de systématisation de Robert Weinberg et Douglas Hanahan dans les « Hallmarks ».

Pour l'instant, l'impression générale est que les différents cadres conceptuels (SMT, TME, et même à l'intérieur du TME, angiogenèse, immunité et matrice) évoluent comme paradigmes indépendants et ont l'ambition de fournir, d'une manière séparée, une vision cohérente du développement des cancers. On pourrait être amené de postuler un pluralisme causal à valeur heuristique équivalente pour chacun de ces cadres conceptuels suggéré par des modèles multiéchelle ou multicouche (« *multi-layered* »,) en lien avec le concept de « *downward causation* » (p.ex. cf. Sarah Green)⁹¹.

Cependant, ce pluralisme causal pose la question de la cohérence, de la consistance, et de l'absence de contradiction (ainsi que d'autres valeurs épistémiques) de toute théorie explicative dont la charpente est la causalité. L'élaboration d'une théorie unifiée pourrait trouver sa force dans un dialogue interdisciplinaire entre biologie moléculaire, médecine et philosophie. Ce dialogue permettrait d'intégrer les concepts de causalité issus de la philosophie à une solide compréhension des processus biologiques sous-jacents, clarifiant ainsi cette problématique.

De plus, les technologies émergentes offrent des opportunités uniques pour cartographier précisément les réseaux moléculaires et les interactions au sein du micro-environnement tumoral. Ces avancées pourraient aider à identifier des points de convergence entre les différentes caractéristiques et « Hallmarks » principaux, facilitant ainsi le développement de stratégies thérapeutiques capables de cibler simultanément plusieurs mécanismes.

Enfin, l'approche intégrative et multiéchelle mentionnée précédemment pourrait être enrichie par des modèles capables de simuler la complexité des interactions entre événements moléculaires, phénotypiques et micro-environnementaux. Ces modèles offriraient une vision systématique et holistique du développement tumoral, contribuant à une meilleure articulation entre les différents éléments du concept des « Hallmarks ».

⁹¹ Green S & Batterman RW. Making sense of top-down causation : Universality and functional equivalence in physics and biology. in Voosholz, J. & Gabriel, M. (2021, eds.). Top-Down Causation and Emergence. MIT Press.



Fig. 7 : Dans le tableau cubiste de Picasso, les formes et les perspectives sont volontairement fragmentées pour révéler une pluralité d'angles et de points de vue. Ce choix visuel souligne la nature morcelée des connaissances actuelles sur les caractéristiques du cancer, évoquant une composition où chaque élément reste partiellement autonome et difficile à relier dans une structure globale. L'image sert donc d'allégorie scientifique, empruntant au langage esthétique du cubisme pour traduire, en une métaphore graphique, la complexité et l'absence d'intégration des différents mécanismes et événements au sein des cadres théoriques du développement tumoral.

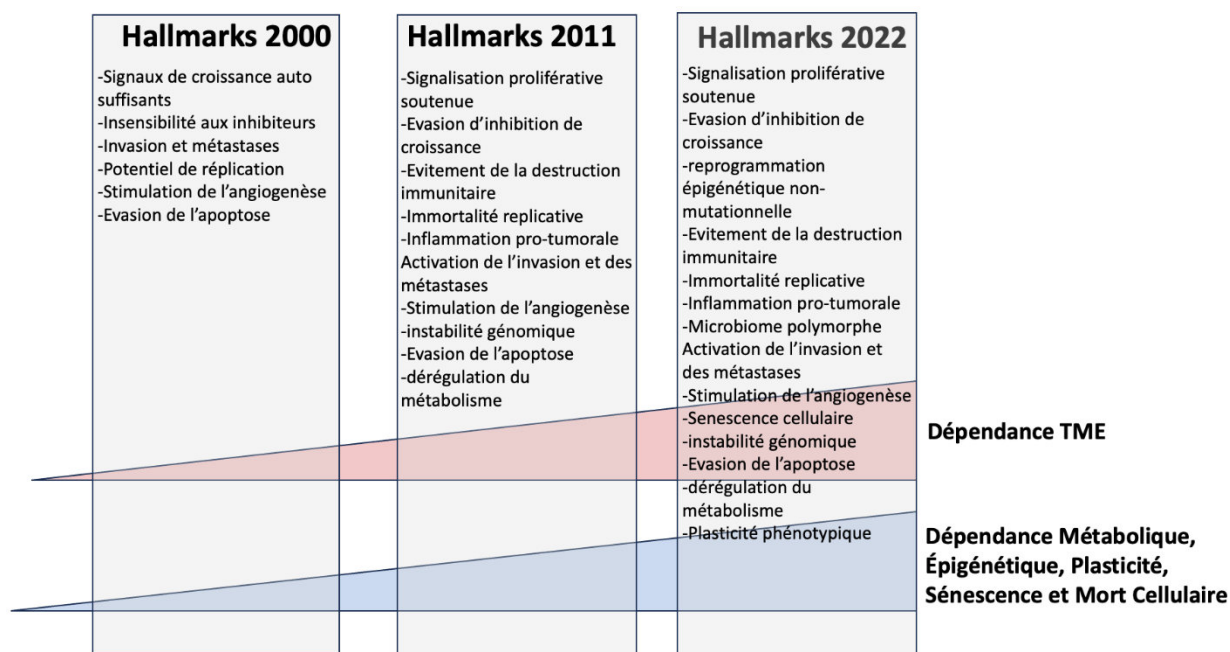


Fig. 8 : Schéma global de l'évolution des « Hallmarks » du cancer. On voit qu'il y a complexification successive avec enrichissement d'une part de la composante micro-environnementale et d'autre part de la composante cellulaire non mutationnelle.

4. Causalité comme cadre théorique, « nature versus nurture »

4.1 La théorie somatique mutationnelle (SMT) versus théorie des champs d'organisation tissulaire (TOFT)

Il existe globalement deux schémas théoriques causaux explicatifs (appelés encore cadres causaux) principaux pour la formation de tumeurs ⁹²: une vue centrée sur les cellules tumorales, commençant par un événement dans la cellule qui déclenche une avalanche d'événements secondaires irréversibles, et une vue centrée sur l'environnement tumoral, qui met l'accent sur la multiplicité des interactions dans l'environnement tumoral et sur la réversibilité de nombreux événements liés au cancer. Nous examinons ici deux cadres théoriques représentatifs de ces deux thèses.

Dans la théorie de la mutation somatique classique (SMT), qui est centrée sur les cellules tumorales, l'état d'une cellule est, par défaut, la quiescence ; la tumeur se forme à la suite de mutations génétiques dans une cellule unique ⁹³. Dans cette théorie, la causalité est liée à un seul événement. Il existe, néanmoins, une variabilité causale du fait de différents facteurs oncogéniques activables selon les types de cellules et de tissus. Dans la théorie de la mutation somatique, la causalité dépend des mutations dans la cellule tumorale. La complexité causale n'a qu'un rôle mineur dans la formulation radicale de cette théorie, les mécanismes impliquant l'environnement cellulaire ne jouant aucun rôle. Cependant, l'introduction de séquences de mutations (telles que celles observées dans la carcinogenèse multiétape) peut augmenter la complexité causale associée à cette théorie. Si l'origine du cancer se situe dans la cellule tumorale (« cause ultime ») dans le cadre de la SMT, des facteurs environnementaux de promotion ont été caractérisés par de multiples travaux et ont été inclus par Hanahan et Weinberg dans les constituants des « Hallmarks » du cancer (cf. Figures 4-6). Parmi les « Hallmarks », trois font partie intégrante du micro-environnement tumoral : l'angiogenèse, le système immunitaire et l'environnement matriciel cellulaire et stromal. Ces éléments sont vus comme les facteurs de promotion, mais non comme les facteurs initiateurs. Les facteurs additionnels font partie de ce qu'on appelle le macro-environnement ou l'environnement tumoral de l'organisme (« tumor organismal environment » TOE). Un certain nombre de données expérimentales sont en faveur de la SMT. Voyons l'exemple de tumeurs où la théorie de la SMT est bien établie :

⁹² Rondeau E, Larmonier N, Pradeu T, Bikfalvi A. Characterizing causality in cancer. *Elife*, 2019, 8:e53755.

⁹³ Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*, 2009, 458(7239):719-24.

- (1) les tumeurs malignes hématologiques telles que la leucémie myéloïde chronique, avec production d'une protéine de fusion aberrante BCR-ABL ⁹⁴.
- (2) La carcinogenèse multiétape colique définie par Vogelstein et al. ⁹⁵
- (3) La dépendance à l'activation de l'oncogène ras des cancers du poumon ⁹⁶ et du pancréas.

Un prérequis de cette théorie est que l'état physiologique de la cellule différenciée est donc la quiescence. Ceci est documenté par l'inhibition de contact des épithéliums ou des endothéliums. Cet état de quiescence est cependant seulement relatif, car il existe bel et bien un renouvellement de ces tissus qui est soit lent soit périodique comme dans le cas de la réparation tissulaire physiologique (cycle menstruel, etc.). Le marquage par bromodésoxyuridine (BrdU) ou 5-ethynyl-2'-désoxyuridine (EDU) révèle l'état de prolifération cellulaire. Dans la plupart des tissus, y compris l'endothélium, ce marquage n'est positif que lors du renouvellement physiologique actif ou en cas de réparation tissulaire. Le concept de la SMT s'était progressivement enrichie par l'intégration de la composante micro-environnementale (décrite dans le chapitre précédent) et également d'autres paramètres comme la plasticité, les cellules souches, le stress cellulaire, l'autophagie/lipophagie/mitophagie et les différentes modalités de la mort cellulaire (apoptose, ferroptose, etc.), ce qui confère à ce concept une grande complexité qui intègre des réseaux moléculaires complexes (voir plus loin les schémas théoriques pour conceptualiser ce fait). La valeur de la théorie SMT est renforcée par diverses études s'appuyant sur des théories évolutionnistes du cancer⁹⁷. Dans ce cadre, il y a compétition de différents clones avec certains devenant prédominants et en réprimant les autres, et permettent les succès des clones ayant des mutations « drivers ». Ceci s'appuie sur des travaux récents très convaincants⁹⁸. Dans ce cadre, l'environnement est relégué à un rôle accessoire.

⁹⁴ Roeder I, Horn M, Glauche I, Hochhaus A, Mueller MC, Loeffler M. Dynamic modeling of imatinib-treated chronic myeloid leukemia: functional insights and clinical implications. *Nat Med.*, 2006, 12(10):1181-4.

⁹⁵ Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.*, 1993, 9(4):138-41.

⁹⁶ East, P., Kelly, G.P., Biswas, D. *et al.* RAS oncogenic activity predicts response to chemotherapy and outcome in lung adenocarcinoma. *Nat Commun.*, 2022, 13: 5632.

⁹⁷ Colom B, Alcolea MP, Piedrafita G, Hall MWJ, Wabik A, Dentro SC, Fowler JC, Herms A, King C, Ong SH, Sood RK, Gerstung M, Martincorena I, Hall BA, Jones PH. Spatial competition shapes the dynamic mutational landscape of normal esophageal epithelium. *Nat Genet.*, 2020, 52(6):604-614.

⁹⁸ Colom B, et al. Mutant clones in normal epithelium outcompete and eliminate emerging tumours. *Nature*, 2021, 598(7881):510-514.

La théorie du champ d'organisation tissulaire (TOFT, « *tissue-organization field theory* »), quant à elle, est centrée sur l'environnement de la tumeur^{99,100}. Cette théorie implique des séquences causales à différents niveaux, ainsi que la variabilité causale, la complexité causale, et l'aspect spatial de la causalité. La perturbation de l'architecture tissulaire est l'événement causal critique dans cette théorie, tandis que les mutations (qui sont distribuées au hasard) succèdent à cette perturbation ou surviennent d'une manière simultanée sans conséquence véritable causale. L'un des postulats de cette théorie est que l'état normal de la cellule est la prolifération et non la quiescence, comme cela est revendiqué dans la SMT.

Ces deux théories ont leurs forces et leurs faiblesses. Concernant la SMT, depuis l'avènement de la génétique et l'identification des gènes drivers, de multiples recherches ont montré clairement le rôle d'activateur de mutations dans le développement des cancers. Ainsi, l'activation d'oncogène ras dans le cancer du poumon ou du pancréas a été décrite et le rôle causal démontré^{101,102}. L'activation de ras endogène dans le cancer du poumon conduit à la transformation des cellules épithéliales pulmonaires en carcinome pulmonaire. De même, la situation est similaire pour le carcinome ductal pancréatique (PDAC). Dans ce dernier cas, le développement du PDAC peut être modélisé chez la souris par l'expression de l'oncogène ras avec un fond génétique P53 -/-¹⁰³. Concernant les tumeurs neuroendocrines du pancréas, celles-ci peuvent être modélisées *in vivo* chez la souris en surexprimant l'antigène T utilisant un promoteur spécifique (RIP, souris RIP-Tag)¹⁰⁴. Un autre exemple est la leucémie myéloïde chronique dans laquelle la translocation de bcr sur l'oncogène -c-abl conduit à sa suractivation et à la transformation cellulaire¹⁰⁵. Par ailleurs, non seulement des événements mutationnels de la cellule tumorale interviennent significativement, mais aussi des amplifications mettant en jeu des boucles auto-ou paracrine comme celles du FGF ou du EGF qui contribue à la stimulation de la prolifération cellulaire et à la transformation maligne¹⁰⁶. Ceci peut être démontré en utilisant les cellules NIH 3T3 qui en

⁹⁹ Soto AM, Sonnenschein C. Emergentism as a default: cancer as a problem of tissue organization. *J Biosci.*, 2005, 30(1):103-18.

¹⁰⁰ Soto AM, Sonnenschein C. The cancer puzzle: Welcome to organicism. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 2021, 165:114-119.

¹⁰¹ East, P., Kelly, G.P., Biswas, D. *et al.* RAS oncogenic activity predicts response to chemotherapy and outcome in lung adenocarcinoma. *Nat Commun.*, 2022, 13 : 5632.

¹⁰² Drosten M, Guerra C, Barbacid M. Genetically Engineered Mouse Models of K-Ras-Driven Lung and Pancreatic Tumors: Validation of Therapeutic Targets. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2018, 8(5):a031542.

¹⁰³ Wasko, U.N., Jiang, J., Dalton, T.C. *et al.* Tumour-selective activity of RAS-GTP inhibition in pancreatic cancer. *Nature*, 2024, 629: 927–936.

¹⁰⁴ Bill R, Christofori G. The Rip1Tag2 Transgenic Mouse Model. *Springer Protocols. Series: Methods In Molecular Biology*, in *Tumor Angiogenesis Assays(book)*, 2016.

¹⁰⁵ Soverini, S., Mancini, M., Bavaro, L. *et al.* Chronic myeloid leukemia: the paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy. *Mol Cancer*, 2018, 17(1) : 49.

¹⁰⁶ Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2, *Endocrine Reviews*, 1997, 18(1) : 26–45.

présence de FGF par exemple perdent l'inhibition de contact qui est l'une des caractéristiques fondamentales de la transformation tumorale.

Historiquement, la SMT, dans sa formulation radicale, avait entièrement ignoré l'intervention de l'environnement tumoral. Des expériences issues des multiples recherches, ont montré le rôle permissif et au moins promoteur de l'environnement tumoral comme montré par Mina Bissell¹⁰⁷ ou Judah Folkman¹⁰⁸. Ces aspects ont été tous intégrés dans les « Hallmarks of cancer » particulièrement dans sa formulation la plus récente.

La TOFT dans sa formulation radicale amène une critique sévère de la SMT et de la théorie des « Hallmarks » du cancer décrite précédemment^{109 110}. Elle postule donc, comme nous l'avons déjà mentionné, deux choses essentielles. Premièrement, elle dit que la prolifération et non la quiescence est l'état intrinsèque de la cellule et que deuxièmement il y a une relation causale directe entre perturbation de l'architecture tissulaire et l'apparition des mutations, les altérations génétiques au niveau de la cellule tumorale. Compatibles avec la TOFT sont des recherches qui montrent que, l'architecture tissulaire joue un rôle décisif dans la modulation des phénotypes des cellules tumorales, comme dans le cas du cancer du pancréas^{111,112}. De plus, les mutations « driver » associées au cancer sont réparties dans la plupart des organes qui ont une histologie parfaitement normale¹¹³, argument qui en apparence est compatible avec la TOFT. D'autres recherches, en apparence compatibles avec la TOFT, incluent la manière dont les interactions entre la tumeur et le micro-environnement (système immunitaire, vascularisation, matrice, etc.) régulent la progression du cancer ainsi que des interactions causales plus distantes (microbiote ou le système nerveux central)¹¹⁴.

Soto fait une analyse critique des « *Hallmarks of Cancer* » de Hanahan et Weinberg, et remet également en question les travaux sur la vascularisation, estimant que ces derniers ne seraient pas causaux, étant donné que des études cliniques avaient montré leur inefficacité. Ceci est un

¹⁰⁷ Bhat R, Bissell MJ. Of plasticity and specificity: dialectics of the microenvironment and macroenvironment and the organ phenotype. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.*, 2014, 3(2):147-63.

¹⁰⁸ Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med.*, 2006, 57:1-18.

¹⁰⁹ Soto AM, Sonnenschein C. Emergentism as a default: cancer as a problem of tissue organization. *J Biosci.*, 2005, 30(1):103-18.

¹¹⁰ Sonnenschein C, Soto AM (2020) Over a century of cancer research: Inconvenient truths and promising leads. *PLoS Biol.*, 2020, 18(4): e3000670.

¹¹¹ Ligorio M, et al . Stromal Microenvironment Shapes the Intratumoral Architecture of Pancreatic Cancer. *Cell*, 2019, 178(1):160-175.e27.

¹¹² Sonnenschein, C, & Soto, AM. Carcinogenesis explained within the context of a theory of organisms. *Prog in Biophys & Mol Biol.*, 2016, 122(1):70–76.

¹¹³ Yizhak K, et al RNA sequence analysis reveals macroscopic somatic clonal expansion across normal tissues. *Science*, 2019, 364(6444): eaaw0726.

¹¹⁴ Laplane L, Duluc D, Larmonier N, Pradeu T, Bikfalvi A. The Multiple Layers of the Tumor Environment. *Trends Cancer.*, 2018, (12):802-809.

raisonnement inadéquat, car une régulation moléculaire dont le ciblage ne se traduit pas obligatoirement par un effet thérapeutique satisfaisant, peut être relevant sur le plan causal. La vascularisation peut être importante sur un plan mécanistique et coopérer avec d'autres modules pour contribuer au développement tumoral et donc jouer un rôle causal.

Par ailleurs, certains des postulats de la TOFT sont fortement critiquables. Le premier postulat est que la prolifération est l'état intrinsèque de la cellule au sein d'un tissu. Dans une architecture tissulaire normale, il y a, certes, renouvellement cellulaire, mais celui-ci est lent et est seulement amplifié en cas de lésion tissulaire ou dans le cas de processus de régénération (cycle menstruel, etc.). Par exemple, l'endothélium dans un vaisseau artériel normal est quiescent grâce à l'inhibition de contact comme le test de l'incorporation de BRDU le montre. En outre, lors de la formation tumorale, la prolifération est généralement stimulée avec un raccourcissement du cycle cellulaire, exception faite du système hématopoïétique où un défaut de maturation a lieu). Le deuxième postulat (la connexion causale entre altération de l'architecture tissulaire et mutation dans la cellule tumorale) est aussi critiquable. En effet, les mutations peuvent intervenir purement par chance comme les travaux de Vogelstein le montrent ¹¹⁵. La désorganisation tissulaire n'induit pas forcément des mutations, et expérimentalement cela reste à être démontré. L'autre postulat est la réversibilité de la maladie cancéreuse. Il est vrai qu'avec des thérapeutiques adaptées (p.ex. acide rétinoïque dans les leucémies promyélocyaires), la maladie peut être réversible en tout cas au niveau phénotypique, mais généralement pas d'une manière spontanée, même si des régressions spontanées ont été décrites¹¹⁶.

La causalité linéaire dans les deux cadres théoriques est très critiquable. Dans le cas de la SMT, l'affirmation que les altérations génétiques sont le point de départ de la dérégulation et de la cancérogenèse qui entraîne également les conséquences micro-environnementales qui rétroagissent ensuite sur la tumeur est dogmatique. Les trois postulats de la TOFT sont également l'objet de critique concernant notamment le rôle initiateur de la désorganisation tissulaire. Les preuves expérimentales sont principalement basées sur des articles publiés entre 1962 et 2006 ^{117, 118, 119, 120}, qui tendent à montrer que le tissu environnant est le facteur initiateur de la

¹¹⁵ Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.*, 1993, 9(4):138-41.

¹¹⁶ Jiang, Y., Shen, X., Zhi, F. *et al.* An overview of arsenic trioxide-involved combined treatment algorithms for leukemia: basic concepts and clinical implications. *Cell Death Discov.*, 2023, 9: 266.

¹¹⁷ Maffini MV, Soto AM, Calabro JM, Ucci AA, Sonnenschein C. The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *J Cell Sci.* 2004, 117(Pt 8):1495-502.

¹¹⁸ McDaniel SM, Rumer KK, Biroc SL, Metz RP, Singh M, Porter W, Schedin P. Remodeling of the mammary microenvironment after lactation promotes breast tumor cell metastasis. *Am J Pathol.*, 2006, 168(2):608-20.

¹¹⁹ D.W. Smithers *et al.* Cancer, an attack on cytologisms, *The Lancet*, 1962, 279(7228): 493-499.

¹²⁰ Orr HC, Harris LE Jr, Bader AV, Kirschstein RL, Probst PG. Cultivation of cells from a fibroma in a rattlesnake, *Crotalus horridus*. *J Natl Cancer Inst.* 1972, 48(1):259-64.

tumorigenèse. L'analyse de ces travaux montre que les données expérimentales rapportées sont bien fragiles, même l'étude de Maffini et al. (2004)⁹⁷ qui a consisté à mettre en contact un tissu mammaire avec un carcinogène connu. Les auteurs ont ainsi tenté de démontrer que ce dernier agissait en désorganisant le stroma, ce qui faciliterait l'apparition de tumeurs. Soto et Sonnenschein en concluent hâtivement que les effets des carcinogènes sur les structures subcellulaires (nucléaire, l'ADN, etc.) ne sont pas directement responsables du développement des cancers. Ceci est contredit par une pléthore d'étude sur les mécanismes d'action des carcinogènes^{121 122}. Sonnenschein et Soto s'appuient sur des affirmations dont la validité expérimentale est critiquable, car basées sur des résultats qui n'ont pas été répliqués. De plus, il est surprenant que Huang, Sonnenschein et Soto annoncent la fin du paradigme génétique du cancer¹²³ alors que ce cadre a généré de nombreuses recherches, des découvertes majeures et des thérapies efficaces.

Il est aussi à souligner que la recherche actuelle évolue principalement dans le cadre du concept du SMT, même si on peut admettre que la SMT originale a été complexifiée considérablement par l'introduction de facteurs micro-environnementaux, de l'épigénétique et de la plasticité cellulaire pour ne citer que ces exemples. Par ailleurs, les chercheurs et médecins ne semblent pas très concernés par ce débat et suivent plus ou moins le concept de la SMT complexifiée. Une clarification est donc nécessaire concernant la conceptualisation du cancer à partir de ces deux théories générales pour faire correspondre la philosophie et la science biomédicale.

La différence entre TOFT et SMT réside seulement dans le fait que la séquence de causalité est inversée. La dis-organisation tissulaire est le facteur initial qui est suivi secondairement par les mutations (non-causales !) et le développement tumoral. Dans la formulation forte de la TOFT les mutations ne sont même pas nécessaires et ne sont qu'un « by-product » de la désorganisation tissulaire.

Dans les deux cas (SMT et TOFT), une conception simplifiée de la causalité est utilisée. Une hiérarchie causale rigide est *a priori* postulée qui est inversée (« en miroir ») dans le cas de la SMT et de la TOFT. Cependant, la réalité biologique est plus complexe, les mécanismes de causalité pouvant différer selon les types de tumeurs, impliquant des trajectoires et des hiérarchies causales distinctes.

¹²¹ Neefjes J, Gurova K, Sarthy J, Szabó G, Henikoff S. Chromatin as an old and new anticancer target. Trends Cancer, 2024, 10(8):696-707.

¹²² Alyafeai E, Qaed E, Al-Mashriqi HS, Almaamari A, Almansory AH, Futini FA, Sultan M, Tang Z Molecular dynamics of DNA repair and carcinogen interaction: Implications for cancer initiation, progression, and therapeutic strategies. Mutat Res., 2024, 829:111883.

¹²³ Huang S, Soto AM, Sonnenschein C. The end of the genetic paradigm of cancer. PLoS Biol. 2025, 23(3) : e3003052.

Sonnenschein et Soto déplacent aussi le débat au niveau épistémologique et postulent que la TOFT est organiciste, holistique et non réductionniste ¹²⁴. Ces trois affirmations sont erronées. Ils pensent aussi que la SMT aurait été acceptée sans critique et sans être rigoureusement testée en raison de la pression sociale du rôle prédominant de la génétique au XXe siècle. On peut répondre à cela de la manière suivante. Sonnenschein et Soto opposent le réductionnisme de la SMT à l'organicisme de la TOFT. Il est cependant clair que la TOFT n'échappe pas au réductionnisme. Le réductionnisme est juste déplacé sur l'environnement tumoral, car dans ce cas il doit y avoir des signaux instructifs qui émanent de l'environnement tumoral, signaux moléculaires qui bien évidemment ne peuvent être analysés que par une approche réductionniste. Il y a trois différents types de réductionnisme : réductionnisme théorique, réductionnisme méthodologique et réductionnisme ontologique. Le cancer est essentialisé par Sonnenschein et Soto. Il me semble qu'on ne doit pas parler du cancer, mais il faut parler des cancers dont les événements et séquences causales sont fort différents.

Une variante plus modérée de la théorie micro-environnementale générale (TMG) est proposée par Mina Bissell^{125 126}. Mina Bissell propose que les facteurs environnementaux et notamment matriciels conditionnent d'une manière importante le phénotype cellulaire, même si elle ne nie pas l'importance de la composante génétique. Pour Bissell le phénotype domine le génotype et conditionne d'une manière décisive l'initiation et la progression tumorale. Dans le concept SMT complexifiée, la progression tumorale peut aussi être sous contrôle (au moins partiel) du TME, cependant l'initiation tumorale serait strictement réservée à la cellule tumorale elle-même. C'est en cela que Bissell diffère du SMT complexifié. Il y a donc là une distinction causale importante. Un certain nombre de facteurs matriciels qui participent au développement normal de l'épithélium mammaire ont aussi des fonctions clés au cours du développement tumoral. Mina Bissell avait travaillé dans le contexte du cancer du sein et a examiné le rôle de la laminine-111 (LN1), qui est une composante essentielle de la membrane basale de l'épithélium mammaire et joue un rôle morphogénique essentiel ¹²⁷. Les cellules myoépithéliales qui entourent les cellules épithéliales et produisent la LN1, jouent un rôle important dans la polarisation des cellules

¹²⁴ Soto AM, Sonnenschein C. Reductionism, Organicism, and Causality in the Biomedical Sciences: A Critique. *Perspect Biol Med.* 2018, 61(4):489-502.

¹²⁵ Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med.*, 2011, 17(3):320-9.

¹²⁶ Furuta S, Ren G, Mao JH, Bissell MJ. Laminin signals initiate the reciprocal loop that informs breast-specific gene expression and homeostasis by activating NO, p53 and microRNAs. *Elife*, 2018, 7: e26148.

¹²⁷ Furuta S, Ren G, Mao JH, Bissell MJ. Laminin signals initiate the reciprocal loop that informs breast-specific gene expression and homeostasis by activating NO, p53 and microRNAs. *Elife*, 2018, 7: e26148.

épithéliales. La perte des cellules myoépithéliales au cours du développement du carcinome mammaire entraîne une désorganisation épithéliale. Ceci peut provoquer une instabilité génomique aboutissant à la transformation maligne. Un autre aspect de ces recherches est le constat que les cellules de carcinome mammaire présentant de nombreuses altérations génétiques peuvent toujours « réverter » vers un phénotype normal si la signalisation matricielle est corrigée. Cependant, il n'y a pas de consensus, et de nombreuses autres équipes ont démontré un rôle essentiel de la composante génétique des tumeurs mammaires.

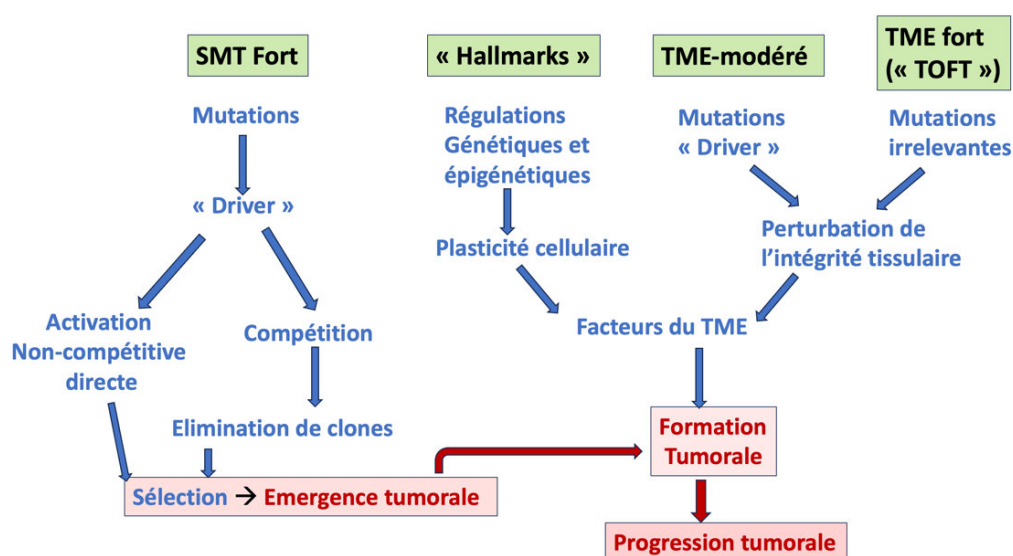
Un travail récent de l'équipe de Cédric Blanpain apporte des arguments supplémentaires pour un rôle des composants matriciels dans le développement des cancers cutanés¹²⁸. L'épiderme cutané se renouvelle constamment tout au long de la vie. La perturbation de l'équilibre entre renouvellement et différenciation peut conduire à une croissance incontrôlée et à l'initiation tumorale. Grâce à des approches multiparamétrique combinant l'analyse clonale *in vivo* par microscopie intravitale, l'analyse unicellulaire et l'analyse fonctionnelle, l'équipe a montré comment une version mutante de l'oncogène « Smoothed » (SMOM2) avait induit le développement d'un carcinome basocellulaire. En effet, l'expression de SmoM2 dans l'épiderme de l'oreille de souris a entraîné une expansion clonale et l'initiation et l'invasion tumorale. Au niveau dorsal, en revanche, l'expression de SmoM2 dans l'épiderme de la peau du dos a conduit à une expansion clonale et a induit une compétition cellulaire latérale sans invasion cutanée ni formation de tumeurs. Ceci est accompagné d'une reprogrammation des cellules interfolliculaires en progéniteurs embryonnaires (EHFP) dans l'oreille, mais pas dans la peau du dos. Cela est corrélé à une composition et « *stiffness* » de la matrice de collagène différente au niveau de l'oreille et du dos. Le traitement de la peau dorsale par la collagénase, l'exposition chronique aux rayons ultraviolets ou le vieillissement naturel ont entraîné l'initiation tumorale après l'expression de SmoM2. La composition de la matrice extracellulaire régule donc la sensibilité des différentes régions de l'organisme à l'initiation et à l'invasion tumorale.

Ce travail mérite que l'on discute en quelques lignes de la validité des conclusions de ces auteurs et du lien à la causalité. SMOM2 ne semble pas être induit par les composantes matricielles, mais agit plutôt, à mon sens, comme une sorte de barrière à l'expansion clonale. Selon ce travail, l'état de la matrice semble induire la progression tumorale quand, en plus, les cellules interfolliculaires acquièrent un état souche. Selon cet article, une connexion directe entre qualité matricielle et phénotype des progéniteurs est indispensable à l'initiation et à la progression tumorale. Mais cette conclusion me semble hâtive, le phénotype souche peut très bien être la conséquence de

¹²⁸ Bansacal N, Vieugue P, Sarate R, Song Y, et al. The extracellular matrix dictates regional competence for tumor initiation. *Nature*, 2023, 623(7988):828-835.

l'expansion tumorale qui est permise quand le tissu matriciel ne remplit plus sa fonction de barrière. Il existe ici un problème de causalité dont le sens n'est pas évident. Cependant, ce travail s'oppose à des théories évolutionnistes de la formation des cancers comme celle défendue plus récemment par Phil Jones et ses collaborateurs précédemment mentionnés ¹²⁹. Les progrès récents en matière de séquençage ont permis de découvrir des mutations somatiques dans tous les tissus épithéliaux étudiés jusqu'à présent. Après une expansion transitoire, les cellules souches mutantes doivent revenir à un comportement homéostatique afin que l'architecture tissulaire normale soit maintenue. Certains mutants sélectionnés positivement peuvent favoriser le développement du cancer, tandis que d'autres inhibent la carcinogenèse. Le paysage mutationnel des épithéliums normaux est façonné par la compétition clonale au sein de la niche des cellules souches. Certains des gènes mutants sélectionnés sont des oncogènes. Ces résultats sont à l'appui d'un modèle dans lequel la survie des cellules tumorales à un stade précoce de leur développement dépend de leur aptitude compétitive par rapport aux clones mutants dans les tissus normaux environnants. Ces clones mutants jouent un rôle antitumoral inattendu en éliminant les cellules tumorales à un stade précoce par compétition cellulaire, préservant ainsi l'intégrité des tissus. Cependant, la sénescence cellulaire peut avoir un effet paradoxal en induisant le « *secretory-associated senescence phenotype* » (SASP)¹³⁰. Dans le SASP les cellules sénescents produisent un sécrétome composé de différents facteurs cytokiniques comme IL6, qui peuvent avoir un effet pro-inflammatoire et donc compromettre la compétition cellulaire.

Nous pouvons donc résumer cette partie de ce chapitre par la représentation suivante :



¹²⁹ Hall MWJ, Shorthouse D, Alcraft R, Jones PH, Hall BA. Mutations observed in somatic evolution reveal underlying gene mechanisms. *Commun Biol.*, 2023, 6(1):753.

¹³⁰ Alimirah F, et al. Cellular Senescence Promotes Skin Carcinogenesis through p38MAPK and p44/42MAPK Signaling. *Cancer Res.*, 2020, 80(17):3606-3619.

Fig. 9 : Schéma général SMT versus TOFT ainsi que toutes les théories intermédiaires. La formalisation de cette figure est décrite dans le chapitre sur la causalité (5.3.2 Caractéristiques et propriétés additionnelles concernant le concept de causalité : *Compétition causale*, paragraphe N°(20) page 103).

4.2 La théorie de la « *self-organized criticality* » (SOC)

À l'opposé des théories déterministes, une autre façon d'envisager le développement du cancer est représentée par les théories stochastiques illustrées par le concept du SOC^{131,132}. Lorsque la densité des interactions dans un réseau augmente, un état critique surviendrait inévitablement au-delà duquel une nouvelle propriété du réseau émergera spontanément. Cette propriété ajouterait une complexité accrue et de nouvelles fonctionnalités.

On peut modéliser la SOC à l'aide de réseaux ou de grilles (lattices) où chaque cellule possède un état discret, et où des règles d'interaction locales déterminent l'évolution du système. Un modèle canonique est celui du tas de sable (Bak, Tang & Wiesenfeld)¹³³ : chaque ajout de "grains" (par analogie, d'événements ou d'interactions cellulaires) augmente localement la "charge", et dès que le seuil critique local est dépassé, une redistribution se produit touchant les voisins, ce qui peut entraîner une cascade (avalanche) de réarrangements. La dynamique du système est alors décrite par une équation de transition d'état :

$S_{(t+1)} = F(S_{(t)}, E)$ où $S_{(t)}$ représente l'état global du système à l'instant t , E l'ensemble des événements externes ou internes, et F la fonction de transition définie par les règles locales.

Dans le contexte de la cancérogenèse, on peut émettre l'hypothèse que jusqu'à un certain niveau critique dans la population des cellules tumorales, les cellules ont un comportement chaotique et indépendant. La « communalité » dans cette phase précritique n'existe pas (cette phase est, en fait, le résultat de la sortie de la « communalité » préexistante du tissu avant sa transformation maligne). Les cellules sont en compétition à ce stade et ne coopèrent pas. Cependant, lorsque la densité cellulaire franchit le seuil critique, le réseau de cellules aberrantes s'autoorganise et forme une nouvelle communauté dont le but est d'accroître et envahir les tissus localement, et/ou d'une manière générale de se diffuser à l'organisme entier. Dans cette phase, l'expansion tumorale est coordonnée. Ce processus est appelé SOC ou criticité autoorganisée (« *self-organized criticality* »). Ceci est compatible avec différents scénarios explicatifs dans lesquels figure la compétition clonale, et des facteurs environnementaux permissifs ou limitants à l'expansion et à

¹³¹ Rosenfeld S. Global Consensus Theorem and Self-Organized Criticality: Unifying Principles for Understanding Self-Organization, Swarm Intelligence and Mechanisms of Carcinogenesis. *Gene Regul Syst Bio.*, 2013;7:23-39.

¹³² Grunt TW, Heller GW, A critical appraisal of the relative contribution of tissue architecture, genetics, epigenetics and cell metabolism to carcinogenesis, *Progr Biophys Mol Biol.*, 2023, 182: 26-33.

¹³³ Bak, P., Tang, C. & Wiesenfeld, K. Self-organized criticality: An explanation of 1/f noise. *Phys. Rev. Lett.*, 1987, 59 (4) : 381-384.

la diffusion tumorale. Dans la compétition clonale, des cellules mutées ne progressent pas toutes (en fait uniquement une petite fraction) vers la néoplasie et au contraire les cellules mutées (non tumorigène) ont la faculté de out-compéter et inhiber les cellules tumorigènes. Ceci correspond tout à fait à ce qu'a décrit Phil Jones dans ses travaux sur les interactions des cellules tumorales dans le modèle des carcinomes œsophagiens¹³⁴. Seulement les cellules ayant acquis des capacités additionnelles peuvent s'échapper, s'autoorganiser et former une nouvelle communauté dont l'avantage sélectif dépassera des contraintes extérieures imposées à elles. Ces contraintes extérieures peuvent aussi être représentées par des constituants de la matrice extracellulaire, l'absence d'une immunité protumorale, l'absence de néovascularisation ou un défaut de neurogenèse. Ces facteurs externes peuvent, en revanche, quand ils sont présents, contribuer à l'auto-organisation de la masse tumorale et avoir donc un effet communautaire. Discutons l'exemple de l'angiogenèse plus en détail dans ce contexte. Le switch angiogénique caractérisé par Judah Folkman¹³⁵ où la vascularisation va structurer la masse tumorale et permettre son expansion. Une tumeur dans l'état préangiogénique ne peut pas se développer au-delà de quelques millimètres. Pour dépasser cette limite, il faut l'apport de la vascularisation. Cet appel à la vascularisation est régulé par des facteurs angiogéniques qui sont produits après le switch angiogénique dans la cellule tumorale. La vascularisation est donc une variable qui limite ou promeut l'auto-organisation et a donc un effet sur la « communalité » tumorale. Le système nerveux et le système immunitaire semblent avoir un effet similaire de « *gate-keeper* » à double tranchant. Un concept voisin est, dans ce contexte, celui des « *attractor states* »¹³⁶. Dans ce concept, la plasticité dynamique des cellules souches entraînerait des événements moléculaires mutationnels et non mutationnels chaotiques qui perturberaient l'homéostasie cellulaire et favorisent leur résistance au traitement. Pour stabiliser ces événements et pour sensibiliser les cellules tumorales au traitement, une possibilité est de les pousser en un état « attractor » différent dans lequel la plasticité est stabilisée (« *Attractor state* » 1 : dépendance à la vascularisation, « *Attractor state* » 2 : dépendance immunitaire etc.).

On peut formaliser cette idée de la manière suivante : $S_{(t+1)} = F(S(t), E)$ et $S_{(t+1)} = F(S(t), E, t)$, où $S(t)$ représente l'état global de la tumeur à l'instant t , E l'ensemble des événements cellulaires et moléculaires externes ou internes, et F la fonction de transition définie par les règles locales. F est aussi dépendant du temps, un temps plus court ayant un F plus élevé.

¹³⁴ Colom B, et al. Mutant clones in normal epithelium outcompete and eliminate emerging tumours. *Nature*, 2021, 598(7881): 510-514.

¹³⁵ Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.*, 2002, 29(6 Suppl16) :15-8.

¹³⁶ Prager BC, Bhargava S, Mahadev V, Hubert CG, Rich JN. Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. *Trends Cancer*. 2020, 6(3):223-235.

Un « attracteur » correspond alors à un sous-ensemble de l'espace des états vers lesquels le système converge de façon stable malgré les perturbations. Ainsi, modifier le micro-environnement tumoral ou appliquer une intervention thérapeutique peut ramener le système vers un nouvel état « attracteur » caractérisé par une plasticité moindre ou une dépendance accrue à certains facteurs biologiques spécifiques : Si $S_{(t)} \in \text{Domaine } A$, alors $\lim_{t \rightarrow \infty} S_{(t)} \rightarrow \text{Attracteur } A$.

Cela signifie que si l'état du système, $S_{(t)}$, se trouve dans un domaine particulier (Domaine A), alors, plus le temps passe (« t » tend vers l'infini), plus l'état du système va progressivement se rapprocher d'un certain attracteur (« Attracteur A »), c'est-à-dire un état stable ou récurrent vers lequel le système converge naturellement.

Pour l'attracteur « Angiogenèse » : Si $S_{(t)} \in \text{Domaine\_Angio}$, alors $\lim_{t \rightarrow \infty} S_{(t)} \rightarrow \text{Attracteur\_Angio}$.

Pour l'attracteur « immunité » : Si $S_{(t)} \in \text{Domaine\_Immun}$, alors $\lim_{t \rightarrow \infty} S_{(t)} \rightarrow \text{Attracteur\_Immun}$.

La transition peut être vue comme un changement de domaine d'attracteur sous l'action d'événements internes ou externes, modélisé par :

- $S_{(t+1)} = F(S_{(t)}, E_{(t)})$
- Si $S_{(t)} \in \text{Domaine\_Angio}$ et $E_{(t)} \rightarrow \text{conditions de transition}$, alors $S_{(t+1)} \in \text{Domaine\_Immun}$
- $\lim_{t \rightarrow \infty} S_{(t)} \rightarrow \text{Attracteur Immun}$

Ce qui change, c'est le domaine « attracteur » (Angio $\rightarrow$ Immun), ce qui est dépendant de la fonction F d'attraction et du domaine « attracteur » A.

Néanmoins, le SOC présente un certain nombre de faiblesses. Le concept du SOC peut être vu un peu comme un concept fourre-tout dans lequel le niveau heuristique est faible. L'état chaotique moléculaire ne peut pas, pour l'instant, être mesuré ou quantifié, ce qui rend ce concept non opérant dans l'état actuel de la recherche.

5. Théories philosophiques de la causalité

Le dictionnaire « Merriam Webster » définit la causalité comme (1) une qualité (causale) ou capacité ou (2) une relation entre une cause et ses effets où des événements sont corrélés d'une manière régulière à des phénomènes (« (1) *a causal quality or agency* » et « (2) *the relation between a cause and its effect or between regularly correlated events or phenomena* »). On voit que la deuxième définition est celle qui est comprise par tout le monde. L'énoncé « les événements corrélés à des phénomènes d'une manière régulière » correspond au concept humien de la causalité (« *Humean Regularity Theory* » HRT, voir plus loin).

Dans les sciences comme en philosophie, la causalité est comprise comme inhérente à un discours rationnel et constitue la charpente de tout programme de recherche. Le vivant ne peut être appréhendé qu'à travers un raisonnement causal, et expliquer un phénomène implique, avant tout, de mettre en lumière sa causalité. Ainsi, science et philosophie partagent un attachement profond à la relation causale, non seulement comme concept, mais aussi comme méthode d'acquisition des connaissances.

Différentes théories de la causalité ont émergé au fil du temps. Ces théories vont de modèles philosophiques traditionnels, tels que la doctrine des quatre causes d'Aristote, à des formulations modernes qui cherchent à approfondir notre compréhension de la relation entre cause et effet. Parmi les approches contemporaines, on trouve les théories probabilistes qui utilisent des réseaux bayésiens pour explorer les dépendances entre variables, ainsi que les théories interventionnistes qui mettent en avant le rôle des manipulations et interventions pour établir des liens causaux¹³⁷. Ces modèles apportent des perspectives variées et enrichissent notre capacité à interpréter des phénomènes complexes.

Dans le contexte de la recherche sur le cancer, la causalité prend une dimension essentielle pour démêler les interactions entre facteurs génétiques, environnementaux et cellulaires. Comprendre les mécanismes causaux, qui sous-tendent l'initiation et la progression tumorale, est crucial pour développer des stratégies thérapeutiques efficaces. Leur élucidation fournit une base pour explorer la dynamique des processus biologiques, permettant ainsi de mieux cerner les trajectoires qui mènent à des états pathologiques et d'envisager des interventions ciblées. Différentes théories de causalité ont été proposées que nous allons revoir ici brièvement, et nous discuterons de leur pertinence pour la recherche dans le domaine du cancer.

¹³⁷ Reiss J. Causation: An Opinionated Introduction. 2007, <http://jreiss.org/Causality%20Manuscript.pdf>.

5.1. Concepts anciens : Le concept de causalité chez Aristote

Aristote distingue quatre causes : la cause matérielle, la cause formelle, la cause efficiente ou motrice, et la cause finale¹³⁸. Ce qui est aussi appelé la doctrine des 4 causes. Concernant la causalité, Aristote se place dans le contexte du pourquoi (pourquoi cette chose existe, etc.). Il poursuit la tradition antérieure tout en donnant un contour précis à ces 4 causes. Son concept de cause a un aspect métaphysique et épistémologique. La première cause, la cause matérielle pose la question de quoi est fait un objet. La deuxième, la cause formelle, demande quelle apparence l'objet doit revêtir. La troisième, la cause efficiente ou motrice, demande quelle est la première source du changement d'apparence d'un objet. Enfin, la cause finale détermine pour quel but un objet existe (un couteau est fait pour couper). Le concept d'Aristote est téléologique et libre de facteurs causaux psychologiques. Pour Aristote, les quatre causes sont indispensables pour expliquer les phénomènes naturels. Les objets naturels sont sujets aux changements dans le temps et dans l'espace, et donc les facteurs qui y contribuent sont la matière, la forme, les conditions qui induisent le changement et la finalité du processus. Dans la génération du monde animal, le mâle apporte la forme et la femelle la matière.

5.2. Théories modernes de Causalité

Il y a différentes théories modernes de la causalité. Ces théories incluent à la fois des aspects métaphysiques/ontologiques et méthodologiques. Certaines peuvent être aussi vues comme des démarches méthodologiques. Je les ai, néanmoins, incluses dans cette liste :

- Théories de régularité (« *regularist theories* », Hume et ses descendants, Andreas, Guenther etc.)
- Théories de modularité (Woodward, Le Roy)
- Théorie contrefactuelle (Lewis, Hendry)
- Théories probabilistes (Bayes-nets théories, Pearl, Spohn, Cartwright, Suppes, Glymour)
- Théories interventionnistes/manipulationnistes (Woodward, Menzies, Price)
- L'Inférence à la meilleure explication (« *Inference of the Best explanation* ») (Harman Gilbert)
- « *Causal Pie modèle* » (Rothman)
- La Causalité de Granger (Granger)
- Théories de singularité (Anscombe, Sosa, Tooley, Kinzler, Salmon, Dowe)

¹³⁸ Ugwu AF. Aristotle's Theory of Causality. Science Open Preprints 2024, DOI: 10.14293/PR2199. 001199.v1.

-Théorie de causalité du cas unique (« *single case causality* ») et critique des concepts de causalité (Cartwright)

Ces théories couvrent donc deux champs, le champ métaphysique/ontologique et le champ méthodologique. Le niveau métaphysique/ontologique inclut les théories de régularité, contrefactuelles et de singularité. Le niveau méthodologique concerne les théories probabilistes et interventionnistes, l'IBE, le « *causal Pie modèle* » et la causalité de Granger.

Nous allons discuter quelques-unes de ces théories ici et leur utilité dans le cadre de ce travail :

5.2.1 Modèles causaux de régularité (« *causal regularity models* »)

Déjà dans les *Discours sur les phénomènes* de Galilée, une relation de temporalité était avancée comme *explanans* de la causalité : « La cause est ce qui est tel que, lorsqu'elle est posée, l'effet s'ensuit ; lorsqu'elle est ôtée, l'effet est ôté ». Au XVIII^e siècle, David Hume définissait la causalité en termes de « conjonctions » répétées d'événements¹³⁹. Le lien causal entre-deux événements n'était pas explicable par une position réaliste, mais seulement empirique, car pour Hume, la causalité est une propriété de la connaissance, mais non de la nature (du réel).

Hume a soutenu que la causalité ne pouvait être définie de manière adéquate qu'en termes de régularités empiriques impliquant des classes d'événements (« *An Inquiry into Human Understanding* », 1751). Pour Hume, trois phénomènes empiriques sont nécessaires pour déduire la causalité : la contiguïté ("la cause et l'effet doivent être contigus dans le temps et l'espace"), la succession ("la cause doit être antérieure à l'effet") et la conjonction constante ("il doit y avoir une union constante entre la cause et l'effet"). Ceci est une définition méthodologique dont le critère est la temporalité. Il y a donc une contingence spatio-temporelle dans la HRT qui est indépendante des notions de force causale et de connectivité entre événements.

Dans les mots de Hume, deux conditions sont requises ¹⁴⁰:

¹³⁹ Andreas H and Guenther M, Regularity and Inferential Theories of Causation. The Stanford Encyclopedia of Philosophy, ed. Edward N. Zalta, <https://plato.stanford.edu/archives/fall2021/entries/causation-regularity/> 2021, Metaphysics Research Lab, Stanford University.

¹⁴⁰ Hume, D. A Treatise of Human Nature. Clarendon Press, Oxford, U.K., 2007, edited by David Fate Norton and Mary J. Norton.

(D1) « un objet précédent et contigu à un autre, et où tous les objets ressemblant au premier sont placés dans des relations de préséance et de contiguïté similaires avec les objets qui ressemblent au second ».

(D2) « Un objet précédent est contigu à un autre, et si uni à lui que l'idée de l'un a déterminé l'esprit à former l'idée de l'autre, et l'impression de l'un à former une idée plus vive de l'autre ».

La théorie de la régularité de Hume (HRT) est formalisable de la manière suivante : Ce sont des événements singuliers du type C et E. L'événement singulier C est une cause de E si :

-C est contigu d'une manière spatio-temporelle à E

-C précède E

-Tous les événements de type C sont suivis par des événements de type E

La notion de la causalité de John Stuart Mill s'articule autour de la notion d'induction et de la logique inductive. Il écrit: « Déterminer quelles sont les lois de la causalité qui existent dans la nature, déterminer les effets de chaque cause et les causes de tous les effets, constitue la tâche principale de l'induction; et montrer comment cela se fait est l'objectif principal de la logique inductive ». (*« To ascertain, therefore, what are the laws of causation which exist in nature ; to determine the effects of every cause, and the causes of all effects, is the main business of Induction ; and to point out how this is done is the chief object of Inductive Logic »*).

Cette vision intègre non seulement le concept de régularité de la causalité, mais comporte aussi un élément contrefactuel. La HRT de la causalité a été raffinée par John Stuart Mill qui proposait une série de règles pour l'inférence causale inductive par l'introduction de la méthode des différences¹⁴¹ : « Si à un moment un événement a lieu et à un autre moment il n'a pas lieu et ont toutes les conditions en commun à l'exception d'une seule qui existe seulement dans le premier événement, la condition qui est différente entre ces deux événements est la cause ou une partie indispensable de la cause du phénomène observé » (*« If an instance in which the phenomenon under investigation occurs, and an instance in which it does not occur, have every circumstance in common save one, that one occurring only in the former ; the circumstance in which alone the two instances differ, is the effect, or the cause, or an indispensable part of the cause, of the phenomenon »*). Si nous pouvons identifier un facteur, et seulement un, qui diffère entre deux situations, alors ce facteur a une importance causale. Cependant, l'inférence causale inductive doit être renforcée par des conditions/critères additionnels. Les deux situations comparées doivent être homogènes, et l'agent/mécanisme causal et la réponse induite doivent seulement être

¹⁴¹ Mill JS. of the composition of causes. Chapter VI System of Logic 1859.

présents dans l'une, mais pas dans l'autre situation. D'autres causes qui pourraient induire la réponse ne doivent pas être présentes au moment de l'expérience. Cela peut être formalisé de la manière suivante :

$\{C_1, \dots, C_n\}$ désignent les facteurs causaux positifs et $\{D_1, \dots, D_m\}$ les facteurs causaux négatifs, tous ensemble suffisants pour induire l'effet E :

- Les événements $C_1, \dots, C_n$ sont contigus à E sur le plan spatio-temporel, à condition que les événements $D_1, \dots, D_m$ soient absents.
- $C_1, \dots, C_n$ précèdent E.
- Tout ensemble positif de type $\{C_1, \dots, C_n\}$ est suivi d'un événement de type E, si aucun facteur négatif de type $\{D_1, \dots, D_m\}$ n'est présent.

Dans ce contexte, la notion de champ causal intervient. Le champ causal est proche de la notion de « *background* » causal. C'est la condition de base sur laquelle la relation causale se déroule. Un champ causal demande la présence de certaines entités pour la durée de temps nécessaire à l'effet causal, dans le cas du cancer, par exemple, la présence d'entités moléculaires ou cellulaires précise à un temps t donné.

La notion de cause suffisante ou nécessaire peut également être abordée brièvement dans ce contexte (cf. discussion plus détaillée plus loin). Quand différentes causes concourent à produire un effet, on peut être en face de deux situations. Dans la première situation, l'effet a lieu seulement si les deux causes interviennent. Dans ce cas, les deux causes sont suffisantes, mais aussi nécessaires (car l'absence de l'une ou de l'autre ne conduira pas à l'effet E). Dans le deuxième cas, l'effet a lieu si l'une ou l'autre des causes interviennent. Ces causes sont alors seulement suffisantes, mais non nécessaires. Ceci peut être formalisé comme suit : $(C_1 \wedge C_2) \vee D_1 \rightarrow E$. Ceci correspond aux conditions INUS (« *Insufficient but non-redundant part of an unnecessary but sufficient condition* »). Dans ce cas, C_1 est une condition INUS, en elle-même, car elle est insuffisante, mais représente également un élément non redondant d'une condition $(C_1 \wedge C_2)$ pour produire l'effet E. Dans le TME, nous rencontrons beaucoup de situations comportant des conditions INUS comme l'effet des facteurs morphogéniques sur la vascularisation qui peuvent être suffisants, mais non nécessaires pour produire une vascularisation tumorale adéquate. Ceci est discuté un peu plus loin plus en détail dans la partie « cause nécessaire et causes suffisantes ».

L'inférence causale inductive est un moteur essentiel dans la stratégie de découverte en biomédecine. L'inférence extrapole une connexion causale entre deux phénomènes biologiques, entre, par exemple, une altération moléculaire et un phénotype observé. Toutefois, cette méthode

doit être consolidée par d'autres approches afin d'éviter les biais liés à la corrélation ou aux variables cachées.

Des formulations modernes de la théorie de régularité ont été faites par Baumgartner¹⁴², Andreas & Gunther¹⁴³. Ces travaux insistent sur la nécessité d'un cadre conceptuel qui prenne en compte la structure logique sous-jacente aux relations causales. Ceci permet d'intégrer la complexité des systèmes biologiques où de multiples facteurs interagissent.

5.2.2 Causalité contrefactuelle (“counterfactual causality”)

Une affirmation contrefactuelle se présente comme un conditionnel dont l'antécédent n'est pas réalisé, mais qui explore ce qui se serait produit si cet antécédent avait eu lieu. La formulation symbolique classique s'appuie sur les variables et la logique des mondes possibles. Supposons : Si P n'a pas eu lieu, mais on examine le monde où P serait vrai (noté $w[P]$), alors le conséquent Q découle de la réalisation de P :

$$P \rightarrow Q$$

Le contrefactuel peut s'écrire :

$\neg P$, mais $(P \rightarrow Q)$: « Si P avait eu lieu, alors Q serait aussi survenu. »

Dans le langage des mondes possibles (Lewis, 1973)¹⁴⁴, cela se formalise ainsi :

$$w[P] \models Q$$

où $w[P]$ est le monde le plus similaire au monde réel où P est vrai, et $\models$ indique que Q est vrai dans ce monde.

En résumé, une relation contrefactuelle entre deux variables s'exprime :

$$(P^* \rightarrow Q^*) \mid \neg P$$

où P^* est l'antécédent non réalisé, Q^* le conséquent qui dépend de P^* , et « $\mid \neg P$ » précise que dans le monde réel, P ne s'est pas produit.

Cette notation met en lumière l'essence du raisonnement contrefactuel en logique causale contemporaine.

Pour évaluer une telle affirmation, il faut imaginer comment le monde aurait été si la condition préalable s'était réalisée. Les contrefactuels sont essentiels au raisonnement causal, à condition qu'une théorie générale (loi causale générale) sous-tende la relation de cause à effet. Par exemple : si une propriété de Q (PQ) est modifiée par P, alors P possède une relation causale avec PQ, ce qui peut entraîner un changement de Q ($P \rightarrow PQ \rightarrow Q$).

¹⁴² Baumgartner, MA. Regularity Theoretic Approach to Actual Causation. *Erkenntnis*, 2013, 78 (1):85-109.

¹⁴³ Andreas H Gunther M. A regularity theory of causation. *Pacific Philosophical Quarterly*, 2024, 105: 2-32.

¹⁴⁴ Lewis DK. *Counterfactuals*. 2001, pages 168, ISBN 9780631224259, Ed. Wiley-Blackwell.

En résumé : Pour affirmer une relation causale dans un contexte contrefactuel, il est nécessaire de considérer la tournure contrefactuelle avec une notation rigoureuse. Comme cela est indiqué plus haut, on écrit typiquement : $(P \rightarrow Q) \mid \neg P$, c'est-à-dire : « Si P avait eu lieu, alors Q se serait produit », alors qu'en réalité P ne s'est pas réalisé. En langage des mondes possibles, cela se formalise ainsi : $w[P] \models Q$, où $w[P]$ désigne le monde le plus similaire au réel dans lequel P est vrai, et $\models$ indique que Q y est vérifié. Cette notation met en évidence la structure du raisonnement contrefactuel dans l'analyse causale. On examine la vérité de Q dans les mondes où P, pourtant faux dans le réel, serait réalisé :

$$(P^* \rightarrow Q^*) \mid \neg P, w[P] \models Q$$

Pour anticiper et pour citer un exemple concernant le sujet de cette thèse :

Affirmation : La cellule tumorale produit des facteurs angiogéniques ce qui conduit à la sortie de l'état dormant et à l'expansion tumorale.

Contrefactuel : Absence de facteurs angiogéniques $\rightarrow$ Retour à l'état dormant et absence d'expansion tumorale. (« Quel aurait été le résultat si la cellule tumorale n'avait pas produit de facteurs angiogéniques »).

Pour Judea Pearl, le raisonnement contrefactuel occupe le sommet de la hiérarchie des raisonnements causaux, car il permet d'aller au-delà de la simple observation ou de l'intervention, pour envisager des mondes alternatifs où certaines conditions auraient été différentes. Ce niveau ultime du raisonnement causal permet de répondre aux questions du type : « Qu'aurait-il pu se passer si... ? » Le contrefactuel est nécessaire, mais non suffisant pour la causalité, car le contrefactuel participe à la causalité, mais toutes les causalités ne sont pas contrefactuelles, et des théories sans contrefactuel ont été proposées¹⁴⁵. Des philosophes dont Nancy Cartwright¹⁴⁶ ont souligné les limites du contrefactuel, notamment en ce qui concerne la causalité des cas singuliers ou uniques, où il devient difficile, voire impossible, de formuler des scénarios alternatifs pertinents. Le débat autour de l'applicabilité du contrefactuel dans différentes disciplines scientifiques reste donc ouvert et témoigne de la richesse de la réflexion sur la causalité.

Cette discussion sera approfondie plus loin dans ce chapitre en tenant compte des différentes critiques et des nuances qu'apportent les approches contemporaines à la compréhension des relations causales.

¹⁴⁵ Salmon W. Causality without counterfactuals. *Philosophy of science*, 1994 61 287-312.

¹⁴⁶ Cartwright N. A philosopher's view of the long road from RCT to effectiveness. *The LANCET*, 377(9775): 1400-1401.

5.2.3 Modèle interventionniste de la causalité

Un développement intéressant dans le concept de causalité est l'interventionnisme de Woodward ¹⁴⁷. Selon cette approche, pour que X soit considéré comme une cause de Y (c'est-à-dire que «X est pertinent causalement pour Y» au niveau du type), il doit exister des circonstances contextuelles B telles qu'une intervention unique modifiant uniquement la valeur de X (sans affecter d'autres variables) entraînerait un changement de Y ou de la distribution de probabilité de Y. Ainsi le critère proposé peut se formuler ainsi : X cause Y s'il existe un contexte B où une intervention sur X, isolée, provoque une modification observable de Y (« *Consider the following characterization of what it is for X to cause Y, where 'cause' here means something like 'X is causally relevant to Y at the type-level': X causes Y if and only if there are background circumstances B such that if some (single) intervention that changes the value of X (and no other variable) were to occur in B, then Y or the probability distribution of Y would change* ») .

Ce modèle est particulièrement adapté aux sciences expérimentales, où l'on peut perturber une relation de cause à effet pour observer la réponse du système. Dans les études observationnelles, la stricte application de l'interventionnisme est plus complexe, car il n'est généralement pas possible de manipuler directement la cause supposée. Toutefois, certaines situations naturelles — comme les expériences naturelles ou les variations contextuelles fortuites — peuvent être assimilées à des quasi-interventions et servir à tester des hypothèses causales.

L'interventionnisme met également en lumière la notion de robustesse causale : si le changement de Y produit par l'intervention sur X est constant à travers différents contextes B, alors la relation causale entre X et Y est jugée robuste. Cette perspective favorise une analyse fine des mécanismes sous-jacents à la causalité, en invitant à considérer la structure du système, la nature des interventions possibles et les conditions contextuelles qui modulent les effets observés.

Dans le domaine biologique, l'approche interventionniste permet d'interpréter les manipulations expérimentales comme des interventions sur les variables d'intérêt, et de déduire la direction et la force des liens causaux. Cela ouvre la voie à une causalité dynamique, centrée sur la possibilité d'agir sur les composants du système pour en révéler les principes organisateurs. Pour les approches observationnelles, l'interventionnisme strict est moins applicable, car il n'est pas possible d'intervenir dans la relation causale. Cependant, des expériences naturelles peuvent faire figure de quasi-intervention.

¹⁴⁷ Woodward J. Making Things Happen: A Theory of Causal Explanation. 2003, pages 418, Oxford University Press Inc. ISBN-10: 0195155270.

On peut décrire ceci d'une façon plus formelle :

Dans le cadre de la théorie interventionniste de la causalité, l'idée clé est que la relation causale entre deux variables X et Y se définit par la possibilité de modifier Y en agissant directement sur X , toutes choses égales par ailleurs. Cette idée se formalise à l'aide du calcul des interventions, souvent noté $\text{do}(X = x)$, introduit par Judea Pearl (le « do operator »).

On note $P(Y | \text{do}(X = x))$ la distribution de probabilité de Y lorsque X est fixé à la valeur x par une intervention, c'est-à-dire en rompant toute influence externe sur X . Formellement, on dit que X cause Y s'il existe au moins deux valeurs x et x' pour lesquelles :

- $P(Y | \text{do}(X = x)) \neq P(Y | \text{do}(X = x'))$

Autrement dit, une intervention sur X entraîne une modification de la distribution de Y . Cette formulation peut aussi s'exprimer en utilisant la notation des graphiques causaux :

- Pour un ensemble de variables V , un modèle causal structurel définit la façon dont chaque variable dépend de ses causes directes.
- L'intervention $\text{do}(X = x)$ consiste à remplacer l'équation structurelle de X par la valeur constante x , et à recalculer la distribution des autres variables du système.

Ainsi, la causalité de X vers Y dans le sens interventionniste correspond à la sensibilité de Y à une modification forcée de X , en maintenant les autres facteurs constants. On écrit, dans un contexte donné (contexte B) :

- $X \text{ cause } Y \Leftrightarrow \exists B, \exists x, x' : P(Y | \text{do}(X = x), B) \neq P(Y | \text{do}(X = x'), B)$

Cette notation permet de distinguer clairement la corrélation $P(Y|X)$ de la causalité $P(Y|\text{do}(X))$.

5.2.4 Théorie de singularité de la causalité

Le caractère nomologique de la causalité (NCC) stipule que chaque fois qu'il existe une relation causale entre deux entités, C et E , il existe une loi causale qui les englobe (au moins sous une certaine description de C et de E). L'idée est que la relation entre les événements C et E fait partie d'un modèle plus général ($C \rightarrow E$), ceci implique l'existence d'une loi causale plus générale. Cependant, la relation causale possède un aspect local, et donc deux événements peuvent être liés de manière causale par seulement ce qui se passe entre ces deux événements. C'est l'idée de la singularité de la causalité¹⁴⁸.

L'exemple suivant peut être donné ¹⁴⁹: « Le plaisir causé par le chocolat qu'Alice est en train de manger, par exemple, ne semble pas dépendre de quoi que ce soit en dehors de la relation entre

¹⁴⁸ Anscombe, GEM. 'Causality and Determination', in: Anscombe, G.E.M. (1981). *Collected, philosophical papers*, vol. II: *Metaphysics and the philosophy of mind*. Oxford: Wiley-Blackwell, pp. 133–47.

¹⁴⁹ Whittle A. Singularism. *Proceedings of the Aristotelian Society*, 2003, 103(1):371-380.

le fait qu'Alice mange du chocolat et son plaisir ». Il ne semble pas dépendre d'événements passés ou futurs de même nature ni d'événements se produisant à des endroits différents. Il semble que cela concerne uniquement ce qui se passe au moment et à l'endroit où Alice mange le chocolat. Le lien causal entre deux événements ne dépend donc en rien de facteurs extérieurs à cette relation. Ceci est donc en faveur d'une théorie de singularité (TS) de la causalité.

Dans le cadre de la TS, la causalité ne s'appréhende pas comme la manifestation d'une loi universelle, mais comme une relation locale et contextuelle entre deux occurrences singulières : l'événement cause *c* et l'événement effet *e*. Ce point de vue s'oppose au paradigme strictement nomologique, où chaque relation causale serait régie par une loi générale applicable en tout temps et en tout lieu.

Formellement, la causalité de la TS peut se définir par la survenue effective d'*e* à la suite de *c*, dans un contexte spécifique *B*, à l'exclusion de toute explication alternative. Autrement dit, dans ce cadre, *c* cause *e* dans *B* si, et seulement si :

- *C* précède *E* dans le temps et la localisation pertinente ;
- *C* et *E* sont liés par un mécanisme ou un processus identifiable dans *B* ;
- Il n'existe aucune autre cause dans *B* qui puisse expliquer la survenue de *E* indépendamment de *C*.

Cette approche met l'accent sur la « connexion causale » propre à un contexte donné, observable dans la structure locale des événements, et pouvant dépendre de propriétés particulières du système. On peut, par analogie aux modèles d'intervention, formaliser la relation causale de singularité ainsi :

C cause *e* dans le contexte *B*

⇔

$P(e \mid \text{do}(c), B) \neq P(e \mid \text{do}(c'), B)$

où *C'* désigne une alternative à *C* dans le même contexte *B*. À la différence d'une loi causale générale, cette formalisation vise la spécificité de la relation dans son occurrence singulière, et autorise la pluralité des lois ou mécanismes selon la situation.

La « *Mark transmission theory* » de Wesley Salmon est à associer à la TS¹⁵⁰. Pour Salmon, les interactions causales sont plus fondamentales que les processus causaux. Les processus causaux sont les moyens par lesquels l'influence causale est transmise à partir des connexions causales objectives et physiques. Les processus causaux peuvent transmettre une « marque » dans l'espace

¹⁵⁰ Salmon, W. (1984). *Scientific Explanation and the Causal Structure of the World*. Princeton: Princeton University Press.

et le temps à la suite de l'interaction causale. Proche de la théorie de Salmon est la théorie de Dowe, qui postule un transfert d'énergie entre l'événement causal et la variable responsable de l'effet ; cette approche implique également la prise en compte d'un contexte spatio-temporel précis et de la récurrence des phénomènes observés ¹⁵¹. Selon les théories de Salmon et Dowe, la relation causale n'est donc pas seulement déterminée par la succession temporelle des événements, mais aussi par la transmission effective d'une quantité physique mesurable.

La question du caractère nomologique de la TS se pose néanmoins. Le caractère nomologique peut être appliqué à la TS dans certaines conditions et notamment dans le domaine des sciences naturelles. L'interaction entre une protéine et son récepteur peut être vue comme un événement de singularité. Cependant, il y a des propriétés structurelles générales (conformation 3D, présence d'acides aminés spécifiques, contraintes spatiales etc.) qui dictent cette interaction et donc contribuent à la relation entre une cause et un effet dans le cadre de l'événement de singularité. Ces interactions sont donc dépendantes de règles précises qu'on peut assimiler à des lois. C'est le cas du TME où les interactions moléculaires obéissent à cette règle. Donc, dans cette perspective physicaliste, le NCC rentre bien dans la TS.

5.2.5 Modèle de Causalité de Granger

Pour analyser l'effet causal d'une série temporelle sur une autre, l'un des outils simples est la causalité de Granger¹⁵². La causalité Granger opère si une variable particulière vient avant une autre. Il s'agit donc d'une série chronologique à partir de laquelle on infère une sorte de lien de causalité. Dans un scénario simple, la causalité de Granger prédit avec précision l'existence d'un lien de causalité entre les composantes X et Y dans le cas d'une relation linéaire, mais exclut de lien lorsque X et Y sont tous les deux en aval d'une variable commune Z. La causalité de Granger s'appuie sur deux informations pour construire cette topologie : le temps et les fluctuations stochastiques de chacune des composantes. Le temps indique la direction : ce qui se passe en premier doit être en amont de ce qui se passe ensuite. Les fluctuations basales indiquent la topologie : dans une relation linéaire, les fluctuations de la composante Y sont en relation avec des fluctuations de Z transmises par Y et des fluctuations X, alors que cette dépendance à la fluctuation de X est absente lorsque Z est l'entrée commune à X et Y. La puissance de cette approche est que nous n'avons plus besoin de nous soucier des effets secondaires possibles des interventions, et elle offre un cadre explicite pour extraire les relations de rétroaction et

¹⁵¹ Dowe P. Physical causation. 2007, Cambridge University Press, 236 pages, ISBN: 0521039754.

¹⁵² Shojaie A, Fox EB. Granger Causality: A Review and Recent Advances. *Annu Rev Stat Appl.* 2022 Mar;9(1):289-319. doi: 10.1146/annurev-statistics-040120-010930. Epub 2021 Nov 17.

d'anticipation à partir de variables corrélatives par paires. Pour adapter cette approche à la problématique biologique qui nous concerne, des sondes spécifiques sont nécessaires pour surveiller les fluctuations d'activité pertinentes des composants dans une voie sans perturber la voie. Des méthodes doivent aussi être développées pour échantillonner les fluctuations d'activité *in situ* à une échelle temporelle pour le transfert d'informations entre les composants liés. La causalité de Granger n'apporte pas la preuve d'une relation causale directe, mais suggère un lien causal entre différentes séries temporelles.

La causalité de Granger se formalise dans le cadre des séries temporelles. Une variable X est dite « cause de Granger » pour une variable Y si la connaissance des valeurs passées de X améliore la prédiction de Y, au-delà de la prédiction obtenue en ne considérant que les valeurs passées de Y. Autrement dit, X cause Y au sens de Granger si :

$$P(Y_t | Y_{t-1}, \dots, Y_{t-p}, X_{t-1}, \dots, X_{t-p}) \neq P(Y_t | Y_{t-1}, \dots, Y_{t-p})$$

où Y_t est la valeur de Y à l'instant t, X_t la valeur de X à l'instant t, et P le nombre de retards considérés.

La procédure classique consiste à comparer deux modèles de régression :

- Le premier modèle (autonome) : Y_t est prédit à partir de ses propres valeurs passées.
- Le second modèle (augmenté) : Y_t est prédit à partir de ses propres valeurs passées et de celles de X.

Si l'ajout des valeurs passées de X améliore significativement la qualité de la prédiction de Y, alors on dit que X a une causalité de Granger sur Y.

Il est donc important de noter que la causalité de Granger ne démontre pas une relation causale véritable, mais une antériorité temporelle et une capacité de prédiction accrue. Elle suppose également que toutes les variables pertinentes ont été prises en compte, faute de quoi des facteurs confondants peuvent fausser l'analyse.

5.2.6 L'inférence de la meilleure explication (« *Inference to the best explanation, IBE* »)

L'inférence de la meilleure explication est une sorte de raisonnement abductif identifié par Gilbert Harman en 1965¹⁵³. Dans le IBE, une hypothèse est acceptée si elle fournit une meilleure explication des preuves connues que toute autre hypothèse alternative. L'idée similaire avait déjà été défendue par Charles S. Peirce un siècle plus tôt : le « raisonnement hypothétique » procède

¹⁵³ Harman, Gilbert H. (1968). Enumerative induction as inference to the best explanation. *Journal of Philosophy* 65 (18):529-533.

en arrière des effets vers les causes, ou l'abduction mène des faits surprenants aux théories explicatives. L'inférence à la meilleure explication correspond approximativement à ce que d'autres ont appelé « l'abduction », « la méthode d'hypothèse », « l'inférence hypothétique », « la méthode d'élimination », « l'induction éliminatoire » et « l'inférence théorique ». L'inférence à la meilleure explication est une forme d'argument inductif dont les prémisses sont un ensemble de faits observés, une hypothèse qui explique ces faits observés et une comparaison d'explications concurrentes, et dont la conclusion est que l'hypothèse est vraie. Le IBE inclut la possibilité d'analyser la nature du raisonnement explicatif par l'approche probabiliste bayésienne. IBE est donc une approche méthodologique de causalité qui est proche de la théorie bayésienne permettant de remonter de l'effet vers la cause.

5.2.7 Modèle du fromage causal (“Causal Pie Model”)

Cette façon de représenter les facteurs causaux a été proposée en 1976 par Rothman¹⁵⁴. Le modèle du fromage causal est intéressant pour visualiser la force causale, c'est-à-dire l'intervention des composantes causales pour générer une causalité suffisante. Il est intéressant de noter que beaucoup de causes suffisantes peuvent exister qui produiront un impact et l'effet désiré. Une cause suffisante peut donc être représentée comme un fromage à diverses composantes. La question qui se pose néanmoins est celle-ci : Quel est le nombre de composantes constitutives d'une cause suffisante ? Celle-ci peut être représentée par l'ensemble $\{x_1, x_2, \dots, x_n\}$, avec une notation formelle indiquant $Z_x = 1$ à $Z_x = n$, où chaque composante x_i contribue à la réalisation de l'événement causal.

Quel est le critère ou mesure qui permet à dire qu'une cause a atteint son maximum en suffisance (on pourrait dire aussi saturation de la suffisance) ? On pourrait dire simplement qu'un nombre maximum de composantes est atteint quand une suffisance causale est atteinte et qu'elle produit l'effet dû à la présence de la cause suffisante. Une autre question est la variabilité ou autrement dit l'interchangeabilité des composantes pour produire un effet donné.

Une séquence causale peut contenir de multiples causes suffisantes qu'on peut représenter sous forme d'une série de fromages. Ces causes suffisantes peuvent agir d'une façon autonome indépendante des autres causes suffisantes ou encore avoir des effets synergiques voir compétitifs. Un autre aspect est la temporalité des différentes causes suffisantes. Elles peuvent intervenir à différents moments, ce qui peut même se dérouler en un mode séquentiel. L'analyse sous la forme d'un fromage causal est un moyen intéressant d'analyser la causalité en biologie,

¹⁵⁴ Rothman 1976, Causes, Am J Epidemiol, 104: 587.

et sera pour nous un moyen additionnel pour décrire les relations causales dans le TME. Ceci pourrait même être combiné avec d'autres modes de présentation comme les graphiques acycliques (voir plus loin).

5.2.8 « Causal Graphs » et « Networks »

En 1920, le généticien Sewall Wright avait publié un article très important concernant les relations causales entre les facteurs héréditaires, développementaux et de l'environnement en utilisant le modèle du hamster pour déterminer l'influence des facteurs développementaux dans l'apparition des couleurs de fourrure du hamster, car elle ne suivait pas les règles mendéliennes¹⁵⁵. À cette fin, il utilisa des diagrammes de chemins causaux (« *Causal Path Diagram* », « *Directed acyclic graph* » or *DAG*) contenant des vecteurs unidirectionnels pour déterminer « le flux » causal.

On considère une variable dépendante notée Y ainsi qu'un ensemble de variables explicatives $X_1, X_2, \dots, X_n$, dont la combinaison vise à maximiser la variance expliquée de Y , généralement mesurée par le coefficient de détermination R^2 dans un modèle de régression. L'objectif principal consiste à identifier les variables, ainsi que les processus sous-jacents, qui conditionnent la survenue de l'effet observé, et à estimer précisément l'ampleur et la direction de leur influence respective.

Afin d'établir une relation de causalité entre une variable X et une variable Y , plusieurs critères doivent être satisfaits :

- X doit précéder Y dans le temps (antériorité temporelle) ;
- Il doit exister une corrélation statistique entre X et Y ;
- Aucune autre variable ou facteur non pris en compte ne doit expliquer cette relation, c'est-à-dire qu'il ne doit pas subsister de variable confondante susceptible d'invalidier le lien causal supposé.

Le coefficient de chemin (« *path coefficient* » appelé aussi β) correspond au poids standardisé de la régression (« *standardized regression weight* »). Il est de 0 à 1. Par ailleurs, les variables peuvent être exogènes ou endogènes. Une variable exogène est une variable qui n'a pas de flèche pointée sur elle, en revanche une variable endogène est une variable qui a au moins une flèche pointée sur elle. Les équations de régression sont développées pour les variables endogènes. Par ailleurs, il faut estimer l'effet direct et indirect qui implique une variable intermédiaire

¹⁵⁵ Wright S. The Relative Importance of Heredity and Environment in Determining the Piebald Pattern of Guinea pigs. Proc Natl Acad Sci USA., 1920, 6(6): 320-332.

(« *mediating variable* »). Il faut aussi identifier les facteurs confondants (« *confounding variables* ») qui ne participent pas directement à la relation causale. Dans le cadre de cette thèse, nous tentons d'élaborer des diagrammes causaux à différents niveaux (niveau des processus, au niveau cellulaire et au niveau moléculaire) et analyserons leur faisabilité et comparerons leur valeur explicative. Ces graphiques causaux peuvent être réalisés à l'échelle moléculaire ou phénotypique. Il est aussi intéressant de constater que les divers niveaux sont souvent entremêlés, ce qui est même requis pour éliciter une réponse causale.

Pour approfondir l'analyse des relations causales dans les systèmes complexes, il est utile de distinguer différentes configurations structurelles au sein des DAGs. Ces configurations permettent de mieux comprendre la nature des dépendances entre variables et de guider l'interprétation des mécanismes sous-jacents.

- Chaîne causale (« Chain ») : Il s'agit d'une séquence de variables reliées par des liens unidirectionnels, dans laquelle chaque variable intermédiaire véhicule l'influence de la variable précédente vers la variable suivante. Formellement, si X influence Y, puis Y influence Z ($X \rightarrow Y \rightarrow Z$), la corrélation totale entre X et Z se calcule comme le produit des coefficients de chemin, soit $R_{XZ} = a \times b$, où a est le coefficient de X vers Y, et b de Y vers Z. Ce schéma représente la transmission séquentielle d'un effet causal.
- Fourche (« Fork » ou variable confondante) : Dans cette structure, une variable commune (Y) influence simultanément deux autres variables (X et Z), générant ainsi une corrélation dite « *spurious* » entre X et Z qui ne reflète pas une relation causale directe, mais résulte du rôle de Y comme facteur confondant. Formellement, $Y \rightarrow X$ et $Y \rightarrow Z$; la corrélation observée entre X et Z provient de leur dépendance commune à Y.
- Collisionneur (« Collider ») : Ici, deux variables indépendantes (X et Z) convergent vers une même variable (Y), selon la structure $X \rightarrow Y \leftarrow Z$. Dans ce cas, X et Z ne sont pas corrélés à moins que l'on ne conditionne sur Y, auquel cas une dépendance conditionnelle peut émerger. Cette configuration est cruciale dans l'analyse des biais de sélection et des variables de contrôle.
- Corrélation entre variables exogènes : Ce cas concerne deux variables exogènes (X et Z) qui ne sont reliées par aucune flèche directe ou indirecte dans le modèle, mais qui présentent néanmoins une corrélation, souvent en raison de facteurs structurels ou de dépendances non modélisées ($X \rightarrow Y \leftarrow Z$).

Chacune de ces structures a des implications particulières pour l'identification des relations causales et pour l'estimation des effets directs, indirects et conditionnels. Une reconnaissance

précise de ces schémas dans un graphique causal est indispensable pour éviter les biais, interpréter correctement les analyses statistiques, et orienter la modélisation.

Ces concepts fondamentaux seront illustrés et approfondis par la suite à travers des exemples concrets d'application des règles de traçage des coefficients de chemin selon Wright, afin d'intégrer rigoureusement la représentation graphique à l'analyse causale. Avec les règles de traçage de Wright, la corrélation entre deux variables s'obtient en multipliant les coefficients de chaque chemin admissible qui les relie, puis en additionnant les produits des différents chemins. Les graphiques acycliques incluent des relations entre variables de nature probabiliste et peuvent être caractérisés comme « *Bayésiens Nets* ». Judah Pearl a aussi introduit le « *do-operator* » qui entraîne une directionnalité dans le lien entre deux variables qui sont liées par un coefficient de probabilité (« *path-coefficient* »)¹⁵⁶.

5.2.9. Nancy Cartwright's théorie et critique des théories de causalité

Pour Nancy Cartwright (1979)¹⁵⁷ X est la cause de Y si X accroît la probabilité de Y dans toutes les situations qui sont causalement homogène.

On peut formaliser la définition de la causalité selon Nancy Cartwright de la manière suivante : X est la cause de Y si, pour tout contexte causalement homogène Si, la probabilité de Y dépendante de X, et Si est supérieure à la probabilité de Y sachant Si seul, soit : $p(Y | X \wedge Si) > p(Y | Si)$ où Si représente un ensemble de circonstances de fond dans lesquelles X pourrait agir ($S_1, S_2, \dots, S_n$), et qui ne sont pas affectées elles-mêmes par X. Cette condition traduit l'idée de stabilité causale dans des contextes pertinents et met en évidence le rôle du « *background* » (les Si) sur lequel X produit son effet sur Y. X peut aussi être considéré ici comme une condition INUS.

Comme nous l'avons déjà brièvement abordé, le problème que Nancy Cartwright soulève est que le contrefactuel ne peut pas s'appliquer à la causalité du cas unique. Elle développe donc à partir des « *potential outcome equations* » (POE) le « *situation-specific causal equation model* » (SCEM)¹⁵⁸ qui est plus riche que le POE. Ce modèle vise à offrir une analyse plus fine des relations causales dans des contextes particuliers, en prenant en compte les caractéristiques spécifiques de la situation étudiée et la nature même des facteurs en jeu.

¹⁵⁶ Pearl J. Causality. Cambridge University Press; 2e édition (14 septembre 2009) 484 pages ISBN-10: 052189560X.

¹⁵⁷ Cartwright, N (1979). Causal Laws and Effective Strategies. *Nous*, 13(4): 419-437.

¹⁵⁸ Cartwright N. How to Learn about Causes in the Single Case. In: Widner J, Woolcock M, Ortega Nieto D, eds. *The Case for Case Studies: Methods and Applications in International Development*. Strategies for Social Inquiry. Cambridge University Press; 2022:29-51.

$$\begin{aligned}
 &x_1(i) \\
 &x_2(i) = \beta_{21}(i)b_{21}(i)x_1(i) \\
 &x_3(i) = \beta_{31}(i)b_{31}(i)x_1(i) + \beta_{32}(i)b_{32}(i)x_2(i) \\
 &\dots \\
 &x_n(i) = \sum_{j=1}^n \beta_{nj}(i) b_{nj}(i) x_j(i)
 \end{aligned}$$

Fig. 10 : Représentation du SCEM. Le SCEM suppose un découpage temporel.

Les variables sont ordonnées dans le temps. Chaque équation donne les causes directes relatives au découpage temporel. L'effet E pourrait être n'importe où, par exemple X5. La cause qui nous intéresse C pourrait l'être, par exemple X2. Cela représente la cause des causes et les effets ultérieurs. Ainsi, le modèle ne se limite pas à une relation binaire simple, mais déploie une structure plus riche, où plusieurs variables peuvent interagir et influencer l'effet étudié selon différentes séquences ou contextes. Modifié à partir de la figure de Nancy Cartwright.

<https://www.youtube.com/watch?v=OmNjwTF1ztM>

Le SCEM intègre également des éléments contextuels, permettant d'identifier non seulement les liens directs, mais aussi les conditions d'apparition ou de suppression d'un effet. Cela autorise une analyse fine des mécanismes sous-jacents, en distinguant les facteurs essentiels des variables accessoires, tout en tenant compte des spécificités propres à chaque situation. Ce raffinement méthodologique favorise une compréhension dynamique et nuancée de la causalité, particulièrement précieuse dans les champs complexes comme la recherche biomédicale, où les interactions multiples et les contextes variés exigent une approche flexible et rigoureuse.

En résumé, dans le SCEM, la causalité n'est pas considérée comme une simple relation universelle, mais comme une équation adaptée à chaque contexte, qui intègre des éléments directs (comme la nature de la cause ou de l'effet, la présence de facteurs facilitateurs ou de puissances causales) et des éléments indirects (tels que la potentialité, l'élimination d'alternatives ou les signes d'opérations causales). L'approche de Cartwright reconnaît ainsi la diversité et la complexité des mécanismes causaux dans un monde réel, en soulignant l'importance d'une analyse contextuelle et nuancée.

Par ailleurs, Nancy Cartwright postule qu'il n'y avait pas une pléthore de théories qui sont en compétition les unes et les autres, mais qu'il y a une pluralité de théories adaptées chacune à différents systèmes et lois causales. Mais elle conclut finalement qu'il n'y a pas de théorie véritable de la causalité. Elle pense qu'il est futile de chercher la théorie de la causalité, mais qu'il faut plutôt chercher des théories causales du monde (*de la réalité*) (« *causal theories of the world* »)¹⁵⁹.

¹⁵⁹ Cartwright N. Where is the theory in our theories of causality? The J of philosophy, Feb 2006.

5.3 Évaluation de l'utilité des concepts philosophiques de la causalité dans la conceptualisation du cancer

5.3.1 Considérations générales

Notre question ici concerne l'utilité de ces concepts philosophiques de causalité pour la conceptualisation et la recherche sur le cancer. Voyons ceci un peu plus en détail.

La théorie de régularité de la causalité introduite par David Hume et révisée par John Stuart Mill postule une temporalité de l'occurrence des événements ainsi qu'une régularité de cette temporalité. La relation causale ne se trouve pas, dans cette théorie, dans la nature physique des objets qui interagissent, mais elle est une construction mentale. Elle a un caractère fréquentiste et s'appuie sur la répétition des événements et n'implique donc pas un lien physique entre les événements X et Y. Ceci a, certes, une signification pour des études épidémiologiques du cancer, mais ne correspond pas aux événements moléculaires et aux interactions cellulaires pour lesquelles une interaction physique est primordiale. Cependant, l'approche, et notamment la méthode de différence de Mill, est utilisée dans la recherche sur le cancer comme un outil d'investigation pour établir une connexion de cause et effet, même si celle-ci est imparfaite, car toutes les variables confondantes ne peuvent pas être exclues. Une façon d'éliminer les variables confondantes est l'utilisation des essais contrôlés et randomisés (RCTs) en double-aveugle qui ferment toutes les portes (« *backdoors* »). Les RCTs ont été cependant critiqués par Nancy Cartwright ¹⁶⁰.

La théorie contrefactuelle est ontologiquement non-matérialiste, car le concept ne revendique pas, par essence, une interaction physique entre les variables. Elle est cependant nécessaire à la formulation de la causalité, car elle représente un conditionnel dont l'antécédent n'est pas réalisé et dont le conséquent, décrit comment le monde, aurait été réalisé si l'antécédent avait été obtenu (conditionnel subjonctif) : « Si P avait été obtenu, alors on aurait obtenu Q ». Cette théorie demande l'imagination d'un monde possible et se situe donc dans l'espace mental. La causalité dans la théorie contrefactuelle est un concept à l'interface entre le monde des idées et la réalité et représente donc une confrontation du potentiel avec le fait. La notion de contrefactuel est indispensable au raisonnement causal et constitue la dernière marche de l'échelle de causalité de Pearl ¹⁶¹. Elle est entièrement intégrée dans la démarche scientifique et elle est importante pour

¹⁶⁰ Cartwright N. A philosopher's view of the long road from RCT to effectiveness. The Lancet, 2011, 377(9775):1400-1.

¹⁶¹ Pearl J The Book of Why: The New Science of Cause and Effect. Penguin; 1er édition (2 mai 2019). 432 pages ISBN-10 : 0141982411.

la construction des « *path diagrams* » pour définir le rôle causal d'une variable. Comme nous en avons discuté dans le chapitre précédent, Nancy Cartwright formule des critiques par rapport au concept contrefactuel surtout quand celui-ci devrait justifier la causalité d'un cas unique (« *causality of the single case* »)¹⁶². Elle postule qu'on n'a pas besoin du contrefactuel pour une causalité d'un cas unique (« *Single case causality* »). Elle revendique, au contraire, un modèle situationnel spécifique (« *situation-specific causal equation model SCEM* ») qui comporte des évidences directes et indirectes (cf. chapitre précédent : chapitre 5.2.9). Par ailleurs, elle pense que les études randomisées (RCTs) n'ont pas de valeur pour le cas unique de causalité. Elle pense qu'on ne peut pas généraliser à partir d'un ensemble donné d'objets pour affirmer un lien causal singulier. Dans un RCT, l'effet est validé pour quelques individus dans la population, mais pas pour tous et on ignore pour qui, même si Sober maintient que la probabilité estimée pour un ensemble augmente la probabilité pour la causalité du cas unique (*Sober's « Connecting Principle »*)¹⁶³. Par ailleurs, le RCT ne peut contrôler pour tout, car des événements imprévus peuvent arriver post-randomisation ce qui peut affecter l'étude. Le RCT peut jouer un rôle utile dans la construction de connaissances scientifiques et de prévisions, mais il ne peut le faire que dans le cadre d'un programme cumulatif, en combinaison avec d'autres méthodes, notamment par un développement conceptuel et théorique, pour découvrir non pas « ce qui fonctionne », mais « pourquoi les choses fonctionnent ».

Les « *Causal Pies* » (CP, fromage causal) semblent intéressants pour représenter les relations causales. Cependant, les CPs ne sont pas connectés entre elles. Ils représentent seulement des causes suffisantes dont les composantes sont représentées par les causes nécessaires. Il n'y a donc pas de représentation dynamique pour constituer une chaîne causale. Un autre aspect est la relation entre cause suffisante et nécessaire. Comment les causes nécessaires sont-elles liées entre elles ? Les CPs ne donnent pas de réponse, car ils apportent seulement une représentation statique et fragmentée. Les CPs ont été largement utilisés dans la représentation des « *Hallmarks* » du cancer¹⁶⁴. Cette représentation est purement statique, cumulative et qualitative; elle est donc limitée dans le pouvoir explicatif. Cependant, la combinaison de graphes acycliques et des CPs pourrait être intéressante et apporter une information supplémentaire concernant l'identité des variables connectées dans le graphique acyclique. Dans la partie (6.2.2.2 *L'Analyse causale des gliomes non-mutés IDH1/2*) nous tentons de représenter cette idée avec un exemple concret.

¹⁶² Cartwright N. Single Case Causes : What Is Evidence and Why. 2017. In Hsiang-Ke Chao & Julian Reiss, *Philosophy of Science in Practice*. Cham: Springer Verlag. pp. 11-24.

¹⁶³ Sober E. Two Concepts of Cause. *PSA: Proceedings of the Biennial Meeting of the Philosophy of Science Association* 1984:405-424.

¹⁶⁴ Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144(5):646-74.

La théorie de singularité (TS) s'appuie sur l'observation d'un événement singulier. La causalité peut être observée dans le cas individuel, et cela indique que la causalité doit, en quelque sorte, être présente dans une relation entre deux variables. Cela suggère que la vérité de l'énoncé causal individuel doit être indépendante de l'obtention de régularités universelles. La TS est, dans ce sens, matérialiste et ne requiert, en théorie, seulement la justification ou l'explication d'une interaction¹⁶⁵. C'est un concept qui demande, dans notre contexte, une explication physique (structurelle, etc.) concernant les interactions entre deux variables. La TS est apparentée à l'IBE, cette dernière représente la meilleure explication pour une interaction causale et qui doit donc s'appuyer sur une interaction matérielle correspondante à la TS. La TS est donc le cadre sur lequel s'appuie l'IBE. Elle est donc tout à fait compatible avec la réalité de la recherche sur le cancer et correspond bien aux interactions cellulaires et moléculaires qui ont lieu dans le TME. Le modèle interventionniste de la causalité correspond bien à la pratique de la recherche expérimentale. Elle a donc un caractère méthodologique. La démarche scientifique expérimentale est étroitement liée au programme interventionniste. Une relation causale entre X et Y peut être affirmée et ces deux variables sont donc dépendantes, si sa perturbation dissocie le lien entre X et Y. On peut observer, par exemple, que, quand X est surexprimé, Y est modifié. Si X est représenté par le gène x_1 , et son invalidation par Crisper Cas9 élimine l'apparition de Y, on peut postuler que X et Y sont reliés d'une manière causale. Il faut cependant contrôler le « *background* » et les variables confondants.

La causalité de Granger permet d'obtenir des informations prédictives sans pour autant fournir des indications sur le lien causal réel entre deux variables. La causalité de Granger compare des séries temporelles et sert à prédire l'occurrence temporelle. Il faudrait une série temporelle (cinétique, « *time course* ») ou deux variables varient en fonction du temps. Par exemple, on pourrait imaginer que la prolifération d'une cellule tumorale varie en fonction du temps et la migration qui varie en fonction du temps, et se demander si ces deux processus sont reliés d'une manière causale. On pourrait aussi se demander si l'expansion *in vivo* de la masse tumorale dans une série temporelle est liée d'une manière causale à l'infiltration de cellules immunitaires ou de vaisseaux sanguins ou de fibres nerveuses. Cela pourrait avoir un certain intérêt pour clarifier plus précisément les relations causales. Cependant, nous n'utilisons pas cette approche dans les modélisations décrites au **chapitre VI**, car nous analysons la probabilité d'occurrence de Y en présence de X (qui peut être dépendante du temps), et nous ne comparons pas des séries temporelles pour inférer la relation causale.

¹⁶⁵ Anscombe, GEM. Causality and Determination, in: Anscombe, GEM (1981). Collected philosophical papers, vol. II: Metaphysics and the philosophy of mind. Oxford: Wiley-Blackwell, pp. 133–47.

5.3.2 Caractéristiques et propriétés additionnelles concernant le concept de causalité

(1) Stabilité causale

Une relation causale reste stable si elle perdure quand on modifie le fond causal (« Causal Background »). En d'autres termes, la relation causale X/Y est stable si elle résiste à un changement du « background » ou arrière-plan/fond causal (B_1 - B_n).

Dans une notation probabiliste selon Sober¹⁶⁶, cela donne ceci :

Soit X une variable causale, Y l'effet, et B un ensemble de conditions de fond (*backgrounds*) noté $B_1, B_2, \dots, B_n$.

La stabilité causale d'une relation entre X et Y implique que, pour toute modification raisonnable de B dans l'ensemble considéré, la probabilité conditionnelle de Y à X et B demeure supérieure à la probabilité conditionnelle de Y à non- X et B :

$$P(Y | X, B_i) > P(Y | \text{non-}X, B_i), \forall B_i \in \{B_1, B_2, \dots, B_n\}$$

Cette relation exprime que l'influence causale de X sur Y est robuste à travers différentes configurations du fond causal. La question centrale devient alors d'identifier l'étendue des variations admissibles de B pour lesquelles cette inégalité reste vraie, et ainsi de définir un seuil de stabilité pertinent au contexte étudié.

L'exemple suivant illustre la stabilité causale dans le cas du cancer : L'effet du VEGF dans la vascularisation tumorale a une stabilité causale relativement grande. En effet, VEGF induit l'angiogenèse dans un grand nombre de tumeurs. Cependant, l'étendue de l'effet causal dépend du choix du fond causal et de son extension (type de matrice extracellulaire, d'autres facteurs solubles intervenants, types de cellules immunitaires, présence de facteurs neuronaux, etc.). Il y a aussi un aspect du fond causal, qui intervient, représenté par la fenêtre d'activité (« fenêtre de tir ») et qui dépend du temps. Cette fenêtre peut varier en fonction de différentes conditions. On peut appeler cela des fluctuations du fond causal. Par exemple, lors de l'invasion des cellules tumorales, l'angiogenèse n'est pas active, en tout cas pas au bord des tumeurs. Il y a donc une condition spatio-temporelle d'action de l'angiogenèse et sa dépendance au VEGF. On peut formaliser ceci comme suit :

¹⁶⁶ Sober E, Papineau D Causal Factors, Causal Inference, Causal Explanation Proceedings of the Aristotelian Society, Supplementary Volumes, Vol. 60 (1986), pp. 97-113+115-136.

On peut exprimer la stabilité causale de l'effet du VEGF sur l'angiogenèse, en tenant compte des différentes conditions de fond (matrice extracellulaire, facteurs solubles, cellules immunitaires, facteurs neuronaux et éléments spatio-temporels), à l'aide de la notation probabiliste suivante : $P(\text{Angio} = 1 \mid \text{VEGF} = 1, \text{EM}, \text{FS}, \text{CI}, \text{FN}, \text{ST}) > P(\text{Angio} = 1 \mid \text{VEGF} = 0, \text{EM}, \text{FS}, \text{CI}, \text{FN}, \text{ST})$
 Où : Angio : processus d'angiogenèse ; VEGF : facteur de croissance vasculaire endothélial (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ; EM : matrice extracellulaire (*Extracellular Matrix*) ; FS : facteurs solubles ; CI : cellules immunitaires ; FN : facteurs neuronaux ; ST : facteurs spatio-temporels.

Cette inégalité signifie que, pour toute configuration plausible des variables de fond, la probabilité que l'angiogenèse se produise lorsque VEGF est présente demeure supérieure à celle observée en absence de VEGF, ce qui illustre la robustesse du lien causal entre VEGF et l'angiogenèse à travers différents arrière-plans causaux.

Cette inégalité exprime que, pour toute configuration raisonnable de l'arrière-plan causal (EM, FS, CI, FN, ST), la présence de VEGF accroît la probabilité d'observer le processus angiogénique par rapport à sa non-présence, illustrant ainsi la robustesse de l'influence causale du VEGF sur l'angiogenèse à travers diverses conditions de fond causal.

(2) Pluralisme ou parité causale versus monisme causal

Le monisme causal postule qu'une seule cause entraînera un effet spécifique. Le pluralisme, au contraire, postule plusieurs causes concomitantes pour un phénomène donné.

Il y a plusieurs exemples en médecine et en biologie qui illustrent ce point. Par exemple, diverses causes (pluralisme causal) ont été évoquées concernant la fièvre puerpérale par Semmelweis (substance cadavérique, substance morbide du cancer du col et du genou de nature différente), mais finalement il postula un monisme causal par l'existence d'une substance septique provenant de différents endroits¹⁶⁷. Concernant le pluralisme causal du cancer, les mécanismes plus complexes sont en jeu et visent à expliquer le développement des cancers. Dans l'étude des phénomènes biologiques complexes tels que l'angiogenèse ou le développement du cancer, la relation de causalité ne se réduit pas à un schéma moniste. Au contraire, diverses causes, agissant à différents niveaux (cellulaire, génétique, physique, etc.), peuvent intervenir indépendamment ou de façon séquentielle dans la genèse d'un même effet, illustrant ainsi le pluralisme causal.

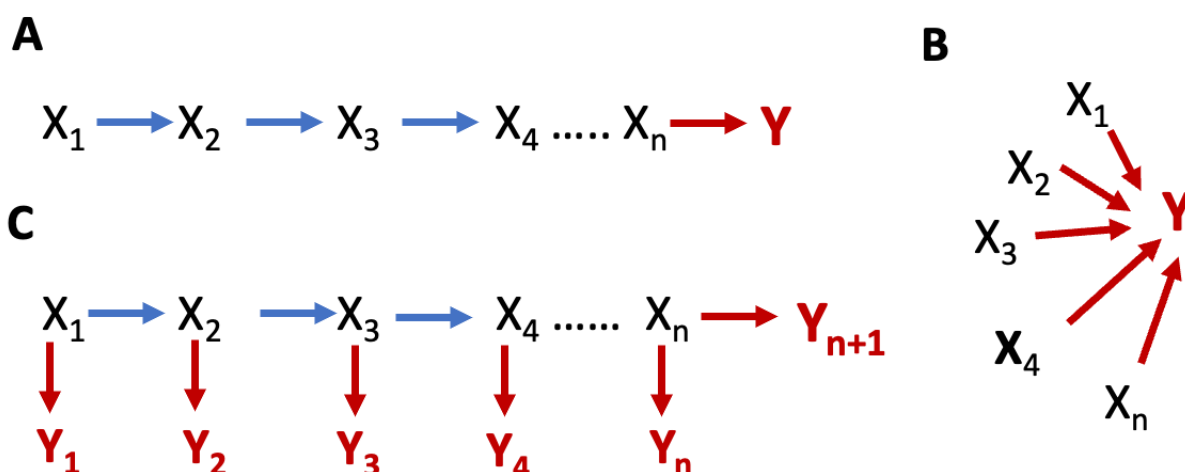
¹⁶⁷ Dash NR, Singh G, Mohapatra A, Keshetty SS. Dr. Ignaz Phillip Semmelweis: The Unrecognized Pioneer of Aseptic Practices. *Cureus*, 2024, 16(8):e68350.

Ces explications causales peuvent être en compétition ou complémentaires, comme nous allons le voir dans la partie « Cancer ».

Une discussion importante concerne deux formes de pluralisme : le pluralisme « compétitif » et le pluralisme « compatible », selon la terminologie de Mitchell ¹⁶⁸. Le pluralisme compétitif peut seulement être transitoire. La coexistence d'explications concurrentes est temporaire, permettant aux communautés scientifiques de maintenir ouvertes plusieurs lignes de recherche jusqu'à ce que l'une d'elles puisse être identifiée comme la bonne ¹⁶⁹. Cependant, dans le cas où le pluralisme compétitif perdure, il peut y avoir une génération de tension épistémique qui pourrait aboutir soit à une élimination « par la force », car l'un des schémas causaux est validé et l'autre non, ou par l'élimination épistémique insidieuse (ignorance, absence de mention dans des articles, symposium, etc.), de l'une ou de l'autre schéma explicatif. En revanche, le pluralisme compatible ne considère pas la coexistence de types d'explications alternatives comme temporaire, mais comme reflétant la complexité à plusieurs niveaux et à plusieurs composantes, et se prêtant à l'intégration plutôt qu'à la concurrence ¹⁷⁰.

Discutons maintenant les différents niveaux de la pluricausalité :

Ces différentes causes doivent être suffisantes et peuvent induire d'une façon indépendante un effet ou, au contraire, être présentes d'une manière séquentielle dans une chaîne causale (Figure 11). Ces différentes causes peuvent aussi se situer sur le même niveau explicatif (soit génétique, soit biochimique, soit physique, par exemple, on pourrait appeler cela homocausalité) ou intégrer les différents niveaux dans une même séquence causale (hétérocausalité).



¹⁶⁸ Mitchell SD. Biological Complexity and Integrative Pluralism. Cambridge University Press, June 2012, 9780511802683. DOI: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511802683>.

¹⁶⁹ Kitcher P. The division of cognitive labor. *Journal of Philosophy* 87 (1):5-22 (1990).

¹⁷⁰ Mitchell SD The landscape of integrative pluralism *Theoria*, 2023, 38(3), 261-297.

Fig. 11 : Pluralisme causal du même niveau explicatif. Ce pluralisme peut correspondre à plusieurs situations. (A) Une chaîne de causes suffisantes (X_n) peut conduire à l'effet Y, (B) plusieurs causes X_1 - X_n peuvent chacune induire l'effet Y, (C) une chaîne causale peut induire l'effet Y_{n+1} , mais chaque variable causale peut indépendamment en plus éliciter l'effet Y_1 à Y_n . Ceci peut se faire avec de multiples permutations.

-Causes suffisantes en chaîne : Plusieurs variables ($X_1, X_2, \dots, X_n$) sont reliées séquentiellement pour induire un effet final Y. Modélisation : $X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 \dots + \beta_n X_n = Y$, où chaque β_i représente le coefficient de chemin.

-Causes suffisantes indépendantes : Chaque cause X peut, isolément, produire l'effet Y. Modélisation : $X_1 \beta_1 = Y \vee X_2 \beta_2 = Y \vee \dots \vee X_n \beta_n = Y$.

-Effets multiples et permutations : Une cause unique (X_1 - X_n) eut généré un effet propre (Y_1) tout en participant à une chaîne qui conduit à un effet plus global (Y_{n+1}), et ceci pour chaque variable. Modélisation : $X_1 + \beta_{2a} X_2 + \dots + \beta_{2n} X_n = Y_{n+1}$ et $Y_1 = \beta_{1b} X_1 \vee Y_2 = \beta_{2b} X_2 \vee \dots \vee Y_n = \beta_{nb} X_n$.

Le pluralisme causal peut revêtir deux différentes formes en ce qui concerne son poids explicatif (« *explanatory power* ») :

(i) Pluralisme des schémas (réseaux) causaux tenant compte du niveau explicatif.

Dans sa forme radicale, tout schéma causal à pouvoir explicatif (« *explanatory power* ») sera équivalent à toute autre séquence causale avec des caractéristiques identiques. Nous n'aurions donc pas à décider quel schéma serait supérieur à un autre, et ils peuvent coexister indépendamment. Puisque le raisonnement causal est à la base de toute théorie scientifique, ceci implique la coexistence de différentes théories, pas nécessairement compatibles, sans pour autant décider laquelle est valide. Mais cela ne correspond pas à l'évolution des théories scientifiques et au progrès des sciences où les théories se complètent entre elles, les moins bonnes étant éliminées.

Le pluralisme complémentaire non compétitif en revanche peut être admis. Une chaîne causale au niveau cellulaire, biochimique ou physique peut coexister et correspondre tout simplement à différents niveaux explicatifs. Cependant, le pouvoir explicatif d'une chaîne causale peut être différent pour un phénomène donné. Pour anticiper déjà un peu la discussion concernant la causalité dans le cancer, ci-dessous une petite excursion dans l'invasion tumorale.

On peut expliquer l'invasion tumorale de différentes manières, au niveau cellulaire, au niveau biochimique et au niveau physique. Quelques exemples : (1) au niveau cellulaire, le type d'invasion qui peut être collectif, à cellule unique ou amiboïde, (2) au niveau moléculaire, cela peut impliquer les intégrines, le cytosquelette, ou le type de la matrice et (3) au niveau physique, les forces tensionnelles exercées par la matrice extracellulaire. Ces différents niveaux peuvent être regardés de différentes manières. S'ils ne sont pas concurrentiels, ils peuvent être complémentaires et agir d'une manière additive ou synergique, ou représenter des niveaux explicatifs correspondants. Néanmoins, leur niveau explicatif peut avoir une valeur plus ou moins grande, et on peut donc hiérarchiser le niveau explicatif (« *explanans/explanandum* »). Cette

discussion est en lien avec la notion de suffisance et de nécessité de la causalité. Un effet peut être obtenu par différentes causes suffisantes et chacune d'une manière indépendante. Cependant, quand les différentes variables sont connectées dans une chaîne causale, il faut que toute la chaîne reste intacte, car sinon l'effet causal ne peut pas être transmis si on suit un raisonnement contrefactuel. Par ailleurs, chaque cause suffisante peut contenir plusieurs composantes différentes, mais nécessaires pour constituer une cause suffisante. L'ensemble peut être représenté par le fromage causal (CP).

Le même raisonnement comme pour l'invasion tumorale s'applique à l'angiogenèse tumorale et peut donc être représenté comme un fromage causal. Ce fromage est constitué de différents éléments et se déroule à trois niveaux : au niveau cellulaire, génétique et moléculaire, et au niveau physique. Par exemple :

- au niveau cellulaire (niveau 1), les cellules endothéliales des vaisseaux forment des extensions de type filipodes qui scannent l'environnement pour suivre un gradient moléculaire. Ces cellules établissent des contacts entre elles avec une cellule de guidage (« *TIP-cell* ») qui est suivi par les cellules du tronc (« *stalk cells* »). Par ailleurs, ces vaisseaux subissent l'effet de facteurs répulsifs qui orienteront la migration du tube dans l'une ou l'autre direction. Un aspect morphogénique est aussi l'établissement de la lumière vasculaire. Secondairement, le recrutement des péricytes tend à stabiliser l'architecture vasculaire.

- Au niveau génétique et moléculaire, les cellules endothéliales participent à des régulations impliquant facteurs solubles, récepteurs, molécules de signalisation et régulateurs épigénétiques. Ces circuits opèrent à la fois dans l'espace intercellulaire et extracellulaire. Un exemple est le circuit de la spécification des cellules « *TIP* » et « *Stalk* » composé par le VEGF, le récepteur R2 du VEGF, la signalisation Notch1 et DLL4. Ce niveau 2 ne pourrait pas fonctionner s'il n'était pas inséré dans le niveau 1.

- Au niveau physique (niveau 3), les contraintes extra et intravasculaires interviennent. Au niveau intravasculaire ce sont les forces de cisaillement qui exercent un effet morphogénique pour promouvoir l'établissement d'une lumière intravasculaire. Par ailleurs, le flux détermine aussi l'ontogénie des cellules endothéliales et les dirige vers un programme veineux et artériel. Quant aux forces extravasculaires, elles déterminent la vitesse de migration du tube vasculaire. Une raideur trop importante ne permet pas l'invasion du tube dans la matrice extracellulaire. Une matrice trop molle ne permet pas la constitution d'un tube vasculaire cohésif. Le niveau 3 a des connexions avec le niveau 2. Par exemple, la matrice contient des molécules d'adhésion qui interagissent avec les intégrines de la surface cellulaire. Une trop forte concentration de ces molécules immobilise les cellules et ne permet pas la migration du tube vasculaire. Dans cet

exemple, le niveau 2 coopère avec le niveau 1 pour aboutir à potentialiser l'effet. Il y a donc ici l'exemple d'une vraie complémentarité causale quand ces deux niveaux sont associés.

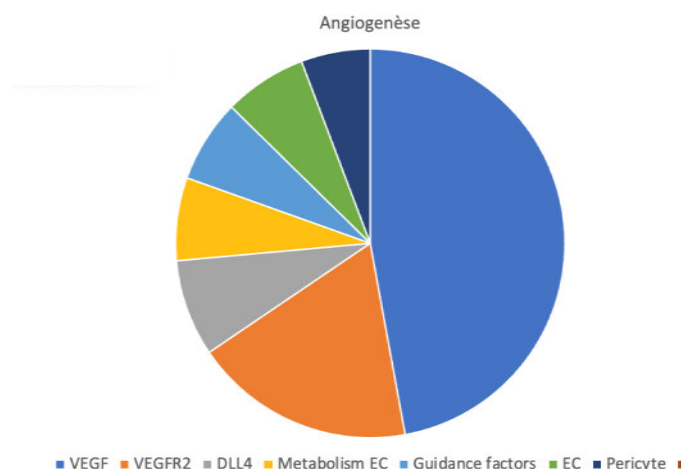


Fig. 12 : Le fromage causal : Ce fromage ou l'angiogenèse tumorale est regardé comme une cause suffisante pour le développement tumoral. Ce fromage est constitué de composantes des 3 niveaux (causes nécessaires) à la fois cellulaires, moléculaires et physiques. L'absence de l'une des composantes ne permettra pas un développement complet de l'angiogenèse.

(ii) Pluralisme entre causes singulières (niveau) : Dans ce cas, différentes causes singulières peuvent coexister et induire un effet d'une manière indépendante. Ces causes singulières sont, chacune, par elles-mêmes, suffisantes pour induire l'effet. La potentialisation des causes singulières peut aussi intervenir. L'effet est maximisé quand différentes causes singulières sont associées. Associées à cette réflexion l'idée du seuil et la question : à partir de quel seuil l'effet causal est-il validé ? On peut avoir une approche pluraliste et estimer que la présence d'un effet, même faible, valide la relation causale et regarde la cause comme suffisante. Une position plus restrictive serait de définir un seuil et de valider la relation causale comme suffisante si le seuil est atteint. Dans ce cas, la détermination d'une relation causale implique une part de jugement personnel, ce qui introduit une dimension subjective à l'analyse.

(3) Idée de la granulation de la causalité et du contexte causal

La chaîne causale change de caractère si on modifie le niveau de lecture vers une lecture microscopique ou macroscopique. On peut comparer cela à la vision d'un objet à différents grossissements. Chaque variable du réseau de causalité peut devenir elle-même un effet sur lequel différentes variables agissent (cf. Nancy Cartwright chapitre 5.2.9). Tout dépend de la granularité, de l'analyse et du contexte de causalité. Il y a donc nécessité de définir pour chaque réseau causal, l'effet ultime sur lequel tout le réseau causal converge.

Un autre aspect dans ce contexte est la distinction entre cause et condition (« enabling condition »). Une cause est directement responsable d'un effet spécifique. Une condition est une simple circonstance ou un contexte qui rend l'effet possible, mais ne contribue pas directement à son apparition. Est-ce que cette différence est conceptuellement défendable ? Les opinions

divergent à ce sujet. Woodward (2011)¹⁷¹ maintient que cette distinction est valable et qu'il y ait une base objective pour cette distinction, car la relation causale serait plus stable que la condition. Deux remarques viennent à l'esprit concernant ce point. La première est la condition INUS de Mackie¹⁷², et le rapport à des causes nécessaires et suffisantes. Cependant, cette distinction ne peut pas être expliquée par des raisonnements formulés uniquement en termes de nécessité et de suffisance, car les causes et les conditions facilitatrices entretiennent la même relation logique avec l'effet dans ces termes. Il a été proposé que la distinction entre causes et conditions facilitatrices soit due à la relation dynamique entre les causes potentielles et l'effet en question et l'ensemble d'événements (conditions) impliqués par le contexte sur lesquels la relation cause-effet se projette¹⁷³. La relation est définie de manière probabiliste, la nécessité et la suffisance étant des cas extrêmes des composantes. La condition peut aussi faire partie du champ/fond causal. Le fond causal lui aussi peut être vu de deux manières : soit comme condition basale dans laquelle la causalité agit (rôle passif), soit comme variable « causale » pouvant intervenir pour moduler/modifier la relation entre cause et effet (rôle actif). Ces dernières peuvent faire partie des conditions INUS. Qu'une caractéristique particulière soit considérée comme une condition ou comme faisant partie du champ ou fond causal est une décision arbitraire. Toutefois, Mackie maintient la distinction entre condition et cause et ne pense pas que les conditions fassent partie des conditions INUS¹⁵⁸.

Pour faire le lien entre cette discussion et la causalité dans le TME, les « Hallmarks » du cancer nous donnent un bon exemple. Dans les Hallmarks 2011, Hanahan et Weinberg parlent de « enabling characteristics » et de « emerging Hallmarks » la première peut être considérée comme condition facilitatrice quand nous faisons le lien avec la philosophie. Une première condition facilitatrice mentionnée dans les Hallmarks 2011¹⁷⁴ est l'instabilité génomique des cellules cancéreuses qui entraîne des mutations aléatoires, notamment des réarrangements chromosomiques. Une deuxième condition facilitatrice mentionnée est l'état inflammatoire des lésions précancéreuses ou malignes, induit par les cellules du système immunitaire, dont certaines favorisent la progression tumorale. On peut voir ces deux « conditions » de deux manières : soit comme condition, soit comme cause, mais non les deux. L'instabilité génomique

¹⁷¹ Woodward, Jim, 'Causes, Conditions, and the Pragmatics of Causal Explanation', in Gregory J. Morgan (ed.), « Philosophy of Science Matters: The Philosophy of Peter Achinstein » (2011; online edn, Oxford Academic, 1 May 2011).

¹⁷² J. L. Mackie. Causes and Conditions. American Philosophical Quarterly, 1965, 2, 4 : 245-264.

¹⁷³ Patricia W. Cheng, Laura R. Novick. Causes versus enabling conditions. Cognition, 1991, 40(1-2) : 83-120.

¹⁷⁴ Hanahan, D, Weinberg R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, 2011, 144, 5 : 646 – 674.

et l'inflammation pourraient être des conditions, car, par elles-mêmes, elles ne provoqueront pas la transformation maligne. Dans une vision extrême, elles pourraient faire partie du fond causal. Alternativement, elles peuvent représenter des causes nécessaires qui ne contribuent, à elles seules à la transformation maligne (dans le contexte des conditions INUS).

Par ailleurs, Hanahan et Weinberg décrivent aussi les « Hallmarks » émergentes. La première implique une reprogrammation majeure du métabolisme énergétique cellulaire. La deuxième implique l'évasion active des cellules cancéreuses de l'élimination par les cellules immunitaires. Ces deux capacités pourraient bien faciliter le développement et la progression des cancers. Ces deux « Hallmarks » représentent soit des causes nécessaires soit des causes suffisantes, mais cela dépend de la valeur attribuée à d'autres facteurs ; dans le premier cas de la présence d'autres causes nécessaires et dans le deuxième cas du fond causal (« *causal background* »).

(4) Spécificité causale

Ceci peut être compris de différentes manières :

- (i) Une seule cause donne lieu à un seul effet spécifique, où la relation entre la cause et l'effet est directe et observable.
- (ii) Une seule cause peut générer plusieurs effets différents, notamment dans les cas où des mécanismes sous-jacents complexes sont impliqués. Par exemple, une mutation génétique particulière peut conduire à plusieurs altérations phénotypiques dans un organisme.
- (iii) Plusieurs causes distinctes peuvent converger pour aboutir à un effet unique et spécifique. Ce scénario est souvent rencontré dans des environnements biologiques ou physiques complexes, où plusieurs variables interconnectées contribuent à l'émergence d'un seul phénomène observable.

Dans le cadre d'une spécificité plus large, couvrant des ensembles de changements phénotypiques et d'événements moléculaires, la relation entre le phénotype et les événements moléculaires peut être décomposée en plusieurs configurations :

- (a) Un seul événement moléculaire est responsable d'un phénotype donné, ce qui reflète un lien direct et univoque.
- (b) Un seul événement moléculaire peut être à l'origine de plusieurs phénotypes distincts, soulignant une certaine polyvalence ou une intersection dans les mécanismes biologiques.
- (c) Plusieurs événements moléculaires interagissent et collaborent pour produire un seul phénotype spécifique. Dans ce cas, les interactions entre ces événements ajoutent une dimension de complexité et illustrent une régulation causale combinatoire.
- (d) Les relations causales peuvent évoluer en fonction du temps et modifier leur spécificité.

Ainsi, dans une analyse de causalité, il est essentiel de comprendre la spécificité non seulement au niveau moléculaire, mais aussi dans ses implications phénotypiques, afin de mieux appréhender les mécanismes sous-jacents et leurs implications dans des systèmes complexes.

Nous pouvons illustrer ceci concernant le TME de manière suivante :

Le VEGF-A a été initialement considéré comme spécifique de la vascularisation, car il activerait d'une manière précise les cellules endothéliales, tandis que le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) cible non seulement les cellules endothéliales, mais également de nombreux autres types cellulaires, tels que les cellules mésenchymateuses, épithéliales et souches. Cependant, des recherches ultérieures ont révélé que le VEGF-A peut aussi stimuler différents types cellulaires *in vitro*, comme les cellules de Leydig et certains neurones. Pourtant, l'invalidation du VEGF-A chez la souris a principalement mis en évidence un effet vasculaire, provoquant des anomalies de la vascularisation menant à une létalité embryonnaire. Ainsi, l'évaluation de la spécificité d'un facteur ou d'un mécanisme dépend largement du contexte expérimental et des méthodologies employées. Si l'on se fonde uniquement sur les observations *in vitro*, on pourrait conclure que le VEGF-A n'est pas spécifique de la vascularisation, alors que les approches *in vivo* – telles que l'invalidation génique – tendent à conserver cette spécificité. Cela souligne à quel point le contexte de la recherche et les paradigmes dominants influencent la manière dont on attribue la spécificité causale.

Un autre aspect crucial réside dans la façon dont la spécificité est attribuée à l'intérieur d'un réseau d'interactions causales. Par exemple, un facteur X_1 peut sembler spécifique pour interagir avec Y afin d'induire l'effet E , mais E peut aussi résulter d'une action combinée des facteurs X_2 à X_n . Cette modularité et redondance dans les réseaux biologiques rendent l'exercice d'assigner une spécificité beaucoup plus nuancé qu'une simple relation univoque. Ainsi, la spécificité causale n'est pas toujours absolue ; elle peut être relative selon le contexte physiologique, pathologique ou expérimental.

Dans le contexte du TME, cette notion prend une dimension supplémentaire : la spécificité des facteurs ou des événements moléculaires peut évoluer au cours de la progression tumorale, reflétant une plasticité adaptative du système. Par exemple, un facteur de croissance ou une cytokine peut être initialement impliqué dans l'angiogenèse, mais, dans un contexte tumoral évolutif, il peut également moduler la réponse immunitaire ou influencer la composition de la matrice extracellulaire.

De plus, la multiplicité des acteurs moléculaires et cellulaires présents dans le TME impose une approche systémique, où la spécificité est souvent partagée ou contextuelle. L'attribution d'un

rôle causal à un événement particulier nécessite donc une analyse intégrative, tenant compte des interactions dynamiques, des rétrocontrôles et des effets redondants ou compensatoires.

En résumé, la compréhension de la spécificité causale dans un système biologique complexe comme le cancer nécessite :

- De situer chaque facteur ou événement dans le réseau global d'interactions,
- D'évaluer la force et la nature des liens causaux selon différents contextes biologiques,
- De reconnaître la possibilité de causalités multiples, hiérarchisées ou émergentes,
- D'intégrer les dimensions temporelles, spatiales et fonctionnelles dans l'analyse de la causalité.

Cette perspective élargie permet de mieux appréhender la complexité et d'affiner l'interprétation des résultats expérimentaux, notamment lorsqu'il s'agit de cibler des mécanismes spécifiques pour des applications thérapeutiques dans le TME ou d'autres contextes pathologiques.

(5) Valeur causale et hiérarchie causale

Divers événements causaux peuvent coexister. La difficulté est de leur attribuer une valeur causale, c'est-à-dire établir une certaine hiérarchie dans l'explication d'un phénomène donné. Certains événements, ne représentant pas une cause primaire, peuvent néanmoins renforcer un lien causal existant. Par exemple, dans une chaîne causale où X_1 conduit à Y , qui à son tour engendre le phénomène P ($X_1 \rightarrow Y \rightarrow P$), les causes additionnelles ($X_2, X_3, \dots, X_n$) peuvent entrer en jeu pour modifier ou amplifier l'effet initial. Ainsi, X_1 pourrait être une cause nécessaire, mais non suffisante (et peut faire partie d'une condition INUS), ayant besoin de l'intervention d'autres variables causales pour pleinement agir sur Y et produire un effet observable (P). Cette dynamique met en lumière la complexité des interactions causales dans les systèmes biologiques, où plusieurs facteurs agissent en synergie pour donner un même effet.

Dans une perspective probabiliste, chaque événement causal peut être représenté par une variable aléatoire, et la relation de causalité s'exprime en termes de probabilités conditionnelles. Ainsi, la valeur causale d'un facteur X_1 pour l'occurrence d'un effet P à travers une variable intermédiaire Y se formalise par $P(P | X_1, Y)$, c'est-à-dire la probabilité de P sachant que X_1 et Y sont présents. Lorsque des causes additionnelles ($X_2, X_3, \dots, X_n$) interviennent, on considère alors la probabilité conjointe $P(P | X_2, X_3, \dots, X_n, Y)$, reflétant l'influence combinée de multiples variables sur l'effet observé.

Dans ce cadre, X_1 pourrait être qualifié de cause nécessaire, mais non suffisante s'il existe des situations où $P(P | X_2, X_3, \dots, X_n, Y) > P(P | X_1, Y)$. La hiérarchisation causale se traduit alors par l'analyse comparative des probabilités conditionnelles associées à chaque facteur ou

combinaison de facteurs, permettant d'identifier ceux qui exercent une influence déterminante ou modulatrice sur le phénomène étudié.

Cette approche probabiliste rend possible une modélisation fine de la complexité des systèmes biologiques, en tenant compte des effets synergiques, redondants ou compensatoires, et offre un cadre robuste pour l'interprétation des réseaux causaux observés.

(6) Temporalité causale

Différents événements causaux peuvent intervenir d'une manière séquentielle dans le temps pour induire un phénomène. Dans certains cas, la séquentialité est absolument requise, chaque événement préparant le terrain pour le suivant. Dans d'autres situations, cette séquentialité peut apparaître, mais sans être strictement nécessaire pour produire l'effet final. Prenons l'exemple de la carcinogenèse multiétape, où des mutations génétiques successives et des modifications épigénétiques se produisent au fil du temps pour transformer des cellules normales en cellules cancéreuses. Ce processus illustre l'importance de la temporalité dans l'établissement d'un lien de causalité. Dans le contexte de notre travail, les modifications au cours de l'évolution tumorale peuvent refléter des changements temporels du TME et modifier le contexte causal. L'évolution des gliomes IDH-mutés illustre bien ceci. Ces gliomes passent d'une phase de latence de plusieurs années à une phase agressive. Au cours de ce passage, les variables causales du TME sont profondément modifiées (voir la **partie VI** pour plus de détails).

Dans ce contexte les SCEM peuvent trouver une utilité¹⁷⁵. La formalisation de la temporalité selon les SCEM suppose que pour qu'une variable X soit dite causale pour un effet Y, il doit exister une séquence tel que :

- X se produit à un temps t_0
- Y survient à un temps t_1 , avec $t_1 > t_0$
- La probabilité conditionnelle $P(Y|X)$ à t_1 , en tenant compte des variables de contexte et des antécédents, est supérieure à $P(Y|\neg X)$

Les SCEM insistent sur la prise en compte des conditions de contexte (*background conditions*) qui peuvent moduler le lien temporel entre X et Y. L'analyse doit donc reposer sur l'identification des chaînes événementielles où la succession temporelle est respectée et où chaque transition est soutenue par une probabilité conditionnelle accrue en présence du facteur causal.

¹⁷⁵ Cartwright N, How to Learn about Causes in the Single Case. 2017, CHESS Working Paper No. 2017-04. https://www.durham.ac.uk/media/durham-university/research-/research-centres/humanities-engaging-sci-and-soc-centre-for/CHESSK4UWP_2017_04_Cartwright.pdf.

Pour illustrer ceci et anticiper avec un exemple dans le cancer :

Soit un ensemble d'événements causaux ordonnés dans le temps : $E_1, E_2, \dots, E_n$, où chaque événement E_i survient à un instant t_i , avec $t_1 < t_2 < \dots < t_n$. Chaque événement peut correspondre à une mutation génétique, une modification épigénétique ou une altération du micro-environnement tumoral (TME).

La probabilité d'occurrence du phénomène final (par exemple, progression tumorale, notée (P) à un instant t_n dépend alors de la survenue séquentielle des événements précédents :

$P(P \mid E_1(t_1), E_2(t_2), \dots, E_n(t_n))$ où chaque $E_i(t_i)$ indique que l'événement E_i s'est produit au temps t_i .

$P(E_{\{i+1\}} \mid E_1, \dots, E_i, \{\text{contexte}\}, t_{\{i+1\}}) = f(P(E_i), \{\text{contexte}\}, t_{\{i+1\}} - t_i)$

Ici, la fonction f intègre l'effet des événements antérieurs, du contexte biologique (par exemple, l'état du TME), et du délai entre les étapes.

Pour la carcinogenèse multiétape, on peut spécifier que l'occurrence du phénotype cancéreux (P) à un temps t_n exige la réalisation d'une séquence précise d'événements :

$P(P(t_n)) = P(E_1(t_1)) \times P(E_2(t_2) \mid E_1(t_1)) \times \dots \times P(E_n(t_n) \mid E_{\{n-1\}}(t_{\{n-1\}}), \dots, E_1(t_1))$

Chaque terme représente :

$P(E_1(t_1))$: la probabilité que le premier événement causal (E_1) survienne au temps t_1 .

$P(E_2(t_2) \mid E_1(t_1))$: la probabilité que le deuxième événement (E_2) se produise au temps t_2 , sachant que E_1 a déjà eu lieu à t_1 .

Les termes suivants suivent la même logique conditionnelle, chaque événement dépendant de la survenue de tous les précédents.

$P(E_n(t_n) \mid E_{\{n-1\}}(t_{\{n-1\}}), \dots, E_1(t_1))$: la probabilité que le dernier événement requis (E_n) arrive au moment t_n , en tenant compte de toute la chaîne causale qui précède.

Chaque événement causal anticipe l'effet d'antériorité : $t_i < t_{\{i+1\}}$

La probabilité conditionnelle d'un effet à $t_{\{i+1\}}$ est supérieure en présence de la cause à t_i qu'en son absence : $P(E_{\{i+1\}}(t_{\{i+1\}}) \mid E_i(t_i)) > P(E_{\{i+1\}}(t_{\{i+1\}}) \mid \text{non-}E_i(t_i))$

« La probabilité que l'événement $E_{\{i+1\}}$ survienne à $t_{\{i+1\}}$ sachant que E_i s'est produit à t_i est supérieure à la probabilité que $E_{\{i+1\}}$ survienne à $t_{\{i+1\}}$ sachant que E_i ne s'est pas produit à t_i ».

Ce concept est également en accord avec la « causalité de Granger », où une relation causale est établie si une séquence temporelle d'événements précède et influence systématiquement une autre séquence dans le temps. Une telle approche permet de révéler des connexions dynamiques dans des systèmes complexes, où la causalité ne peut être réduite à une simple association statique. Par exemple, dans un contexte biologique, un signal moléculaire qui commence une

cascade de réactions cellulaires peut être identifiée comme une cause en raison de sa position temporelle dans la chaîne des événements.

Ainsi, la temporalité causale ne se limite pas à établir un ordre des événements, mais elle joue un rôle fondamental dans la compréhension des interactions entre les facteurs causaux. Elle met en évidence les dynamiques temporelles et les relations qui sous-tendent les mécanismes complexes, offrant une perspective plus riche.

(7) Niveaux de causalité et “downward causation”

Le niveau de causalité peut être vu de deux manières, soit comme relation entre causalité au niveau générique/population/type et cas isolé/individuel/« token », soit au niveau des différentes strates explicatives.

Dans le premier cas, la question est de savoir si la relation causale mise en évidence au niveau d'un groupe ou une population est valable au niveau individuel. Sober ¹⁷⁶postule le « *connecting principle* » qui dit que la probabilité au niveau individuel suit la probabilité de l'événement causal pour le groupe ou la population. Le facteur essentiel dans ce cas est l'hétérogénéité du niveau individuel. Concernant le TME, il peut y avoir une hétérogénéité interindividuelle concernant la distribution des cellules immunitaires, de la vascularisation ou de la matrice extracellulaire. Cependant, il y a des situations dont la probabilité individuelle ne suit pas la probabilité globale comme cela est le cas pour le paradoxe de Simpson.

Dans le deuxième cas, un niveau explicatif impacte des niveaux inférieurs d'explication. Un exemple est représenté par des forces physiques (comme les forces tensionnelles d'un tissu) qui sont un niveau explicatif pouvant impacter les régulations biochimiques (récepteurs, système de transduction du signal, système mécanosenseur). Le problème est ici de savoir comment intégrer ceci dans un schéma causal qui décrit correctement le phénomène biologique (un phénotype donné par exemple). Est-ce que dans ce cas, il y a une pluricausalité avec une valeur causale identique ou est-ce qu'il y a hiérarchie causale ?

(8) Éléments spatiaux dans la causalité

Les événements causaux peuvent avoir une distribution spatiale. Cette distribution spatiale va impacter sur la force avec laquelle un facteur causal va induire un effet donné. Dans un tissu par

¹⁷⁶ Sober E, Papineau D. Causal Factors, Causal Inference, Causal Explanation. *Aristotelian Society Supplementary* 1986, 60 (1).

exemple, différents facteurs peuvent être produits plus ou moins proche ou loin d'une cible pour induire un effet (changement phénotypique, régulations moléculaires, etc.).

Ce qui est important c'est la position spatiale, la distance euclidienne, la densité locale et la configuration du milieu. On peut exprimer ceci en probabilité conditionnelle où la relation $P(\text{Effet} \mid \text{Cause})$, peut inclure de la dimension spatiale (et temporelle) : $P(E_{\{i+1\}}(t_{\{i+1\}}, x_{\{i+1\}}) \mid E_i(t_i, x_i))$. T , temps ; x localisation spatiale.

Donc, la caractéristique spatiale est importante à considérer dans ce contexte. Dans le contexte du TME, la distribution spatiale des vaisseaux, des cellules immunitaires ou des astrocytes par rapport aux cellules tumorales a des conséquences importantes sur le développement tumoral. Ceci peut être dû à des distances à parcourir par les facteurs diffusibles (cytokines, facteurs de croissance, etc.) ou au contact direct des cellules du TME avec les cellules tumorales (cellules immunitaires...). Si les cellules immunitaires cytotoxiques n'arrivent pas à être en contact avec les cellules tumorales, l'effet cytotoxique n'aura pas lieu. Un bon exemple est l'exclusion immunitaire en raison d'une matrice extracellulaire importante comme cela a été décrit pour le cancer du pancréas ¹⁷⁷.

(9) Place de l'explication mécanistique dans les relations causales à partir de données observationnelles

Ceci est le cas si nous disposons seulement d'éléments observationnels où l'intervention expérimentale n'est pas possible comme dans l'épidémiologie, l'anthropologie, ou l'économie. Le cas du lien causal entre le tabagisme et le cancer du poumon en est un bon exemple. Richard Doll et Austin Bradford Hill ont mené des études épidémiologiques décisives qui ont joué un rôle important dans l'établissement d'un lien étroit entre le tabagisme et le cancer du poumon ¹⁷⁸. La première était une étude cas-témoins menée dans des hôpitaux de la région de Londres. Ceci concernait des patients atteints d'un cancer du poumon et un groupe témoin composé de patients du même hôpital, appariés selon l'âge et le sexe et atteints de maladies autres que le cancer. Après leur étude cas-témoins contrôlés, Doll et Hill avaient lancé une étude de cohorte prospective. Les premiers résultats ont été publiés en 1954, et un rapport de suivi en 1958. Ces études ont démontré une association encore plus forte entre le tabagisme et la mortalité du cancer du poumon, et a

¹⁷⁷ Clifton GT, Rothenberg M, Ascierto PA, Begley G, Cecchini M, Eder JP, Ghiringhelli F, Italiano A, Kochetkova M, Li R, Mechta-Grigoriou F, Pai SI, Provenzano P, Puré E, Ribas A, Schalper KA, Fridman WH. Developing a definition of immune exclusion in cancer: results of a modified Delphi workshop. *J Immunother Cancer*. 2023 Jun;11(6):e006773. doi: 10.1136/jitc-2023-006773. PM.

¹⁷⁸ Hill AB. The environment and disease: Association or causation? *Proc Royal Soc Med*. 1965;58(5):295–300.

également montré que fumer était significativement associé à d'autres cancers et à diverses autres causes de décès non cancéreuses, notamment l'emphysème, la bronchite chronique, la tuberculose, la cardiopathie athéroscléreuse, l'accident vasculaire cérébral, l'hypertension et l'anévrisme. En 1965, Hill et d'autres avaient proposé une liste de preuves à prendre en compte pour tenter de tirer des conclusions sur la causalité. Hill a défini les critères suivants : Force de l'association, cohérence, spécificité, la temporalité, gradient biologique, plausibilité, cohérence et analogie ¹³³ (Tableau 1). Ces critères ont une portée plus large, car applicables à d'autres domaines comme les sciences expérimentales et notamment en biomédecine. Dans certains aspects fondamentaux du cancer, la preuve interventionniste ne peut pas être apportée et nous sommes obligés de faire appel aux critères de Hill. Nous ne pouvons pas formellement prouver par une approche interventionniste qu'un réseau moléculaire complexe faisant intervenir une multitude de gènes dans le micro-environnement tumoral est impliqué dans le contrôle de l'invasion tumorale. Nous pouvons, au besoin, seulement interrompre l'action de « drivers » moléculaires principaux faisant partie du réseau moléculaire et tester l'effet sur le phénotype. L'action simultanée de l'ensemble du réseau ne pourrait pas être testée et nous devons donc faire appel aux critères de Hill pour revendiquer une relation causale entre le réseau et un phénotype donné.

Viewpoint	Explanatory quotations from Bradford Hill [1]
Strength of association	"But to explain the pronounced excess in cancer of the lung [<i>among cigarette smokers</i>] in any other environmental terms requires some feature of life so intimately linked with cigarette smoking and with the amount of smoking that such a feature should be easily detectable." p. 296
Consistency	"We have, therefore, the somewhat paradoxical position that the different results of a different inquiry certainly cannot be held to refute the original evidence; yet the same results from precisely the same form of inquiry will not invariably greatly strengthen the original evidence. I would myself put a good deal of weight upon similar results reached in quite different ways, e.g. prospectively and retrospectively." p. 296–297
Specificity	"If, as here, the association [<i>between working as a nickel refiner and cancer</i>] is limited to specific workers and to particular sites and types of disease and there is no association between the work and other modes of dying, then clearly that is a strong argument in favour of causation. We must not, however, over-emphasize the importance of the characteristic [<i>specificity</i>]." p. 297
Temporality	"Which is the cart and which the horse? This is a question which might be particularly relevant with diseases of slow development." p. 297
Dose-response	"For instance, the fact that the death rate from cancer of the lung rises linearly with the number of cigarettes smoked daily, adds a very great deal to the simpler evidence that cigarette smokers have a higher death rate than non-smokers." p. 298
Plausibility	"But this is a feature I am convinced we cannot demand. What is biologically plausible depends upon the biological knowledge of the day." p. 298
Coherece	"On the other hand, the cause-and-effect interpretation of our data should not seriously conflict with the generally known facts of the natural history and biology of the disease." p. 298
Experiment	"Occasionally it is possible to appeal to experimental, or semi-experimental, evidence. For example, because of an observed association some preventive action is taken. Does it in fact prevent? The dust in the workshop is reduced, lubricating oils are changed, persons stop smoking cigarettes. Is the frequency of the associated events affected? Here the strongest support for the causation hypothesis may be revealed." p. 298–299
Analogy	"In some circumstances it would be fair to judge by analogy. With the effects of thalidomide and rubella before us we would surely be ready to accept slighter but similar evidence with another drug or another viral disease in pregnancy." p. 299

Table 1 : Critères de causalité de Hill¹⁷⁹. Ces critères peuvent être appliqués à différents champs de la biologie et de la médecine et non seulement en épidémiologie.

¹⁷⁹ Hill AB. The environment and disease: Association or causation? Proc Royal Soc Med. 1965;58(5):295–300.

La thèse de Russo et Williamson (RWT)¹⁸⁰ postule que les critères de Hill se décomposent en deux ensembles distincts : « *difference making* » et « production ». Le premier regroupe l'évaluation de l'impact d'un facteur causal sur la survenue d'un effet – à travers des notions comme la probabilité, le raisonnement contrefactuel ou la manipulabilité – tandis que le second s'attache à l'identification des mécanismes, à la compréhension des processus sous-jacents et à l'établissement d'un lien explicatif solide entre la cause et l'effet. Il serait sans doute plus pertinent de parler, pour le « *difference making* », « d'approches méthodologiques pour attester une relation causale » (AMRC), et pour la « production », « d'événements » inscrits dans le déroulement effectif de la relation causale.

Dans le domaine biomédical, ces deux perspectives se complètent : les démarches observationnelles, statistiques ou épidémiologiques (relatives à l'AMRC) permettent d'identifier des associations robustes et d'en tester la force, alors que les investigations mécanistiques cherchent à élucider les chaînes d'événements et les interactions moléculaires responsables de l'effet observé. Ainsi, la valeur d'une relation causale repose sur la convergence de ces deux dimensions : la démonstration d'une corrélation significative et la compréhension intime des processus générateurs.

Dans le cadre de la RWT, l'explication mécanistique peut être soit formellement établie soit inférée par analogie d'un contexte à un autre¹⁸¹. L'extrapolation mécanistique peut jouer à différents niveaux, (i) entre espèces (p.ex. mécanismes établis chez la souris et extrapolation à l'homme), (ii) entre tissus ou (iii) entre cellules. Pour citer Claude Bernard : « je prouverai plus loin que tout ce que l'on obtient chez les animaux peut parfaitement être concluant pour l'homme quand on sait bien expérimenter »¹⁸². Ceci renforce l'affirmation d'une relation causale postulée par AMRC.

Cette articulation est particulièrement cruciale dans l'étude du micro-environnement tumoral (TME), où la complexité des interactions impose une analyse fine, mêlant preuves empiriques et exploration des mécanismes. Ainsi, pour établir une véritable relation causale dans ce contexte, il devient essentiel de croiser à la fois les données observationnelles robustes et la compréhension détaillée des enchaînements mécanistiques sous-jacents. Cela permet d'atteindre une explication plus globale, tenant compte de la dynamique propre aux systèmes biologiques complexes.

¹⁸⁰ Russo, F. and Williamson, J. (2007). Interpreting causality in the health sciences. *International Studies in the Philosophy of Science*, 21(2):157–170.

¹⁸¹ Williamson, J. Establishing Causal Claims in Medicine. *International Studies in the Philosophy of Science*, 2019, 32(1) : 33–61.

¹⁸² Bernard C. Introduction à l'étude de la médecine expérimentale. 1865, ed/ JB Baillière et fils.

Par ailleurs, cette approche intégrative ouvre la voie à une réflexion sur la hiérarchie des causes, la distinction entre causalité directe et indirecte, ou encore la question des effets d'échelle – autant d'aspects qui enrichissent l'analyse comme la distinction entre les différentes formes de causalité et les niveaux explicatifs.

(10) Cause proximale-cause ultime

Cette distinction vient du biologiste de l'évolution Ernst Mayer¹⁸³. Une cause proximale est un événement qui est le plus proche ou immédiatement responsable de la cause d'un résultat observé. À l'opposé, une cause ultime qui se situe à un niveau supérieur qui est généralement considéré comme la vraie raison pour laquelle quelque chose s'est produit. Les explications proximales sont dynamiques, car elles font appel aux causalités au cours des processus physiologiques ou pathologiques. La causalité proximale répond à diverses questions, notamment « Comment quelque chose se construit-il ? » et « Comment quelque chose fonctionne-t-il ? ». Les causes ultimes sont en fait évolutionnistes et ne sont pas dynamiques. Ce sont plutôt des explications qui se réfèrent à des événements se situant au niveau de l'ensemble et qui suivent les tendances globales plutôt qu'au niveau individuel. Les explications évolutionnistes répondent à des questions relatives à la diversité biologique, comme « pourquoi quelque chose persiste ou domine dans un ensemble de variables ». Concernant la causalité dans le TME ce concept est difficilement applicable. Les interactions dans le TME se situent au niveau moléculaire et au niveau cellulaire et s'entremêlent. Il n'y a pas de cause ultime pour les interactions causales qui nous concernent, car toutes les variables causales ont une valeur équivalente.

Il est toutefois possible d'évoquer la notion de finalité causale, dans la mesure où un réseau causal tend nécessairement à converger vers une ou plusieurs variables dites « ultimes ». Ainsi, un réseau causal peut comporter une pluralité de finalités causales, phénomène caractéristique des réseaux complexes et ramifiés (cf. (14) finalité causale).

(11) Causes nécessaires et suffisantes

Une cause nécessaire est une cause dont l'absence ne permettra plus l'effet B induit par un facteur causal A. Cependant, à elle seule, elle ne pourrait pas induire l'effet. Une cause suffisante peut à elle-même induire l'effet. Ceci implique un raisonnement contrefactuel.

Schématiquement on peut représenter les causes nécessaires et suffisantes de la manière suivante :

¹⁸³ Ariew A. Ernst Mayr's 'ultimate / proximate' distinction reconsidered and reconstructed. *Biology and Philosophy* 18, 553-565, 2003.

C_1 est une cause suffisante : $C_1 \vee C_2 \Rightarrow E$

C_1 est une cause nécessaire : $C_1 \wedge C_2 \Rightarrow E$

C_1 est une cause nécessaire et suffisante : $C_1 \Rightarrow E$

La qualité de cause « nécessaire » ou « suffisante » peut cependant varier si on s'adresse au niveau d'un individu ou au niveau d'une population. Un agent infectieux comme le VIH peut représenter seulement une cause nécessaire au niveau d'un individu, car tous les individus infectés ne produisent pas la maladie. Cependant, la pénétrance au niveau d'une population peut être si importante que l'agent devient une cause suffisante de la maladie (voir aussi : niveaux de causalité ; « *levels of causation* », *individual level or population level*, voir : Sober¹⁸⁴).

Une notion dans ce contexte est INUS (« *Insufficient but Non-redundant part of an Unnecessary but Sufficient Condition* », Mackie 1974)¹⁸⁵. Ce sont des conditions d'ensemble (« *Set Conditions* ») qui produisent ensemble l'effet observé. INUS conditions, prises individuellement, ne sont ni nécessaires ou suffisantes, mais le deviennent si elles sont prises ensemble. Selon la théorie de Mackie, un facteur C est une cause de E si C est au moins une condition INUS de E et que chaque cluster qui contient C est suffisante pour que l'événement E ait lieu.

Les causes doivent être situées dans un champ causal et dans un contexte appelé conditions. Le contexte ou les conditions sont représentés par des événements habituels (« normaux ») qui peuvent exister et permettre la survenue de l'effet. Elles font partie des « background conditions » lesquelles doivent être contrôlées (cf. lien avec stabilité causale). Un point intéressant est que le contrefactuel s'applique à la fois aux causes et aux conditions et ne permet donc pas de les distinguer.

La notion de causes nécessaires et suffisantes est aussi importante dans le contexte du fromage causal (« *Causal Pies* ») de Rothman¹⁸⁶. Ceci sera abordé dans le contexte du TME au **chapitre VI**.

(12) Causalité et vérité

Établir et valider une relation causale contribue à établir une sorte de vérité, et donc causalité et vérité semblent intimement liées. Ceci a conduit à postuler que la causalité (l'établissement d'une relation causale) est la méthode pour découvrir « le vrai » en tout cas en ce qui concerne les sciences naturelles. Cependant, il existe des affirmations vraies qui ne sont pas liées à la causalité. On peut dire, par exemple, que la structure du glucose est composée de 6 carbones, 12 molécules

¹⁸⁴ Sober E. Causal factors, causal inference, causal explanation, 1983 <https://philpapers.org/archive/SOBCFC>.

¹⁸⁵ Mackie, J. L. (1965). Causes and Conditions. *American Philosophical Quarterly* 2 (4):245 - 264.

¹⁸⁶ Rothman KJ (1976). "Causes". *Am J Epidemiol*. 104 (6): 587-92.

d'hydrogène et de 7 molécules d'oxygène ($C_6H_{12}O_6$) est un énoncé vrai, mais qui n'a pas de lien causal. Causalité et vérité ont donc une relation unidirectionnelle et suivent l'implication ($C > V$). Toute causalité établie et validée empiriquement est un instrument pour établir une vérité acquise par l'expérience. Cependant, il y a des vérités qui ne nécessitent pas une explication causale comme l'exemple ci-dessus l'illustre.

(13) Causalité et explication (« explanandum/explanans »)

Dans un certain sens, un « explanans » peut être vu comme une cause de « l'explanandum ». Toutefois, cette relation n'est pas toujours unidimensionnelle : l'explanans doit non seulement précéder « l'explanandum », mais il doit également rendre compte de la manière dont le phénomène observé s'est produit.

Mais est-ce que tout lien causal apporte une explication (« explanandum/explanans ») d'un phénomène ? La réponse est non. Il y a des causes distantes qui n'expliqueront pas l'occurrence d'un phénomène. Le feu d'une forêt peut être provoqué par un pyromane et donc l'acte de générer un feu est une cause de l'apparition du feu. Cependant, l'existence du pyromane en est une autre, car si on applique le raisonnement contrefactuel, la non-existence du pyromane n'aurait pas provoqué le feu. Il y a donc des relations causales qui fournissent une explication ou mieux un « explanans » du « explanandum » et d'autres qui ne le font pas. On peut se poser la question de savoir si certains raisonnements contrefactuels sont par nature « causaux » si on suppose qu'un raisonnement causal doit fournir une explication d'un phénomène donné.

Il existe donc des relations causales qui permettent véritablement de fournir une explication – ou, pour reprendre la terminologie, un « explanans » du « explanandum » – tandis que d'autres ne servent pas cet objectif explicatif. La question se pose alors de savoir si tout raisonnement contrefactuel relève intrinsèquement de la causalité, ou si seuls ceux qui débouchent sur une explication du phénomène étudié doivent être considérés comme proprement causaux. Cela invite à réfléchir sur la portée des raisonnements causaux dans l'analyse scientifique : expliquer, ce n'est pas seulement établir une corrélation ou une succession d'événements, mais bien mettre en lumière ce qui est véritablement lié à l'effet. L'explication mécanistique peut être un appui pour la solidification du lien causal.

Une autre façon de clarifier est de comparer le binôme « explanans/explanandum » à celui de causes/conditions. Dans cette perspective, une cause doit apporter une véritable explication à l'effet observé, alors qu'une condition, en elle-même, peut être nécessaire, mais non suffisante ni suffisante pour expliquer entièrement le phénomène.

Ainsi, pour qu'un lien soit véritablement explicatif, il doit montrer en quoi la cause identifiée, au-delà de sa simple présence, éclaire le mécanisme de survenue de l'événement. La distinction peut se complexifier encore : Les causes qui fournissent un explanans, les causes qui ne fournissent pas d'explanans, les conditions et le fond causal. Cependant, certaines de ces catégories n'ont pas de frontières étanches et méritent une réflexion approfondie. C'est le cas notamment pour « conditions » et « fond causal » (« *Background* »). Théoriquement, on pourrait penser que condition et fond causal se superposent, car les deux se distinguent clairement de la catégorie « cause ». Mais, le fond causal désigne une condition beaucoup plus générale que « condition ».

Cette distinction prend toute son importance dans l'étude du micro-environnement tumoral (TME). Il ne suffit pas d'identifier des facteurs associés à certains phénomènes ; il s'agit de comprendre comment ces facteurs interagissent et, surtout, par quels processus ils entraînent l'apparition ou l'évolution du cancer. Dans ce contexte, un raisonnement causal qui ne débouche pas sur une explication mécanistique claire du phénomène observé demeure incomplet. Ceci est en lien avec la RWT pour laquelle l'explication mécanistique d'une intervention thérapeutique est essentielle et sous-entend une bonne connaissance des mécanismes causaux.

Ainsi, la robustesse d'un modèle explicatif dépend de sa capacité à articuler causes et mécanismes, à distinguer ce qui relève de la simple condition d'existence de ce qui éclaire réellement la genèse de l'événement. L'analyse des différents niveaux, – moléculaire, cellulaire, phénotypique – et leur articulation, permet non seulement de renforcer la validité des explications proposées, mais aussi d'ouvrir la voie à de nouvelles hypothèses et à des interventions ciblées.

(14) Finalité causale (« Causal Endpoint »)

Ceci concerne la définition de(s) variable(s) Y et son effet sur la nature des causes agissant sur Y. Cette réflexion s'articule autour de deux volets :

(i) On peut définir dans nos schémas causaux la signification et l'étendue du domaine que Y représente, et ceci aurait une signification importante sur la valeur des variables X. Si Y représente la survie globale des malades ou alternativement la survie sans progression, les variables X du réseau causal peuvent avoir un poids différent. Ceci pourrait avoir un impact double : (1) soit le « *path coefficient* » va être modifié et pourrait passer par exemple de 0,5 pour la survie globale (« OS ») à 0,8 pour la survie sans progression (« PFS »). De même, si on prend comme « *endpoint* » Y le développement tumoral, l'effet pourrait être soit la régression tumorale, soit une stabilisation du développement tumoral. Là aussi le « *path coefficient* » peut changer et

passer d'une valeur inférieure (pour régression) à une valeur supérieure (pour stabilisation). Donc la définition du « *endpoint* » est importante.

(ii) La nature de ces variables ultimes dépendra du niveau auquel se situe l'analyse du réseau de causalité. Lorsque l'on considère le niveau moléculaire (NM), les variables ultimes seront d'ordre moléculaire. Si l'analyse se situe au niveau phénotypique (NPhe), les variables ultimes auront une dimension phénotypique. Enfin, au niveau physique (NP), les variables ultimes seront physiques. Il convient également de noter que des configurations hybrides sont envisageables, associant par exemple les niveaux NM/NP, NP/NPhe ou encore NM/NPhe. Le niveau NPhe et dépendant du niveau moléculaire dans la mesure qu'une propriété moléculaire (M^*) constitue un intermédiaire ou « miroir » de la propriété phénotypique de la manière suivante :

$M \Rightarrow M^* \Rightarrow \text{Phe}$.

(15) Causalité et réductionnisme

Le réductionnisme est connecté à la loi du pont (« *bridge principle* » ou « *bridge law* »). Le « *bridge principle* » réclame une articulation conceptuelle entre différents niveaux d'explication scientifique. Le « *bridge principle* » pose qu'il doit exister des lois où des relations systématiques permettant de relier un niveau causal à un autre avec la potentialité de réduire, par exemple, un schéma A à un schéma B. Ainsi, une explication causale à un niveau supérieur doit pouvoir être traduite ou mise en correspondance avec un niveau plus fondamental.

Dans notre contexte, il y a trois aspects concernant le réductionnisme causal. Le premier aspect concerne la réduction d'une chaîne causale macroscopique à un niveau inférieur « microscopique ». Le deuxième est la réduction de la complexité des interactions à un nombre plus réduit de variables. Dans ce cas, il est impératif que la réduction n'impacte pas sur le pouvoir explicatif de la chaîne causale. Le troisième est l'autonomie des différents niveaux de causalité. En autres termes, est-ce que les niveaux de causalité sont incommensurables et mutuellement exclusifs ? On pourrait penser que oui, car le niveau moléculaire par exemple peut uniquement produire une séquence causale qui implique des interactions moléculaires. Cependant ces séquences causales moléculaires doivent avoir un pendant macroscopique, c.a.d. phénotypique. Donc dans l'analyse mécanistique les niveaux peuvent se croiser et être connectés. Par exemple, les mécanismes moléculaires impliquant les Rho-GTPases et les filaments d'actine sont indispensables à la migration et à l'invasion des cellules tumorales. Pour qu'il y ait migration, il faut que le corps cellulaire se modifie ainsi que la position du noyau, ce qui est des caractéristiques morphologiques. Ces caractéristiques/modifications morphologiques entraînent ensuite l'invasion des cellules tumorales soit par migration des cellules individualisées ou

migration collective. Il doit donc exister un relais de traduction en double sens entre le niveau moléculaire et phénotypique. La notion de finalité causale peut intervenir aussi dans ce cas, et on peut voir les modifications phénotypiques comme finalité causale (dans le cas de l'interaction directionnelle : niveau moléculaire → niveau phénotypique).

(16) Convergence causale

On peut parler de convergence causale dans le cas où les niveaux explicatifs convergent vers un seul niveau. Par exemple, la migration cellulaire collective peut être expliquée par la présence de connexions entre cellules migrantes et la compétition pour la position de la cellule « guide » qui est placée au niveau du front de migration. Un deuxième niveau est biochimique comportant les interactions moléculaires. Un troisième niveau d'explication est biophysique incluant le concept de « *jamming* » et des mécanosenseurs ¹⁸⁷. Le niveau moléculaire (« biochimique ») et biophysique vont ensuite converger vers le niveau cellulaire, et on peut qualifier cela comme un mouvement vers le bas (« *downward* ») et vers le haut (« *upward* ») pour constituer une/des chaîne(s) causale(s) pluriniveau (Figure 14).

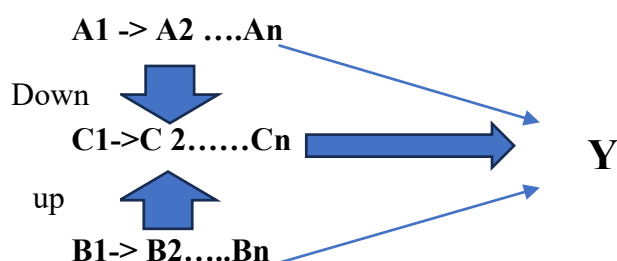


Fig. 13 : Effets “*downward*” et “*upward*” dans la causalité

En considérant plusieurs niveaux d'explication, nous obtenons :

- Niveau moléculaire : $A = (A_1, A_2, \dots, A_n)$
- Niveau cellulaire : $B = (B_1, B_2, \dots, B_m)$
- Niveau biophysique : $C = (C_1, C_2, \dots, C_p)$

Chaque niveau regroupe un ensemble de variables ou de facteurs causaux.

La convergence causale peut alors se modéliser comme une fonction d'intégration multiniveau :

$$Y = f(A, B, C)$$

où :

¹⁸⁷ Gottheil P, Lippoldt J, et al. State of Cell Unjamming Correlates with Distant Metastasis in Cancer Patients Phys Rev., 2023, 13: 031003.

- Y désigne l'événement ou le phénomène observé (par exemple, une invasion tumorale ou une autre modification phénotypique qui est différente des variables B).
- f est une fonction de combinaison causale qui agrège les effets des différents niveaux.

Le processus de convergence peut aussi être représenté par une suite de transformations :

$$\forall [A \xrightarrow{g_1} B \xrightarrow{g_2} C \xrightarrow{g_3} Y]$$

Ou encore : $a \in A: a \mapsto g_1(a) \in B \mapsto g_2(g_1(a)) \in C \mapsto g_3(g_2(g_1(a))) \in Y$.

Le composé global est $g = g_3 \circ g_2 \circ g_1: A \rightarrow Y$.

Où chaque fonction de transition (g_1, g_2, g_3) traduit l'incidence d'un niveau sur le niveau suivant.

Enfin, le schéma général peut être synthétisé par un graphique causal orienté, où chaque niveau est un ensemble de nœuds reliés par des flèches représentant les relations de cause à effet.

Cette formalisation permet d'appréhender la dynamique de convergence entre niveaux explicatifs et de quantifier l'apport de chaque cause, condition ou mécanisme au sein d'un modèle global.

(17) Complémentarité causale

On peut parler de complémentarité causale dans le cas où des facteurs causaux de différents niveaux (« *scales* », « *levels* » etc.) ne sont pas exclusifs, mais au contraire sont complémentaires (voire synergiques) pour produire un effet Y. Cette complémentarité concerne la mécanotransduction, des éléments biochimiques et cellulaires.

(18) Exclusion causale

Exclusion causale stipule que le niveau causal fondamental doit être maintenu et ne pas être utilisé pour directement inférer au niveau supérieur, comme inférer directement du niveau microscopique au niveau macroscopique. Ce problème se pose pour le physicalisme réductionniste et non réductionniste¹⁸⁸. Quand on intervient/manipule par exemple une propriété phénotypique Phe1 et on observe un effet sur Phe2, Phe1 devrait théoriquement exercer un effet directement sur Phe2, ceci ne peut cependant pas être le cas, et cela contredit le physicalisme non réductionniste. Cela est particulièrement important pour les réseaux causaux dans le TME où les différents niveaux se chevauchent. Ce problème est résolu par le fait qu'une propriété moléculaire est directement associée à la propriété phénotypique et la reflète « en miroir »

¹⁸⁹ (Figure 14).

¹⁸⁸ Kim J Mechanism, Purpose, and Explanatory Exclusion. *Philosophical Perspectives*, 1989, 3: 77–108.

¹⁸⁹ Blanchard T & Hüttemann A. Causal modeling in multilevel settings: A new proposal. *Phil Phenomenol Res.* 2024, 109 (2):433-457.

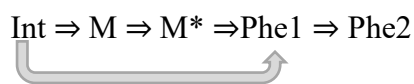


Fig.14 : Résolution du problème de l'exclusion causale. L'intervention causale agit sur les processus moléculaires en les modifiant ($M \Rightarrow M^*$) de sorte qu'ils correspondent étroitement à la modification du phénotype ($\text{Phe1} \Rightarrow \text{Phe2}$).

Pour approfondir cette réflexion : ce n'est pas la présence en elle-même de l'entité (p.ex. entités biologiques comme les molécules, etc.), mais son comportement qui doit être associé au phénotype. Cela implique qu'un élément dynamique doit faire partie de la relation causale. Ceci s'applique également au chevauchement des niveaux (molécules, phénotype). On peut donc considérer que « molécule » (M) et « dynamique » (D) constituent des causes nécessaires qui deviennent suffisantes ensemble pour actionner le phénotype (Phe) : $M \wedge D \Rightarrow \text{Phe}$. Dans ce cas, la traduction phénotypique est strictement associée à la dynamique moléculaire (p.ex. la dynamique moléculaire du cytosquelette entraîne la migration cellulaire).

(19) Proportionnalité causale

La proportionnalité causale postule qu'une cause doit être proportionnelle à son effet en termes de caractéristique sémantique reflétant le niveau explicatif. Il reste toutefois difficile de définir précisément les limites de ce qui est permis ou interdit. Il y a eu des tentatives d'établir des approches qui permettent de résoudre le problème de proportionnalité. Dans ce contexte, on peut distinguer les approches comparatives et non comparatives pour caractériser la proportionnalité¹⁹⁰. Les approches comparatives font appel à la relation qui s'établit entre des événements et leurs causes/conditions plus générales. Selon l'approche de l'élimination (« *screening off* »)¹⁹¹, les causes proportionnelles sont celles qui neutralisent les effets quand elles (les causes) sont absentes. Selon l'approche de la « suffisance causale »¹⁹², les causes proportionnelles ont une suffisance maximale pour leurs effets par rapport à d'autres facteurs causaux potentiels.

Les approches non comparatives gravitent autour de la notion de similarité d'une situation pertinente comme l'approche de la « covariation contrefactuelle »¹⁹³.

¹⁹⁰ Rubenstein, Ezra. (2023). Proportionality in Causation, Part II: Applications and Challenges. *Philosophy Compass*. 19. 10.1111/phc3.12960.

¹⁹¹ Yablo, S. 1997. "Wide Causation," *Philosophical Perspectives*, 11: 251-281.

¹⁹² Strevens, M. *Depth: An Account of Scientific Explanation*. 2008, Harvard, University Press, Cambridge, MA.

¹⁹³ List C & Menzies P Nonreductive Physicalism and the Limits of the Exclusion Principle. *The Journal of Philosophy*, 2009, 106 (9): 475–502.

(20) Compétition causale

Différents schémas causaux revendiquent l'explication d'un phénomène, mais ces schémas sont en tension entre eux et peuvent être théoriquement incompatibles. On parle dans ce cas de compétition causale. La compétition causale peut être résolue par l'abandon d'un schéma et alternativement par résolution du conflit causal en introduisant des hypothèses auxiliaires.

On peut formaliser la notion de compétition causale. S_i représente un schéma causal de l'ensemble des schémas $\{S_1, S_2, \dots, S_n\}$, D les données disponibles, Pr la pratique scientifique et C le contexte d'application (économique, sociétal...). On peut associer ensuite une probabilité notée P ($\{Adhésion\} S_i | D, Pr, C$). Cela permet de comparer les différents schémas causaux, et estimer leur valeur permet d'exprimer la confiance, la préférence ou la plausibilité que l'on accorde à chaque explication possible.

La compétition causale apparaît, quand pour certains S (p.ex. S_1 versus S_2) des mécanismes explicatifs concurrents existent, et que, dans l'état actuel des connaissances, la communauté scientifique ne parvient pas à discriminer entre ces deux schémas.

- Abandon d'un schéma : Si les données réfutent les hypothèses centrales de S_i , alors $P(\{Adhésion\} S_i | D, Pr, C) \rightarrow 0$.
- Introduction d'hypothèses auxiliaires : Un conflit entre S_1 et S_2 peut être résolu par l'intégration des hypothèses supplémentaires soit dans S_1 ou dans S_2 (ou les deux).

Un exemple de compétition causale a été représenté dans le **chapitre III** (Figure 9) concernant la tension entre SMT et TOFT. On peut formaliser cela d'une manière suivante en utilisant un langage probabiliste :

- FT : formation tumorale (événement d'intérêt), - Anc : activation non compétitive
- MUTd : survenue d'une mutation driver, - ET : émergence tumorale
- C : compétition clonale, - TME : micro-environnement tumoral
- RGE : régulation génétique et épigénétique, - PIT : perturbation de l'intégrité tissulaire,
- E : Facteurs de l'environnement cellulaire. - P : probabilité

- SMT forte (1) : La probabilité d'une formation tumorale (FT) dépend de la probabilité que l'activation non compétitive (Anc) soit suivie d'une mutation driver (MUTd), puis de l'émergence d'une tumeur (ET), et enfin de la compétition (C). Elle est supérieure à (2), (3) et (4). Formellement :

$$P(FT | Anc \cap MUTd \cap ET \cap C) > P(FT | TME \cap RGE \cap ET)$$

$$P(FT | Anc \cap MUTd \cap ET \cap C) > P(FT | TME \cap PIT \cap MUTd)$$

$$P(FT | Anc \cap MUTd \cap ET \cap C) > P(FT | TME \cap PIT \cap \neg MUTd)$$

- « Hallmarks » (2): Ici, la probabilité d'une formation tumorale (FT) dépend de la régulation génétique et épigénétique (RGE) du micro-environnement tumoral (TME), de l'interaction entre formation tumorale et émergence tumorale (FT, ET), et enfin de l'influence du micro-environnement (TME). Elle est supérieure à (1), (3) et (4). Formellement :

$$P(FT | TME \cap RGE \cap ET) > P(FT | PIT)$$

$$P(FT | TME \cap RGE \cap ET) > P(FT | Anc \cap MUTd \cap ET \cap C)$$

- TME modéré (3) : La probabilité de formation tumorale (FT) dépend de la présence de mutations driver (MUTd), de perturbation de l'intégrité tissulaire (PIT), du rôle du micro-environnement (TME), et de l'interaction entre tous ces facteurs. Elle est supérieure à (1), (2) et (4). Formellement :

$$P(FT | TME \cap PIT \cap MUTd) > P(FT | TME \cap PIT \cap \neg MUTd)$$

$$P(FT | TME \cap PIT \cap MUTd) > P(FT | Anc \cap MUTd \cap ET \cap C)$$

$$P(FT | TME \cap PIT \cap MUTd) > P(FT | TME \cap RGE \cap ET)$$

- TME fort (4): La probabilité d'une formation tumorale (FT) dépend d'un micro-environnement tumoral altéré (TME) en l'absence de mutation driver ($\neg MUTd$), ainsi que de la capacité du micro-environnement à favoriser la transformation. Formellement :

$$P(FT | TME \cap PIT \cap \neg MUTd) > P(FT | ET)$$

$$P(FT | TME \cap PIT \cap \neg MUTd) > P(FT | TME \cap PIT \cap MUTd)$$

La TOFT extrême ne peut pas être maintenue si on analyse la situation rigoureusement et doit être abandonné. On peut cependant conserver certains éléments en introduisant des hypothèses auxiliaires comme la régionalisation ou hétérogénéité des schémas causaux. L'explication « environnementale dominante » peut être valable pour certaines tumeurs, mais pas pour d'autres.

(21) Domination causale

La domination causale a deux différents aspects.

(i) La domination de certaines variables dans un réseau causal :

Dans un réseau causal, certaines variables ont un poids causal plus élevé que d'autres. Par exemple dans certaines tumeurs l'hypoxie et l'angiogenèse sont prépondérantes et dans d'autres

tumeurs l'immunité (tumeurs chaudes versus tumeurs immunologiquement froides). Dans d'autres tumeurs encore, c'est l'invasion qui domine. Ceci a des conséquences sur le réseau causal dans sa globalité et impacte sur l'effet final représenté par la variable Y.

On peut formaliser la notion de domination de certaines variables au sein d'un réseau causal comme suit : considérons un ensemble de variables causales $\{V_1, V_2, \dots, V_n\}$ contribuant à l'explication d'un effet sur Y via un réseau causal donné. À chaque variable V_i , on peut associer un poids causal w_i reflétant son importance dans le réseau (influence relative sur Y), déterminé par les données, la pratique scientifique et le contexte d'application. La variable V^* est dominante dans le réseau si, pour la majorité des configurations pertinentes :

$$w^* = \operatorname{argmax}_{\{i\}} w_i \text{ et } w^* \gg w_j \text{ pour tout } j \neq *$$

L'équation « $w^* = \operatorname{argmax}_{\{i\}} w_i$ et $w^* \gg w_j$ pour tout $j \neq *$ » sert à identifier, parmi plusieurs variables causales ($V_1, V_2, \dots, V_n$), celle qui exerce l'influence la plus forte sur la variable ultime Y dans un réseau causal.

« $w^* = \operatorname{argmax}_{\{i\}} w_i$ » signifie que la variable V^* possède le poids causal le plus élevé de toutes les variables considérées (« argmax » = argument du maximum (« *argument of the maximum* »)).

(ii) La dimension sociétale :

La domination causale implique aussi une dimension sociétale. Les facteurs responsables se situent hors de critères épistémiques classiques et impliquent la persuasion et l'adhésion d'une communauté à un schéma causale. La domination causale peut être formalisée comme un basculement épistémique où un schéma causal donné s'impose comme explication principale d'un phénomène au sein d'une communauté scientifique ou d'une pratique clinique, supplantant les schémas concurrents. Ce processus comporte plusieurs caractéristiques :

- Critère de crise : Une crise, souvent liée à l'incapacité d'un schéma causal dominant à satisfaire les attentes (ex. : échec relatif des traitements fondés sur ce schéma), constitue le déclencheur du déplacement de la dominance.
- Le processus d'acceptation dans une communauté se produit lorsqu'un nouveau schéma causal est adopté, généralement parce que des preuves convaincantes finissent par persuader la communauté scientifique ou médicale. Ce consensus peut aussi être influencé par des dynamiques de groupe ou des pressions psychologiques.
- Persistance de l'influence sociétale et industrielle : Les choix industriels, les politiques de recherche et la production scientifique influencent la pérennité ou l'abandon d'un schéma causal (ex. : développement de nouveaux médicaments, priorités de financement).

- Effet sur la dynamique de recherche : La domination d'un schéma causal réoriente les efforts de recherche, marginalisant les approches alternatives et modifiant la structure des publications, des financements et des collaborations.
- Non-relativisme : Cette domination n'implique pas que tous les schémas se valent, mais que l'un s'impose en raison de son pouvoir explicatif, des résultats cliniques, et du consensus social autour de son efficacité.

On peut exprimer la domination causale par :

Soit un ensemble de schémas causaux $\{S_1, S_2, \dots, S_n\}$ expliquant un phénomène Y. Le schéma causal S^* est dominant si :

- Pour la majorité de la communauté, $P(\text{Adhésion à } S^* \mid \text{Données, Pratique, Contexte}) \gg P(\text{Adhésion à } S_j \mid \text{Données, Pratique, Contexte})$ pour $j \neq *$
- L'allocation des ressources (financement, publications, essais cliniques) est principalement dirigée vers S^*
- L'efficacité perçue ou démontrée de S^* sur Y, notée $E(S^*, Y)$, est supérieure à celle des autres schémas, selon les critères de la pratique ou du contexte.

Si nous introduisons le facteur temps, nous pouvons estimer les conditions de bascule du cadre causal :

1. État initial :

Soit $\{S_1, S_2, \dots, S_n\}$ un ensemble de schémas expliquant Y.

S^* dominant $\Leftrightarrow P(\text{Adhésion à } S^* \mid \text{Données, Pratique, Contexte}) \gg P(\text{Adhésion à } S_j \mid \text{Données, Pratique, Contexte}), \forall j \neq *$.

2. Déclenchement de la crise :

Si $E(S^*, Y)$ (efficacité perçue ou démontrée) diminue sous un seuil critique (ex. : résultats cliniques décevants), alors le consensus s'érode et la probabilité d'adhésion à S^* baisse.

3. Ouverture à la concurrence :

D'autres schémas ($S', S'', \dots$) voient leur probabilité d'adhésion augmenter, soutenus par de nouvelles données, des résultats ou des intérêts institutionnels/industriels.

4. Redéploiement des ressources :

Allocation croissante de ressources (financement, essais, publications) vers S' , ce qui alimente sa crédibilité et sa visibilité.

5. Basculement :

Si, pour la majorité de la communauté, $P(\text{Adhésion à } S' \mid \text{Données, Pratique, Contexte}) \gg P(\text{Adhésion à } S^* \mid \dots)$, alors S' devient le nouveau schéma dominant.

6. Possibilité de réversibilité :

Un schéma ancien peut redevenir pertinent via intégration ou combinaison avec le schéma dominant, illustrant la plasticité du système.

Étape	Phénomène	Variable clé	Conséquence
1	Dominance d'un schéma S^*	$P(\text{Adhésion à } S^*)$ élevée	Ressources et consensus concentrés sur S^*
2	Crise (résultats insuffisants)	$E(S^*, Y)$ décroît	Baisse de la confiance, ouverture à l'innovation
3	Émergence de S'	$P(\text{Adhésion à } S')$ augmente	Ressources redirigées, croissance scientifique autour de S'
4	Basculement	$P(\text{Adhésion à } S') \gg P(\text{Adhésion à } S^*)$	Nouvelle dominance, nouveau consensus
5	Plasticité/réversibilité	Intégration possible de S^* sous forme amendée	Hybridation ou retour partiel de S^*

Tableau 2 : Représentation schématique du basculement entre cadres causaux

L'exemple de la domination causale et le passage d'un schéma « angiogénique » d'explication du développement tumoral à un schéma « immunitaire » en est une bonne illustration. Ce passage est dû à l'existence d'une crise qui peut être représentée par l'absence de remplir les attentes (et d'obtention des résultats espérés). Dans le cas de l'angiogenèse / immunité, le point de bascule est initié par la recherche clinique et non par la recherche fondamentale, même si les traitements anti-angiogéniques ont augmenté la survie sans progression (PFS) les résultats concernant la survie globale des malades dans de nombreuses tumeurs étaient décevants. Le moment du point de bascule est approximativement à estimer entre 2005-2010. Cette déception clinique a entraîné une crise qui a donné l'opportunité à d'autres schémas causaux de venir dominant. Cette domination partie d'une crise survenue dans le domaine de la recherche clinique a envahi ensuite la recherche fondamentale, et ceci a conduit à une diminution nette des travaux biologiques sur l'angiogenèse tumorale (Figure 14). Ceci a été aussi favorisé par l'industrie pharmaceutique qui poussait son « pipeline » de développement dans d'autres directions. L'évolution récente dans certains types de tumeurs semble en faveur d'un retour de l'angiogenèse tumorale en

combinaison avec l'immunothérapie. Le concept de domination causale n'implique à aucun moment la notion de relativisme.

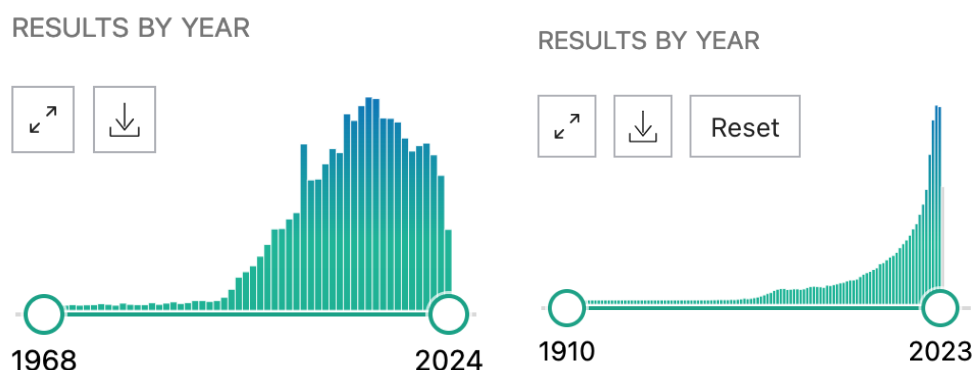


Figure 14 : Illustration du basculement entre « Angiogenèse » et « Immunité »

(22) Relativisme causal

Le relativisme causal implique qu'un schéma causal A est équivalent à un schéma causal B au niveau de sa potentialité explicative («*explanans/explanandum* »)¹⁹⁴. On pourrait imaginer une explication causale purement biochimique et en même temps une explication causale purement biophysique sans croisement entre les deux chaînes causales. Ceci n'est pas concevable dans l'état actuel de la science et ces deux chaînes doivent obligatoirement se croiser. L'exemple même de ce croisement est la mécanotransduction. Un autre aspect est l'existence d'une tension entre deux schémas causaux. Cette tension entre divers schémas de causalité peut rendre la cohabitation impossible et ceci peut uniquement être résolu par la validation de l'un ou l'autre des schémas. Citons l'exemple de la SMT et TOFT ici. En théorie on pourrait dire que les schémas de la SMT et de la TOFT pourraient coexister en fournissant des explications causales appropriées pour divers types de tumeurs. Comme nous l'avons dit auparavant, le schéma de la TOFT ne pourra pas être maintenu dans la forme radicale voulue par ses défenseurs et doit être abandonné, car les preuves scientifiques sont insuffisantes comme discuté dans le chapitre précédent. Le concept de la SMT doit être, cependant, amendé par l'intégration d'éléments du TME auxquels un poids causal accru doit être associé.

Le tableau ci-dessous résume les divers aspects de la causalité traités dans ce chapitre et son rapport à la cancérologie.

¹⁹⁴ Hempel, C.G. & Oppenheim, P., « Studies in the Logic of Explanation », *Philosophy of Science*, XV, 1948, p. 135–175.

Modèle/ Théorie	Description	Caractéristiques	Avantages	Limites	Application en cancérologie
Aristote (4 causes)	Distinction matérielle, formelle, efficiente, finale	Approche téléologique, explicative globale	N/A	Manque d'opérationnalité scientifique directe	N/A
Régularité (Hume/Mill)	Causalité comme conjonction régulière d'événements	Temporalité, fréquence, méthode des différences	Fondement des méthodes épidémiologiques, inductives ; utilité d'inférence causale de Mill pour tester des hypothèses dans le cas de l'expérimentation	Ne capte pas l'interaction physique, biais de variables cachées	Utilisé pour l'investigation causale en population, dans la forme d'inférence causale de Mill utile pour l'analyse d'hypothèses moléculaire/cellulaire/phénotypique par l'expérimentation
Contrefactuel (Lewis/Pearl)	Analyse par scénarios alternatifs (« si...alors... »)	Logique des mondes possibles, subjonctif	Essentiel au raisonnement causal, base des diagrammes causaux	Imprécis pour cas uniques, dépend de la modélisation mentale	Indispensable pour la modélisation des interventions et hypothèses sur le TME
Interventionnisme (Woodward/Pearl)	Causalité définie par effet d'une manipulation sur une variable	Opérateur do(X), robustesse contextuelle	Adapté à l'expérimentation, formalisation des interventions	Difficile à appliquer en observationnel pur, nécessite le contrôle du contexte	Cadre méthodologique pour tester l'influence de facteurs dans le TME
Singularité (Anscombe/Sosa, Kinzler, Salmon, Dowe)	Causalité comme lien local, non universel	Relation contextuelle, non-nomologique	Prise en compte du cas individuel, matérialisme	Difficulté de généralisation, dépendance au contexte précis	Pertinent pour l'étude d'interactions moléculaires/cellulaires uniques
Granger	Dépendance temporelle d'une variable sur une autre	Analyse séries temporelles, prédictivité	Outil statistique pour inférer des liens temporels	Ne prouve pas la causalité réelle, nécessite séries temporelles riches	Peu utilisé, mais potentiellement utile pour l'étude de processus dynamiques dans le cancer
IBE (Harman)	Inférence à la meilleure explication (abduction)	Comparaison hypothèses explicatives	Souple, intégrable à l'approche bayésienne	Sensibilité au choix des hypothèses, subjectivité	Utile pour générer/modéliser des hypothèses causales à partir de données complexes
Causal Pie (Rothman)	Modélisation par ensembles de causes suffisantes (fromage causal)	Visualisation des composantes, conditions INUS	Clarté sur la combinaison de facteurs nécessaires/suffisants	Statique, non dynamique, pas de chaîne causale	Utilisé pour représenter les « hallmarks » du cancer, complémentaire aux réseaux
Graphiques causaux (Wright/Pearl)	Représentation graphique des relations causales (DAGs, bayésien nets)	Coefficients de chemin, variables exo/endo, gestion des confondants	Permet modélisation multiniveau, quantification des effets	Nécessite exhaustivité des variables, complexité croissante	Outil central pour modéliser les interactions dans le TME à tous les niveaux
Cartwright (SCEM)	Équations causales spécifiques au contexte, intégrant les variables de fond	Analyse situationnelle, prise en compte du contexte	Finesse d'analyse, adaptation à la complexité réelle	Complexité, difficulté de généralisation, lourdeur méthodologique	Pertinent pour analyser les réseaux causaux contextuels et multivariés en cancérologie
Critères de Hill	Ensemble de critères pour inférer la causalité à partir de données observationnelles	Force, cohérence, spécificité, temporalité, plausibilité, etc.	Large applicabilité, complément des preuves expérimentales	Non formel, critères non obligatoirement cumulatifs	Utilisé pour valider les liens causaux en épidémiologie et biomédecine

Pluralisme/Monisme	Pluralité (ou unicité) des causes pour un effet donné	Causes multiples, complémentarité ou compétition	Reflète la complexité des systèmes biologiques	Peut générer des tensions explicatives, hiérarchie difficile à établir	Essentiel pour comprendre la multiplicité des causes dans le TME et la progression tumorale
Stabilité causale	Robustesse du lien causal malgré variations du contexte	Test de robustesse, analyse probabiliste	Permet de distinguer causes majeures vs. accessoires	Dépend de la définition du « background », seuils difficiles à fixer	Permet d'évaluer la généralité d'un mécanisme (ex. : effet du VEGF sur l'angiogenèse)
Spécificité causale	Degré d'unicité de la relation cause/effet	Univoque, polyvalente, combinatoire	Affinage de l'analyse, identification de cibles thérapeutiques	Dépend du contexte, évolutive, parfois relative	Cruciale pour cibler les mécanismes dans le TME
Hiérarchie causale	Établissement d'une valeur relative aux causes	Probabiliste, pondération des variables	Permet la priorisation des interventions	Soumise à subjectivité, dépend de la modélisation	Orienté le choix des cibles thérapeutiques prioritaires
Temporalité causale	Ordre séquentiel des événements causaux	Chaînes d'événements, conditionnalité temporelle	Analyse dynamique des processus, prise en compte de la chronologie	Données temporelles parfois difficiles à obtenir	Essentielle pour comprendre la progression multiétapes du cancer
Niveaux de causalité / Downward causation	Relations entre niveaux explicatifs (population/individu, moléculaire/cellulaire...)	Principe de connexion, hétérogénéité	Intégration multiéchelles, pont entre niveaux	Paradoxe de Simpson, difficultés d'extrapolation	Analyse de l'hétérogénéité du TME, transfert des données populationnelles à l'individu
Spatialité causale	Importance de la localisation/distance des acteurs causaux	Distribution spatiale, densité, configuration du milieu	Affinage de la compréhension des interactions locales	Souvent négligée, difficile à quantifier	Clé pour comprendre la distribution des acteurs dans le TME et l'hétérogénéité spatiale des réseaux causaux
Explication mécanistique	Recherche de chaînes d'événements/processus sous-jacents	Corrélation/production, liens explicatifs solides	Assure la validité et la profondeur de l'explication	Peut manquer pour certains phénomènes complexes, et être problématique pour des situations causales « forte », mais sans mécanisme sous-jacent	Indispensable pour relier données observationnelles et interventions ciblées
Proximal/ Ultime	Distinction entre causes immédiates et causes fondamentales	Explication dynamique vs. évolutionniste	Éclaire différents niveaux d'explication	Peu pertinent pour interactions moléculaires/cellulaires du TME	Utilisé pour distinguer des niveaux d'explication, mais difficile à exploiter pour le TME
Nécessaire/ Suffisante	Cause dont la présence/absence détermine l'effet	Conditions INUS, dépend du contexte	Affinage des critères d'intervention	Souvent non binaire en biologie, relations complexes	Permet de modéliser les effets des facteurs dans le TME
Réductionnisme	Possibilité de ramener un schéma causal complexe à un niveau plus fondamental	Lois de pont, articulation multiniveau	Permet de relier les niveaux d'explication	Risque de perte d'information, de complexité d'intégration	Utile pour articuler le niveau moléculaire/cellulaire/phénotypique
Convergence causale	Plusieurs niveaux explicatifs convergent vers un effet	Fonction d'intégration, multiniveau	Vision systémique, prise en compte de la complexité	Modélisation difficile, poids relatif des niveaux à définir	Permet de comprendre l'émergence de phénomènes complexes dans le TME

Complémentarité causale	Facteurs de différents niveaux agissent en synergie	Non-exclusivité, potentialisation	Valorise l'intégration interniveaux	Analyse des synergies parfois complexe	Clé pour comprendre les effets combinés dans le micro-environnement tumoral
Exclusion causale	Un niveau causal ne doit pas être utilisé pour inférer directement au niveau supérieur	Maintien de la cohérence explicative entre niveaux	Évite les erreurs de transfert entre niveaux	Difficile à maintenir dans les réseaux multiniveaux, danger de réduction des relations causales et appauvrissement du potentiel d'explication causale	Évite les raccourcis explicatifs dans l'analyse du TME
Proportionnalité causale	Adéquation entre la cause et l'effet au niveau explicatif	Suffisance, screening off, covariation	Précision dans l'attribution causale	Définition et mesure complexes	Permet de calibrer l'effet des interventions ciblées
Compétition causale	Conflit entre plusieurs schémas explicatifs	Tension, résolution par données ou hypothèses auxiliaires	Stimulation du progrès scientifique	Peut retarder le consensus, générer des tensions épistémiques	Apparent lors des changements de paradigme (ex : angiogenèse vs immunité)
Domination causale	Poids relatif dans le réseau causal ou hégémonie d'un schéma causal	Poids causal, dimension sociétale/épistémique	Guide la recherche, concentre les ressources	Effet de mode, marginalisation des alternatives	Explique les cycles de prédominance des paradigmes en oncologie
Relativisme causal	Équivalence ou cohabitation de plusieurs schémas explicatifs	Non-exclusivité, croisement de chaînes causales	Flexibilité, adaptation à la diversité des systèmes	Limites à la cohabitation, nécessité de validation empirique	Justifie l'intégration de plusieurs modèles pour expliquer la diversité des cancers

Tableau 3 : Aspects de la causalité et rapport à la cancérologie.

6. Causalité et micro-environnement tumoral : Étude de cas

6.1 Considérations générales

La question clé est comment l'action des différentes composantes cellulaires et moléculaires du micro-environnement tumoral conduit au développement tumoral. Ceci veut dire qu'il faut identifier les événements causaux au niveau cellulaire et moléculaire sous-jacent. Mais nous devons d'abord décomposer le développement tumoral en ses différentes étapes, car une variété de facteurs causaux intervient à ces différents stades. Il est, par ailleurs, évident que les tumeurs des différents tissus ne sont pas les mêmes, cela veut dire que, dans le cadre de notre travail, les événements causaux sont différents.

Nous allons donc d'abord décrire des événements cellulaires puis moléculaires pour deux différentes tumeurs que nous choisirons comme représentatives (désignées ici comme prototypes). Ces deux types de tumeurs ont toutes les deux des caractéristiques phénotypiques différentes et un comportement différent. Nous avons choisi les tumeurs cérébrales primitives pour les propriétés d'invasion locale (Prototype I) et le cancer du rein (ccRCC) pour le pouvoir métastasant (Prototype II). Les tumeurs cérébrales ont une expansion locale et invasion locorégionale se limitant à la boîte crânienne. Les cancers du rein ont une expansion locorégionale et le pouvoir de former des métastases à distance, principalement dans le poumon et dans le foie.

6.1.1 Utilisation des diagrammes causaux pour appréhender la causalité tumorale du TME (« *Causal path diagrams* »)

Comme déjà mentionné, Sewall Wright avait en 1922 introduit une méthode simple pour représenter les relations causales des phénomènes biologiques¹⁹⁵. Cette méthode associe une représentation graphique à un coefficient de probabilité, ce qui revient en réalité à l'application de l'approche bayésienne dans un contexte causal. Si possible, cette méthode sera utilisée de différentes manières pour représenter les interactions dans le micro-environnement tumoral. Nous pourrions, à minima, utiliser la représentation de graphiques acycliques (« *directed acyclic graphs* », *DAGs*) si l'estimation de coefficients de voie (« *path coefficients* ») ne s'avère pas

¹⁹⁵ Wright S. The Relative Importance of Heredity and Environment in Determining the Piebald Pattern of Guineapigs, 1920, 6 (6): 320-332.

possible. Nous aurions, néanmoins, aussi des discussions plus générales concernant les relations causales dans ces différents contextes tumoraux.

Nous allons nous référer en premier lieu aux tumeurs cérébrales, à savoir à la représentation des gliomes diffus. Les gliomes diffus sont subdivisés principalement en gliomes mutés de l'enzyme IDH1/2 (IDH mutés) et gliomes IDH1/2 sauvage (IDHWT), dont ces enzymes ne sont pas modifiées. Nous construisons en premier lieu « différents mondes » dans lesquels les « *path coefficients* » sont déterminés *a priori* pour imaginer différents scénarios possibles. Ces différents mondes peuvent être corrigés, si possible, par confrontation à des données expérimentales. Ces mondes seront construits pour les gliomes diffus IDH1/2 non mutés (sauvage) et mutés. Nous imaginons aussi l'effet des scénarios d'évolution des interactions causales. Dans cette analyse, les variables sont constituées par des processus (invasion, angiogenèse, inflammation, etc.) qui seront reliés par des « *path coefficients* ». Ces variables sont de différente nature et reflètent soit des processus soit des entités moléculaires. Les processus et entités moléculaires peuvent être mixés et être représentés ensemble dans le DAG. Nous abordons aussi les relations causales par l'analyse d'articles scientifiques, que j'avais publié, concernant les mécanismes cellulaires et moléculaires des tumeurs cérébrales, et nous discutons la force et la faiblesse inhérente à la démarche expérimentale décrite. Ceci sera suivi d'une analyse comparative des gliomes IDHWT et gliomes IDH mutés et d'une modélisation réductionniste.

Dans un deuxième temps, nous abordons les relations causales dans le cas du cancer du rein. Dans ce cas, la démarche choisie sera similaire. Cependant, ce cancer est très différent en comparaison aux tumeurs cérébrales, car très angiogénique et formant aussi des métastases à distance. Nous abordons d'abord la causalité en partant de la mutation von Hippel-Lindau (VHL) caractéristique du cancer du rein à cellules claires. Nous abordons aussi les relations causales par l'analyse d'un article scientifique concernant les mécanismes cellulaires et moléculaires de ces tumeurs. Dans un deuxième temps, nous discuterons les mécanismes plus généraux, notamment en relation avec l'immunité.

Nous concluons cette partie par une discussion générale en comparant l'analyse causale pour ces deux types de tumeurs pour extraire des spécificités et ce qui est commun.

6.2 Gliomes Diffus (Prototype I)

6.2.1 Mécanismes et facteurs causaux intrinsèques des gliomes diffus

Nous considérons ici seulement les gliomes diffus qui comportent donc deux sous-types chez l'adulte. Les gliomes diffus IDHWT (glioblastomes, GB) qui émergent spontanément et représentent les formes les plus agressives des gliomes diffus et les gliomes mutés IDH1 qui ont une évolution plus lente et surviennent dans une population plus jeune. La classification actuelle est représentée dans la Figure 13 ¹⁹⁶.

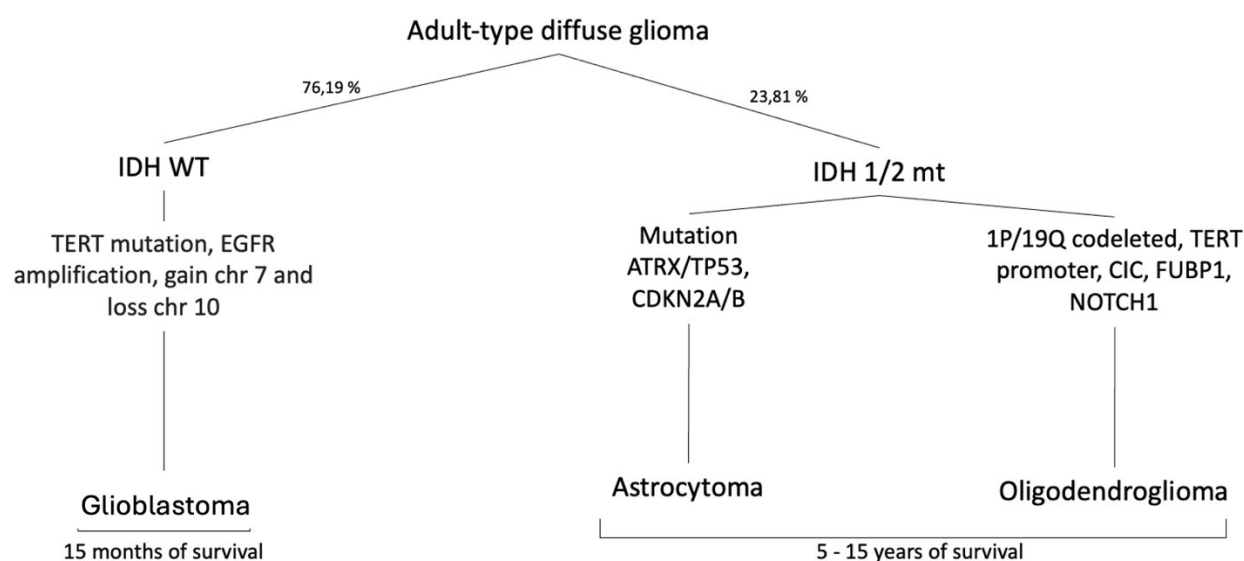


Fig. 15 : Classification des gliomes diffus

Les gliomes diffus de type adulte sont les tumeurs malignes du système nerveux central les plus fréquentes¹⁹⁷. La survie varie considérablement en fonction du sous-type de gliome présent, les gliomes de bas grade ayant des taux de survie à 5 ans pouvant atteindre 80 %, tandis que les gliomes de haut grade ont des taux de survie à 5 ans inférieurs à 5 %¹⁹⁸. Quels que soient leur grade et leur pronostic, les gliomes sont hautement infiltrants et résistants au traitement, ce qui les rend largement incurables. Historiquement, la classification et le pronostic des gliomes diffus reposaient sur les caractéristiques morphologiques de la tumeur en question. Ces catégories

¹⁹⁶ Weller M, van den Bent M, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol.*, 2021, 18(3):170-186.

¹⁹⁷ Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, Wrensch MR. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nat Rev Neurol.*, 2019, 15(7):405-417.

¹⁹⁸ Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2014, 23(10):1985-96.

histopathologiques (par exemple, astrocytome, oligodendrogliome et glioblastome) étaient conceptuellement basées sur la cellule d'origine présumée. Cependant, au cours de ces dernières années, des progrès significatifs dans la caractérisation moléculaire ont permis une amélioration de la classification des gliomes diffus, basée sur des marqueurs moléculaires prédisant mieux le comportement clinique¹⁹⁹. Les progrès dans la classification moléculaire permettent un meilleur « management » clinique des patients atteints de ce type de tumeur.

L'OMS 2021 développe une classification des gliomes en 2016 sur la base de biomarqueurs moléculaires clés en réduisant considérablement la dépendance aux caractéristiques morphologiques²⁰⁰. La terminologie relative à la classification de ces tumeurs a également été simplifiée, les caractéristiques moléculaires dictant la classification et les analyses histopathologiques et moléculaires conjointes déterminant le grade. Pour la classification des gliomes diffus mise à jour de 2021, celle-ci dépend en grande partie du statut de mutation de l'isocitrate déshydrogénase (IDH1/2) et du statut de codélétion 1p/19q, ce qui donne lieu à trois groupes de maladies primaires : mutant IDH, oligodendrogliome codélété 1p/19q ; Astrocytome mutant IDH, non codélété ; et le glioblastome de type sauvage IDH²⁰¹. Cette révision distingue davantage le mutant IDH de la maladie IDH de type sauvage, une nécessité étant donné le large écart de survie entre les tumeurs mutantes IDH et les tumeurs de type sauvage IDH, même celles portant la même classification histopathologique²⁰². On peut distinguer : Les oligodendrogliomes diffus sont mutants IDH et codélété 1p/19q ; les astrocytome sont des gliomes diffus mutant IDH, non codélété ; les glioblastome sont des gliomes diffus IDHWT.

Si la connaissance de la génétique a amélioré la prise en charge des patients, beaucoup de problèmes persistent i.e. la résistance évasive, l'invasion non contrôlée, un micro-environnement rééduqué par la tumeur, l'inefficacité de l'immunothérapie, etc. Ceci est dû à la complexité des relations causales dans la tumeur et de son TME.

¹⁹⁹ Weller M, van den Bent M, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol.*, 2021, 18(3):170-186.

²⁰⁰ Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.*, 2016, 131(6):803-20.

²⁰¹ Weller M, van den Bent M, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol.*, 2021, 18(3):170-186.

²⁰² Miller JJ, Gonzalez Castro N, McBrayer S et al. Isocitrate dehydrogenase (IDH) mutant gliomas: A Society for Neuro-Oncology (SNO) consensus review on diagnosis, management, and future directions, *Neuro-Oncology*, 2023, 25(1): 4-25.

6.2.2 Les Gliomes IDHWT : le Glioblastome

6.2.2.1 Challenges dans la recherche sur le glioblastome : focus sur le micro-environnement tumoral – considérations générales

Le Glioblastome (GB) est le type de tumeur cérébrale primitive maligne le plus courant, avec une incidence de deux à cinq cas pour 100 000 personnes par an aux États-Unis et en Europe²⁰³. Le pronostic du GB reste sombre, avec une survie médiane d'environ 15 mois pour les patients recevant un traitement standard et de moins d'un an dans les études basées sur la population²⁰⁴. Le GB est caractérisé par des formes sauvages de l'enzyme isocitrate déshydrogénase ½ (IDH1/2), des taux de prolifération élevés, une nécrose centrale, une prolifération microvasculaire et une infiltration tumorale. Le traitement du GB implique une résection chirurgicale et une radiothérapie associée à une chimiothérapie concomitante au témozolomide (TMZ), connue sous le nom de protocole Stupp²⁰⁵. Ce protocole n'a pas évolué depuis 2005. La résistance au traitement est principalement causée par des cellules tumorales qui échappent à la résection et/ou envahissent le parenchyme cérébral normal. À ce jour, les mécanismes sous-jacents au développement du GB restent incomplètement compris, et les systèmes expérimentaux actuels *in vitro* et *in vivo* ne récapitulent que partiellement les propriétés du GB. La génétique du GB a été largement étudiée et des mutations et amplifications comme l'existence des variants du récepteur de l'EGF (EGF VII) ont été mises en évidence. Le séquençage de l'ADN au niveau de la cellule unique (scSeq) a mis en évidence la coexistence de différents sous-clones, tandis que le séquençage de l'ARN sur cellule unique (scRNAseq) a dévoilé différents profils transcriptomiques qui ont permis la classification en groupes transcriptionnels (mésenchymal, classique, proneurale...).

Cependant, cette vision centrée sur les cellules tumorales a sous-estimé le rôle de l'environnement tumoral. L'environnement tumoral comprend divers composants : L'environnement « Cellule tumorale-Cellule tumorale » (TCTC), la niche tumorale, le TME proprement dit, l'environnement proxy-tumoral(proxTE), peritumoral (périTE) et l'environnement tumoral organismal (TOE)²⁰⁶.

²⁰³ Weller M, van den Bent M, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol.*, 2021, 18(3):170-186.

²⁰⁴ Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2014, 23(10):1985-96.

²⁰⁵ Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.*, 2005, 352:997–1003.

²⁰⁶ Laplane L, Duluc D, Larmonier N, Pradeu T, Bikfalvi A. The Multiple Layers of the Tumor Environment. *Trends Cancer.* 2018, 4(12):802-809.

Le TME contrôle à la fois la croissance tumorale et l'invasion du GB, ouvrant ainsi de nouvelles possibilités d'intervention thérapeutique. Cependant, la connaissance des signaux micro-environnementaux qui ont un impact sur les propriétés des cellules du GB est fragmentaire. Le micro-environnement du GB est complexe, avec un mélange de cellules immunitaires, principalement représentées par des cellules myéloïdes/microglies (l'un des constituants cellulaires les plus abondants du TME), des vaisseaux sanguins, des astrocytes et une matrice extracellulaire (MEC), qui varie selon les différentes tumeurs. Ces interactions ont été étudiées au niveau cellulaire et moléculaire, comme le rôle du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) et des récepteurs du VEGF (VEGFR), les facteurs de guidage et les signaux positifs ou négatifs entre les cellules GB et les vaisseaux sanguins. Plus récemment, une interaction complexe avec les neurones a été documentée, mais la manière dont tous ces différents éléments sont intégrés spatialement et causalement est inconnue²⁰⁷. Le paysage immunitaire du GB a également été exploré et comparé aux métastases cérébrales en utilisant une combinaison d'approches²⁰⁸. L'inconvénient de ce travail est sa nature purement descriptive et le manque d'informations sur la façon dont les microglies ou les macrophages dérivés des monocytes interagissent spatialement avec les autres composants du TME. Divers aspects ne sont pas bien connus comme les événements moléculaires (et leur dynamique) entre les cellules tumorales, les neurones, les compartiments vasculaires et immunitaires. Notre compréhension est aussi incomplète concernant notamment, l'hétérogénéité régionale des tumeurs, les contraintes et signaux externes régulant le TME et leur impact sur le développement de la tumeur, et l'impact des interventions thérapeutiques dans l'environnement complexe des tumeurs cérébrales.

L'initiation tumorale est caractérisée par deux événements concomitants, l'activation « oncogénique » (PDGFBB, EGFRVII..) et la perte d'action de suppresseur de tumeur (p53, etc.). L'expansion tumorale est le fait d'une vascularisation importante, même si elle est fonctionnellement défectueuse. Par ailleurs, les cellules microgliales (MG) se regroupent à la périphérie de la tumeur, mais leur rôle semble être restreint à une tentative de limitation de l'expansion tumorale, néanmoins insuffisante. Une fraction des cellules forme des microtubes (MT) notamment au centre de la tumeur. Par ailleurs, des synapses entre neurones et cellules GB

²⁰⁷ Venkataramani V, et al. Cancer Neuroscience of Brain Tumors: From Multicellular Networks to Neuroscience-Instructed Cancer Therapies. *Cancer Discov.*, 2025, 15(1):39-51.

²⁰⁸ Maas RR, et al. The local microenvironment drives activation of neutrophils in human brain tumors. *Cell*, 2023, 186(21):4546-4566.e27.

(NGS) se forment et semblent impliquées dans l'invasion tumorale. L'invasion dans le tissu nerveux procède de trois manières : invasion vasculaire, invasion neuronale (sur les axones) et une voie interstitielle. Le système immunitaire est également présent (Cellules NK, macrophages, T cytotoxique, T helper, etc.) néanmoins à une quantité nettement inférieure aux métastases cérébrales.

J'ai synthétisé les connaissances actuelles des GBs dans un article conceptuel avec la participation de toute la communauté de neuro-oncologie française. L'article passe en revue tous les facteurs causaux importants impliqués dans la régulation du micro-environnement en prenant comme prototype tumoral le glioblastome qui est généralement IDH-WT.

Résumé de l'article 1

Challenges in glioblastoma research : focus on the tumor microenvironment.

Bikfalvi A, da Costa CA, Avril T, Barnier JV, Bauchet L, Brisson L, Cartron PF, Castel H, Chevet E, Chneiweiss H, Clavreul A, Constantin B, Coronas V, Daubon T, Dontenwill M, Ducray F, Enz-Werle N, Figarella-Branger D, Fournier I, Frenel JS, Gabut M, Galli T, Gavard J, Huberfeld G, Hugnot JP, Idhah A, Junier MP, Mathivet T, Menei P, Meyronet D, Mirjolet C, Morin F, Mosser J, Moyal EC, Rousseau V, Salzet M, Sanson M, Seano G, Tabouret E, Tchoghandjian A, Turchi L, Vallette FM, Vats S, Verreault M, Virolle T. **Trends Cancer**. 2023 Jan;9(1):9-27. doi: 10.1016/j.trecan.2022.09.005. **L'Article complet est inclus en Annexes**

Dans cet article, nous mettons en lumière les avancées récentes qui mettent le micro-environnement tumoral (TME) au cœur de la recherche sur le glioblastome.

Points clés

- La vision centrée sur la cellule tumorale a sous-estimé le rôle du micro-environnement tumoral (TME) et n'a pas permis de développer des thérapies surpassant le traitement Stupp pour les glioblastomes (GB).
- L'environnement tumoral comprend non seulement les composantes de la niche tumorale (TME), mais aussi le milieu macroorganismal de la tumeur.
- Le TME est composé de plusieurs compartiments, avec des interactions cellulaires et moléculaires complexes tant à l'intérieur qu'entre chaque compartiment.
- Les neurones sont des acteurs récemment étudiés dans le développement des GB, qu'ils modulent via des synapses entre cellules de GB et neurones.
- De nombreux modèles expérimentaux de GB ont été développés, incluant des modèles *in vivo/ex vivo* chez différentes espèces ainsi que des modèles *in vitro* en 3D.

- Pour accroître la complexité, des modèles 3D ont été proposés en introduisant certains composants sélectionnés du TME.
- Diverses approches thérapeutiques existantes ou en développement nécessitent encore des améliorations, notamment par une meilleure définition de la combinaison des cibles les plus prometteuses au sein du TME.
- Les traitements actuels peuvent également modifier le TME et influencer la réponse thérapeutique.

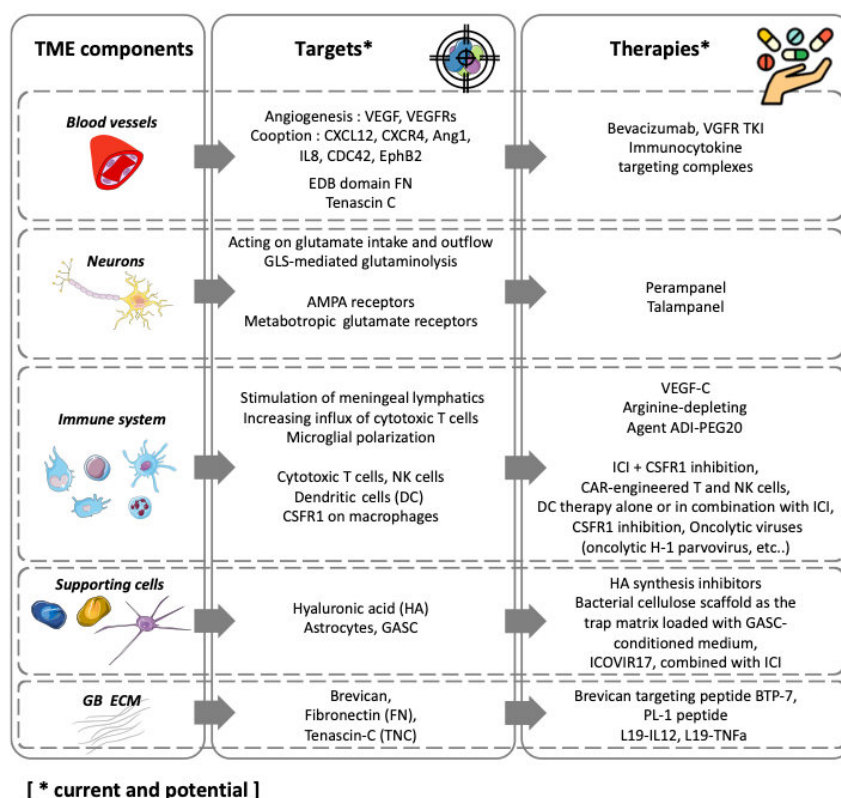


Fig. 16 : Éléments du TME et leur mécanisme causal dans la régulation du développement tumoral. Permission de reproduire : Copyright Clearance Center.

6.2.2.2 Analyse causale des gliomes non mutés IDH1/2

Pour l'analyse causale, trois niveaux peuvent être considérés. Le premier niveau est représenté par l'analyse des fromages causaux, le deuxième niveau par les graphiques acycliques dirigés (DAGs), et le troisième niveau par une formulation plus mathématique utilisant la modélisation par équations structurelles (« Structural Equation Modelling », SEM) et des probabilités conditionnelles.

6.2.2.2.1 *Le fromage causal (« causal pie », CP)*

« Le fromage causal » est une représentation graphique de causes suffisantes et de ses sous-catégories. Les sous-catégories sont représentées par des causes nécessaires. Chaque séquence causale peut avoir un nombre n de causes suffisantes qui chacune seule peut induire l'effet donné. Dans le cas d'utilisation des DAGs, l'analyse comporte deux stratégies possibles. Une première possibilité est d'imaginer des « mondes différents ». Dans ce cas des valeurs arbitraires sont utilisées pour les coefficients de voie (« *path coefficients* ») et on favorisera donc l'une ou l'autre voie. Ceci permet de modéliser une situation où, dans la tumeur, une séquence d'événements est actionnée qui entraînera des modifications moléculaires et phénotypiques distinctes. Nous pouvons ainsi construire n différents mondes.

La formulation en SEM (« *Structural Equation Modelling* ») n'est rien d'autre qu'une formulation mathématique des interactions causales représentées par les graphiques acycliques. Le deuxième niveau est représenté par l'association de probabilité de différents scénarios ou hypothèses qui est fonction de l'activité des différents types cellulaires et /ou voies de signalisation. Une probabilité peut être associée à chacun des scénarios qui sont ensuite corrigés en fonction des données expérimentales. Les scénarios possibles sont par exemple une probabilité élevée pour l'angiogenèse, pour le métabolisme glycolytique ou au contraire Oxphos, une composante neuronale très active, etc. Des combinaisons de ces différentes conditions peuvent exister par l'association de 2, 3 ou de multiples variables.

Le troisième niveau est une représentation extrêmement réductionniste caractérisée par deux états métastables : l'état de compaction et l'état de diffusion. Ces deux états sont liés par une relation caractérisée par un coefficient de probabilité. Ces deux états sont sous la dépendance de facteurs cellulaires et moléculaires incluant des facteurs de transcription et métaboliques, des effets externes exercés par les vaisseaux sanguins ou le système nerveux. Ceci est abordé dans la partie où les gliomes IDHWT et IDH mutants sont comparés.

Le problème de décider d'une cause suffisante ou nécessaire dépend de la relation de cause à effet qu'on cherche à modéliser. Prenons pour l'exemple l'angiogenèse. Dans le contexte d'une tumeur ayant le potentiel d'être richement vascularisée (cela veut dire que tous les modules moléculaires et cellulaires existent pouvant contribuer à la vascularisation) l'angiogenèse est un facteur causal suffisant pour au moins (et très certainement) l'expansion de la masse tumorale. Le Fromage Causal (CP) peut être utilisé pour compiler les composantes faisant partie d'une cause suffisante. Le CP peut ou doit contenir des éléments cellulaires et moléculaires. C'est la coexistence des éléments moléculaires et cellulaires qui permet la formation des vaisseaux

sanguins. Un élément moléculaire seul et un élément cellulaire seul ne peuvent pas produire l'angiogenèse. Donc le CP doit contenir les deux, ce sont deux conditions nécessaires qui ensemble constituent une cause suffisante. On peut enrichir cela encore plus avec des variables physiques qui peuvent être définies (1) comme la propriété tensionnelle-rigidité (matrice) et (2) comme la propriété élastique du tissu vasculaire lui-même. Cela complexifie encore un peu plus le CP. Donc trois niveaux doivent être associés pour représenter entièrement le CP. On peut cependant se demander si ces trois niveaux sont absolument requis pour établir une relation ou séquence causale. En adoptant une approche interventionniste, on peut conclure que l'interruption d'une interaction moléculaire, comme celle du VEGF avec son récepteur, inhibe le développement tumoral. On pourrait conclure que, dans ce cas, l'explication moléculaire est, à elle seule, suffisante. Limiter l'interventionnisme à l'interaction du VEGF avec son récepteur comme seule cause est une erreur. D'autres facteurs comme la matrice extracellulaire, des récepteurs d'adhésion, ainsi que l'agencement cellulaire avec une topographie spécifique sont aussi requis. Ces derniers constituent des facteurs causaux nécessaires, mais non suffisants. La question demeure : peut-on qualifier l'interaction VEGF/VEGFR de relation causale suffisante ? Je pense qu'il serait préférable de nommer ces relations « facteurs causaux actifs » et « facteurs causaux d'accompagnement ». Dans ce cas, tous les deux sont des facteurs causaux nécessaires, mais possédant des caractéristiques distinctes.

Une perspective alternative consiste à adopter celle qui s'aligne sur la théorie de Nancy Cartwright. Comme indiqué au chapitre précédent, pour Nancy Cartwright (1979) X est la cause de Y si X accroît la probabilité de Y dans toutes les situations qui sont causalement homogènes : X causes Y si $p(Y|X \wedge S_i) > p(Y|S_i)$. S_i représente toute cause dont les effets ne sont pas causés par A. L'ensemble de $(S_1, S_2, \dots, S_n)$ peut être vu comme le « *background* » sur lequel X causes Y. S_i X est représenté par l'interaction VEGF/VEGFR et Y par l'angiogenèse, et S_i tout autre cause indépendante de VEGF/VEGFR, on peut formaliser comme suit :

VEGF/VEGFR causes angiogenèse si : $p(\text{Angio} | \text{VEGF/VEGFR} \wedge S_i) > p(\text{Angio} | S_i)$.

Dans le cas des tumeurs à potentiel faible de vascularisation, l'expansion tumorale doit faire appel à d'autres mécanismes et facteurs causaux. Les cellules tumorales doivent subir une adaptation métabolique et dépendre, en théorie, plus des voies glycolytiques qui sont indépendantes de l'oxygène. De plus, d'autres « *inputs* » doivent être renforcés comme des interactions paracrines entre cellules tumorales, l'input neuronal, inflammatoire, etc.

Les autres variables (l'invasion cellulaire, etc.) peuvent être décomposées de la même façon. Pour l'invasion, par exemple, on peut décomposer en composantes cellulaires, moléculaires et physiques de la même manière. Dans ce cas, la composante cellulaire est la cellule tumorale ; la composante moléculaire est représentée par des molécules attractantes, des récepteurs membranaires (p.ex. intégrines), le type de la matrice cellulaire et des protéases ; la composante physique est représentée par des tensions exercées par la matrice extracellulaire et les mécanosenseurs. On peut ainsi construire une variété de CPs qui ensuite peut être relié entre elles par des relations causales inter CP. Dans la figure 18 une représentation de différents CPs qui contribuent ensemble à la régulation du développement tumoral. Les différents fromages sont les suivants : Fromage invasion, Fromage Angiogenèse, Fromage input neuronal, Fromage Immunité adaptative, Fromage Immunité innée, Fromage glycolytique, Fromage oxydatif, (Figure 17).

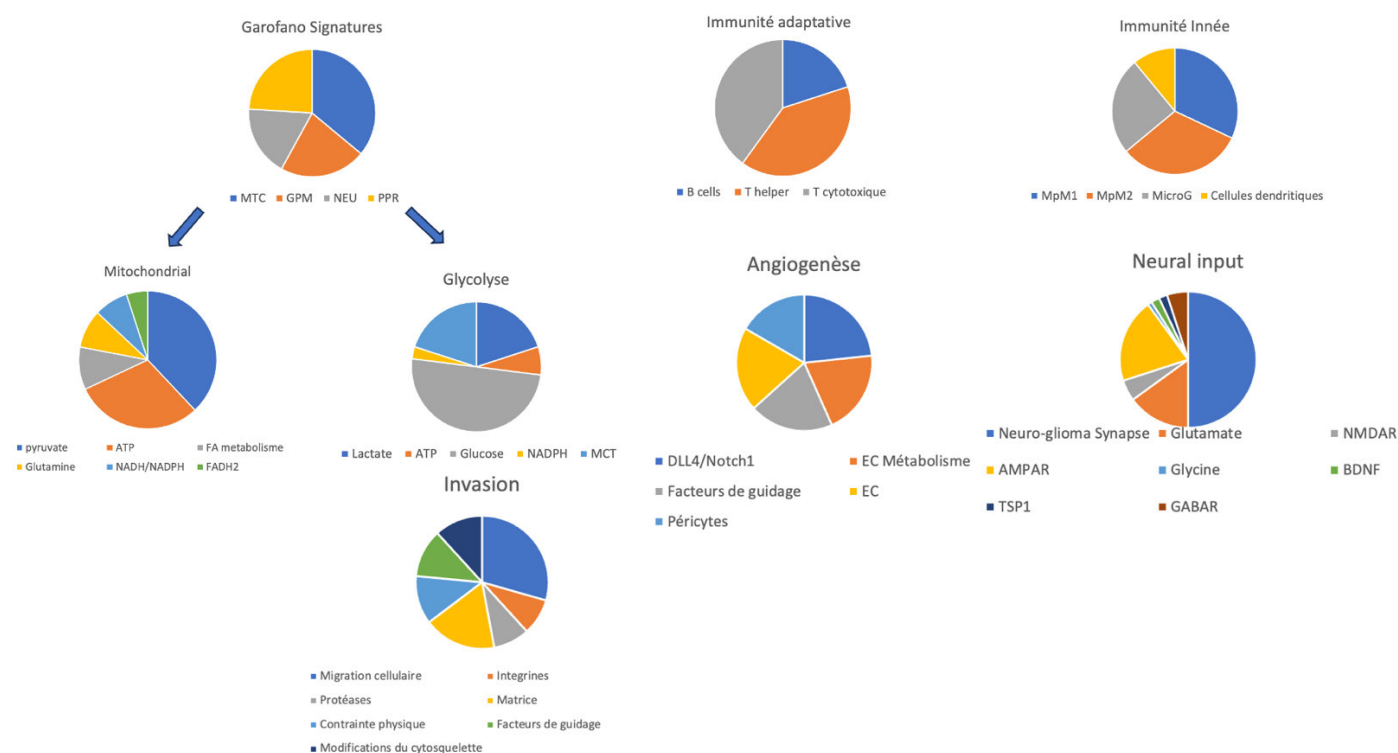


Fig. 17 : Différents fromages causaux (CPs) des gliomes IDH WT. Ces fromages causaux constituent des causes suffisantes au développement tumoral. Leur poids dans le développement tumoral est variable et fonction du sous-type moléculaire (pro-neural, classique, mésenchymal, ...) et fonction du stade du développement de la tumeur. Ceci est dû à des modifications dynamiques spatio-temporelles au cours de l'évolution tumorale. La répartition des différents sous-ensembles de chaque CP correspond à une simulation avec des valeurs estimées a priori.

Comment le concept d'INUS s'applique-t-il à cette discussion ? Pour rappel, l'INUS, dans sa forme abrégée, se formule ainsi : $(Ca_1 \wedge Ca_2) \vee D \rightarrow E$. Ceci peut se complexifier et donner ceci : $(Ca_1 \wedge Ca_2 \wedge \dots \wedge Ca_n) \vee (Cb_1 \wedge Cb_2 \wedge \dots \wedge Cb_n) \vee \dots \rightarrow \text{Effet } E$

Chaque composante d'un CP peut être définie comme une condition indispensable au sein d'un ensemble, mais non suffisante isolément : seule l'association de plusieurs conditions INUS (ex. VEGF, cellule endothéliale, matrice extracellulaire, mécanotransduction, etc.) forme une cause suffisante pour l'angiogenèse, alors que d'autres modules (invasion, métabolisme...) peuvent contribuer au développement tumoral et affecter la survie des patients. Alternativement, les dernières peuvent contribuer au fond causal (« *background* »).

Quand nous appliquons le concept INUS à notre cas, nous avons :

- VEGF : Vascular endothelial growth factor
- CE : Cellule endothéliale
- ECM : Matrice extracellulaire
- MÉCANOTR : Mécanotransduction
- GLUT : Glutamine
- NEUI : Input neuronal
- COOP : Coooption vasculaire

Module Angiogenèse : $(VEGF \wedge CE \wedge ECM \wedge MÉCANOTR \wedge \dots)$

Module Invasion : $(GLUT \wedge NEUI \wedge COOP \wedge \dots)$

Effet global : $(VEGF \wedge CE \wedge ECM \wedge MÉCANOTR \wedge \dots) \vee (GLUT \wedge NEUI \wedge COOP \wedge \dots) \vee (\dots)$

Chaque module correspond à une combinaison minimale de facteurs nécessaires ; son activation entraîne l'effet visé lorsqu'au moins un module est fonctionnel. Dans ce cas, VEGF est une condition INUS.

Les différents constituants d'un fromage causal ci-dessus peuvent remplir la fonction de la condition INUS à condition que le « *background* » ou fond causal ne soit pas, en lui-même, inducteur de l'effet causal. Citons ici un exemple. Le VEGF peut représenter la condition INUS du module « Angiogenèse » qui est fortement induite et va promouvoir le développement tumoral. Lorsqu'on garde l'« input » neuronal, l'immunité innée et adaptative, l'invasion et le métabolisme constants, l'angiogenèse seule est susceptible de favoriser le développement tumoral. Les autres causes suffisantes citées plus haut (l'« input » neuronal, l'immunité, l'invasion, le métabolisme, etc.) joueront dans ce cas le rôle du fond causal. Imaginons une troupe de danseurs ou chaque danseur peut générer une réaction de plaisir chez les spectateurs. Cependant, un danseur doit sortir de son rang et danser seul. La réaction de plaisir peut être induite par chaque danseur individuellement. Chaque danseur peut, dans ce cas, alterner entre l'agent causal ou faire partie du fond causal.

6.2.2.2.2 Graphiques acycliques dirigés (« Directed Acyclique Graphs » DAG)

Nous proposons ci-dessous de construire des graphiques acycliques (DAGs) pour les gliomes IDH WT. Nous avons vérifié d'abord si les DAG proposés avaient une structure correcte avec notamment l'absence de chemins biaisés (« *biased path* »). Nous avons défini les variables d'entrées (« *Exposures* ») qui sont représentées par « *Adaptive immunity* », « *Glycolytic state of tumor cells* », « *Hypoxia* », « *Innate immunity* », « *Molecular profile of tumor cells* », « *Neural input* », « *oxydative state* », « *Vessel cooption* » ainsi que la variable de sortie (« *Outcome* ») « *Patient survival* » représentée par $PS = 1 - dPS$ (dPS étant la diminution de la survie).

Nous avons ensuite construit différents scénarios reflétant différents états tumoraux (« appelés ici mondes »). Dans ces différents « Mondes », les variables sont connectées par des coefficients de voie (« *path coefficients* ») estimés a priori. Ces coefficients de voie sont choisis arbitrairement, mais dans un souci (1) d'accorder le même poids à l'angiogenèse et l'invasion, (2) de favoriser l'angiogenèse par rapport à l'invasion ou (3) de favoriser l'invasion par rapport à l'angiogenèse. Ces coefficients expriment une probabilité de $0 \rightarrow 1$.

Structure générale du DAG « gliome » :

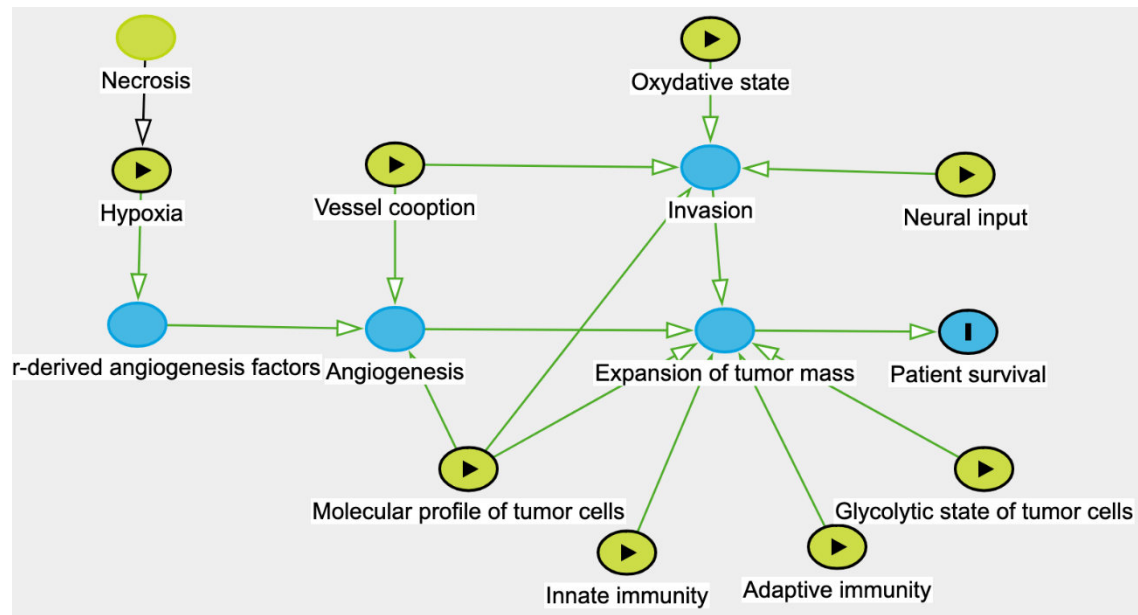


Fig. 18 : DAG intégrant les processus à l'aide de DAGITTY. Analyse du DAG : « Expositions : Immunité adaptative, état glycolytique des cellules tumorales, hypoxie, immunité innée, profil moléculaire des cellules tumorales, input neuronal, état oxydatif, cooption vasculaire. Résultat : Survie du patient. Il n'existe aucun chemin de biais ouvert et aucun ajustement n'est nécessaire pour estimer l'effet total de l'hypoxie, de la cooption vasculaire, de l'état oxydatif, de l'input neuronal, de l'immunité innée, de l'immunité adaptative, de l'état glycolytique des cellules tumorales, ou du profil moléculaire des cellules tumorales sur la survie du patient. » On retrouve cinq covariables et onze « chemins causaux ». PS dans ce DAG est $PS = 1 - dPS$. Les codes peuvent être trouvés en Annexe (Annexe 2).

Graphiques acycliques avec coefficients de chemin (« *path coefficients* ») :

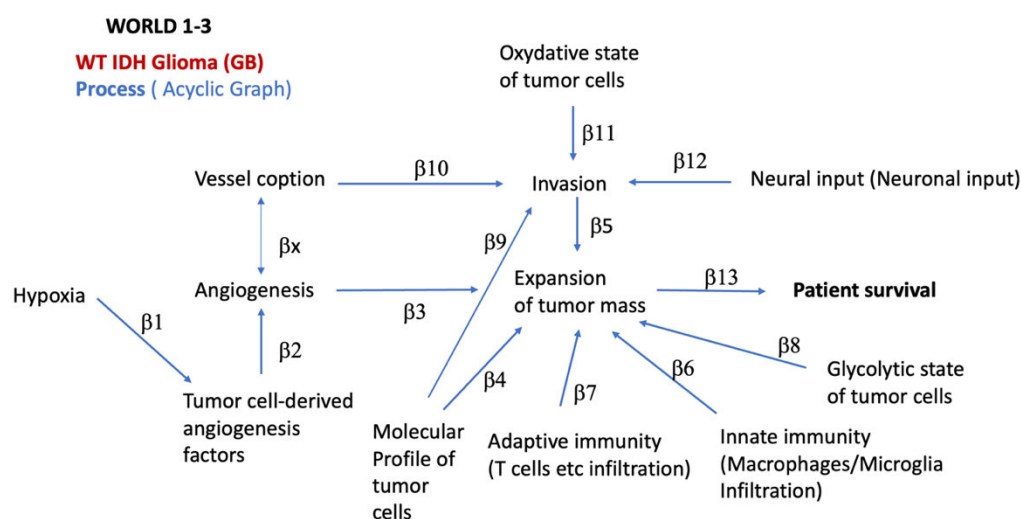


Fig. 19 : Graphique acyclique représentant différents mondes dont l'existence dépend des coefficients de voie β , qui reflètent leur dépendance à l'angiogenèse, l'invasion ou les deux.

6.2.2.2.3 Modélisation par modèles d'équations structurelles (SEM) et simulations

Les graphiques acycliques dirigés (DAG) de « mondes possibles » utilisent des coefficients de chemin prédéfinis pour simuler les corrélations attendues entre variables, comme entre l'angiogenèse et la diminution de la survie du patient.

Cela peut également être formulé comme un « *Structural Equation Model* » (SEM), dans lequel les équations décrivent les relations entre variables.

(1) Équations

1. Facteurs angiogéniques dérivés de la tumeur :

$$\text{TDAF} = \beta_1 H + \varepsilon \text{TDAF}$$

où (H) représente l'hypoxie.

2. Angiogenèse :

$$A = \beta_2 \text{TDAF} + \varepsilon A$$

3. Expansion de la masse tumorale :

$$\text{ETM} = \beta_3 A + \beta_4 \text{MP} + \beta_5 I + \beta_6 \text{II} + \beta_7 \text{AI} + \beta_8 G + \varepsilon \text{ETM}$$

MP : Profil moléculaire ; I : invasion ; II : immunité innée ; AI : immunité adaptative ; G : état glycolytique.

4. Invasion :

$$I = \beta_9 \text{MP} + \beta_{10} \text{VC} + \beta_{11} O + \beta_{12} \text{NI} + \varepsilon I$$

VC : cooption vasculaire ; O : état oxydatif.

5. Survie du patient :

$$dSP = \beta_{13} \text{ETM} + \varepsilon dSP$$

6. SP= 1-dSP

Le symbole ε (epsilon) représente le terme d'erreur ou la perturbation associée à chaque équation du modèle. Il n'est pas expliqué par les variables indépendantes incluses dans le modèle et tient compte de la variabilité de la variable dépendante. Ceci inclut l'erreur de mesure, les variables omises des variables et la variabilité aléatoire.

(2) Simulation de différents scénarios

Nous pouvons construire trois différents scénarios ou « mondes ». Ces trois mondes sont :

Monde 1 : Angiogenèse et invasion tumorale ont une importance équivalente

Monde 2 : Angiogenèse prime par rapport à l'invasion tumorale

Monde 3 : Invasion tumorale prime par rapport à l'angiogenèse

Nous pouvons simuler les relations causales et assigner d'une manière arbitraire des coefficients des voies ("*path coefficients*") pour créer trois scénarios : Monde 1 (Angiogenèse et Invasion ont une valeur égale), monde 2 (Angiogenèse a une valeur supérieure à l'invasion, et monde 3 (Invasion a une valeur supérieure à l'angiogenèse). À titre d'exemple :

Path Coefficients	Monde 1 (A=I)	Monde 2 (A>I)	Monde 3 (I>A)
β_1	0,5	0,9	0,1
β_2	0,5	0,9	0,1
β_3	0,5	0,9	0,1
β_4	0,4	0,2	0,3
β_5	0,4	0,1	0,4
β_6	0,4	0,2	0,1
β_7	0,2	0,2	0,1
β_8	0,2	0,2	0,1
β_9	0,2	0,1	0,6
β_{10}	0,3	0,1	0,3
β_{11}	0,2	0,1	0,4
β_{12}	0,2	0,1	0,2
β_{13}	0,6	0,6	0,6

Tableau 4 : Estimation des coefficients de voie (“path coefficients”).

L’hypoxie vers les facteurs angiogéniques dérivés de la tumeur (β_1), facteurs angiogéniques dérivés de la tumeur vers l’angiogenèse (β_2), angiogenèse vers l’expansion de la masse tumorale (β_3), profil moléculaire vers l’expansion de la masse tumorale (β_4), profil moléculaire IDH vers l’invasion (β_9), cooption vasculaire vers l’invasion (β_{10}), état oxydatif vers l’invasion (β_{11}), entrée neuronale vers l’invasion (β_{12}), immunité innée vers l’expansion de la masse tumorale (β_6), immunité adaptative vers l’expansion de la masse tumorale (β_7), état glycolytique vers l’expansion de la masse tumorale (β_8), invasion vers l’expansion de la masse tumorale (β_5), et expansion de la masse tumorale vers la diminution de la survie des patients (β_{13}).

Nous ne tenons pas compte, pour ce calcul, du poids des différentes variables, en assumant que chaque variable a la même valeur intrinsèque. Cependant, nous tenons compte du facteur ε qui représente l’erreur estimée, et nous corrigeons le résultat final par un facteur de correction.

Sur cette base, nous pouvons déterminer les coefficients (probabilités) globaux pour chaque « Monde » :

Pour le Monde 1 (A=I) :

$$SP = \beta_{13}[\beta_3(\beta_2(\beta_1H + \varepsilon_{Tdaf}) + \varepsilon_A) + \beta_4M\_P + \beta_5(\beta_9M\_P + \beta_{10}V\_C + \beta_{11}O + \beta_{12}NI + \varepsilon_I) + \beta_6II + \beta_7AI + \beta_8G + \varepsilon_{ETM}] + \varepsilon_{PS}$$

$$SP = \beta_{13}[\beta_3(\beta_2(\beta_1) + \beta_4 + \beta_5(\beta_9 + \beta_{10} + \beta_{11} + \beta_{12}) + \beta_6 + \beta_7 + \beta_8]$$

$$\beta_1 = 0,5 ; \beta_2 = 0,5 ; \beta_3 = 0,5 ; \beta_4 = 0,4 ; \beta_5 = 0,4 ; \beta_6 = 0,4 ; \beta_7 = 0,2 ; \beta_8 = 0,2 ; \beta_9 = 0,2 ; \beta_{10} = 0,3 ; \beta_{11} = 0,2 ; \beta_{12} = 0,2 ; \beta_{13} = 0,6$$

Étapes du calcul :

- Calculez le produit $\beta_1 \times \beta_2 = 0,5 \times 0,5 = 0,25$
- Multipliez ce résultat par β_3 : $0,25 \times 0,5 = 0,125$
- Ajoutez β_4 : $0,125 + 0,4 = 0,525$
- Additionnez les coefficients $\beta_9, \beta_{10}, \beta_{11}, \beta_{12}$: $0,2 + 0,3 + 0,2 + 0,2 = 0,9$
- Multipliez cette somme par β_5 : $0,9 \times 0,4 = 0,36$
- Ajoutez le résultat à l’étape 3 : $0,525 + 0,36 = 0,885$
- Ajoutez β_6, β_7 et β_8 : $0,885 + 0,4 + 0,2 + 0,2 = 1,685$
- Enfin, multipliez ce total par β_{13} : $1,685 \times 0,6 = 1,011$
- Le résultat du calcul avec ces coefficients est : $dSP = 1,011$ $dSP \approx 1$
- $SP = 1 - dSP \approx 0$
- Avec le facteur de correction (0,15) : $SP \approx 0,13$

Pour le Monde 2 (A>I)

$$SP = \beta_{13} \times [\beta_3 \times (\beta_2 \times \beta_1) + \beta_4 + \beta_5 \times (\beta_9 + \beta_{10} + \beta_{11} + \beta_{12}) + \beta_6 + \beta_7 + \beta_8]$$

En remplaçant par les valeurs numériques :

$$\beta_1 = 0,9 ; \beta_2 = 0,9 ; \beta_3 = 0,9 ; \beta_4 = 0,2 ; \beta_5 = 0,1 ; \beta_6 = 0,2 ; \beta_7 = 0,2 ; \beta_8 = 0,2 ; \beta_9 = 0,1 ; \beta_{10} = 0,1 ; \beta_{11} = 0,1 ; \beta_{12} = 0,1 ; \beta_{13} = 0,6$$

Étapes du calcul :

- $\beta_2 \times \beta_1 = 0,9 \times 0,9 = 0,81$
- $\beta_3 \times (\beta_2 \times \beta_1) = 0,9 \times 0,81 = 0,729$
- Somme $(\beta_9 + \beta_{10} + \beta_{11} + \beta_{12}) = 0,1 + 0,1 + 0,1 + 0,1 = 0,4$
- $\beta_5 \times$ la somme précédente $= 0,1 \times 0,4 = 0,04$
- Ajout des coefficients : $0,729$ (étape 2) + $0,2$ (β_4) + $0,04$ (étape 4) + $0,2$ (β_6) + $0,2$ (β_7) + $0,2$ (β_8) = $1,569$

- Multiplication finale par β_{13} : $1,569 \times 0,6 = 0,9414$
- Résultat final : $dSP = 0,9414$
- $SP = 1 - dSP \approx SP = 0,06$
- Avec le facteur de correction (0,15) : $SP \approx 0,28$

Pour le Monde 3 (I>A)

$$SP = \beta_{13} [\beta_3(\beta_2(\beta_1)) + \beta_4 + \beta_5(\beta_9 + \beta_{10} + \beta_{11} + \beta_{12}) + \beta_6 + \beta_7 + \beta_8]$$

$$\beta_1 = 0,1 ; \beta_2 = 0,1 ; \beta_3 = 0,1 ; \beta_4 = 0,3 ; \beta_5 = 0,4 ; \beta_6 = 0,1 ; \beta_7 = 0,1 ; \beta_8 = 0,1 ; \beta_9 = 0,6 ; \beta_{10} = 0,3 ; \beta_{11} = 0,4 ; \beta_{12} = 0,2 ; \beta_{13} = 0,6$$

- Produit imbriqué : $\beta_3(\beta_2(\beta_1)) = 0,1 \times (0,1 \times 0,1) = 0,1 \times 0,01 = 0,001$
- Valeur de β_4 : 0,3
- Somme des coefficients β_9 à β_{12} : $0,6 + 0,3 + 0,4 + 0,2 = 1,5$
- Produit $\beta_5 \times (\text{somme})$: $0,4 \times 1,5 = 0,6$
- Valeurs de β_6 , β_7 et β_8 : $0,1 + 0,1 + 0,1 = 0,3$

Assemblage de la formule :

- 0,001 (produit imbriqué)
- + 0,3 (β_4)
- + 0,6 (β_5 et somme des β_9 à β_{12})
- + 0,3 ($\beta_6 + \beta_7 + \beta_8$)

Total à l'intérieur des crochets : $0,001 + 0,3 + 0,6 + 0,3 = 1,201$

Application du coefficient final β_{13} : $0,6 \times 1,201 = 0,7206$

Résultat final :

- $dSP \approx 0,72$
- $SP = 1 - dSP \approx 0,28$
- Avec le facteur de correction (0,15) : $SP \approx 0,43$

Le DAG et le SEM fournissent un cadre pour comprendre les relations entre les différents facteurs du développement du glioblastome et leur impact sur la survie des patients. Dans cet exemple, avec les valeurs arbitraires assignées, nous obtenons des valeurs de dSP relativement élevées avec $P(A=I) > P(A>I) > P(I>A)$. Ces coefficients de voie sont hypothétiques et peuvent être corrigés à l'aide de méthodes statistiques issues des données expérimentales et/ou cliniques. Cela correspond en quelque sorte à des « priors » de type bayésien qui peuvent être corrigés par l'expérience. Nous n'avons pas tenu compte de la fonction résiduStd qui calcule la variance résiduelle pour la somme des coefficients de chemin menant à la variable (ce qui pourrait nous amener à amender les coefficients de voie).

Aucune relation causale positive entre l'angiogenèse et la cooption des vaisseaux (variables qui ont un bord à double flèche dans le DAG) est représentée dans ce DAG. Il existe néanmoins une corrélation négative entre ces deux variables. Une discussion plus approfondie est nécessaire concernant la relation entre ces deux variables. La connexion causale entre ces deux variables n'est pas claire, et pour cette raison elle n'a pas été incluse dans notre analyse.

Ces différents « Mondes » ont donc chacun une probabilité globale. Cela veut dire que le scénario global pour chacun des « Monde » 1-3 a une probabilité qui est fonction des coefficients de voies. Cependant, dans le calcul, nous n'avions pas tenu compte du poids de chaque variable. On peut, donc, théoriquement, rajouter le poids de chaque variable et pondérer les équations. À titre d'exemple, la présence d'une vascularisation importante rend le « Monde » 2 très probable à condition que le fond causal caractérisé par l'absence de mutation IDH1/2 soit présent. L'absence d'une néovascularisation augmente la probabilité du « Monde » 3 considérablement. La variable « Angiogenèse » est donc une variable déterminante qui conditionne le « Monde » 2&3. Cette variable peut être quantifiée soit au niveau d'histologie ou au niveau d'expression de protéines angiogéniques comme le VEGF. Pour les « Mondes » 1 et 3, il faudrait au moins un paramètre additionnel qui reflète l'invasion. Ceci peut être la cooption, le métabolisme oxphos ou l'input neuronal.

L'évolution des interactions dans le TME au fil du temps représente un autre point à considérer. Les différents mondes définissent des scénarios susceptibles d'évoluer selon la temporalité. La valeur des coefficients de voie peut donc changer au cours de l'évolution tumorale. Ceci est dû aux différentes boucles de contrôle et rétrocontrôle qui se modifient en fonction du temps. Il y a donc le conditionnel du temps $t_1 \rightarrow t_n$ qu'il faut prendre en considération.

(3) Intervention sur les différentes variables

Un aspect important est l'intervention sur les différentes variables. Ces interventions peuvent être de différente nature p.ex. thérapeutique, stress, facteurs environnementaux, etc. L'intervention sert aussi à valider les interactions entre les variables en accord avec la théorie interventionniste woodwardienne. Dans le DAG, l'intervention peut agir, en théorie, les différentes variables comme l'angiogenèse, l'invasion, le métabolisme, l'immunité, l'input nerveux, etc., soit spécifiquement sur chacune des variables ou plus globalement sur des combinaisons de variables.

Si on reprend le SEM pour le DAG du monde 1-3 : On pourrait intervenir au niveau des facteurs angiogéniques dérivés de la tumeur (TDAF), au niveau de l'invasion (I), de l'immunité adaptative (AI), de la glycolyse (G), du métabolisme oxydatif (O) ou de la contribution neuronale (NI). Les variables choisies sur lesquelles l'intervention (**Int**) est exercée (en nombre de 6), sont indiquées en **bleu**.

$$TDAF = \beta_1 H + \varepsilon TDAF$$

où (H) représente l'hypoxie.

2. Angiogenèse :

$$A = \beta_2 TDAF^{Int1} + \varepsilon A$$

3. Expansion de la masse tumorale :

$$ETM = \beta_3 A + \beta_4 MP + \beta_5 I^{Int2} + \beta_6 II + \beta_7 AI^{Int3} + \beta_8 G^{Int4} + \varepsilon ETM$$

MP : Profil moléculaire ; I : invasion ; II : immunité innée ; AI : immunité adaptative ; G : état glycolytique.

4. Invasion :

$$I = \beta_9 MP + \beta_{10} VC + \beta_{11} O^{Int5} + \beta_{12} NI^{Int6} + \varepsilon I$$

VC : cooption vasculaire ; O : état oxydatif ; NI : Input neuronal.

5. Survie du patient :

$$dSP = \beta_{13} ETM + \varepsilon dSP$$

$$SP = 1 - dSP$$

Nous avons le choix entre intervention seule ou en combinaison. On peut également attribuer un poids à chaque intervention :

- Nombre d'interventions et combinaisons (Int1 à Int 6) :

Chaque intervention peut agir seule ou en combinaison avec les autres. On peut estimer les différentes combinaisons possibles des interventions (Int1 à Int6) :

$$C(n, k) = n! / [k! \times (n - k)!]$$

k, nombre de combinaisons d'éléments ; n nombre des interventions (6 dans notre exemple)

- Combinaisons de 1 Intervention : $C(6,1) = 6$
- Combinaisons de 2 Interventions: $C(6,2) = 15$
- Combinaisons de 3 Interventions: $C(6,3) = 20$
- Combinaisons de 4 Interventions: $C(6,4) = 15$
- Combinaisons de 5 Interventions: $C(6,5) = 6$
- Combinaisons de 6 Interventions : $C(6,6) = 1$

Au total, il y a $2^6 - 1 = 63$ combinaisons d'intervention possibles.

- Poids de différentes interventions

On peut attribuer un poids à ces différentes interventions et utiliser l'équation décrite pour la domination causale (5.3.2. (1)(i)).

$$w^* = \operatorname{argmax}_{\{i\}} w_i \text{ et } w^* \gg w_j \text{ pour tout } j \neq *$$

L'équation « $w^* = \operatorname{argmax}_{\{i\}} w_i$ et $w^* \gg w_j$ pour tout $j \neq *$ » sert à identifier, parmi plusieurs interventions (Int1, Int2, Int3, Int4, Int5, Int6), celle qui exerce l'influence la plus forte sur la variable ultime Y dans un réseau causal.

« $w^* = \text{argmax}_{\{i\}} w_i$ » signifie que *Int** possède le poids causal le plus élevé de toutes les interventions considérées (« argmax » = argument du maximum (« argument of the maximum »)).

6.2.2.2.4 Résumé de la contribution du cadre conceptuel de la causalité à l'article 1

Le cadre conceptuel sur la causalité apporte une grille de lecture pour approfondir la compréhension des mécanismes complexes décrits dans l'article sur le glioblastome (GB) (gliomes IDHWT). Il permet de structurer et d'interpréter les interactions multiples entre facteurs moléculaires, cellulaires et environnementaux qui régulent le développement tumoral et la survie des patients. Plusieurs approches sont mobilisées dans l'article pour modéliser ces relations : le « fromage causal » (causal pie), les graphiques acycliques dirigés (DAG), le concept INUS et la modélisation par équations structurelles (SEM).

Tout d'abord, le « fromage causal » sert à décomposer les causes d'un phénomène complexe (comme l'angiogenèse ou l'invasion tumorale) en modules constitués de conditions nécessaires, mais non suffisantes isolément. Seule leur combinaison aboutit à un effet donné, ce qui permet d'analyser la contribution de chaque composante (moléculaire, cellulaire, physique). Cette représentation facilite l'identification des facteurs qui, ensemble, sont suffisants pour déclencher un processus clé du développement tumoral.

Ensuite, la construction de DAGs va plus loin en modélisant explicitement les relations causales entre variables, en évitant les chemins biaisés et en facilitant l'identification des facteurs qui influencent la survie du patient. Les DAGs permettent de simuler différents « mondes » ou scénarios, où l'importance relative de l'angiogenèse et de l'invasion tumorale varie selon les coefficients de voie (« path coefficients ») attribués. Cette modélisation graphique est complétée par une formulation mathématique via les SEM, qui décrivent les relations quantitatives entre variables et permettent d'estimer l'impact de chaque facteur sur le résultat final (la survie du patient).

Le concept INUS (*Insufficient but Necessary part of an Unnecessary but Sufficient condition*) éclaire également la discussion en montrant que chaque composante d'un module causal peut être indispensable au sein d'un ensemble, mais non suffisante isolément : seule l'association de plusieurs conditions INUS forme une cause suffisante pour un effet donné (par exemple, l'angiogenèse). L'application de ce concept à l'analyse du glioblastome permet de distinguer les facteurs causaux actifs de ceux d'accompagnement, et de mieux comprendre comment des

modules distincts (angiogenèse, invasion, métabolisme, immunité, input neuronal...) interagissent pour promouvoir le développement tumoral.

Enfin, le cadre conceptuel sur la causalité offre des outils pour tester l'effet des interventions sur les différentes variables du modèle. L'approche interventionniste permet de simuler l'impact des manipulations (thérapeutiques ou environnementales) ciblées sur les interactions du TME, en évaluant le poids relatif de chaque intervention et leurs combinaisons possibles.

En résumé, le cadre conceptuel sur la causalité permet de passer d'une vision descriptive et statique du micro-environnement tumoral (telle que proposée dans les « *Hallmarks* » du cancer) à une analyse dynamique et intégrative, où les relations causales entre facteurs sont explicitement modélisées et comparées. Le cadre conceptuel causal permet aussi de formuler de nouvelles hypothèses qui peuvent être testées. Des développements futurs aboutiront très certainement à la mise au point de nouveaux outils computationnels qui faciliteront l'analyse causale et son application à la recherche biomédicale et à la pratique clinique.

6.2.2.3 Articles 2&3 : Rôle de la thrombospondine-1 dans l'invasion des gliomes IDHWT

6.2.2.3.1 Généralités

La matrice extracellulaire (MEC) joue un rôle important dans le développement tumoral en favorisant ou en limitant la croissance tumorale, l'invasion et les métastases. Un composant important est la famille matricielle des thrombospondines, composée de cinq membres (TSP1_5).

TSP1 a été découvert pour la première fois dans les plaquettes²⁰⁹ et il a été démontré qu'il joue un rôle important dans le développement du cancer²¹⁰. TSP1 régule le comportement des cellules tumorales via des mécanismes directs et indirects. Les effets directs sont médiés par l'effet sur la motilité cellulaire et les effets indirects d'une action sur le système vasculaire. TSP1 est produite par les cellules tumorales et le TME, et TSP1 est associée à la fois aux cellules tumorales²¹¹ et

²⁰⁹ N.L. Baenziger, G.N. Brodie, P.W. Majerus A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1971, 68: 240-243.

²¹⁰ Kazerounian S, Yee KO, Lawler J. Thrombospondins in cancer. Cell Mol. Life Sci., 2008, 65: 700-712.

²¹¹ J.C. Rodriguez-Manzanique, et al Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98 (2001), pp. 12485-12490.

au système vasculaire ²¹². Les TSP1 associés aux cellules tumorales et aux cellules vasculaires peuvent avoir des rôles distincts.

Il a été démontré que la famille des thrombospondines est impliquée dans d'autres pathologies, outre le cancer, telles que les maladies ayant une composante fibreuse en raison de son rôle dans l'induction du TGF β et l'assemblage des fibrilles de collagène^{213 214}. De plus, des fonctions régulatrices de l'angiogenèse et de la régulation immunitaire ont été décrites ainsi que la régulation de la fonction cardiovasculaire et des réponses au stress via CD47²¹⁵.

TSP1 a un impact sur le développement tumoral et la progression de plusieurs types de cancers tels que le mélanome, le carcinome du sein et du poumon et le glioblastome (GB) ²¹⁶. Nous et d'autres nous sommes particulièrement concentrés sur le rôle de TSP1 dans les gliomes diffus ²¹⁷. La génétique de ces tumeurs a été largement étudiée, mais cela n'a pas conduit à des améliorations majeures des résultats cliniques. Il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles cibles potentielles, impliquées dans les interactions des cellules de GB avec le TME, pour une intervention thérapeutique.

Deux articles sont inclus dans cette section. Un premier article qui correspond à un travail expérimental réalisé sous ma direction ¹⁶⁸ et un deuxième article représente une analyse conceptuelle de l'article expérimental dans le contexte des connaissances actuelles et d'autres travaux sur ce sujet ²¹⁸. Ces articles sont à la base de l'analyse causale qui est réalisée un peu plus loin.

Résumé de l'article 2

Daubon T, Léon C, Clarke K, Andrique L, Salabert L, Darbo E, Pineau R, Guérit S, Maitre M, Dedieu S, Jeanne A, Bailly S, Feige JJ, Miletic H, Rossi M, Bello L, Falciani F, Bjerkvig R, Bikfalvi A. Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development. Nat Commun. 2019 Mar 8;10(1):1146. **L'Article complet est inclus en Annexes**

²¹² Isenberg, JS et al. CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1. J. Biol. Chem., 2006, 281: 26069-26080.

²¹³ J.E. Murphy-Ullrich, M.J. Suto Thrombospondin-1 regulation of latent TGF- β activation: a therapeutic target for fibrotic disease Matrix Biol., 68–69 (2018), pp. 28-43.

²¹⁴ N.J. Galvin, P.M. et al. Interaction of human thrombospondin with types I-V collagen: direct binding and electron microscopy J. Cell Biol., 104 (1987), pp. 1413-1422.

²¹⁵ Roberts, D.D. et al. The matricellular protein thrombospondin-1 globally regulates cardiovascular function and responses to stress via CD47 Matrix Biol., 31 (2012), pp. 162-169.

²¹⁶ Filleur, S. et al. *In vivo* mechanisms by which tumors producing thrombospondin 1 bypass its inhibitory effects Genes Dev., 15 (2001), pp. 1373-1382.

²¹⁷ Daubon, T et al. Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development. Nat. Commun., 10 (2019), p. 1146.

²¹⁸ Bikfalvi A, Guyon G, Daubon T, New insights into the role of thrombospondin-1 in glioblastoma development, Seminars in Cell & Developmental Biology, Volume 155, Part B, 2024, Pages 52-57.

Nous avons mené une étude systématique axée sur la protéine matricielle Thrombospondine-1 (THBS1) afin de mettre en lumière les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du glioblastome (GB). Il a été constaté que l'expression de THBS1 augmente avec le grade des gliomes. Sur le plan mécanistique, nos résultats montrent que la voie canonique du TGF β régule transcriptionnellement THBS1 via la fixation de SMAD3 au promoteur du gène THBS1. L'inhibition de THBS1 réduit l'invasion cellulaire tumorale et la croissance, aussi bien seule qu'en combinaison avec une thérapie anti-angiogénique. L'inhibition spécifique de l'interaction THBS1/CD47 à l'aide d'un peptide antagoniste diminue l'invasion cellulaire, ce qui est confirmé par des expériences de réduction de l'expression de CD47. Le séquençage de l'ARN provenant de tissus xéno greffés dérivés de patients, obtenus par capture laser, microdissection des zones périphériques et centrales des tumeurs, révèle que THBS1 est l'un des gènes présentant la connectivité la plus élevée aux marges tumorales. Dans l'ensemble, ces données indiquent que TGF β 1 induit l'expression de THBS1 via Smad, ce qui contribue au comportement invasif lors de l'expansion du GB. De plus, la protéine CD47 exprimée à la surface des cellules tumorales est impliquée dans ce processus.

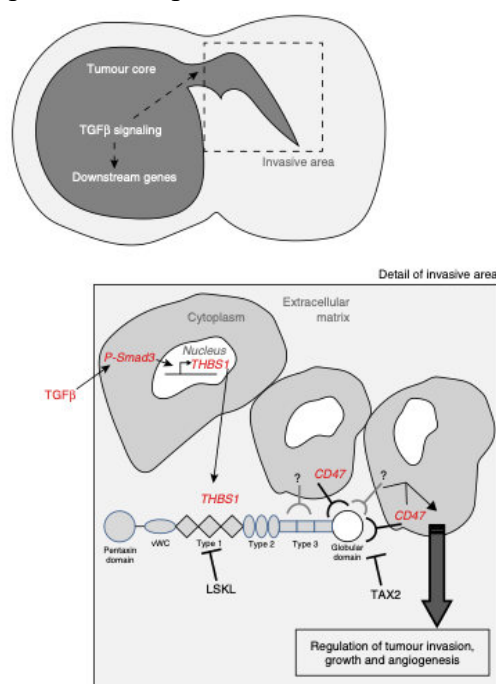


Fig 20 : Résumé graphique du rôle de TSP1 dans le glioblastome

Résumé de l'article 3

Bikfalvi A, Guyon J, Daubon T. New insights into the role of thrombospondin-1 in glioblastoma development. *Semin Cell Dev Biol.* 2024 Mar 1;155(Pt B):52-57. **L'Article complet est inclus en Annexe.**

Le glioblastome (GB), sous-type le plus malin des gliomes diffus, est extrêmement agressif, invasif et vascularisé. Sa survie médiane reste courte, même avec les soins standards maximaux. Il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles molécules et mécanismes impliqués dans les interactions entre les cellules de GB et le micro-environnement tumoral (TME) afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques. La thrombospondine-1 (TSP1) est une protéine matricielle aux multiples facettes qui joue un rôle essentiel dans le développement, la physiologie et diverses pathologies, dont le cancer. Des travaux récents ont mis en évidence l'importance de TSP1 dans le développement du GB, ce qui sera résumé et discuté ici. Nous aborderons

principalement les études issues de la recherche préclinique, susceptibles d'approfondir la compréhension du rôle de TSP1 dans le développement du GB. Nous évoquerons également certaines questions relatives à la transposition de ces connaissances en pratique clinique.

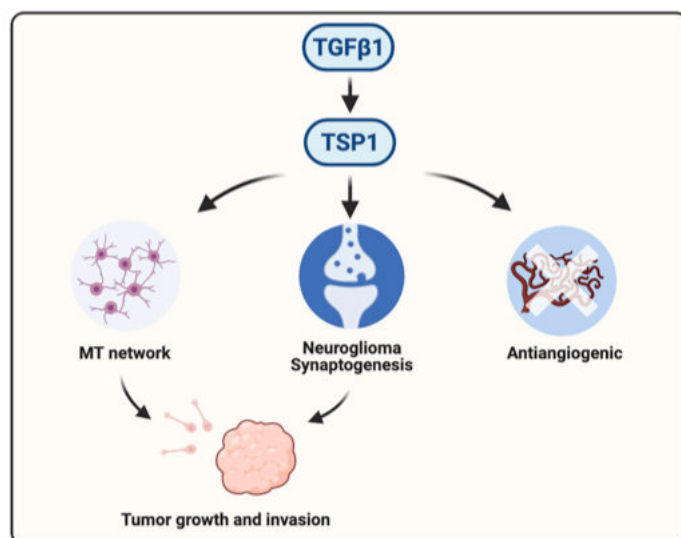


Fig 21 : Résumé graphique. Permission de reproduire : « Copyright Clearance Center ».

6.2.2.3.2 Analyse causale relative à l'article 2&3

Nous avons tenté sur la base de ces travaux d'établir un graphique acyclique des relations causales qui place TSP1 au centre d'un réseau d'interactions dont l'impact final est la régulation de la masse tumorale et la survie des patients. Dans ce graphique, deux variables convergent vers TSP1, TGFβ1 et l'hypoxie. La réalité de ces interactions était mesurée sur un plan expérimental. TSP1 ensuite agit sur la matrice en tant que protéine matri-cellulaire et sur l'interaction neurone – gliome en renforçant la synapse neurogliale. Ces interactions ont été décrites dans plusieurs publications (pour références voir ²¹⁹). Par ailleurs, l'interaction entre TSP1 et CD47 qui médie l'invasion des cellules tumorales est prouvée sur un plan expérimental par notre travail. L'interaction CD36 est connue dans la littérature et joue un rôle plutôt au niveau du système vasculaire. L'interaction avec les facteurs de croissance de type VEGF ou FGF a été montrée également dans des études indépendantes. La tolérance immunitaire induite par le TGFβ est également établie et a été le sujet de diverses publications. Nous avons donc un mix entre données apportées par notre travail et données provenant de la littérature. Par ailleurs, il y a un autre aspect qui concerne l'intrication de deux différents niveaux dans ce graphique : le niveau moléculaire et le niveau phénotypique. Cependant ces deux niveaux doivent être présents pour établir ce type de schéma causal.

²¹⁹ Bikfalvi A, Guyon J, Daubon T. New insights into the role of thrombospondin-1 in glioblastoma development. *Semin Cell Dev Biol.* 2024 Mar 1;155(Pt B):52-57. doi: 10.1016/j.semcdb.2023.09.001. Epub 2023 Sep 9. PMID: 37690904.

Pour compléter l'analyse, nous devons attribuer des « *path coefficients* » aux interactions entre les différentes variables. Ceci peut être fait en imaginant différents scénarios ou « Mondes » comme auparavant et/ou dériver les « *path coefficients* » d'une analyse de régression à partir de données expérimentales. Nous allons donc établir des DAGs et également des SEM.

(1) Structure du DAG

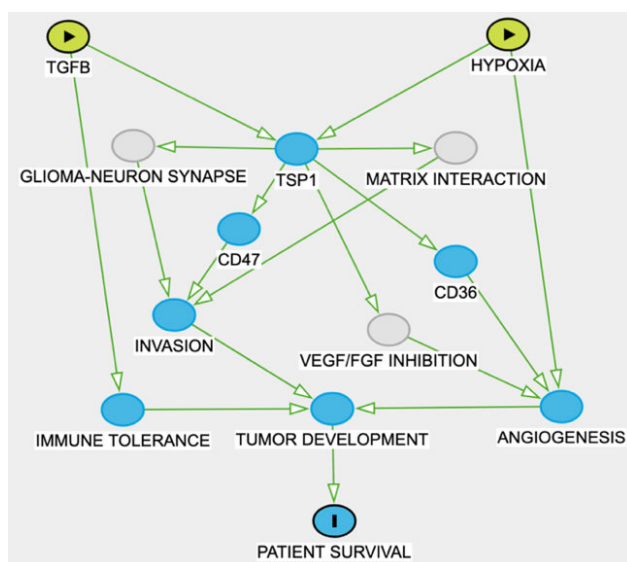


Fig. 22 : DAG concernant l'effet de la TSP1 sur le développement des gliomes IDH wt. TSP1 est le nœud central de ce DAG avec une fonction collider par TGFβ1 et l'hypoxie (« exposure(s) HYPOXIA, TGFβ1, outcome(s) PATIENT SURVIVAL, covariates10, causal paths 12 »).

Absence de voies biaisées ouvertes (« no open biasing paths »). Il n'est pas nécessaire d'ajuster pour estimer l'effet global de l'hypoxie et du TGFβ1 sur la survie des patients. Les codes du graphique sont indiqués en Annexe.

Pour reformuler le DAG en SEM, nous avons deux possibilités :

On peut faire agir l'hypoxie seulement à travers une régulation VEGF/FGF **ou** par un effet double incluant VEGF/FGF et directement sur l'angiogenèse à travers une action directe sur l'endothélium vasculaire.

Activation de CD47 par TSP1 : $CD47 = \alpha_4 \times \beta_4 \times TSP1 + \varepsilon_4$

Activation de la matrice par TSP1 : $Matrice = \alpha_5 \times \beta_5 \times TSP1 + \varepsilon_5$

Activation de CD36 par TSP1 : $CD36 = \alpha_6 \times \beta_6 \times TSP1 + \varepsilon_6$

Régulation de VEGF/FGF par TSP1 (inhibition) et hypoxie : $VEGF/FGF = -\alpha_7 \times \beta_7 \times TSP1 + \alpha_8 \times \beta_8 \times Hypoxie + \varepsilon_7$

Invasion : $Invasion = \alpha_{10} \times \beta_{10} \times Synapses + \alpha_{11} \times \beta_{11} \times CD47 + \alpha_{12} \times \beta_{12} \times Matrice + \varepsilon_8$

Angiogenèse : $Angiogenèse = \alpha_{13} \times \beta_{13} \times CD36 + \alpha_{14} \times \beta_{14} \times VEGF/FGF + \varepsilon_9$

Ou

$Angiogenèse^* = \alpha_{13} \times \beta_{13} \times CD36 + \alpha_{14} \times \beta_{14} \times VEGF/FGF + \alpha_{15} \times \beta_{15} \times Hypoxie + \varepsilon_9$

Tolérance immunitaire : $Tolérance = \alpha_{15} \times \beta_{15} \times TGF\beta + \varepsilon_{10}$

Développement tumoral : $Développement = \alpha_{16} \times \beta_{16} \times Angiogenèse + \alpha_{17} \times \beta_{17} \times Tolérance + \alpha_{18} \times \beta_{18} \times Invasion + \varepsilon_{11}$

Angiogenèse* : cette équation contient aussi l'effet direct de l'hypoxie sur l'angiogenèse.

Dans cette formulation, nous avons individualisé le poids empirique (α) de chaque variable, qui est multipliée avec la valeur (β) du coefficient de voie. Les termes ϵ_i représentent les erreurs aléatoires ou les variations non expliquées.

(2) Construction de différents scénarios (« Mondes »)

Divers scénarios (« Mondes ») peuvent être envisagés et déterminés par « les *path coefficients* » d'une manière différentielle. Dans un cas l'activation de TGF- β est prépondérante, dans un autre cas l'hypoxie. Si la voie de TGF- β est prépondérante, les effets hors activation de la TSP1 s'y rajoutent et notamment les effets sur le système immunitaire. Dans le cas où l'hypoxie est prépondérante, l'hypoxie agit aussi sur d'autres cibles incluant VEGF, des GLUT et d'autres effecteurs cellulaires. Ceci peut perturber les conditions de « *background* » et modifier l'orientation de l'effet causal et est dépendante de la stabilité causale. Si la stabilité causale est faible, cela peut impacter sur le réseau causal et l'effet résultant des différentes interactions du graphique acyclique. Une autre condition est l'interaction avec les composantes du système nerveux. Il n'est pas établi si TSP1 renforce seulement la synapse neurogliale, mais peut aussi agir sur les synapses tripartites entre astrocytes-neurones. Ceci pourrait aussi impacter le « *background* » et modifier l'interaction causale. Il y a donc le problème de l'interaction TGF β - > TSP1-> CD47. L'invasion doit être dominante sur toutes les autres régulations du micro-environnement qui auront lieu en même temps.

● Conditions de dominance

On peut introduire la condition de dominance dans ce schéma. Cette condition de dominance signifie que le poids de ces variables doit être supérieur à d'autres et/ou les « *path coefficients* » de ces variables doivent avoir une probabilité plus élevée par rapport aux autres variables qui se déroulent en même temps. D'autre part, les effets « *down-stream* » s'exercent soit sur l'invasion, soit sur l'angiogenèse. L'effet sur l'invasion est potentialisateur, l'effet sur l'angiogenèse inhibiteur.

L'introduction d'une condition de dominance peut se formaliser en imposant que les coefficients associés à l'axe d'invasion soient supérieurs à ceux des autres voies dans le système d'équations, i.e. $\beta_{10}, \beta_{11}, \beta_{12} > \beta_{13}, \beta_{14}$, etc. Ceci peut être pondéré par les valeurs α de chaque variable.

L'analyse de la dominance des voies doit tenir compte de l'effet de TSP1 et de l'hypoxie. L'effet stimulateur de VEGF/FGF par TSP1 devient négatif : $\text{VEGF/FGF} = \beta_7 \times \text{TSP1}$ (avec $\beta_7 < 0$) +

$\beta_8 \times \text{Hypoxie} + \varepsilon_7$. Cela implique que l'augmentation de TSP1 diminue l'activité de VEGF/FGF, ce qui peut réduire l'angiogenèse.

Les relations de dominance probabiliste sont donc : la contribution de VEGF/FGF à l'angiogenèse diminue lorsque TSP1 est élevé, renforçant l'importance relative des voies associées à l'invasion.

En termes probabilistes, la dominance s'écrit :

$$P(\beta_{10} > \beta_{13}, \beta_{14}(\text{TSP1}) \mid \text{Données}) > \theta,$$

où β_{14} diminue avec l'augmentation de TSP1 (écrit $\beta_{14}(\text{TSP1})$). La probabilité conditionnelle de dominance de l'invasion s'en trouve augmentée dans des contextes de forte expression de TSP1 :

$$P(\text{Invasion dominante} \mid \text{TSP1, Angiogenèse, Immunité, Contexte})$$

La modulation contextuelle intègre l'effet inhibiteur :

$$P(\text{TSP1} \rightarrow \text{CD47, VEGF/FGF} \downarrow \mid \text{Hypoxie})$$

Ainsi, la dominance de l'invasion s'exprime par :

- $\beta_{10} > \beta_{13}$ et $\beta_{10} > \beta_{14}$ (mais β_{14} est atténué si TSP1 est élevé)
- $\beta_{11} > \beta_{13}$ et $\beta_{11} > \beta_{14}$
- $\beta_{12} > \beta_{13}$ et $\beta_{12} > \beta_{14}$

Pour simplifier notre analyse, nous n'avons pas inclus la valeur de pondération α de chaque variable. La pondération α pourrait certainement moduler les relations de domination.

• L'effet sur l'angiogenèse

Pour détailler l'effet de TSP1, l'hypoxie ou TGF- β sur l'angiogenèse, en assumant un effet binaire (0,1), nous obtenons ceci :

- $P(\text{VEGF}=1 \mid \text{TSP1}=1, \dots) = \alpha_1 < P(\text{VEGF}=1 \mid \text{TSP1}=0, \dots) = \alpha_0$
- $P(\text{FGF}=1 \mid \text{TSP1}=1, \dots) = \beta_1 < P(\text{FGF}=1 \mid \text{TSP1}=0, \dots) = \beta_0$
- L'hypoxie augmente la probabilité d'activation de VEGF et FGF :
- $P(\text{VEGF}=1 \mid \text{Hypoxie}=1) = \gamma_1 > P(\text{VEGF}=1 \mid \text{Hypoxie}=0) = \gamma_0$
- $P(\text{FGF}=1 \mid \text{Hypoxie}=1) = \delta_1 > P(\text{FGF}=1 \mid \text{Hypoxie}=0) = \delta_0$
- $P(\text{VEGF}=1 \mid \text{TGF-}\beta=1, \dots) = \varepsilon_1 < P(\text{VEGF}=1 \mid \text{TGF-}\beta=0, \dots) = \varepsilon_0$
- $P(\text{FGF}=1 \mid \text{TGF-}\beta=1, \dots) = \phi_1 < P(\text{FGF}=1 \mid \text{TGF-}\beta=0, \dots) = \phi_0$

Au total :

$$\sum \text{VEGF, FGF } P(\text{Angiogenèse}=1 \mid \text{VEGF, FGF, TSP1, Hypoxie, TGF-}\beta, \text{Contexte}) \times P(\text{VEGF} \mid \text{TSP1, Hypoxie, TGF-}\beta, \text{Contexte}) \times P(\text{FGF} \mid \text{TSP1, Hypoxie, TGF-}\beta, \text{Contexte})$$

(3) Formalisation probabiliste mettant en relation TGF- β , hypoxie, CD47, CD36 et leurs effets sur le développement des gliomes

Dans cette formalisation, nous tenons compte de la dominance, des influences et des conditions modulatrices. Les variables incluses sont dans cas :

- TGF : activation du TGF- β
- HYP : activation de l'hypoxie
- CD47 : expression ou activation de CD47
- CD36 : expression ou activation de CD36
- TSP1 : activité de la thrombospondine-1
- INV : invasion tumorale
- ANG : angiogenèse
- DEV : développement tumoral

Les relations causales principales entre les variables sont modélisées par des probabilités conditionnelles. Chaque variable peut agir comme modulateur ou médiateur selon le cas.

TGF- β dominant

$P(\text{DEV} \mid \text{TGF}, \text{HYP}, \text{CD47}, \text{CD36}, \dots) \approx P(\text{DEV} \mid \text{TGF}, \text{CD47}, \text{CD36}, \dots)$

avec $P(\text{TGF} > \text{HYP}) \gg 0.5$

Effets : $P(\text{DEV} \mid \text{TGF}\uparrow) > P(\text{DEV} \mid \text{HYP}\uparrow)$

Conditions modulatrices : immunité, micro-environnement

: $P(\text{DEV} \mid \text{TGF}, \text{IMM}, \text{MICROENV})$

Hypoxie dominante

$P(\text{DEV} \mid \text{HYP}, \text{TGF}, \text{CD47}, \text{CD36}, \dots) \approx P(\text{DEV} \mid \text{HYP}, \text{CD47}, \text{CD36}, \dots)$

avec $P(\text{HYP} > \text{TGF}) \gg 0.5$

Effets : $P(\text{DEV} \mid \text{HYP}\uparrow) > P(\text{DEV} \mid \text{TGF}\uparrow)$

Conditions modulatrices :

Activation de VEGF, GLUT, cibles cellulaires : $P(\text{DEV} \mid \text{HYP}, \text{VEGF}, \text{GLUT}, \text{CC})$

TGF- β et Hypoxie équivalents

Influence égale : interaction sur invasion et angiogenèse

$P(\text{DEV} \mid \text{TGF}, \text{HYP}, \dots)$ avec $P(\text{TGF} = \text{HYP}) \approx 0.5$

Effets : $P(\text{INV}, \text{ANG} \mid \text{TGF}, \text{HYP})$

Conditions modulatrices : $P(\text{DEV} \mid \text{TGF}, \text{HYP}, \text{DAG\_interactions})$

Dominance CD47 sur CD36

CD47 plus influent sur l'invasion

$P(\text{INV} \mid \text{CD47}, \text{CD36}, \dots)$ avec $P(\text{CD47} > \text{CD36}) \gg 0.5$

Effets : $P(\text{INV} \mid \text{CD47}\uparrow) > P(\text{INV} \mid \text{CD36}\uparrow)$

Conséquence : $P(\text{DEV} \mid \text{INV}\uparrow)\uparrow$

Dominance CD36 sur CD47

CD36 plus influent sur l'angiogenèse

$P(\text{ANG} \mid \text{CD36}, \text{CD47}, \dots)$ avec $P(\text{CD36} > \text{CD47}) \gg 0.5$

Effets : $P(\text{ANG} \mid \text{CD36}\uparrow) < P(\text{ANG} \mid \text{CD47}\uparrow)$

Conséquence : $P(\text{DEV} \mid \text{ANG}\downarrow)\downarrow$

On peut résumer cette section dans le tableau suivant :

Scénario	Condition principale	Effets secondaires	Dominance	Conséquence
Activation TGF- β prépondérante	TGF- β dominant dans le réseau causal	Effets immunitaires, régulation microenvironnementale	TGF- β > Hypoxie	Modulation du développement tumoral via TSP1 et CD47
Activation Hypoxie prépondérante	Hypoxie dominante dans le réseau causal	Activation de VEGF, GLUT, autres cibles cellulaires	Hypoxie > TGF- β	Modification de l'orientation de l'effet causal
TGF- β et Hypoxie équivalents	Influence égale dans le réseau causal	Interaction sur invasion et angiogenèse	TGF- β = Hypoxie	Stabilité causale variable, dépendance aux interactions du DAG
Dominance CD47 sur CD36	CD47 plus influent que CD36	Effet potentialisateur sur invasion	CD47 > CD36	Renforcement de l'invasion tumorale
Dominance CD36 sur CD47	CD36 plus influent que CD47	Effet inhibiteur sur angiogenèse	CD36 > CD47	Réduction de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins

Tableau 5 : Interactions causales du réseau « TSP1 » des gliomes IDH WT

(4) Analyse conceptuelle générale du rôle de TSP1

Nous avons identifié différents scénarios résultants de valeurs différentes des coefficients de voie pouvant être pondérés si nécessaire. On peut simplifier ce schéma en décrivant les différentes conditions et contraintes qui s'exercent sur les relations causales :

Contrainte 1 : TGF β a des effets alternatifs inhibiteurs ou activateurs qui potentialisent ou diminuent l'effet causal

Contrainte 2 : L'hypoxie a des effets alternatifs inhibiteurs ou activateurs qui potentialisent ou diminuent l'effet causal

Contrainte 3 : Les covariables (variables secondaires) du schéma causal ne dominent pas, elles-mêmes, l'effet sur le développement tumoral. Et ceci d'une manière indépendante de TSP1.

Ces covariables secondaires sont : Immune tolérance, angiogenèse, matrice extracellulaire.

Ce schéma peut avoir une portée plus générale en remplaçant les variables qualitatives (TSP1, TGF- β etc.) par des variables indéterminées (A, B, C, D, ... etc.) (Figure 23).

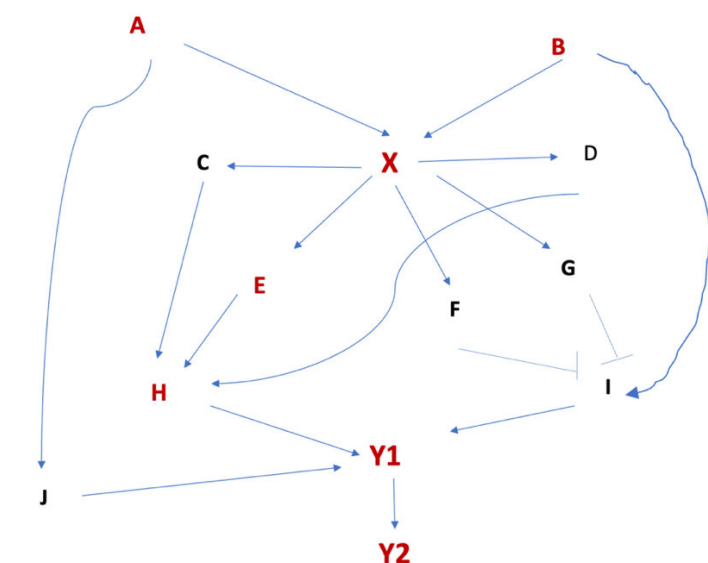


Fig. 23 : Structure abstraite du DAG en absence de variables réelles

Si on regarde cette figure et on simplifie encore les relations, nous avons un « collider » qui est représenté comme suit : $A \rightarrow X \leftarrow B$ avec $X \rightarrow Y_1/Y_2$. Ce « collider » dans notre cas est représenté par $TGF\beta 1 \rightarrow TSP1 \leftarrow \text{Hypoxie}$ avec $TSP1 \rightarrow \text{Survie}$. Nous avons testé cela en analysant une cohorte de patients de glioblastome. À cette fin, nous avons effectué une analyse de régression et utilisé la cohorte GLASS, qui comporte des GB IDHWT et IDH mutés (<https://glass-consortium.org/>). Quand nous analysons seulement 138 patients de GB IDHWT en excluant les GB IDH mutés, nous obtenons les résultats suivants :

Quand nous contrôlons pour $TGF\beta$ seulement la significativité est de $p = 0.07$. Mais quand nous contrôlons pour le $TGF\beta$ et l'hypoxie ($HIF1\alpha$) nous obtenons une significativité avec une valeur p de 0,03. Ceci signifie que quand nous fermons les deux portes « arrières » (« *backdoors* ») du « collider » la significativité est importante avec un risque de faux positif de 3 %. Cette analyse causale renforce la valeur des données obtenues *in vitro* et dans des modèles précliniques (voir codes en Annexe pour détails).

Un autre aspect est que cette représentation est statique et non dynamique. Il peut y avoir une évolution temporelle de ces interactions et donc introduire des fluctuations et une dynamique temporelle. Cela peut se dérouler de différentes manières.

(i) Premier cas de figure : Dans un premier temps, les covariables dominent les interactions dans le TME, mais ceci se stabilisera ensuite et diminuera. L'interaction causale majeure impliquant TSP1 sort ensuite du bruit de fond et devient dominante.

(ii) Deuxième cas de figure : Dans un premier temps, l'interaction causale impliquant TSP1 domine, mais ensuite elle s'estompe et l'effet des variables additionnelles rentre en jeu.

(iii) Troisième cas de figure qui représente un mélange des deux situations : Initialement, les co-variables dominant, puis la voie de TSP1 apparaît et devient dominante, ensuite les covariables deviennent dominantes de nouveau et la valeur des interactions de TSP1 diminue. L'effet des co-variables peut être agoniste ou antagoniste. Ceci peut être vu soit par rapport à l'invasion tumorale, soit par rapport à l'expansion tumorale.

- Modulation (Renforcement/inhibition) de l'invasion tumorale : Dans ce cas, l'augmentation de la vascularisation par l'angiogenèse si précédée de l'invasion, peut contribuer à la mise à disposition de support vasculaire additionnel pour permettre l'augmentation de l'invasion. Cependant, si l'invasion et l'angiogenèse sont concomitantes, cela ne permettra pas le renforcement de l'invasion tumorale et pourrait avoir un effet inhibiteur. Les autres variables sont représentées par des effets directs des neurones et de la matrice. Les neurones établissent des synapses avec les cellules tumorales périphériques qui tendent à envahir le tissu cérébral environnant et stimulent donc l'invasion. La rigidité de la matrice peut contribuer au mode d'invasion des cellules tumorales : invasion en cellule unique (rigidité faible) ou invasion collective (rigidité forte).

- Modulation (Renforcement/inhibition) de l'expansion tumorale : L'expansion tumorale sera renforcée si l'angiogenèse a lieu après l'invasion, car elle contribue à la compaction de la tumeur. L'expansion de la masse tumorale ne sera pas renforcée si l'angiogenèse reste faible. L'effet de l'input électrique pourrait jouer au niveau de l'expansion en raison de l'activité de « pace maker » d'une cellule tumorale qui entraîne l'établissement de circuits calciques intratumoraux. La matrice peut contribuer à la compaction de la tumeur par formation d'un tissu de support pour l'expansion. L'expansion peut être cependant inhibée par l'augmentation de la rigidité de la matrice qui forme une coque limitant l'expansion globale (effet paradoxal).

Comment les résultats *in vivo* obtenus sur des modèles de rongeurs peuvent-ils être interprétés dans ce cadre ? L'effet *in vivo* est significatif, mais il ne semble pas être stable et durer dans le temps. Ceci pourrait être interprété comme suit. L'effet invasif est transitoire et suivi rapidement par une compaction probablement à des cycles répétés. L'angiogenèse joue très certainement un rôle important et s'explique par un rôle ambivalent de l'hypoxie en raison de l'effet de stimulation par l'induction de facteurs angiogéniques et des régulateurs du métabolisme. Il y a donc une antinomie entre l'invasion qui contribue à la diffusion des cellules tumorales, et l'angiogenèse qui contribue à la compaction de la masse tumorale. Un deuxième élément est l'augmentation de la masse des cellules tumorales grâce à la prolifération cellulaire ou à une

inhibition de la mort cellulaire. Dans ce contexte, le rapport prolifération/mort cellulaire doit être > 1 . Ce qui peut seulement inhiber la mort des cellules tumorales.

Une leçon pour la thérapie des GB est que le blocage de l'invasion seule est insuffisant pour apporter un bénéfice thérapeutique. Mais agir seulement sur la compaction est également insuffisant. Il y a donc une double attaque à mener qui doit être néanmoins calibrée par des interventions séquentielles d'action sur l'invasion et la compaction (Figure 25).

L'invasion et donc la diffusion des cellules tumorales est promue par des facteurs intrinsèques (modulation d'expression ou l'activité des récepteurs membranaires et les voies de signalisation, activité électrique et flux calciques avec établissement de circuits entre cellules tumorales, etc.) et extrinsèques (modulation de l'interaction avec la matrice extracellulaire, facteurs diffusibles ou matri-cellulaires comme TSP1, action neuronales et formation de synapses neurogliales, etc.). La compaction est aussi promue par des facteurs intrinsèques (prolifération et ratio prolifération et survie) et extrinsèques (angiogenèse). Dans l'histoire naturelle du développement tumoral, ceci se déroule en cycles répétés à des fréquences variables. Il est très probable qu'au stade initial du développement tumoral, la fréquence soit très élevée et va diminuer pendant la croissance de la tumeur pour s'estomper progressivement laissant la place à la compaction au stade final de la maladie (Figure 25).

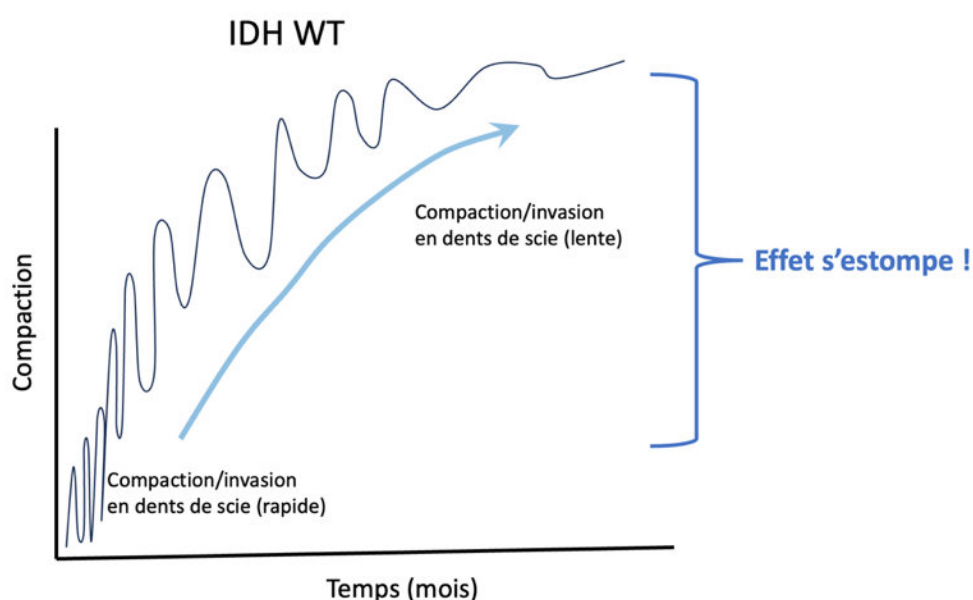


Fig. 24 : L'évolution de la compaction en fonction du temps.

6.2.2.3.3 Contribution du cadre conceptuel de la causalité aux articles 2 et 3

Le cadre conceptuel de la causalité joue un rôle central dans l'analyse et l'interprétation des résultats présentés dans les articles 2 et 3 concernant la thrombospondine-1 (TSP1) dans les gliomes IDHWT. Il permet de dépasser une simple description des observations pour structurer, modéliser et hiérarchiser les interactions complexes entre facteurs moléculaires, cellulaires et environnementaux impliqués dans le développement tumoral.

Premièrement, la modélisation par graphique acyclique dirigé (DAG) a permis de positionner TSP1 au cœur du réseau d'interactions, où elle reçoit des signaux convergents de TGF β et de l'hypoxie. Cette approche graphique explicite les relations causales et met en évidence les voies dominantes qui orientent l'invasion tumorale, l'angiogenèse et la survie des patients. Elle facilite ainsi l'identification des facteurs clés et l'évaluation de leurs effets directs ou indirects sur le développement du gliome.

Deuxièmement, l'utilisation des équations structurelles (SEM) formalise quantitativement l'impact de chaque variable du modèle, à travers l'attribution de « *path coefficients* » qui traduit la force des relations causales. Différents scénarios (« Mondes ») sont simulés pour explorer comment la dominance de TGF β ou de l'hypoxie module la stabilité et l'orientation des effets causaux dans le réseau, en tenant compte des interactions contextuelles et des modulateurs secondaires comme l'immunité ou la matrice extracellulaire.

Troisièmement, le concept INUS (*Insufficient but Necessary part of an Unnecessary but Sufficient condition*) est mobilisé pour montrer que TSP1, bien qu'essentielle dans certains modules causaux (par exemple, l'invasion), n'est pas suffisante isolément : seule la combinaison de plusieurs facteurs aboutit à un effet suffisant. Cela permet de distinguer les déterminants majeurs de l'invasion et de l'angiogenèse des variables d'accompagnement, et d'anticiper la variabilité des réponses selon le contexte tumoral.

Enfin, l'approche causale offre des outils pour tester et comparer l'effet des interventions thérapeutiques ou expérimentales, en évaluant la dominance ou l'équivalence des variables et en identifiant les leviers les plus prometteurs pour moduler l'évolution tumorale. Elle met également en évidence les limites et la portée des modèles, qui dépendent des hypothèses structurelles du DAG, de la validité des données expérimentales et de la stabilité des relations causales dans le temps.

En résumé, le cadre conceptuel de la causalité appliqué à l'étude du rôle de TSP1 dans les gliomes IDH WT permet :

- D'intégrer et de structurer les connaissances issues de la littérature et des données expérimentales ;
- D'identifier et de quantifier les voies causales dominantes et les conditions de leur prépondérance ;
- De distinguer les effets directs et indirects, ainsi que les modulateurs contextuels ;
- D'offrir une base rationnelle pour la conception et l'évaluation de stratégies thérapeutiques ciblées ;
- Et de mieux comprendre la dynamique évolutive et la complexité du micro-environnement tumoral.

Concept	Description	Implications
Dominance d'une variable (ex : TGF- β ou hypoxie)	La variable dominante influence plus fortement le développement tumoral que les autres.	Détermine la probabilité conditionnelle du développement tumoral selon la variable dominante.
Équivalence entre variables	Interactions fortes entre variables, dépendance élevée.	Peut entraîner une instabilité ou une variabilité de l'effet causal global.
Effets secondaires (immunité, angiogenèse, etc.)	Modulateurs intégrés dans les probabilités conditionnelles.	Potentialisent ou diminuent l'effet causal principal.
Dépendances structurelles du DAG (ex : effet collider)	Relations structurelles dans le graphique causal.	Nécessité de contrôle pour éviter les biais d'interprétation, comme démontré par l'analyse de régression contextuelle.
Conclusion : portée et limites	Formalisation probabiliste des relations causales entre TGF- β , hypoxie, CD47, CD36 et leurs effets.	L'importance des dominances, équivalences, interactions et modulateurs secondaires est mise en évidence, mais la validité dépend du modèle causal (DAG) et des hypothèses expérimentales.

Tableau 6 : Représentation plus générale et impact.

6.2.3 Les Gliomes IDH mutés

6.2.3.1 Article 4 : Gliomes IDH mutés et micro-environnement tumoral (TME)

Les gliomes diffus de l'adulte sont les tumeurs cérébrales primaires les plus courantes. Bien que le taux d'incidence des cancers nouvellement diagnostiqués soit inférieur à 1 %, les gliomes sont associés à une fréquence de récurrence élevée et à un faible taux de survie²²⁰. Selon la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) de 2021, les gliomes diffus de l'adulte sont divisés en deux catégories en fonction du statut du gène de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) : les gliomes IDH de type sauvage et les gliomes IDH mutants²²¹. Les gliomes IDH de type sauvage, y compris les glioblastomes, présentent un comportement biologique agressif et un mauvais pronostic. En revanche, les gliomes IDH mutants, y compris l'astrocytome (IDH muté) et l'oligodendrogliome (IDH muté et codéleté 1p/19q), présentent un comportement biologique moins agressif et leur pronostic est moins influencé par le grade de la tumeur. Les gliomes mutants de l'isocitrate déshydrogénase apparaissent généralement dans une population plus jeune, et sont généralement associés à des crises d'épilepsie, qui altèrent la capacité des patients à maintenir une vie sociale et professionnelle²²². De nombreuses avancées thérapeutiques ont été réalisées en utilisant une résection chirurgicale maximale et une chimiothérapie/radiothérapie initiale pour retarder l'apparition de la récurrence. L'intégration du profilage moléculaire dans le diagnostic histologique a constitué une amélioration majeure dans la classification des tumeurs (classification OMS de 2016). Cependant, les gliomes mutants de l'IDH évoluent invariablement vers un phénotype plus malin, avec diverses récurrences survenant parmi les patients. L'hétérogénéité interindividuelle dans la progression de la maladie complique la prédiction d'une récurrence précoce²²³. Les gliomes diffus IDH mutés concernent des tumeurs dont l'isoenzyme Isocitrate deshydrogenase-1 et/ 2 est muté. IDH1 est plutôt cytosolique tandis que IDH-2 est mitochondrial. Au lieu de produire le α -cétooglutarate le produit qui résulte de l'action de IDH-sauvage, la forme mutée produit le 2hydroxyglutamate (2HG)²²⁴. Le 2HG est un oncométabolite

²²⁰ Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, Wrensch MR. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nat Rev Neurol.*, 2019, 15 :405-417.

²²¹ Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro Oncol.*, 2021, 23 :1231-1251.

²²² Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, Wrensch MR. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nat Rev Neurol.*, 2019, 15 :405-417.

²²³ Hervey-Jumper SL, Zhang Y, Phillips JJ, et al. Interactive effects of molecular, therapeutic, and patient factors on outcome of diffuse low-grade glioma. *J Clin Oncol off J Am Soc Clin Oncol.*, 2023, 41:2029- 2042.

²²⁴ Schwartz, AV, Chao G, et al. Catalytically distinct metabolic enzyme isocitrate dehydrogenase 1 mutants tune phenotype severity in tumor models, *J.Biol. Chem.*, 2025, 301(5) : 108477.

qui a des actions au niveau de l'épigénome et au niveau du métabolisme. Le problème est que ces tumeurs, à un intervalle de temps plus ou moins long, peuvent progresser et devenir agressives. La survie globale est beaucoup plus longue que pour les tumeurs IDH WT de 5 à 10 ans, voir plus long. Il y a cependant des groupes des patients qui évoluent plus vite et donc il est important d'identifier les facteurs causaux de cette évolution rapide.

Dans le travail de recherche que nous avons effectué et qui est inclus dans cette thèse, nous voulions identifier des sous-groupes de patients souffrant d'un gliome diffus muté IDH1/2 dont l'évolution était plus rapide. Cette thèse examine si les caractéristiques des variables moléculaires et phénotypiques identifiées dans cet article représentent des facteurs causaux ou de simples corrélations. Cette distinction, discutée en détail, a pour but de clarifier la contribution de ce travail de recherche à la causalité.

Résumé de l'Article 4

Tiffanie Chouleur, Christèle Etchegaray, Laura Villain, Antoine Lesur, Thomas Ferté, Marco Ross, Laetitia Andrique, Costanza Simoncini, Anne-Sophie Giacobbi, Matteo Gambaretti, Egesta Lopci, Bethania Fernades, Gunnar Dittmar, Rolf Bjerkvig, Boris Hejblum, Rodolphe Thiébaut, Olivier Saut, Lorenzo Bello, Andreas Bikfalvi. Une stratégie d'intégration multimodale de données transcriptomiques, protéomiques et radiomiques pour la prédiction de la récurrence chez les patients atteints de gliomes IDH mutés. *Int J Cancer* 2025 2025 Aug 1;157(3):573-587. **Articles inclus en Annexes**

Les gliomes IDH mutés sont des cancers cérébraux mortels qui altèrent la qualité de vie des jeunes adultes. Bien qu'ils soient moins agressifs que les glioblastomes, les gliomes IDH mutés évoluent invariablement vers une maladie incurable, avec des récurrences imprévisibles. Une meilleure classification du risque de récurrence chez les patients est donc nécessaire. Ici, nous présentons une approche analytique multimodale intégrant des profils d'imagerie, de transcriptomique et de protéomique à l'aide de l'apprentissage automatique afin d'améliorer la stratification des patients grâce à de nouvelles signatures prédictives du risque de récurrence, basées sur l'expression génique, le niveau protéique et l'imagerie. De plus, nous décrivons les caractéristiques biologiques des sous-types de gliomes IDH mutés, catégorisés selon la tomographie par émission de positons (TEP) et l'histologie, et nous soulignons l'intérêt d'intégrer les métriques issues de la TEP dans la classification de ces tumeurs.

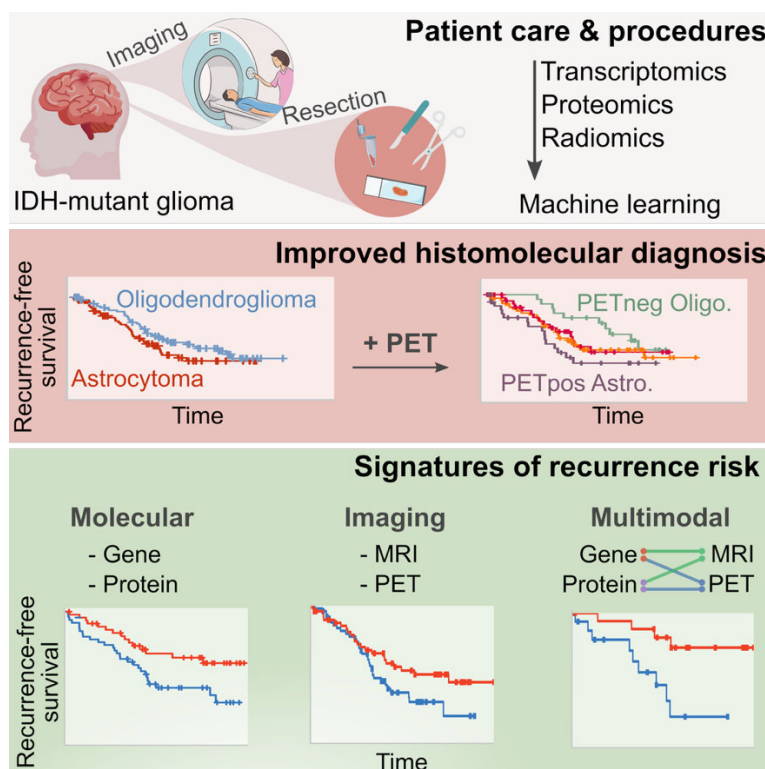


Fig. 25 : Résumé graphique. Permission de reproduire : Creative Commons.

6.2.3.2 Analyse causale

Nous allons faire d'abord une analyse très générale des interactions causales impliquées dans le développement des gliomes IDH mutés. Celle-ci sera suivie par une formalisation des interactions causales.

6.2.3.2.1 Généralités

La mutation IDH1/2 entraîne des modifications dramatiques dans l'histoire naturelle de la maladie et représente donc le facteur causal dominant, car sa présence se traduit, au niveau de l'évolution clinique, en une évolution plus lente et une survie des patients très augmentées. Sur le plan biologique, l'invasion est prépondérante au début de la maladie qui peut dominer pendant de longues années. L'angiogenèse semble être faible, voire nulle, et l'immunité adaptative est quasi inexistante (Figure 26). Comme mentionné plus haut, ce changement est dû à la production d'un oncométabolite, le 2-hydroxyglutarate qui a des cibles multiples (épigénétiques, chromatine, métabolisme mitochondrial, etc.). La présence de ce métabolite est la traduction actionnelle de la mutation IDH qu'on pourrait formaliser comme $Cg \rightarrow Ca$, Ca représentant en quelque sorte un avatar de Cg (Cg=causalité génétique, Ca=causalité actionnelle).

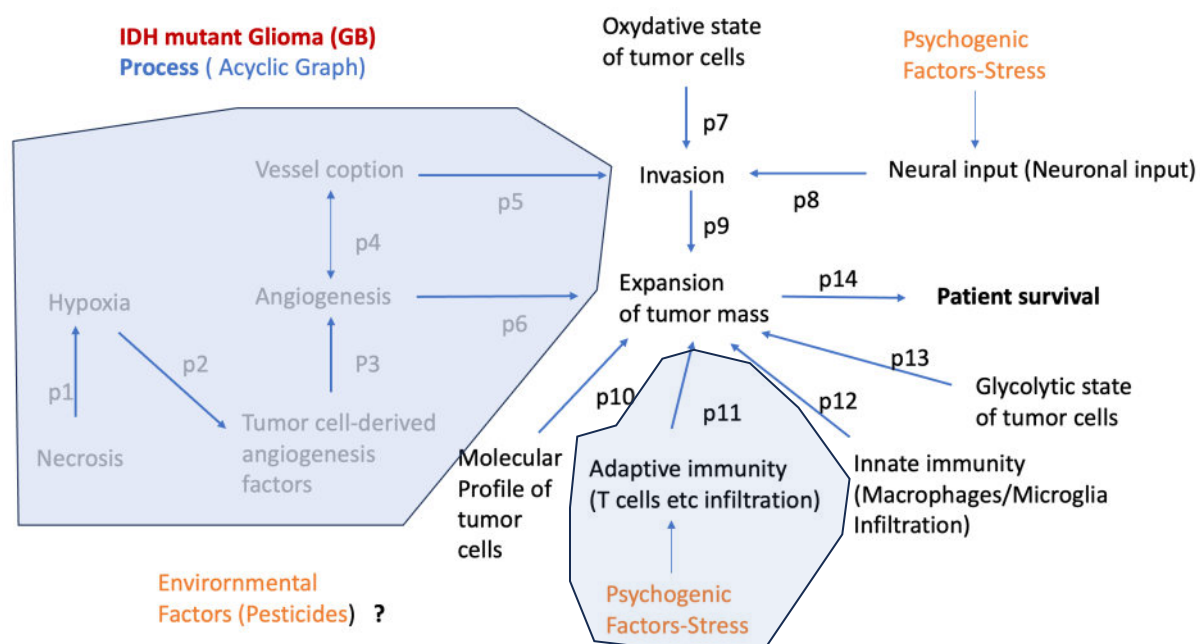


Fig. 26 : DAG du gliome IDH muté.

Nous avons donc ici une réduction, voir la simplification de notre graphique acyclique quand nous comparons les gliomes IDH WT aux gliomes IDH mutés avec une amputation de circuits de régulation et une répression/diminution d'action de variables. La partie « vasculaire » et « immunitaire adaptative » sont réprimées, voir amputées et la prolifération est très ralentie. Ceci perdure pendant une longue durée de l'histoire naturelle de la maladie. Cependant, ceci n'est pas stabilisé d'une manière définitive, car au stade tardif de la maladie (progression), la prolifération est réactivée ainsi que la vascularisation et la composante immunitaire. En d'autres termes, les coefficients de voie (« *path coefficients* ») sont donc près de 0 pour les variables « angiogénèse » et « immunité adaptative » et très diminuée pour la variable « prolifération » pendant une longue durée de la maladie. Ceci est cependant renversé au stade de progression de la maladie (Figure 27).

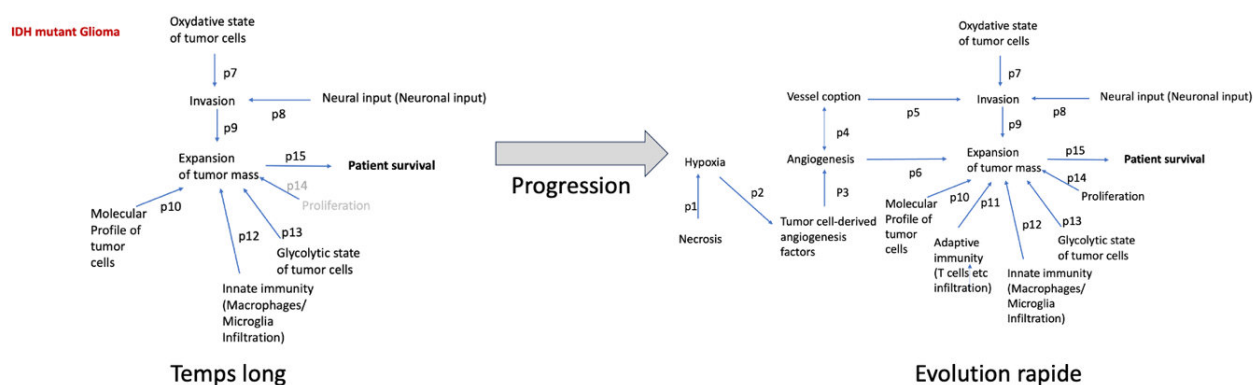


Fig. 27 : Transition du gliome IDH muté vers un état plus agressif (progression de la maladie).

En ce qui concerne l'article mentionné, l'analyse de la causalité devra prendre en compte les éléments suivants :

(1) Causalité et « PET metrics »

Le PET fait appel à l'incorporation d'un acide aminé, le méthionine – C14 dans le tissu tumoral. Ceci reflète l'activité métabolique de la tumeur. Nous avons des tumeurs PET négatif et PET positif. Théoriquement, l'évolution d'une tumeur PET + devrait être plus défavorable, car son activité métabolique est plus élevée. En d'autres termes, l'activité métabolique plus élevée est le facteur causal de l'évolution défavorable (progression) de la maladie et donc la mesure PET est une variable indirecte qui mesure cela. Cependant, ceci est seulement valable si on place la métrique PET dans un contexte spécifique (« background condition ») qui est représenté par le contexte tissulaire (astrocytome/oligodendrogliome). En fonction du contexte tissulaire, l'effet causal « activité métabolique » est modifié, reflété par l'effet sur la survie des patients : astrocytome PET + plus mauvais pronostic, Oligodendrogliome PET -, meilleur pronostic. Ceci indique donc que la variable causale « activité métabolique » a une stabilité toute relative, car dépendante d'une covariable qui représente un contexte additionnel permettant l'émergence de la relation causale.

(2) Causalité et signatures moléculaires des sous-groupes PET + et PET- / Astrocytomes -Oligodendrogliomes

Nous avons trouvé plusieurs voies différenciant les quatre groupes, notamment la signalisation BMP, la différenciation cellulaire, le cycle cellulaire et l'apoptose. De plus, 59 gènes différentiellement exprimés ont été trouvés entre l'astrocytome PETpos et l'oligodendrogliome PETneg et ont été impliqués dans des voies liées au cancer, à la signalisation Ras, à la signalisation MAPK, à la régulation du cytosquelette d'actine, à la pluripotence des cellules souches embryonnaires et à la croissance des fibroblastes de type 1. Ces voies ont révélé des fonctions biologiques distinctes cliniquement pertinentes de l'oligodendrogliome PETneg et de l'astrocytome PETpos. Nous discutons seulement ici les voies moléculaires des astrocytomes PET+ car liées à une accélération de l'évolution de la maladie et donc à une progression tumorale soutenue. Ces voies pourraient avoir un lien causal avec la progression tumorale. Ceci pourrait seulement être testé en utilisant une procédure interventionnelle. Cependant se pose ici le problème de causalité versus *explanandum/explanans*. En quelle mesure l'ablation de la voie des MAPK par exemple est-elle un *explanandum/explanans* pour le passage de la « lag-phase » à la progression ? Est-ce tout simplement écraser une mouche avec un marteau au lieu d'ouvrir la

fenêtre pour la laisser s'envoler ? Ceci ressemble à la situation suivante : la cause d'un feu dans une forêt peut être due à l'intention d'un pyromane de mettre le feu dans une forêt et à sa présence dans la forêt, mais si on utilise un raisonnement contrefactuel, si le pyromane n'était pas né, sa naissance serait aussi un élément causal pour le feu dans la forêt. On pourrait aussi parler de cause distale et proximale. En quelle mesure une cause distale peut-elle expliquer l'apparition du feu dans la forêt ? Revenons à notre problème de la progression des gliomes diffus mutés IDH. Quatre circuits moléculaires participent majoritairement à la progression : prolifération, inhibition de la migration, angiogenèse et matrice extracellulaire. La question est : existe-t-il une cause unique responsable pour tout cela ou est-ce qu'il y a plusieurs causes indépendantes ? Alternativement, il pourrait exister une causalité connectée qui réduira le nombre de variables indépendantes (Figure 28).

6.2.3.2.2 Scénarios et modélisation

Différents scénarios d'interaction causale existent. Théoriquement, un scénario (Figure 28A) à trois facteurs causaux indépendant est possible. Cependant, ceci est peu probable, car la progression tumorale doit être coordonnée et donc les voies moléculaires doivent être connectées. Une autre option est deux facteurs causaux indépendants et ceci peut avoir de multiples variantes (Figures 28 B, D, E et F). Par exemple, le facteur X_1 peut agir sur la prolifération et la migration, et X_2 sur l'angiogenèse. Une autre option est que X_1 agit par exemple sur la prolifération ce qui indirectement inhibe la migration, gardant l'effet de X_2 sur l'angiogenèse indépendante. X_1 et X_2 doivent aussi être liés d'une manière causale et donc connectés. Dans le troisième cas, un seul facteur causal est présent, et ceci semble être la situation la plus probable. Ceci peut être soit un effet sur les trois entités simultanées ou un effet sur deux entités qui impactent sur la troisième entité. En tout état de cause, l'effet sur l'angiogenèse doit être séparé de la prolifération et la migration, car ceci implique le recrutement d'un autre type cellulaire. La figure 29 illustre la variabilité des mécanismes observés.

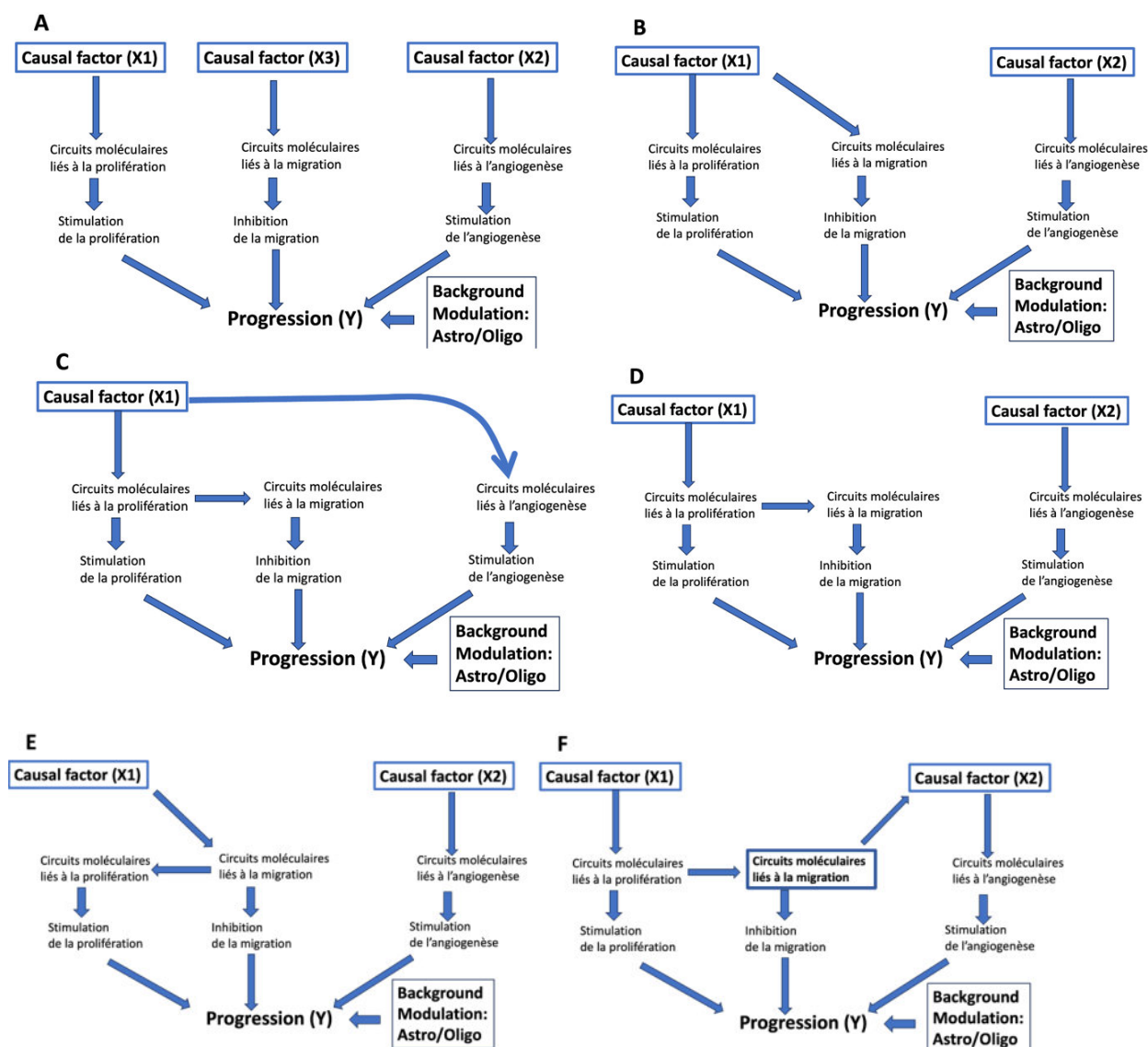


Fig. 28 : Possibilités causales concernant la progression des gliomes IDH mutés. Les différents scénarios sont plus ou moins probables (voir la discussion).

Nous pouvons utiliser des modèles probabilistes et SEM pour modéliser les scénarios A-F.

Variable latente	Variable observée	Relation
X ₁	P	$\beta_1 X_1$
X ₂	M	$\gamma_1 X_2$
X ₃	A	$\alpha_1 X_3$

Tableau 7: Variables et relations entre variables latentes et observées. Prolifération (P), migration/inhibition de migration (M), angiogenèse (A). Chaque facteur causal X agit uniquement sur une variable cible, sans médiation entre elles.

Scénario A : Trois facteurs causaux indépendants

- $X_1 \rightarrow P$
- $X_2 \rightarrow M$
- $X_3 \rightarrow A$

La progression tumorale (Y) dépend alors des trois variables indépendantes :

- $P(Y = \text{progression} \mid P, M, A) = f(P, M, A)$

Scénario B : Deux facteurs causaux indépendants

- $X_1 \rightarrow P$ et M
- $X_2 \rightarrow A$

SEM :

- $P = \beta_1 X_1 + \varepsilon_1$
- $M = \gamma_1 X_1 + \varepsilon_2$
- $A = \alpha_1 X_2 + \varepsilon_3$

La probabilité de progression tumorale :

- $P(Y | P, M, A) = f(P, M, A)$

Scénario C : Deux facteurs causaux connectés

- $X_1 \rightarrow P \rightarrow M$
- $X_2 \rightarrow A$

SEM (avec médiation) :

- $P = \beta_1 X_1 + \varepsilon_1$
- $M = \gamma_1 P + \varepsilon_2$
- $A = \alpha_1 X_2 + \varepsilon_3$

Ici, la migration passe par la prolifération.

Scénario D : Interdépendance partielle

- $X_1 \rightarrow P$ et M
- $X_2 \rightarrow A$
- $X_1 \leftrightarrow X_2$ (corrélation causale entre X_1 et X_2)

SEM :

- $P = \beta_1 X_1 + \varepsilon_1$
- $M = \gamma_1 X_1 + \varepsilon_2$
- $A = \alpha_1 X_2 + \alpha_2 X_1 + \varepsilon_3$

La variable A reçoit une contribution des deux facteurs.

Scénario E : Effet principal unique avec médiations

- $X_1 \rightarrow P \rightarrow M$
- $X_1 \rightarrow A$

SEM :

- $P = \beta_1 X_1 + \varepsilon_1$
- $M = \gamma_1 P + \varepsilon_2$
- $A = \alpha_1 X_1 + \varepsilon_3$

Un seul facteur coordonne les trois axes.

Scénario F : Effet unique coordonné

- $X_1 \rightarrow P$
- $X_1 \rightarrow M$
- $X_1 \rightarrow A$

SEM :

- $P = \beta_1 X_1 + \varepsilon_1$
- $M = \gamma_1 X_1 + \varepsilon_2$
- $A = \alpha_1 X_1 + \varepsilon_3$

Ce schéma traduit une coordination maximale via un seul facteur causal.

6.2.3.2.3 Modélisation des signatures moléculaires

Dans l'article 4, nous avons obtenu, par ailleurs, de signatures moléculaires de deux types : signature transcriptomique (KRT19, RUNX3, SCRT2) et signature protéomique (ATXN10, EIF4H, ITGAV, and NCAM1). Ces signatures font partie intégrante de divers circuits moléculaires des gliomes diffus hormis KRT19 qui est une kératine impliquée dans l'organisation de myofibres et associé à des cancers épithéliaux et au développement du système nerveux.

Pour les 3 gènes de la signature transcriptomique, la question de leur participation dans des réseaux moléculaires causaux se pose. Il y a des arguments indirects issus de la littérature. Pour KRT19, des arguments en faveur d'une action de reprogrammation des cellules souches cancéreuses épithéliales existent, car intégrés dans le circuit Wnt et Notch signalling²²⁵. RUNX3 est un suppresseur de tumeur dans les cellules épithéliales, mais aussi un inhibiteur du développement des gliomes via β -caténine/TCF-4²²⁶. Le « Scratch family transcriptional repressor 2 » (SCRT2) a une expression neuronale dans le cerveau et est surexprimé dans les gliomes. C'est un facteur de transcription qui régule négativement l'apoptose²²⁷. Leur implication et validité causale peut être testée par l'approche d'interférence woodwardienne. Cependant les mêmes interrogations, comme discutées plus haut, sont valables ici aussi (causation distale/proximale/ explanandum/explanans).

(1) Établissement du schéma causal

Pour modéliser l'implication des trois gènes de la signature transcriptomique (KRT19, RUNX3, SCRT2) dans des réseaux moléculaires causaux, il convient d'établir un schéma causal incluant des interactions connues et potentielles.

Gène	Voie / Interaction	Effet potentiel sur le gliome
KRT19	Wnt, Notch	Reprogrammation, plasticité cellulaire
RUNX3	β -caténine/TCF-4	Inhibition de la progression tumorale
SCRT2	Réseaux de transcription neuronale	Blocage de l'apoptose, survie cellulaire accrue

Tableau 8 : Gènes identifiés et interactions.

²²⁵ Xue, C., Chu, Q., Shi, Q. et al. Wnt signaling pathways in biology and disease: mechanisms and therapeutic advances. *Sig Transduct Target Ther* 10, 106 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41392-025-0214>.

²²⁶ Sun J, Li B, Jia Z, Zhang A, Wang G, Chen Z, Shang Z, Zhang C, Cui J, Yang W. RUNX3 inhibits glioma survival and invasion via suppression of the β -catenin/TCF-4 signaling pathway. *J Neurooncol*. 2018 Oct;140(1):15-26. doi: 10.1007/s11060-018-2927-0. Epub 2018 Jun 18. PMID: 29916101.

²²⁷ Rodríguez-Aznar E, Nieto MA. Repression of Puma by scratch2 is required for neuronal survival during embryonic development. *Cell Death Differ*. 2011 Jul;18(7):1196-207. doi: 10.1038/cdd.2010.190. Epub 2011 Jan 21. PMID: 21252910.

On peut formaliser ceci comme suit :

RUNX3 : suppresseur tumoral en modulant négativement la voie Wnt/ β -caténine/TCF-4. Son activation favorise la différenciation cellulaire et l'apoptose, limitant ainsi la prolifération tumorale. À l'inverse, une inhibition ou une perte de RUNX3 conduit à une activation excessive de la voie Wnt, augmentant la transcription de gènes pro-prolifératifs et favorisant la progression tumorale.

SCRT2 : interagit avec la signalisation Notch. L'activation conjointe de SCRT2 et de Notch induit le blocage de l'apoptose, ce qui accroît la survie cellulaire. Ainsi, dans un scénario tumoral, la surexpression de SCRT2 combinée à une signalisation Notch active crée un micro-environnement propice à la résistance à la mort cellulaire programmée et à la persistance de cellules tumorales agressives.

(2) Représentation causale minimale

- Représentation du réseau causal basal : RUNX3 ($-|$ Wnt/ β -caténine/TCF-4) $\rightarrow$ Apoptose $\uparrow$, Prolifération $\downarrow$; SCRT2 + Notch $\rightarrow$ Blocage de l'apoptose $\uparrow$, Survie cellulaire $\uparrow$.
- $P(\text{progression tumorale} \mid \text{RUNX3 bas, SCRT2 haut, Notch haut}) > P(\text{progression tumorale} \mid \text{RUNX3 haut, SCRT2 bas})$.
- Représentation du réseau causal enrichi : Ce réseau causal peut être enrichi par l'ajout d'autres acteurs moléculaires (par exemple, P53, PTEN, ou des microARN régulateurs), ainsi que par la prise en compte des rétroactions et des boucles de régulation. Les interactions entre la voie Wnt et Notch sont aussi modulées par des signaux environnementaux et des facteurs épigénétiques, ce qui complexifie davantage le réseau.

(3) Enrichissement du réseau causal

Le réseau causal enrichi peut être représenté sous forme d'un DAG dont les variables ont des propriétés suivantes :

- RUNX3 inhibe la voie Wnt/ β -caténine/TCF-4 ; P53 et PTEN renforcent cette inhibition.
- SCRT2 et Notch s'activent mutuellement, favorisant la survie cellulaire.
- MicroARN module l'expression de RUNX3, P53, PTEN, SCRT2 et Notch.
- Les facteurs environnementaux et épigénétiques agissent en amont, modulant l'activité des voies Wnt et Notch ainsi que l'expression des microARN.
- Des boucles de rétroaction existent : par exemple, la voie Wnt peut rétro-inhiber RUNX3 via des microARN, et Notch peut moduler l'expression de P53.

Les variables sont donc : RUNX3, SCRT2, Notch, P53, PTEN, microARN, Facteurs environnementaux, Facteurs épigénétiques.

Relations causales :

- Facteurs environnementaux/épigénétiques → (microARN, RUNX3, P53, PTEN, SCRT2, Notch)
- MicroARN → (RUNX3, P53, PTEN, SCRT2, Notch)
- RUNX3, P53, PTEN $\neg$ Wnt/ β -caténine/TCF-4
- SCRT2 + Notch → Blocage de l'apoptose, Survie cellulaire accrue
- Wnt/ β -caténine/TCF-4 → Prolifération cellulaire $\uparrow$, Rétro-inhibition de RUNX3 (via microARN)
- Notch $\leftrightarrow$ SCRT2 (boucle positive)
- P53 $\neg$ Prolifération cellulaire, $\rightarrow$ Apoptose
- PTEN $\neg$ PI3K/AKT, $\neg$ Prolifération cellulaire

Représentation graphique :

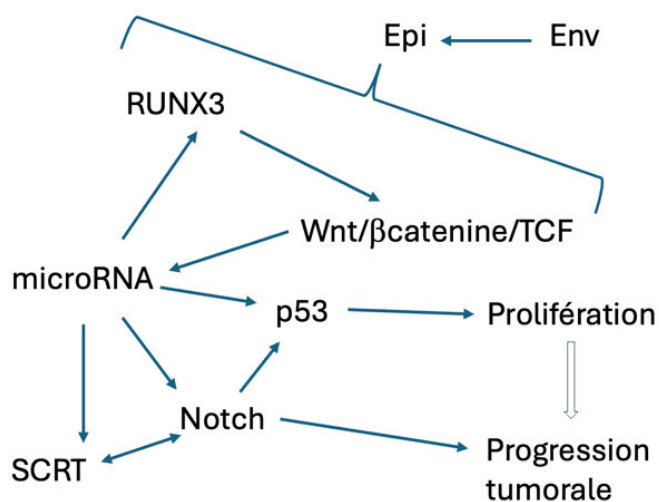


Fig. 29 : Représentation graphique des interactions potentielle.

Formalisation probabiliste :

On note :

- $P(A|B)$: probabilité de l'événement A sachant B.

Le modèle probabiliste du réseau s'écrit :

- $P(\text{progression tumorale} \mid \text{RUNX3, SCRT2, Notch, P53, PTEN, microARN, Env, Epi})$

Chaque variable est conditionnée par ses parents dans le réseau :

- $P(\text{RUNX3} \mid \text{microARN, Env, Epi})$
- $P(\text{P53} \mid \text{microARN, Env, Epi})$
- $P(\text{PTEN} \mid \text{microARN, Env, Epi})$
- $P(\text{SCRT2} \mid \text{microARN, Env, Epi})$
- $P(\text{Notch} \mid \text{microARN, Env, Epi, SCRT2})$
- $P(\text{Wnt}/\beta\text{-caténine/TCF-4} \mid \text{RUNX3, P53, PTEN, microARN, Env, Epi})$
- $P(\text{Blocage\_apoptose} \mid \text{SCRT2, Notch})$
- $P(\text{Prolifération} \mid \text{Wnt}/\beta\text{-caténine/TCF-4, Notch, PI3K/AKT})$

La probabilité de progression tumorale finale s'exprime alors comme :

$$P(\text{progression tumorale} \mid \dots) = f(\text{RUNX3, SCRT2, Notch, P53, PTEN, microARN, Env, Epi})$$

L'introduction de rétroactions et de boucles de régulation (par exemple, l'inhibition de RUNX3 par des microARN induits par Wnt, ou la régulation croisée entre Notch et SCRT2) rompt l'acyclicité stricte du graphique causal, nécessitant des approximations ou des modèles dynamiques (réseaux bayésiens dynamiques, équations différentielles stochastiques). De plus, la modulation par des facteurs environnementaux et épigénétiques introduit une variabilité contextuelle : la distribution de probabilité de chaque variable dépend de l'état du micro-environnement tumoral, de la plasticité épigénétique et du profil d'expression des microARN. Cette complexité rend compte de la diversité phénotypique observée et explique la difficulté d'une prédiction linéaire de la progression tumorale. Une modélisation probabiliste intégrant ces dépendances croisées et rétroactives est donc essentielle pour saisir la dynamique réelle des réseaux moléculaires tumoraux.

L'approche probabiliste permet néanmoins de hiérarchiser les contributions de chaque variable moléculaire et voie à la dynamique tumorale, et d'identifier des cibles potentielles pour des interventions thérapeutiques. Néanmoins, la complexité du système soulève la question du niveau de causalité (distale/proximale) et du statut explicatif (*explanandum/explanans*), comme discutée précédemment. Ce modèle rappelle donc qu'il existe à la fois des arguments issus de la littérature et la nécessité d'une validation expérimentale pour établir la chaîne causale précise.

6.2.3.2.4 Causalité et signatures radiomiques

(1) Caractéristiques des signatures radiomiques et TEP

Les signatures radiomiques obtenues à partir des images IRM sont composées des caractéristiques de forme et de texture associant la rondeur et l'homogénéité de la texture du volume d'intérêt (VOI), et ceci est associé à un meilleur pronostic. Cette signature ne peut pas être réduite à des causes biologiques sous-jacentes et représente juste un facteur prédictif.

Cinq signatures de risque de récurrence basées sur la TEP ont également été identifiées ; ces signatures comprenaient des caractéristiques de premier ordre combinées à des caractéristiques morphologiques ou de texture GLRLM.

Nous avons tenté de faire une formalisation causale probabiliste en associant les aspects moléculaires et les aspects radiomiques/TEP. Les caractéristiques radiomiques incluses étant la rondeur, l'homogénéité, et les caractéristiques de texture GLRLM. Les caractéristiques TEP étant TEP positif ou TEP négatif.

(2) Association entre variables moléculaires et signatures radiomiques/TEP

La probabilité P(progression tumorale), dépend conditionnellement d'un ensemble de variables moléculaires et environnementales (p.ex.exposome) (RUNX3, SCRT2, Notch, P53, PTEN, microARN, facteurs environnementaux x et épigénétiques) et de variables radiomiques et de signatures TEP :

$P(\text{progression tumorale} \mid \text{variables moléculaires, signature radiomique, TEP +/-}) = f(\text{RUNX3, SCRT2, Notch, P53, PTEN, microARN, Env, Epi, signature radiomique, TEP+/-})$

Il faudrait souligner que les signatures moléculaires pourront jouer un rôle causal ; en revanche les signatures radiomiques et TEP joueront seulement un rôle prédictif.

Ci-dessous, un tableau récapitulatif des interactions moléculaires et des signatures et radiomiques/TEP des gliomes diffus IDH1/2 mutés basées sur l'article 4.

Variable / Signature	Facteurs / Gènes / Protéines	Fonction / Implication	Réseaux / Voies impliqués	Remarques
P(PTEN microARN, Env, Epi)	PTEN	Suppresseur de tumeur	microARN, Environnement, Épigenétique	Probabilité conditionnelle
P(SCRT2 microARN, Env, Epi)	SCRT2	Régulation transcriptionnelle	microARN, Environnement, Épigenétique	Probabilité conditionnelle
P(Notch microARN, Env, Epi, SCRT2)	Notch	Voie de signalisation, différenciation cellulaire	microARN, Environnement, Épigenétique, SCRT2	Probabilité conditionnelle
P(Wnt/β-caténine/TCF-4 RUNX3, P53, PTEN, microARN, Env, Epi)	Wnt/β-caténine/TCF-4	Signalisation, prolifération	RUNX3, P53, PTEN, microARN, Environnement, Épigenétique	Probabilité conditionnelle
P(Blocage apoptose SCRT2, Notch)	SCRT2, Notch	Inhibition de l'apoptose	SCRT2, Notch	Probabilité conditionnelle
P(Prolifération Wnt/β-caténine/TCF-4, Notch, PI3K/AKT)	Wnt/β-caténine/TCF-4, Notch, PI3K/AKT	Prolifération cellulaire	Wnt/β-caténine/TCF-4, Notch, PI3K/AKT	Probabilité conditionnelle
P(progression tumorale ...)	RUNX3, SCRT2, Notch, P53, PTEN, microARN, Env, Epi	Progression tumorale globale	Réseaux croisés, rétroactions	Modélisation probabiliste nécessaire
Signature radiomique (IRM)	Forme, texture (rondeur, homogénéité VOI)	Prédiction du pronostic	-	Facteur prédictif, non réductible à la biologie
Signature de risque (TEP)	Caractéristiques de premier	Risque de récurrence	-	Cinq signatures identifiées

	ordre, morphologiques, texture GLRLM			

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des interactions moléculaires et signatures radiomiques dans les gliomes diffus IDH1/2 mutés basées sur l'article 4.

6.2.3.2.5 Contribution du cadre conceptuel de la causalité à la compréhension de l'article 4

L'article 4 présente une stratégie d'intégration multimodale de données (transcriptomiques, protéomiques et radiomiques) pour prédire la récurrence chez les patients atteints de gliomes IDH mutés. L'apport du cadre conceptuel de la causalité à la compréhension de cet article permet de distinguer ce qui relève de la simple corrélation de ce qui peut être interprété comme un lien de cause à effet dans les processus biologiques sous-jacents à la progression tumorale.

(1) Identification des facteurs causaux versus prédictifs

Le cadre causal permet de différencier les variables qui jouent un rôle actif dans la progression tumorale (facteurs causaux) de celles qui ne sont que prédictives. Ainsi, les signatures moléculaires (gènes et protéines identifiés) peuvent être évaluées pour leur implication directe dans les voies de signalisation responsables de la progression ou du blocage tumoral, contrairement aux signatures radiomiques et TEP qui, bien qu'utiles pour la prédiction, n'ont pas nécessairement de rôle dans la causalité biologique.

(2) Modélisation des chaînes de causalité

L'approche causale structurelle (via les DAGs – graphiques orientés acycliques) permet de formaliser les interactions entre différentes variables (généétiques, phénotypiques, environnementales). Cela aide à représenter les relations hiérarchiques et les dépendances conditionnelles entre les facteurs étudiés dans l'article, notamment comment la mutation IDH influence l'évolution tumorale à travers la production de 2-hydroxyglutarate et ses effets en cascade sur l'épigénome, la prolifération, l'angiogenèse et l'immunité.

(3) Hiérarchisation des variables et scénarios explicatifs

Grâce à la formalisation probabiliste des relations causales, différents scénarios (A-F) sont possibles pour expliquer la progression des gliomes IDH mutés. Le cadre causal permet de hiérarchiser la contribution de chaque variable (par exemple, RUNX3, SCRT2, Notch, etc.) et d'identifier les circuits moléculaires les plus susceptibles de jouer un rôle central dans la progression ou la résistance à la maladie. Cette hiérarchisation est essentielle pour guider des interventions thérapeutiques ciblées.

(4) Prise en compte de la complexité et de l'interdépendance des voies

Le cadre causal ne se limite pas à l'analyse de relations simples, mais prend en compte les rétroactions, les boucles de régulation et la modulation par des facteurs contextuels (environnementaux, épigénétiques). Ainsi, la compréhension de l'article est enrichie par la possibilité de modéliser des systèmes complexes, où les interactions croisées (par exemple, entre Wnt, Notch, microARN, P53, PTEN) conditionnent la dynamique tumorale et la variabilité interindividuelle de la progression.

(5) Clarification du statut explicatif des signatures identifiées

Le cadre conceptuel de la causalité permet de clarifier si les signatures identifiées sont des causes proximales (directement impliquées dans la progression) ou distales (marqueurs indirects), ou encore si elles relèvent d'une simple corrélation descriptive sans implication causale directe. Cette distinction est cruciale pour interpréter la portée des résultats de l'article et pour concevoir des études futures visant à tester expérimentalement la validité causale des signatures proposées.

(6) Intégration des approches probabilistes et dynamiques

L'analyse causale de l'article s'appuie sur une formalisation probabiliste des relations entre variables, intégrant la variabilité contextuelle et les dépendances croisées. Le cadre causal permet ainsi de proposer des modèles dynamiques (réseaux bayésiens, équations différentielles stochastiques) capables de rendre compte de la diversité phénotypique observée, et d'améliorer la prédiction du risque de récurrence chez les patients.

L'apport du cadre conceptuel de la causalité à la compréhension de l'article 4 se manifeste donc par une meilleure distinction entre corrélation et causalité, une formalisation des interactions complexes, une hiérarchisation des facteurs impliqués, ainsi qu'une clarification du rôle des signatures identifiées dans le réseau causal.

6.2.4 Modélisation causale réductionniste

6.2.4.1 Considérations générales : Comparaison gliomes IDHWT et gliomes IDHmut

On peut simplifier la comparaison entre gliomes IDHWT et IDH mutés en réduisant à un nombre limité de variables. Dans le cas des gliomes IDHWT, il y a invasion (diffusion) et compaction en vagues successives. Ceci peut être modélisé comme une courbe ascendante en dents de scie (Figure 28). Dans le cas des gliomes IDH mutés, la compaction est tardive. Il y a donc une phase « dormante » de compaction puis soudain une progression (Figure 30). On pourrait proposer le modèle suivant :

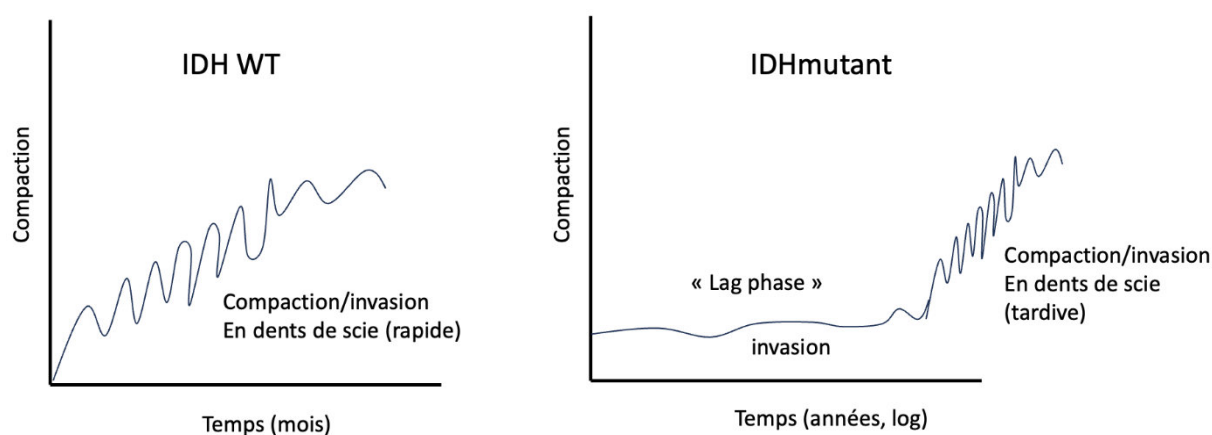


Fig. 30 : Comparatif gliomes IDH WT et mutés.

Cependant, l'évolution des gliomes IDH mutés est variable, et il y a des patients qui évoluent plus vite vers une progression (« *early recurrence* »). La causalité de cette progression rapide n'est pas connue. Comme discuté plus haut, il y a des facteurs prédictifs et causaux potentiels comme le travail récent de notre équipe l'a montré (Article 4 : Chouleur et al. 2024).

Une situation comparable est celle du « *grow or go* » (soit migration, soit prolifération). Cependant dans le cas des gliomes, il n'y a pas seulement des facteurs intrinsèques cellulaires (comme c'est le cas dans le paradigme « *grow or go* »), mais l'interférence de divers acteurs moléculaires intrinsèques ou extrinsèques. La causalité est donc ici plus complexe, car des variables multiples entrent en jeu. Cependant, la présence de la mutation IDH est un facteur causal principal de l'apparition d'un phénotype diffus soutenu. Les tumeurs IDHWT ont aussi des phases invasives, mais qui sont courtes et suivies par la compaction, et ceci se déroule à des cycles répétés.

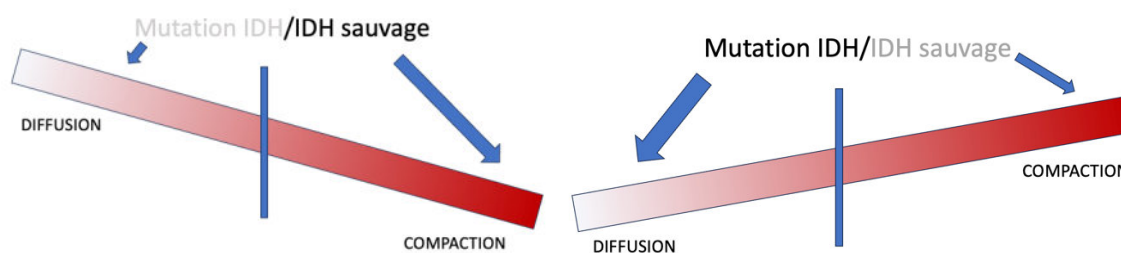


Fig. 31 : Diffusion et compaction comme paramètres de comparaison entre gliomes WT et mutés

Pour modéliser la progression des gliomes IDH mutés et IDH wild-type (WT) en utilisant une approche réductionniste, des graphiques acycliques peuvent être construits en introduisant des coefficients de chemin estimés. Ceci devrait nous fournir une base pour formaliser les résultats. Cette approche implique la création de deux modèles distincts pour les gliomes IDH mutés et IDHWT, étant donné leurs différences significatives en termes de progression, d'invasion, de survie et d'angiogenèse. La création d'un graphique acyclique implique de représenter les caractéristiques clés et les étapes de progression de chaque type à travers des nœuds et des bords dirigés, où les nœuds représentent des états ou des événements dans la progression de la maladie, et les bords indiquent la transition d'un état à un autre. Ces modèles sont simplifiés et n'incluent pas toutes les complexités et dynamiques des gliomes IDH mutés et IDHWT. Ils représentent une conceptualisation réductionniste et tenant compte d'un nombre limité de variables. Ces variables sont néanmoins centrales pour les différences du développement tumoral des gliomes IDH WT et mutés. Les graphiques pourraient être complexifiés ultérieurement en incluant d'autres approches de modélisation mathématique et computationnelle.

6.2.4.2 Modélisations

Pour comparer de manière causale les gliomes IDHWT et les gliomes IDH mutés, il convient d'identifier les principales chaînes de causalité qui relient les caractéristiques moléculaires à l'évolution tumorale, en intégrant les observations morphologiques et fonctionnelles décrites précédemment. La modélisation causale doit tenir compte du fait que les gliomes IDHWT présentent une dynamique tumorale plus agressive, avec des cycles rapides de prolifération, compaction et diffusion, soutenus par une angiogenèse et un métabolisme accru. Les gliomes IDH mutés, à l'inverse, évoluent de façon plus lente, avec une prolifération et une angiogenèse faible, avec une invasion forte pendant une longue période. L'angiogenèse suivie de cycles de

compaction/diffusion est plus tardive. Nous décrivons ci-dessous différentes modélisations causales à complexité croissante.

(1) *Modélisation 1*

Dans cette modélisation, l'évolution des gliomes IDHWT et IDH, mutés en fonction du temps, est comparée en utilisant seulement deux critères : l'état « compact » et l'état « soft » (reflétant la diffusion). Les états alternent en fonction du temps entre les états « compact » (vert) et « soft » (orange) pour les gliomes diffus IDHWT et IDH mutés. Pour les IDHWT, « compact » et « soft » augmentent d'abord, puis « compact » se stabilise tandis que « soft » diminue sous le niveau de « compact ». Chez les gliomes IDH mutés, « soft » prédomine longtemps avant un changement où le même schéma qu'IDHWT apparaît, avec succession de cycles répétés. On voit donc que le développement tumoral est conditionné par l'alternance entre deux états en fonction du temps. La cinétique de l'alternance est différente pour les gliomes IDHWT et IDH mutés ce qui entraîne des trajectoires évolutives différentes pour ces deux variantes de gliomes diffus. On peut donc considérer que la cinétique de l'alternance représente une cause macroscopique (on peut appeler cela cause de premier ordre). Cette causalité macroscopique sous-entend l'existence de facteurs causaux de deuxième ordre cellulaires et moléculaires (cf. Annexes pour codes et scripts).

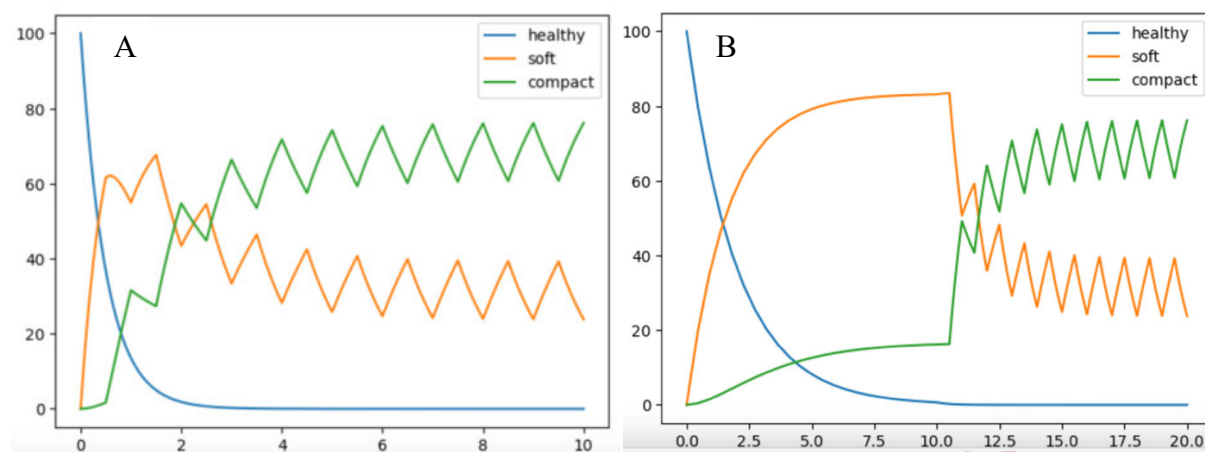
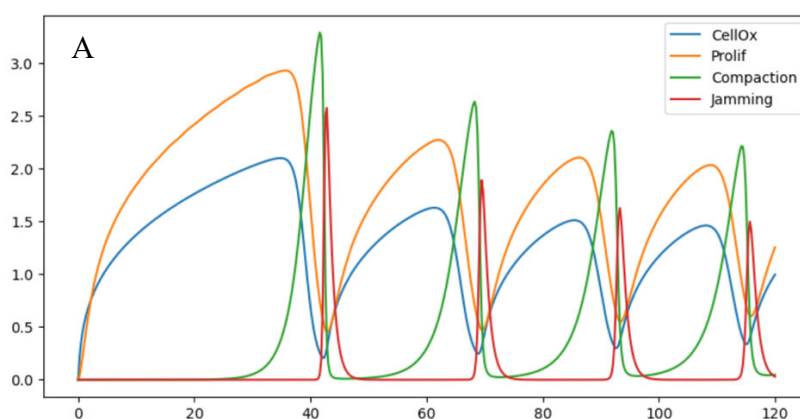


Fig. 32 : Représentation graphique de la modélisation N°1, gliomes IDH WT à gauche (A) et IDH mutés à droite (B). La figure illustre les cycles alternés entre les états « compact » (vert) et « soft » (orange) pour les gliomes diffus IDH WT et IDH mutés. Pour les IDH WT, « compact » et « soft » augmentent d'abord, puis « compact » se stabilise tandis que « soft » diminue sous le niveau de « compact ». Chez les gliomes IDH mutés, « soft » prédomine longtemps avant un changement où le même schéma qu'IDH WT apparaît, avec succession de cycles répétés (cf. Annexe pour détails).

(2) Modélisation 2

Pour la modélisation 2, différents paramètres sont associés à la compaction et diffusion. Ici, la diffusion est représentée par le « *jamming* ». Les paramètres associés sont le métabolisme et la prolifération pour la figure 33, et l'invasion et le métabolisme (Oxphos, glycolyse) pour la figure 34.

La figure du haut (A) illustre l'évolution des paramètres : (métabolisme glycolytique/oxydatif), prolifération, compaction et « *jamming* ». Au début, on observe une augmentation de la prolifération, une hausse du métabolisme (glycolytique), puis une augmentation de la compaction. Lorsque la prolifération et le métabolisme (glycolytique) chutent, le « *jamming* » est alors déclenché. Ceci est soutenu par une augmentation du métabolisme oxydatif. Ce cycle se répète plusieurs fois, traduisant les alternances de phases dans la dynamique tumorale. La figure du milieu (B) reflète les oscillations soutenues de ces paramètres dans le temps, mettant en évidence la périodicité et l'amplitude des variations selon le type de gliome. Pour les gliomes IDHWT, les oscillations sont rapides et marquées, tandis que pour les gliomes IDH mutés, elles sont plus lentes et de moindre amplitude, témoignant d'une progression plus stable et diffuse. La figure du bas (C) représente l'augmentation de la masse tumorale sous forme d'escalier, lente et prolongée, avec une prédominance de l'état diffus et une compaction retardée. Chaque palier correspondant à une phase de croissance liée aux cycles de prolifération, compaction et « *jamming* ». Cette modélisation permet de visualiser comment l'enchaînement de ces paramètres aboutit à une progression tumorale caractéristique, différente selon le statut IDH. Ainsi, la dynamique des gliomes IDH WT est marquée par une croissance rapide et des cycles courts, alors que les gliomes IDH mutés montrent une évolution retardée avec un décalage de l'initiation des cycles rapides d'alternance (cf. Annexe pour codes et scripts).



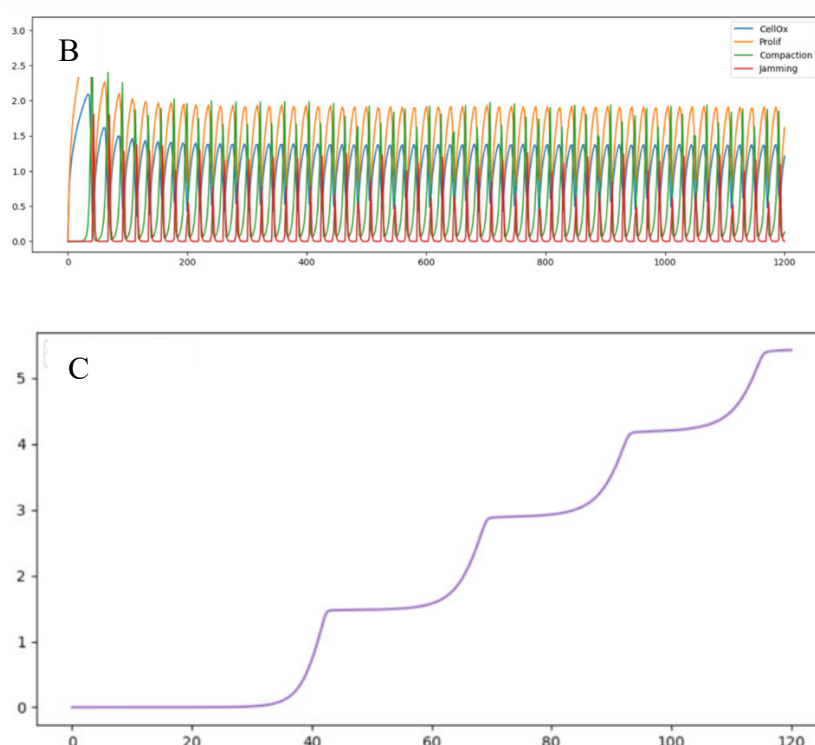


Fig. 33 : Représentation graphique de la modélisation N°2. Gliome IDH WT versus IDH muté. Figure du haut (A), évolution des paramètres cellox (métabolisme), prolifération, compaction et « jamming ». Au début la prolifération puis le métabolisme augmentent, suivis par la compaction. À la chute de la prolifération et du cellox, le « jamming » est enclenché. Ceci est répété à plusieurs cycles. La figure du milieu (B) reflète les oscillations soutenues. La figure du bas (C) représente l'augmentation de la masse tumorale en escalier quand on tient compte des paramètres ci-dessus (cf. Annexe pour détails).

Pour préciser cette dernière modélisation :

En fait, le modèle représenté ci-dessus doit être explicité. Cellox-> prolifération représente un chemin plus complexe. Ce chemin est représenté comme suit : oxphos -> invasion -> glycolyse -> prolifération -> compaction -> jamming (« break-down » des contraintes externes) avec des retro-contrôles. Le schéma complexifié est donc le suivant :

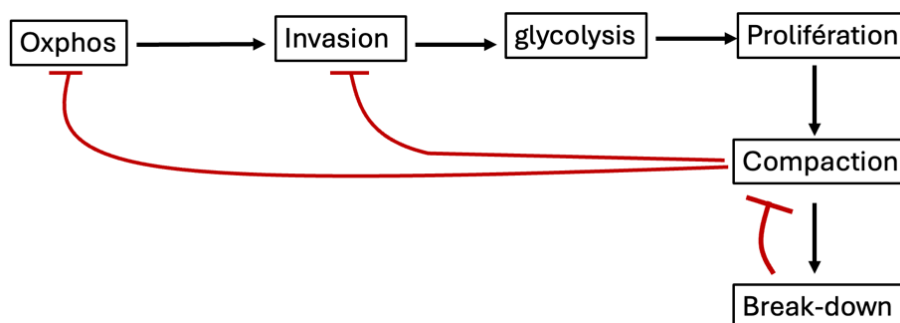


Figure 34 : Schéma complexifié des interactions causales.

Ceci ne change rien aux schémas oscillatoires décrits plus haut. Le point intéressant est que la compaction, dans ce modèle, aura un effet de rétrocontrôle inhibiteur au niveau du métabolisme oxphos et au niveau de l'invasion. Les cibles moléculaires peuvent être multiples et inclure des éléments de la chaîne respiratoire ou d'autres éléments moléculaires du métabolisme mitochondrial, ainsi que des éléments moléculaires liés à l'invasion (intégrines, etc.). La dégradation (« *break-down* ») du tissu environnant aura un effet inhibiteur négatif sur la compaction de la tumeur. Il est à noter que cette façon de présenter reflète un phénomène séquentiel. Il a été montré que l'inhibition de la glycolyse entraîne un effet stimulateur du métabolisme oxydatif. Cela veut dire que l'invasion est stimulée, et cela est suivi par une restimulation de la glycolyse qui est promoteur de la compaction.

(3) *Modélisation 3*

Dans cette modélisation, nous avons ajouté le temps (t) comme paramètre additionnel. La différence entre les gliomes IDH WT et les gliomes IDH mutés peut être des fonctions d'état décrivant l'évolution temporelle des principaux paramètres : prolifération (P), compaction (C), diffusion (D), métabolisme oxydatif (M), et invasion (I). On introduit l'indice WT pour les gliomes IDH « *wild-type* » et mut pour les gliomes IDH mutés.

Chaque paramètre évolue selon des dynamiques propres à chaque type de gliome. Ainsi, les gliomes IDH WT se caractérisent par une croissance rapide et des cycles fréquents entre les états « compact » et « soft », traduisant une alternance périodique entre compaction et diffusion. À l'inverse, les gliomes IDH mutés présentent une progression plus lente, avec des oscillations de faible amplitude et fréquence, reflet d'une stabilité relative et d'une prédominance prolongée de l'état « soft ». Cette approche permet de formaliser mathématiquement les trajectoires évolutives distinctes des deux types de gliomes, en intégrant l'impact du métabolisme oxydatif et des processus d'invasion sur la dynamique tumorale.

Pour les gliomes IDH WT :

- $PWT(t) = P_0 \cdot e^{\alpha t}$: croissance exponentielle rapide de la prolifération, avec α élevé.
- $CWT(t)$ et $DWT(t)$: alternance périodique, modélisée par $CWT(t) = AC \cdot \sin(\omega t) + BC$, $DWT(t) = AD \cdot \cos(\omega t) + BD$, où ω est élevé (cycles rapides).
- $MWT(t) = M_0 \cdot e^{\beta t}$ avec β élevé, suivi d'une chute déclenchant le « jamming » : $JWT(t) = H(MWT(t) - M_{th})$, où H est la fonction de Heaviside et M_{th} le seuil métabolique.

Pour les gliomes IDH mutés :

- $P_{mut}(t) = P_0 \cdot e^{\alpha' t}$: croissance lente, $\alpha' \ll \alpha$.
- $C_{mut}(t)$ et $D_{mut}(t)$: oscillations à faible amplitude et fréquence, $C_{mut}(t) = A'C \cdot \sin(\omega' t) + B'C$, $D_{mut}(t) = A'D \cdot \cos(\omega' t) + B'D$, avec $\omega' \ll \omega$.
- $M_{mut}(t) = M_0 \cdot e^{\beta' t}$ où $\beta' \ll \beta$, et le « jamming » survient tardivement : $J_{mut}(t) = H(M_{mut}(t) - M_{th})$.

La différence entre gliomes IDHWT et gliomes IDH mutés s'exprime donc par des paramètres de croissance (α , β , ω) nettement plus élevés chez les IDHWT, traduisant une dynamique tumorale rapide, alors que les IDH mutés présentent des valeurs faibles, témoignant d'une progression lente et d'une stabilité relative. Cette formalisation permet de modéliser et de comparer quantitativement les trajectoires évolutives des deux types de gliomes.

Comment cela est achevé au niveau moléculaire n'est pas connu. On peut spéculer que, l'affaiblissement du processus d'invasion et de la respiration mitochondriale entraîne automatiquement une stimulation de la glycolyse et un basculement vers la compaction.

(4) *Modélisation 4*

Une autre façon de représenter les modifications phénotypiques entre les états « de Compaction » et de « Diffusion » est montrée dans la figure ci-dessous. Le passage entre chaque état est caractérisé par une probabilité associée. Si $P_1 > P_2$ la diffusion est favorisée, si $P_2 > P_1$ la compaction est favorisée. Des variables cellulaires et moléculaires sont associées à ces deux états. Les facteurs internes sont représentés par des conditions métaboliques et signaux migratoires et les facteurs externes par l'angiogenèse, la microglie, les neurones et astrocytes et la matrice extracellulaire.

Cette représentation probabiliste permet de mieux appréhender la dynamique évolutive des systèmes tumoraux, en mettant en lumière l'influence déterminante de l'environnement cellulaire et des signaux moléculaires sur le comportement tumoral. Ainsi, selon l'équilibre entre facteurs internes et externes, la tumeur peut osciller entre un état compact, caractérisé par une forte densité cellulaire et une moindre mobilité, et un état diffus, marqué par une invasion accrue du tissu environnant. Modéliser ces transitions offre non seulement un cadre conceptuel pour comprendre la plasticité tumorale, mais aussi des pistes pour cibler spécifiquement les mécanismes impliqués dans la progression ou le contrôle de la maladie.

En intégrant la notion de causalité, il devient possible d'explorer comment des événements ou des modifications spécifiques au niveau moléculaire ou environnemental déclenchent ou inhibent

la transition entre les états de compaction et de diffusion. Par exemple, une altération métabolique ou une stimulation migratoire peut agir comme cause directe d'un changement d'état, tandis que des facteurs externes tels que l'angiogenèse ou l'interaction avec la matrice extracellulaire peuvent moduler cette causalité en renforçant ou en limitant la probabilité de transition. Ainsi, la dynamique tumorale ne se limite pas à une fluctuation aléatoire entre deux états, mais résulte d'une chaîne causale où chaque facteur, interne ou externe, possède une capacité à influencer le comportement du système tumoral et son évolution. Cette approche causale ouvre la voie à une compréhension plus fine des leviers thérapeutiques potentiels, en ciblant les causes premières des transitions phénotypiques.

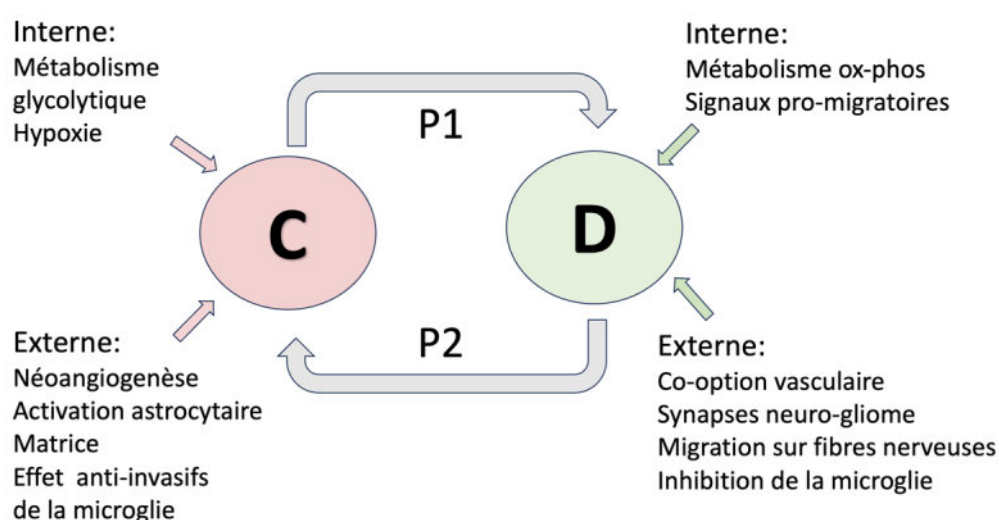


Figure 35 : Représentation réductionniste comportant deux variables cibles, Compaction et Diffusion.

On peut formaliser ceci comme suit :

Soit $X(t)$ l'état phénotypique d'un système tumoral à un instant t , où $X(t)$ peut prendre deux valeurs : Compaction (C) ou Diffusion (D). Cet état peut osciller/transitionner entre D et C, conditionné par des probabilités conditionnelles, qui permettent d'anticiper le comportement du système au fil du temps.

	Compaction (C)	Diffusion (D)
Compaction (C)	$1 - P_{C \rightarrow D}$	$P_{C \rightarrow D}$
Diffusion (D)	$P_{D \rightarrow C}$	$1 - P_{D \rightarrow C}$

Tableau 10 : La ligne « Compaction (C) » : la probabilité de rester en compaction est $1 - P_{C \rightarrow D}$, et de passer à diffusion est $P_{C \rightarrow D}$. La ligne « Diffusion (D) » : la probabilité de passer à la compaction est $P_{D \rightarrow C}$, et de rester en diffusion est $1 - P_{D \rightarrow C}$.

À chaque instant, la tumeur peut être soit dans l'état de compaction (C), soit dans l'état de diffusion (D). À chaque étape (ou période), il existe une certaine probabilité que la tumeur reste dans le même état ou qu'elle passe à l'autre état. Ces probabilités sont :

- $PC \rightarrow D$: probabilité de transition de l'état de compaction vers l'état de diffusion.
- $PD \rightarrow C$: probabilité de transition de l'état de diffusion vers l'état de compaction.

Si on associe les variables internes et externes qui conditionnent l'état de diffusion et compaction, nous obtenons :

- Variables internes : métabolisme glycolytique (Gly), métabolisme oxphos (Oxphos), signaux migratoires (Migr).
- Variables externes : angiogenèse (Angio), microglie (Microg), neurones/astrocytes (Neur), matrice extracellulaire (MEC).

On peut modéliser les probabilités de transition, par exemple :

- $PC \rightarrow D = f1(\text{Oxphos, Migr, Angio, Microg, Neur, MEC})$
- $PD \rightarrow C = f2(\text{Gly, Angio, Microg, Neur, MEC})$

Où $f1$ et $f2$ sont des fonctions de combinaison (linéaire ou non linéaire) des facteurs biologiques, pouvant être paramétrées selon des données expérimentales. Les effets de rétrocontrôle (*feedback*) peuvent être intégrés comme des dépendances temporelles ou fonctionnelles dans les fonctions $f1$ et $f2$.

La dynamique du système sur n étapes de temps est alors :

- $P(X(t+1) = C) = P(X(t) = C) \times (1 - PC \rightarrow D) + P(X(t) = D) \times PD \rightarrow C$
- $P(X(t+1) = D) = P(X(t) = D) \times (1 - PD \rightarrow C) + P(X(t) = C) \times PC \rightarrow D$

Cette formulation décrit comment évolue la probabilité qu'une cellule soit dans un état donné (compaction, noté C, ou diffusion, noté D) d'un temps t à l'autre. Elle se base sur les probabilités de transition entre ces deux états.

$P(X(t+1) = C)$ représente la probabilité qu'à l'étape suivante ($t+1$), la cellule soit en état de compaction (C). Cette probabilité dépend de deux contributions :

- $P(X(t) = C) \times (1 - PC \rightarrow D)$: il s'agit des cellules qui étaient déjà en compaction à l'étape t et qui y restent (elles n'ont pas basculé vers la diffusion). $(1 - PC \rightarrow D)$ est la probabilité de rester en compaction.
- $P(X(t) = D) \times PD \rightarrow C$: il s'agit des cellules qui étaient en diffusion à l'étape t , mais qui passent en compaction au temps suivant. $PD \rightarrow C$ est la probabilité de transition de diffusion vers la compaction.

De la même manière, $P(X(t+1) = D)$ donne la probabilité de retrouver la cellule en état de diffusion à l'étape suivante, et se calcule :

- $P(X(t)=D) \times (1 - P_{D \rightarrow C})$: cellules déjà en diffusion qui y restent.
- $P(X(t)=C) \times P_{C \rightarrow D}$: cellules qui étaient en compaction, mais qui basculent en diffusion.

Pour résumer,

Les facteurs qui sont impliqués dans la compaction sont : La prolifération des cellules tumorales, l'angiogenèse, la microglie, la formation de microtubes qui représentent des connexions entre cellules tumorales. Le métabolisme glycolytique peut également être associé à l'hypoxie. Cette dernière favorise le métabolisme glycolytique ainsi que la production de facteurs angiogéniques par les cellules tumorales.

Les facteurs impliqués dans la diffusion sont : au niveau de la cellule tumorale, le métabolisme oxphos et les signaux pro-migratoires mettant en jeu les intégrines et les protéases jouant un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Au niveau de l'environnement tumoral, la cooption vasculaire, les synapses neuro-gliomateuses et les fibres nerveuses rentrent en jeu. La problématique ici est d'assigner une valeur causale à ces différents facteurs. On peut avoir deux approches. Le facteur causal initiateur provient soit des cellules tumorales soit de l'environnement tumoral. Ceci peut être testé expérimentalement par interférences en agissant sur l'une ou l'autre variable, ce qui conduit à la perturbation des mécanismes régulateurs dans les cellules tumorales ou leur micro-environnement. Il reste difficile d'établir une séquence causale sans prendre en compte le temps. Une série temporelle à partir de l'initiation tumorale peut aider à définir la séquence causale pour chaque type de tumeur.

Le tableau ci-dessous résume les caractéristiques principales des quatre modèles et l'apport de l'analyse causale :

Modèle	Caractéristiques principales	Apport de l'analyse causale
Modèle 1 : Causalité « macroscopique »	Analyse descriptive des états cellulaires (compaction/diffusion) avec prise en compte de la dynamique de la fluctuation entre les deux états. Approche phénoménologique centrée sur les observations	Deux interprétations sont possibles : 1. Rôle causal de la dynamique entre les deux états qui impactent le développement tumoral 2. Limité à la corrélation, ne permet pas d'identifier les facteurs moteurs

Modèle 2 : Causalité macroscopique complexifiée	Analyse descriptive des états cellulaires (compaction/diffusion) avec prise en compte de la dynamique de la fluctuation entre les deux états et intégration de variables additionnelle (métabolisme, etc.)	Rôle causal de la dynamique entre les deux états intégrant des variables additionnelles qui impactent le développement tumoral .
Modèle 3 : Causalité dynamique	Permet de modéliser l'alternance périodique Permet de formaliser mathématiquement les trajectoires évolutives distinctes des deux types de gliomes	Permet de formaliser la dynamique en tenant compte des paramètres de croissance (α , β , ω) reflétant une dynamique tumorale lente ou rapide selon leur valeur
Modèle 4 : Causalité avec transition d'états	-Intégration de probabilités de transition entre états (PC→D, PD→C), représentation des changements phénotypiques par des variables aléatoires -Série temporelle depuis l'initiation tumorale, analyse des séquences causales spécifiques à chaque type de tumeur.	Permet l'identification de facteurs causaux qui favorisent ou limitent la transition entre les états.

Tableau 11 : Caractéristiques des modèles et apports de l'analyse causale

6.2.4.3 Contribution du cadre conceptuel de la causalité à la modélisation réductionniste

L'introduction du cadre conceptuel de la causalité dans la modélisation réductionniste des gliomes IDHWT et IDH mutés permet de dépasser une simple description statistique ou phénoménologique des dynamiques tumorales, pour leur attribuer une structure explicative hiérarchisée et testable.

Premièrement, la causalité permet d'identifier et de hiérarchiser les variables les plus déterminantes dans la progression tumorale. Dans les modèles réductionnistes présentés, les états « compaction » et « diffusion » ne sont plus seulement observés comme des alternances, mais sont reliés à des causes premières qui dépendent de facteurs internes comme le métabolisme glycolytique/oxphos, signaux migratoires, et de facteurs externes comme l'angiogenèse, la microglie, la matrice extracellulaire, etc. Par ailleurs, la dynamique de l'alternance entre « compaction » et « diffusion » est en elle-même causale pour le développement tumoral, car elle orientera la tumeur vers un chemin développemental spécifique. Nous avons donc une stratification des interactions causales. Cette hiérarchisation oriente la recherche vers les

mécanismes qui, s'ils sont modifiés, peuvent perturber de façon prévisible la trajectoire évolutive de la tumeur.

Deuxièmement, le cadre causal permet de formaliser les chaînes de relations entre variables, en intégrant les rétroactions et interdépendances, ce qui est essentiel pour comprendre pourquoi certains gliomes IDH mutés présentent une progression lente et d'autres une évolution plus rapide (« *early recurrence* »). Par exemple, l'utilisation de graphiques acycliques ou de modèles probabilistes avec probabilités de transition conditionnelles ($PC \rightarrow D$, $PD \rightarrow C$) permet de représenter explicitement les liens de causalité entre événements moléculaires, cellulaires et changements d'état phénotypique.

Troisièmement, l'approche causale rend possibles la simulation et la prédiction du comportement tumoral sous différentes perturbations expérimentales. En modélisant les transitions entre états comme le résultat de causes identifiables et quantifiables, il devient possible de tester, par des manipulations ciblées, quelles variables sont réellement causales (et non simplement corrélées) dans l'évolution tumorale, et d'anticiper les réponses à des interventions thérapeutiques.

Enfin, le cadre de la causalité permet de clarifier la distinction entre signatures associées à la progression (marqueurs) et facteurs causaux moteurs. Ceci est fondamental pour la conception de modèles réductionnistes pertinents, car seuls les facteurs causaux identifiés peuvent être considérés comme des cibles potentielles pour une intervention efficace.

En synthèse, l'apport du cadre conceptuel de la causalité à la modélisation réductionniste repose sur :

- La hiérarchisation et l'identification des variables causales majeures dans la progression des gliomes ;
- La formalisation des interactions complexes et des rétroactions entre variables internes et externes ;
- La possibilité de tester et de valider expérimentalement les chaînes causales par des interventions ciblées ;
- L'amélioration de la prédiction de la dynamique tumorale et l'orientation vers des stratégies thérapeutiques personnalisées.

Ainsi, le cadre causal enrichit la modélisation réductionniste en la dotant d'un pouvoir explicatif et prédictif pour mieux comprendre et contrôler la progression des gliomes IDHWT et IDH mutés.

6.3 Carcinome rénal (Prototype II)

6.3.1 Mécanismes et facteurs causaux intrinsèques des cancers du rein

Le carcinome à cellules rénales (CCR) englobe un groupe hétérogène de cancers dérivés de cellules épithéliales des tubes rénaux, comprenant plusieurs sous-types histologiques et moléculaires, dont le CCR à cellules claires (ccRCC) est le plus courant²²⁸. Le CCR a représenté environ 179 000 décès dans le monde au cours de l'année dernière, et sa mortalité devrait doubler au cours des 20 prochaines années (projet Globocan 2024, mise à jour décembre 2024 ²²⁹). Le problème majeur pour les patients atteints de CCR est l'absence d'option thérapeutique efficace, notamment pour les formes récurrentes et métastatiques de la maladie. Le CCR localisé est traité par résection chirurgicale et a un bon taux de survie à cinq ans. Cependant, 40 % des patients présentant une maladie apparemment localisée rechutent ultérieurement avec un CCR localisé ou métastatique. Les récives localisées et les métastases du CCR sont difficiles à traiter et de mauvais pronostic. Les options thérapeutiques privilégiées pour le traitement du CCR visent à cibler l'angiogenèse tumorale (c'est-à-dire Sunitinib ou Bevacizumab, bloqueurs du VEGF/VEGFR) ou le système immunitaire (c'est-à-dire Ipilimumab + Nivolumab, deux inhibiteurs de CTLA-4 et PD-1 respectivement)²³⁰. Cependant, ces thérapies sont rarement curatives et la résistance aux médicaments est presque inévitable. De plus, le traitement clinique du CCR est entravé par le manque de biomarqueurs pertinents. Le diagnostic du patient, le pronostic et les décisions cliniques sont actuellement basés sur des informations histologiques, c'est-à-dire le grade de Fuhrman ou le score MSKCC et le stade de la tumeur. La sélection thérapeutique est basée sur des lignes directrices limitées et sur la réponse aux traitements antérieurs. À cet égard, le traitement du CCR est moins avancé que celui d'autres cancers pour lesquels les connaissances moléculaires sont plus avancées pour guider les décisions thérapeutiques (par exemple, le statut des récepteurs hormonaux ou du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) dans le cancer du sein). En fait, on sait peu de choses sur les mécanismes physiopathologiques de l'initiation et de la progression du CCR. L'élucidation de ces mécanismes est essentielle pour développer des stratégies thérapeutiques efficaces pour le CCR, en particulier pour ses formes métastatiques.

²²⁸ McKinnon MB, Rini BI, Haake SM. Biomarker-informed care for patients with renal cell carcinoma. *Nat Cancer.*, 2025, 6(4):573-583.

²²⁹ Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.*, 2024, 74(3) :229-263.

²³⁰ Burgers FH, van der Mijn JCK, Seijkens TTP, Jedema I, Bex A, Haanen JBAG. Immunological features of clear-cell renal-cell carcinoma and resistance to immune checkpoint inhibitors. *Nat Rev Nephrol.* 2025 Jul 22. Online ahead of print, doi : 10.1038/s41581-025-00983-w.

La progression tumorale depuis l'initiation jusqu'à la métastase complète est un processus en plusieurs étapes qui se déroule via une série d'étapes qui se chevauchent. La progression tumorale peut être considérée comme un processus évolutif par lequel les cellules tumorales doivent se détacher de la tumeur primaire, accéder et survivre dans la circulation, sortir du système vasculaire, survivre et proliférer dans l'environnement de l'organe secondaire. Ainsi, différents mécanismes entrent en jeu à différents stades, et la progression tumorale globale est la somme de ces processus. Une meilleure compréhension des changements moléculaires se produisant dans la cellule cancéreuse au cours des étapes de progression tumorale pourrait faciliter le diagnostic, la prévention et le traitement du cancer métastatique, y compris le CCR.

Les mécanismes causaux peuvent être appréhendés de différentes manières : soit en tenant compte de la spécificité des sous-types du cancer du rein comme le cancer du rein à cellules claires (ccRCC) ou en étudiant des mécanismes causaux plutôt universels des cancers du rein c.à.d. en faisant abstraction des caractéristiques spécifiques des différents sous-types. Nous décrivons les relations causales d'abord d'une manière générale puis nous formalisons les relations causales.

6.3.2 Analyse causale du sous-type ccRCC

6.3.2.1 Généralités

Divers graphiques acycliques peuvent être construits en tenant compte de différents éléments décrits dans la littérature ayant des caractéristiques plus au moins réductionnistes décrites. Ceci peut comporter soit des éléments cellulaires et leurs interactions moléculaires soit des processus ou un mix entre les deux.

L'événement causal primaire est l'inactivation du gène von Hippel-Lindau (VHL) par mutation, délétion, perte de chromosome 3p25 ou inactivation épigénétique. C'est le facteur causal dominant pour la progression de ces tumeurs dont la dépendance à divers régulateurs est grande. VHL participe, au sein du protéasome, à la dégradation de nombreuses molécules, et sa mutation entraîne une inhibition du mécanisme de dégradation. Les cibles majeures sous-jacentes sont les « hypoxia-inducible factors » HIF1/2 représentant une plaque tournante qui mets en jeu un grand nombre de cibles moléculaires secondaires en se liant à des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE). Au niveau cellulaire, cela affecte à la fois les cellules tumorales et les cellules du TME (endothéliales, fibroblastes, immunitaires). Au niveau subcellulaire, le métabolisme et la respiration mitochondriale sont également altérés. Cependant, les mécanismes causaux sont aussi

dépendants des conditions de fond « *background conditions* » qui sont représentées par un système immunitaire activé ou par un micro-environnement immunosuppresseur. La question soulevée est la dépendance de HIF aux « *background conditions* ». HIF-1 exerce des effets importants sur les macrophages. La situation n'est pas claire étant donné que l'activation of HIF-1 α via le pyruvate kinase M2 (PKM2) favorise la polarisation des macrophages M1 et contribue donc à un environnement inflammatoire. Comment alors des sous-types inflammatoires et immunosupprimés peuvent coexister et contribuer à classer les ccRCC en immunoactivés ou immunosuppresseurs ? Il y a donc certainement un/des facteurs additionnels contribuant à la sensibilité des macrophages à HIF-1. On peut spéculer que les macrophages immunosuppresseurs ont une sensibilité diminuée à HIF. A contrario, les macrophages immunoactivés auraient une sensibilité élevée à HIF. Ceci peut être testé expérimentalement. Au niveau moléculaire, les effecteurs sont multiples et incluent des facteurs de croissance (VEGF, FGFs PDGF, TGFs etc..), des cytokines et chimiokines (CXCL12, IL10, IL6, IL34 et...), des enzymes du métabolisme glycolytique et oxydatif (PFK, PKM2...).

Compte tenu de ces éléments, le graphique acyclique suivant illustre le chemin causal depuis la mutation VHL :

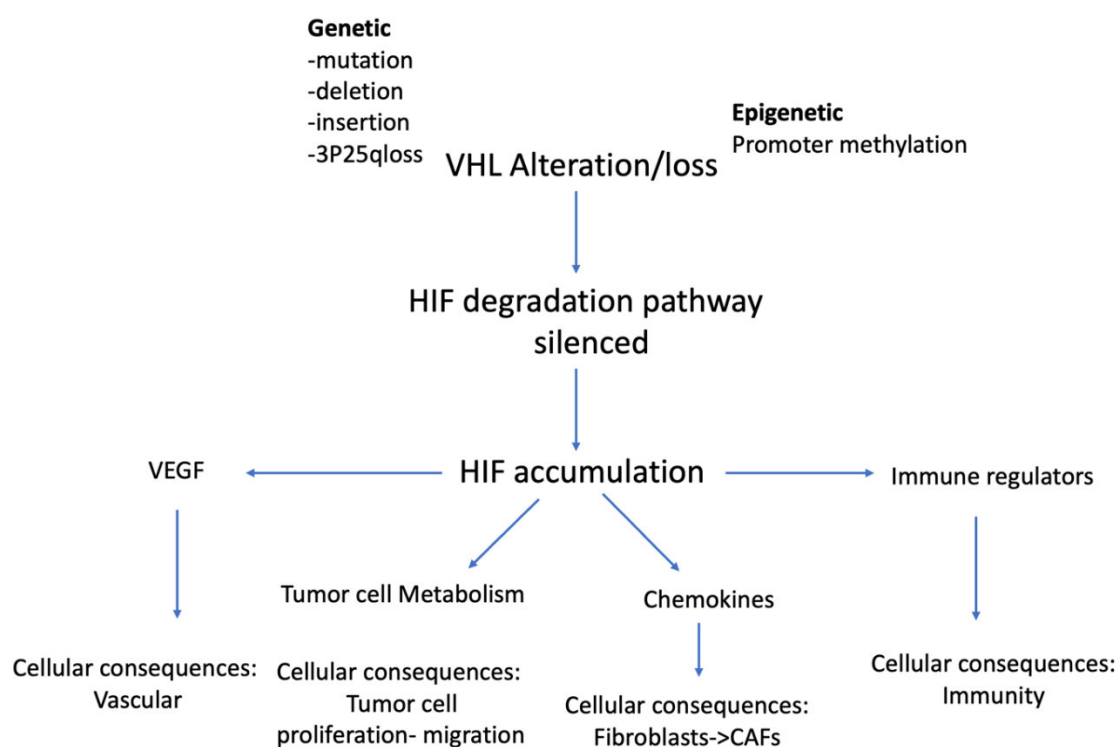


Fig.36 : Représentation graphique des interactions moléculaires et cellulaires du RCC

Néanmoins la dérégulation initiée au niveau de la cellule tumorale peut avoir des conséquences au niveau des cellules du TME représenté par des sous-réseaux causaux :

-Sous-réseau causal « Vasculaire »

Ce sous-réseau est sous la dépendance des facteurs angiogéniques dont principalement le VEGF A qui induit le bourgeonnement des vaisseaux sanguins. Néanmoins, il a des facteurs additionnels qui sont les facteurs de stabilisation/déstabilisation vasculaire ainsi que la fuite vasculaire. Ce sous-réseau fait appel à la communication entre les cellules de guidage (« TIP cells ») et les cellules du tronc (« stalk cells ») et implique une communication moléculaire entre VEGF-A-VEGFR2-DLL4-Notch1 selon le schéma suivant :

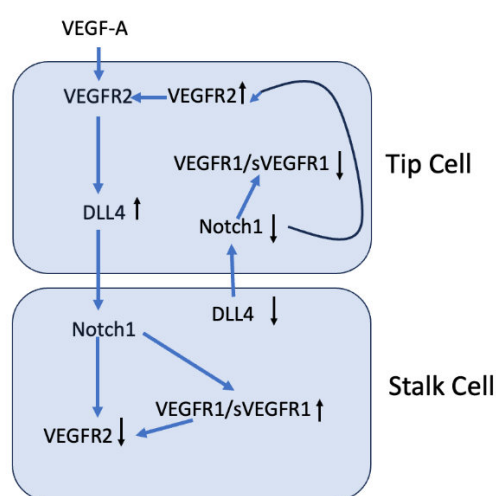


Fig. 37 : Interaction des cellules « TIP » et « Stalk » dans le vaisseau sanguin

Ce schéma combine deux phénomènes : l'activation moléculaire qui induit la signalisation et l'expression qui régule la concentration nette des molécules présentes. VEGF active le récepteur VEGFR2, mais le VEGFR2 activé augmente la concentration de DLL4 dans les cellules « TIP ». Ce DLL4 active ensuite NOTCH1 qui diminue à son tour la concentration de VEGFR2 dans les cellules « Stalk », mais augmente en même temps VEGFR1 et la forme soluble de VEGFR1. La diminution de la concentration de DLL4 dans les cellules « Stalk » réduit l'activation de Notch1 dans les cellules « TIP ». La diminution de l'activation de Notch1 entraîne ensuite une augmentation de la concentration de VEGFR2. Cette augmentation de la concentration de VEGFR2 dans les cellules « TIP » amène plus de molécules VEGFR2 à la surface cellulaire qui sont à leur tour activées par VEGF. En parallèle, la concentration en VEGFR1/sVEGFR1 diminue. On assiste donc à un schéma de régulation représentant une séquence causale composée de modules alternants d'activation et augmentation/diminution qui sont en même temps intégrés

dans le contexte d'interaction entre deux cellules. Les contextes moléculaires et cellulaires sont donc étroitement imbriqués et caractérisés par des événements microrégionaux.

Ce schéma est réductionniste, car il élimine des facteurs jugés non essentiels pour l'interaction « TIP » et « Stalk ». Un élément essentiel est que le phénotype vasculaire dans la tumeur rénale est poussé vers un le « TIP ». La relation entre cellules « TIP » et « Stalk » peut être représentée de manière suivante :

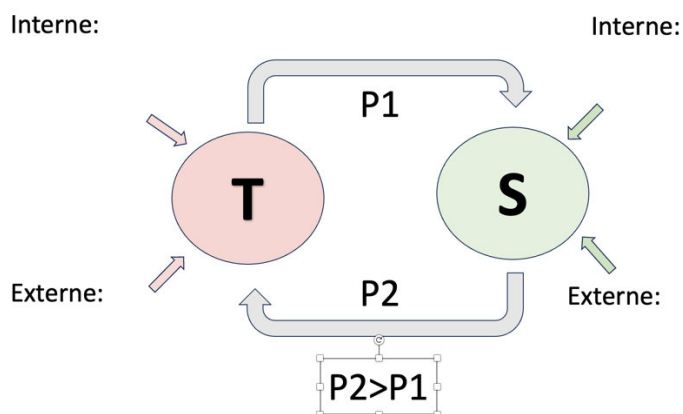


Fig. 38 : Schéma réductionniste de l'interaction cellule « TIP » et cellule « Stalk »

Il y aura donc une probabilité $P1 = p(S/T)$ qui est supérieure à $P2 = p(T/S)$. Des facteurs externes et internes influenceront la probabilité de l'état T ou S. Ceci est dû à une préférence pour la signalisation VEGF dans les cellules « TIP » et à une répression de la signalisation Notch1 dans les cellules « Stalk ». Des facteurs externes influencent également ce déséquilibre. Ces facteurs sont représentés par la couverture des cellules murales. Cette couverture est déstabilisée par divers systèmes moléculaires (Tie2 et PDGF principalement). La question de causalité est ici posée : est-ce que le « *primum movens* » est le VEGF et la déstabilisation par bourgeonnement ce qui entraîne secondairement la déstabilisation de la couverture murale ou est-ce que la dégradation de la couverture murale précède le bourgeonnement ? La troisième possibilité est que ces événements sont simultanés et nécessaires à la vascularisation tumorale.

-Sous réseau causal « métabolique »

Le métabolisme dans ce type de tumeurs concerne différents réseaux métaboliques. Glycolyse, métabolisme oxphos, métabolisme du glutamate et serine, et le métabolisme des acides gras.

La situation se complique par le fait que les circuits métaboliques semblent différents au niveau de la tumeur primaire et au niveau des métastases.

Les carcinomes rénaux à cellules claires (ccRCC) présentent une inhibition du cycle de Krebs (cycle de l'acide tricarboxylique TCA) *in vivo* et *ex vivo* comparé au tissu adjacent avec une activité diminuée de la chaîne de transport d'électrons et donc un métabolisme oxydatif diminué. Cependant, les métastases du ccRCC présentent de manière inattendue un métabolisme oxydatif stimulé par rapport à celui des ccRCC primaires, ce qui indique un programme métabolique divergent quand on compare le métabolisme de la tumeur primaire à des métastases. Ceci est validé dans des modèles expérimentaux et *in vivo* par des approches interventionnelles incluant le recyclage du NADH (qui stimule la formation des métastases ou l'inhibition du complexe I de la chaîne de transport d'électrons (qui inhibe les métastases). Il y a donc un « switch » entre métabolisme glycolytique et oxydatif qui est causal pour la formation des métastases²³¹.

Ceci peut être représenté comme suit :

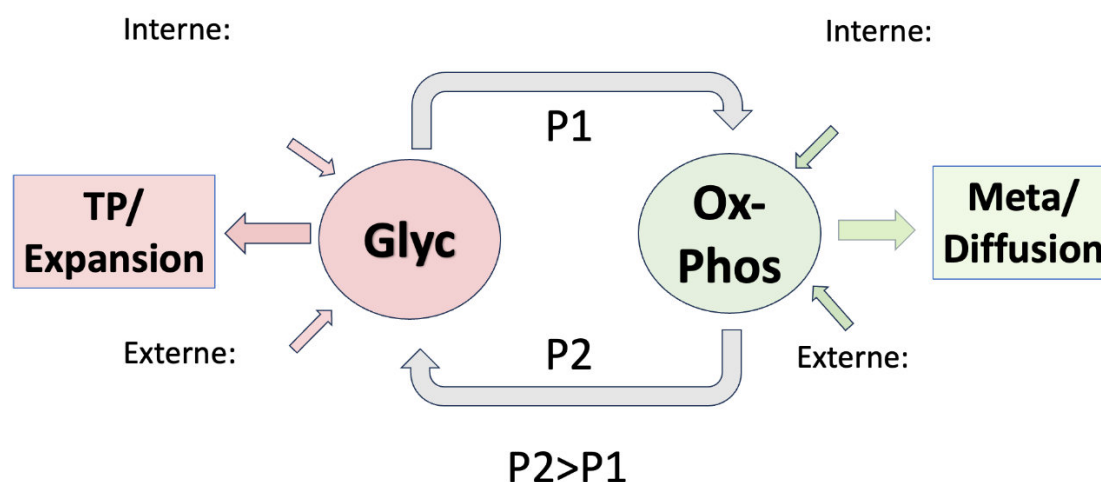


Fig.39 : Représentation schématique et réductionniste des facteurs métaboliques

On peut aussi déduire de ce schéma qu'après le processus de diffusion des cellules tumorales au cours du processus métastatique, que la lésion métastatique retourne à un métabolisme glycolytique pour promouvoir la croissance locale.

²³¹ Bezwada D et al. Mitochondrial complex I promotes kidney cancer metastasis Nature, 2024 633(8031): 923–931.

-Sous réseau causal « Stromal »

Le sous-réseau causal stromal fait appel à l'activation des fibroblastes en « *cancer-associated fibroblasts* » (CAFs). Ces CAFs sont générés grâce à l'interaction des fibroblastes avec des cellules VHL-mutées et en raison d'une stabilisation de HIF1. Cette stabilisation entraîne au niveau des fibroblastes une transformation en CAFs qui produit divers médiateurs (p.ex. : CXCL12, CXCL1, protéases, etc.) dont l'effet est d'augmenter l'effet sur l'angiogenèse et l'inflammation. On peut regarder ce système comme une sorte d'amplification de l'effet de la cellule tumorale sur le TME.

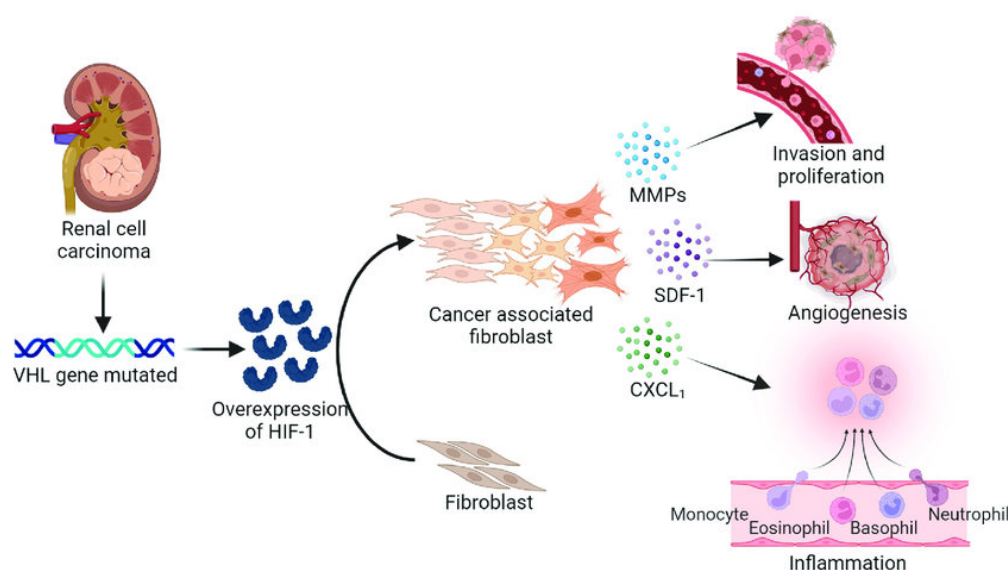


Fig. 40 : Rôle des CAFs dans le développement du RCC (figure de Monjaras-Avila et al.)²³². Permission de reproduire : « Creative Commons attribution ».

-Sous réseau causal immunitaire »

Ce sous-réseau est composé d'éléments d'immunité innée et adaptative. Il peut exister deux états au niveau du cancer du rein. Un état dit pro-inflammatoire et un état anti-inflammatoire. L'état pro-inflammatoire tente à limiter le développement tumoral. Il est composé de macrophages pro-inflammatoires, de cellules T cytotoxiques, de cellules dendritiques, des cellules T helper1, et bien sûr de cellules tumorales (Figure 41).

Les sous-groupes pronostiques et prédictifs de ccRCC, distincts sur le plan transcriptomique, peuvent être définis comme : 1) silencieux au niveau immunitaire, caractérisés par une faible infiltration immunitaire, une forte angiogenèse et un métabolisme altéré ; 2) activés

²³² Monjaras-Avila CU, Lorenzo-Leal AC, Luque-Badillo AC, et al. The Tumor Immune Microenvironment in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. International Journal of Molecular Sciences., 2023; 24(9):7946.

immunitairement, caractérisés par des infiltrats immunitaires pro-inflammatoires ; et 3) supprimés immunitairement, caractérisés par un milieu cellulaire globalement anti-inflammatoire. Les thérapies anti-VEGF, les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (ICI) et leurs combinaisons sont adaptées selon le profil immunitaire et angiogénique des tumeurs. Les anti-VEGF favorisent l'infiltration et l'activation immunitaires, tandis que la combinaison avec ICI stimule une réponse antitumorale plus active. Les micro-environnements tumoraux et les cibles cellulaires diffèrent selon chaque sous-groupe, notamment via l'action sur les CTL, Tregs, cellules tumorales ou d'autres cellules immunitaires. Outre l'inhibition de l'angiogenèse, les anti-VEGF peuvent aussi renforcer l'activité des CTL par divers mécanismes, incluant la normalisation vasculaire et l'inhibition de certaines cellules immunosuppressives.

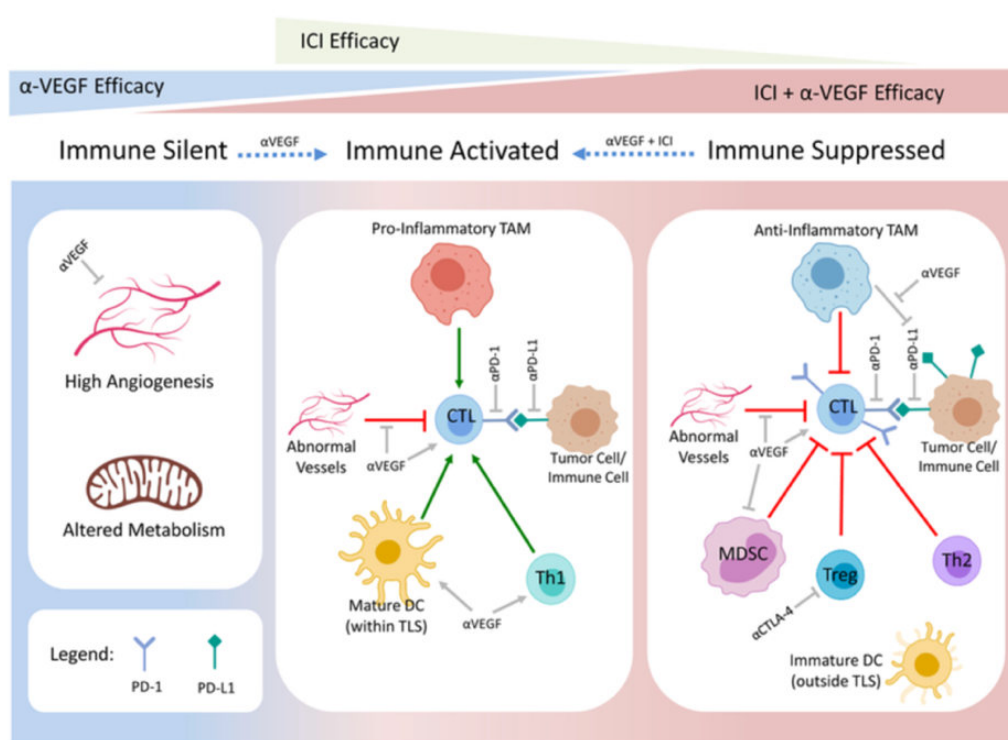


Fig. 41 : Immunité et cancer du rein (Figure de Vuong et al.)²³³

CTL, lymphocyte T cytotoxique ; TAM, macrophage associé à une tumeur ; DC, cellule dendritique ; Th1, T helper 1 ; Th2, T helper 2 ; Treg, cellules T régulatrices ; MDSC, cellule suppressive dérivée des myéloïdes ; TLS, structures lymphoïdes tertiaires ; aPD-1, anti-programmed cell death-1 ; aPD-L1, anti-programmed cell death-ligand 1 ; aVEGF, inhibiteurs du facteur de croissance endothélial vasculaire ; ICI, inhibiteurs de points de contrôle immunitaire. Permission de reproduire : « Copyright Clearance Center ».

²³³ Vuong L, Kotecha RR, Martin H, Voss MH, Hakimi AACancer Discov., 2019, 9 (10): 1349–1357.

6.3.2.2 Modélisation du ccRCC utilisant des SEM et probabilités conditionnelles

La formalisation mathématique, à partir des équations SEM et des probabilités, intègre les principaux sous-réseaux impliqués dans la tumorigenèse du ccRCC, partant de la mutation du gène VHL jusqu'aux effets sur le micro-environnement tumoral et la réponse immunitaire. L'approche SEM et probabiliste appliquée au ccRCC fournira un outil pour la modélisation causale multidimensionnelle, intégrant les différents modules (vasculaire, métabolique, stromal et immunitaire).

(1) Définition des variables et modules causaux

Les variables causales principales et leur définition :

- VHL : statut du gène VHL (0 : fonctionnel, 1 : inactivé)
- HIF : activation des facteurs HIF1/HIF2 (0 : basal, 1 : activé)
- Vasculaire (V) : activation du module angiogénique (ex. VEGF, Notch, DLL4, etc.)
- Métabolique (M) : état métabolique de la cellule tumorale (glycolytique, oxydatif, switch métabolique)
- Stromal (S) : activation des fibroblastes associés au cancer (CAFs) et production de médiateurs
- Immunitaire (I) : état du micro-environnement immunitaire (pro-inflammatoire, immunosuppresseur)
- Microenvironnement tumoral (TME) : état global du micro-environnement, résultant des modules précédents
- Phénotype tumoral (P) : progression, métastase, réponse thérapeutique

Certaines variables, comme le statut immunitaire des macrophages, sont latentes et modulées par l'interaction de plusieurs modules.

(2) Construction du modèle par équations structurelles (SEM)

La propagation causale peut être formalisée par un modèle SEM où chaque variable dépend d'un ensemble de prédicteurs, selon des équations structurelles linéaires ou non linéaires. Les relations principales sont :

- Activation HIF :

$$\text{HIF} = f_1(\text{VHL}) + \varepsilon_{\text{HIF}}$$

où f_1 représente la fonction d'activation (ex : $\text{HIF} = \text{VHL} - 1$ pour une inactivation complète), et ε_{HIF} le bruit aléatoire

- Module vasculaire :

$$\text{V} = f_2(\text{HIF}, \text{facteurs externes}, \text{S}) + \varepsilon_{\text{V}}$$

f_2 intègre l'impact de HIF (via VEGF), la communication Tip/Stalk, et la contribution stromale

- Module métabolique :

$$\text{M} = f_3(\text{HIF}, \text{VHL}, \text{TME}, \text{état métastatique}) + \varepsilon_{\text{M}}$$

Permet de modéliser le switch glycolytique/oxydatif, avec rétroaction du statut métastatique

- Module stromal :

$$S = f_4(\text{HIF, interactions tumorales, V}) + \varepsilon_S$$

Transformation des fibroblastes en CAFs sous l'effet de HIF et de signaux angiogéniques

• Module immunitaire :

$$I = f_5(\text{HIF, S, V, M, conditions de fond}) + \varepsilon_I$$

Capture la polarisation des macrophages, l'équilibre pro-/anti-inflammatoire, et la rétroaction du métabolisme

• Microenvironnement tumoral global :

$$\text{TME} = f_6(\text{V, M, S, I}) + \varepsilon_{\text{TME}}$$

• Phénotype tumoral final :

$$P = f_7(\text{TME, M, interventions thérapeutiques}) + \varepsilon_P$$

Chaque f_i peut être spécifiée par des fonctions linéaires, logistiques ou d'autres formes.

(3) Représentation des probabilités conditionnelles et interactions modulaires

La probabilité d'un phénotype tumoral agressif ($P=1$) s'exprime :

$$P(P=1 \mid \text{VHL, HIF, V, M, S, I}) = P(P=1 \mid \text{TME, M}) \times P(\text{TME} \mid \text{V, M, S, I}) \times \dots \times P(\text{HIF} \mid \text{VHL})$$

Les dépendances conditionnelles entre modules peuvent être visualisées par un DAG, avec des connexions unidirectionnelles entre nœuds représentés par des variables. Les variables latentes (p.ex. : sensibilité des vaisseaux aux cytokines et facteurs de croissance, polarisation macrophagique, sensibilité à HIF, activation des intégrines etc.) sont représentées par des nœuds spécifiques, non directement observables, mais inférées.

Le modèle permet également d'exprimer des scénarios d'intervention (do-calculus) : l'effet d'une inhibition pharmacologique de HIF ou d'une stimulation du métabolisme oxydatif sur la probabilité d'apparition de métastases, sous forme de :

$$P(P=1 \mid \text{do}(\text{HIF}=0)) \text{ ou } P(P=1 \mid \text{do}(\text{M}=\text{oxydatif}))$$

(4) Schéma d'intégration causale des modules

Ci-dessous, une représentation schématique (DAG) des dépendances causales majeures :

- $\text{VHL} \rightarrow \text{HIF} \rightarrow \text{V, M, S, I}$
- $\text{V, M, S, I} \rightarrow \text{TME} \rightarrow \text{P}$
- Interactions croisées : $\text{S} \leftrightarrow \text{V}$ (CAF/angiogenèse), $\text{M} \leftrightarrow \text{I}$ (métabolisme/immunité), $\text{I} \leftrightarrow \text{S}$ (CAF/inflammation)

Ce schéma formalise la propagation causale depuis la mutation VHL jusqu'aux effets sur le micro-environnement tumoral et la réponse immunitaire, en intégrant les rétroactions et variables latentes. Ce DAG est compatible avec schéma général accepté décrit dans la partie « Analyse causale du sous-type ccRCC (6.3.2.1) ».

(5) Validation expérimentale potentielle

La formalisation proposée permet de générer des hypothèses testables : Comment, par exemple, l'hypoxie agit-elle sur l'immunité et comment ceci est médié (p.ex. des CAF), et quel est l'effet des interventions à ce niveau sur la capacité de la tumeur de former des métastases ? Comment la modulation du métabolisme agit-elle sur l'état immunitaire et vasculaire et quel est l'effet des interventions à ce niveau ?

Un problème est l'estimation des coefficients de voie du SEM. Les approches existantes ont toutes des défauts (estimation à partir des expériences *in vitro*, des données multiomiques, effet des interventions sur un réseau causal, etc.). Tout cela a donc des limitations et constitue une solution utile, mais imparfaite. Il y a certainement présence de variables latentes non directement observables, dont la valeur à l'intérieur du réseau causal peut être déduite.

6.3.3 Analyse causale générale - ccRCC

Nous avons donc différents modules qui sont associés au carcinome rénal, mais qui doivent avoir des interactions causales. La question est de savoir s'il y a une structuration hiérarchique entre ces différents modules. Comment ces différents modules sont-ils activés et s'il y a des séquences d'activation ? Une autre façon de raisonner est qu'il y ait une simultanéité de l'activité de ces différents modules. Font-ils partie d'un fromage causal (« *causal pie* ») composé de causes nécessaires, mais non suffisantes ? Prenons pour exemple le métabolisme. Le blocage de la chaîne respiratoire ou la stimulation par le NADH inhibe ou stimule le processus métastatique. Ceci est certainement une cause nécessaire, mais est-elle suffisante ? De même, si on stimule encore plus le métabolisme oxphos par NADH et on voit une augmentation de la formation des métastases, est-ce un argument suffisant pour dire que c'est une cause suffisante ? Quand nous analysons chacun des modules comme l'angiogenèse ou la réaction stromale ou immunitaire, nous arrivons à la même conclusion.

Nous avons ci-dessous représenté ces différentes situations dans la figure suivante :

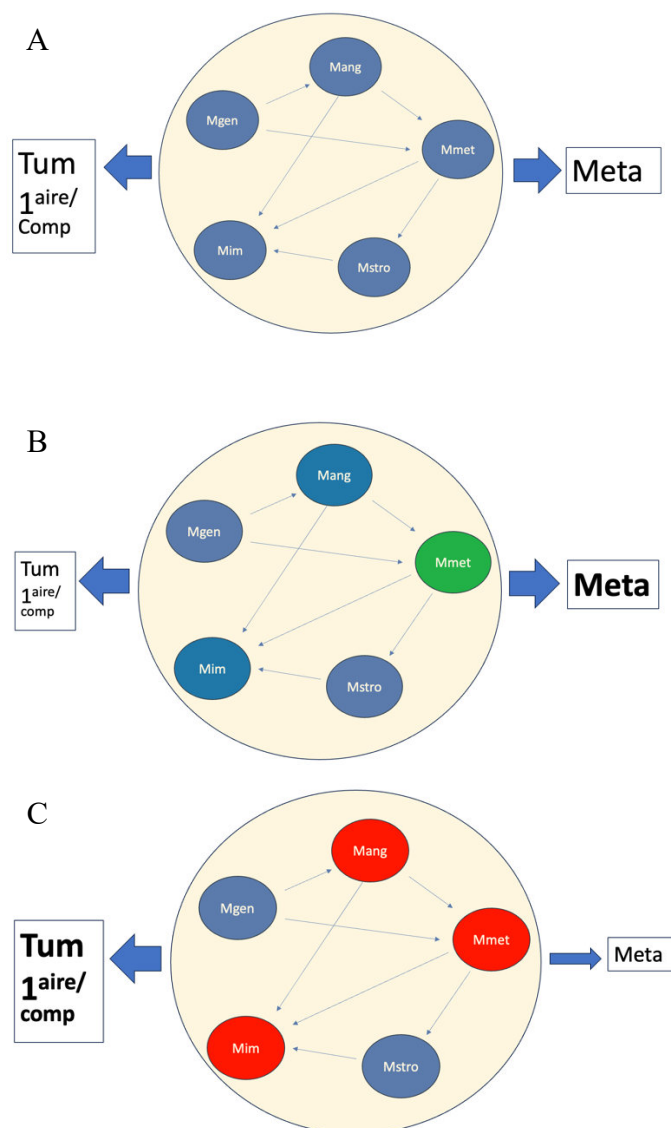


Fig.42. Analyse causale incluant différents modules et leurs interactions. Des interactions potentielles sont illustrées avec des flèches. A, les différents modules sont « neutre » l'un vers l'autre ce qui résulte en équilibre c.a.d. absence de favoriser la compaction (comme dans la tumeur primaire) ou la diffusion métastatique. B, le métabolisme des cellules tumorale passe en oxphos, ce qui donne le signal de diffusion et la formation des métastases. L'angiogenèse est réduite, l'infiltration immunitaire est plutôt diminuée (tumeur froide) ainsi que la réaction stromale. C, le métabolisme est glycolytique, l'angiogenèse est importante ainsi que l'infiltration immunitaire qui est plutôt immunosuppressive
Mang, Module Angiogenèse ; Mgen, module génétique-moléculaire ; Mstro, module stromal ; Mmet, module métabolisme ; Mim, module immunitaire.

Pour modéliser les interactions causales entre les principaux modules impliqués dans le carcinome rénal—le métabolisme (M), l'angiogenèse (A), la réaction stromale (S) et l'immunité (I)—on considère chaque module comme une variable aléatoire représentant son état d'activation (activé ou non).

La probabilité d'apparition d'une métastase, notée $P(\text{Met} \mid M, A, S, I)$, dépend alors de la configuration des modules. Deux approches principales permettent de formaliser cette relation :

(i) Modèle de causes indépendantes (simultanéité)

Dans cette logique, chaque module agit indépendamment des autres pour augmenter le risque de métastase. La probabilité que la progression métastatique survienne alors que les modules sont activés s'exprime ainsi :

$$P(\text{Met} \mid M, A, S, I) = 1 - \prod_{j \in \{M, A, S, I\}} [1 - P(\text{Met} \mid j)]$$

Chaque module constitue une cause nécessaire, mais non suffisante : l'activation individuelle n'entraîne pas à elle seule la progression, mais la combinaison de plusieurs modules activés élève le risque de façon cumulative.

(ii) Modèle hiérarchique (dépendances conditionnelles)

Dans ce modèle, le fonctionnement d'un module peut dépendre de l'état d'un ou plusieurs autres modules. Par exemple, l'angiogenèse peut être conditionnée par l'activation du métabolisme, par la réponse immunitaire ou par la transformation stromale (p.ex. Fibroblastes → CAFs). Les probabilités conditionnelles reflètent ces dépendances :

$$P(A|M) \neq P(A), P(S|A,M) \neq P(S), P(M|A,I) \neq P(M), P(I|A,M) \neq P(I), \text{ etc.}$$

La probabilité de progression métastatique devient alors :

$$P(\text{Met}|M, A, S, I) = \sum_{\text{config}} P(\text{Met}|\text{config}) \times P(\text{config})$$

Ici, on somme sur toutes les configurations possibles des états des modules, en prenant en compte la probabilité spécifique de progression pour chaque configuration, pondérée par la probabilité d'observer cette configuration.

- Cette formalisation probabiliste permet de quantifier précisément l'impact individuel et combiné des différents modules dans la dynamique tumorale.
- Elle offre un cadre flexible pour intégrer les relations de causalité linéaires, hiérarchiques ou simultanées et pour tester l'importance relative de chaque module et de leurs interactions sur le risque de progression métastatique.

6.3.4 Article 5 : Le rôle de IL34 dans l'invasion du RCC

L'interleukine-34 régule le développement des cellules phagocytaires mononucléaires dans la moelle osseuse. Dans les tumeurs, l'IL34 peut exercer des fonctions pléiotropes en fonction du contexte cellulaire et moléculaire^{234 235}. Quatre récepteurs différents pour cette cytokine ont été décrits (CSF1R, TREM2, Syndecan-1 et PTP-ζ), et ils activent des voies de signalisation distinctes²³⁶. Par exemple, dans les cancers du poumon et du côlon, l'IL34 soutient la croissance tumorale en favorisant la prolifération et la survie des cellules cancéreuses par l'activation du CSF1R²³⁷, tandis que dans les cellules du glioblastome, l'IL34 inhibe leur prolifération par

²³⁴ Auffray C, Sieweke, MH and Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *An Rev Immunol.*, 2009, 27: 669–692.

²³⁵ Franzè, E. et al. Role of Interleukin-34 in Cancer. *Cancers*, 2020, 12(1): 252.

²³⁶ Baghdadi M, Umeyama, Y, et al. Interleukin-34, a comprehensive review. *J Leukoc Biol.* 2018, 104(5): 931-951.

²³⁷ Baghdadi M. et al. Chemotherapy-induced IL34 enhances immunosuppression by tumor-associated macrophages and mediates survival of chemoresistant lung cancer cells. *Cancer Research*, 2016, 76(20): 6030–6042.

l'activation du PTP- ζ ²³⁸. L'expression de l'IL34 est hétérogène selon les types de cancer, et des taux élevés d'IL34 peuvent représenter soit un facteur de mauvais pronostic (c'est-à-dire dans les cancers du foie et du poumon) ²³⁹, soit un facteur favorable (c'est-à-dire dans les cancers du col de l'utérus ou de la tête et du cou, voir « résumé pronostique » de l'IL34 sur www.proteinatlas.org). En ce qui concerne le RCC, la fonction de l'IL34 n'a jamais été décrite. Dans ce travail, nous avons entrepris différentes approches pour étudier le rôle de l'IL34 dans la biologie et la réponse thérapeutique du RCC.

Résumé de l'article 5

Targeting the IL34-CSF1R axis improves metastatic renal cell carcinoma therapy outcome via immune-vascular crosstalk regulation.

Emanuelli A, Souleyreau W, Chouleur T, Boeckx B, Pobiedonoscew Y, Cooley L, Derieppe MA, Martineau J, Ambrosetti D, Bernhard JC, Sawai CM, Lambrechts D, Mathivet T, Bikfalvi A. *iScience*. 2025 May 26;28(6):112752. doi: 10.1016/j.isci.2025.112752 **L'Article complet est inclus en Annexe**

Il est nécessaire d'identifier et de valider des biomarqueurs et de mieux comprendre les mécanismes responsables de la résistance thérapeutique. Nous démontrons ici que l'interleukine-34 (IL34) est associée à un pronostic défavorable, à la survenue de métastases et à la résistance aux traitements dans le RCC. Chez la souris, le séquençage d'ARN à cellule unique par l'approche « nucléaire » (snRNAseq) et la caractérisation des phénotypes révèlent que le micro-environnement tumoral enrichi en IL34 présente une immunosuppression et une vascularisation non fonctionnelle, deux caractéristiques clés de la résistance thérapeutique.

Sur le plan mécanistique, l'IL34 augmente la migration des macrophages associés aux tumeurs dérivées de monocytes (MD-TAM) dans les tumeurs primitives et les métastases pulmonaires via le récepteur du facteur stimulant les colonies 1 (CSF1R). Le blocage du CSF1R par le médicament pexidartinib, approuvé par la FDA, s'oppose à l'accumulation de MD-TAM observée dans le micro-environnement enrichi en IL34 et améliore la réponse au sunitinib ou au traitement anti-PD1 en réduisant la croissance métastatique. Dans l'ensemble, les données mettent en lumière le rôle de l'axe IL34-CSF1R dans la régulation du dialogue immuno-vasculaire tumoral dans le RCC et indiquent que le pexidartinib constitue une alternative thérapeutique en association avec les traitements actuels.

²³⁸ Nandi, S. et al. Receptor-type protein-tyrosine phosphatase ζ is a functional receptor for interleukin-34. *J Biol Chem.*, 2013, 288(30): 21972–21986.

²³⁹ Baghdadi, M., Endo, H., et al. (2018) 'High coexpression of IL-34 and M-CSF correlates with tumor progression and poor survival in lung cancers', *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 418.

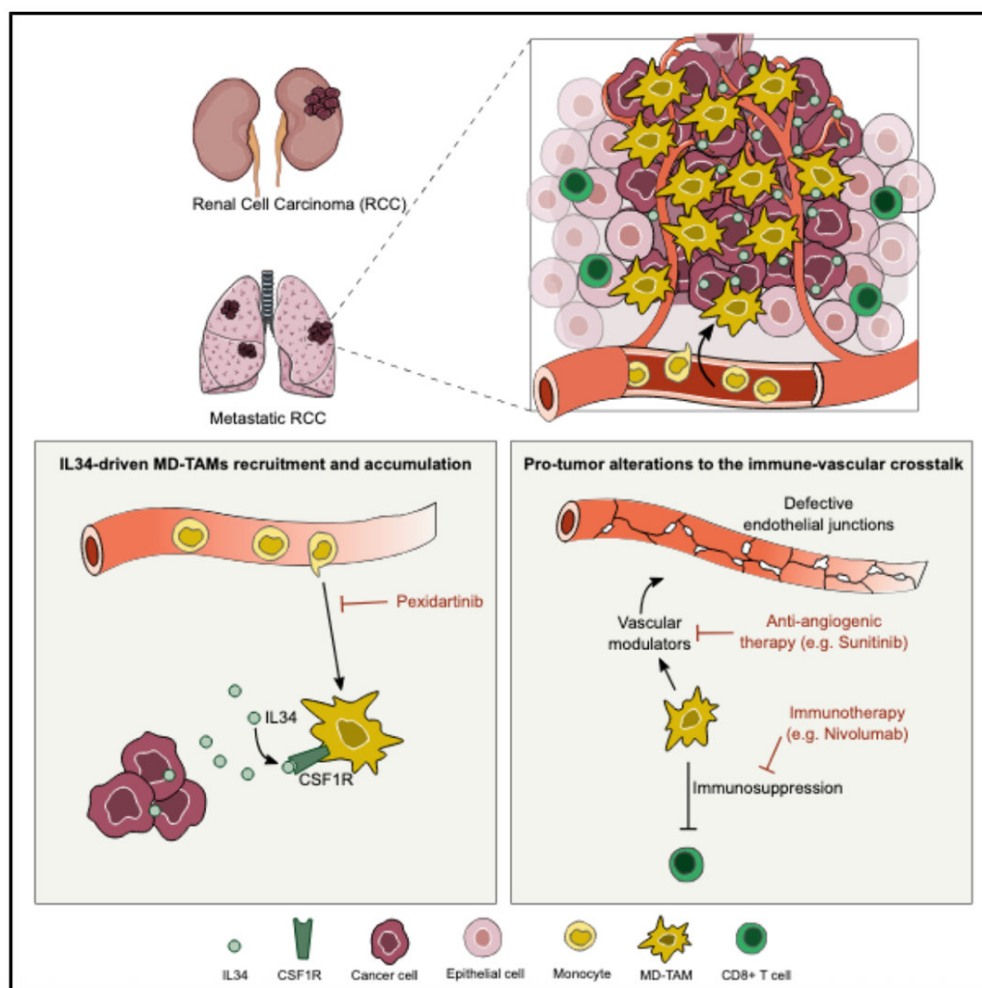
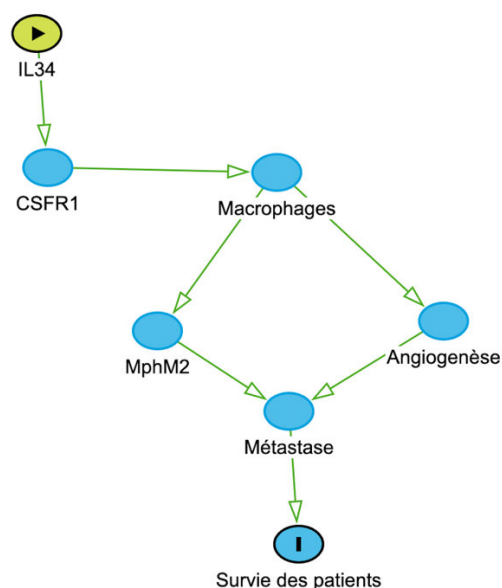


Fig.43 : Résumé graphique

6.3.4.1 Analyse causale relative à l'article 5

Ce travail montre que IL34 joue un rôle causal dans le développement du cancer du rein. Cet effet peut être décrit comme suit :

IL34 stimule CSF1R au niveau des macrophages qui sont attirés, et cela a pour conséquence d'altérer la réponse immunitaire et la vascularisation en induisant l'immunosuppression et l'angiogenèse. Par ailleurs, l'interaction IL34 et CSFR1 est importante au niveau causal, car le blocage de cette interaction empêche l'accumulation de ces macrophages et améliore la réponse thérapeutique. Ceci permet de formuler le DAG suivant :



exposure(s) IL34

outcome(s) Survie des patients

covariates 5

causal paths 2

Exposure: IL34

Outcome: Survie des patients

No open biasing paths.

No adjustment is necessary to estimate the total effect of IL34 on “Survie des patients”.

Ce DAG a 6 « covariates » et deux chemins causaux.

Dans la formulation avec des coefficients de voie et SEM cela donne :

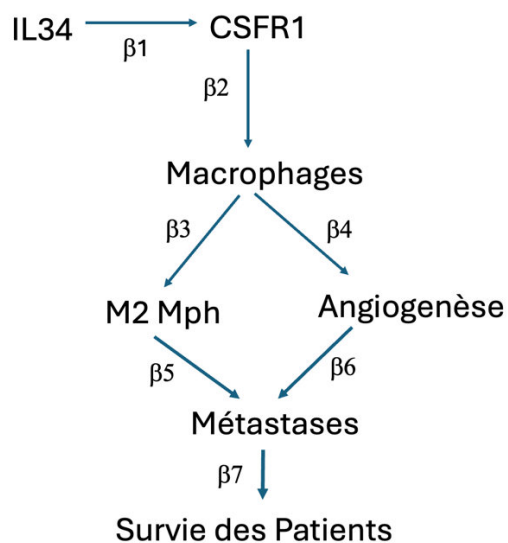


Fig. 44 : Les deux DAGs concernant l’effet causal de IL34 sur la formation des métastases et la survie des patients. **En haut**, DAG réalisé avec DAGGITY. **En bas**, DAG avec β_1 - β_7 représentent les coefficients de voie (« path coefficients »)

$$CSFR1 = \beta_1 IL34 + \epsilon\{CSFR1\}$$

$$Mph = \beta_2 CSFR1 + \epsilon\{Mph\}$$

$$MphM2 = \beta_3 Mph + \epsilon\{Mph\}$$

$$Angio = \beta_4 Mph + \epsilon\{Angio\}$$

$$Meta1 = \beta_5 Mph + \epsilon\{Meta1\}$$

$$Meta2 = \beta_6 Angio + \epsilon\{Meta2\}$$

$$MetaC = \{\beta_5 Mph + \epsilon\{Meta1\}\} + \{\beta_6 Angio + \epsilon\{Meta2\}\}$$

$$dPS = \beta_7 MetaC + \epsilon\{dPS\}$$

$$dPS = \beta_7 \{ \beta_5 Mph + \epsilon \{ Meta1 \} + \{ \beta_6 Angio + \epsilon \{ Meta2 \} + \epsilon \{ dPS \} \}$$

$$PS = 1 - dPS$$

Variable dépendante	Variables explicatives	Formule	Interprétation
CSFR1	IL34	$CSFR1 = \beta_1 \times IL34 + \epsilon \{ CSFR1 \}$	Effet de IL34 sur CSFR1
Mph	CSFR1	$Mph = \beta_2 \times CSFR1 + \epsilon \{ Mph \}$	Influence de CSFR1 sur les macrophages
MphM2	Mph	$MphM2 = \beta_3 \times Mph + \epsilon \{ Mph \}$	Différenciation des macrophages en MphM2
Angio	Mph	$Angio = \beta_4 \times Mph + \epsilon \{ Angio \}$	Impact des macrophages sur l'angiogenèse
Meta1	Mph	$Meta1 = \beta_5 \times Mph + \epsilon \{ Meta1 \}$	Effet des macrophages sur la métastase (voie 1)
Meta2	Angio	$Meta2 = \beta_6 \times Angio + \epsilon \{ Meta2 \}$	Effet de l'angiogenèse sur la métastase (voie 2)
MetaC	Meta1, Meta2	$MetaC = \{ \beta_5 \times Mph + \epsilon \{ Meta1 \} \} + \{ \beta_6 \times Angio + \epsilon \{ Meta2 \} \}$	Combinaison des deux voies vers la métastase
dPS (Survie)	MetaC	$dPS = \beta_7 \times MetaC + \epsilon \{ dPS \}$	Diminution de la survie selon la progression métastatique
dPS et PS (détaillé)	Mph, Angio	$dPS = \beta_7 \{ \beta_5 \times Mph + \epsilon \{ Meta1 \} \} + \{ \beta_6 \times Angio + \epsilon \{ Meta2 \} \} + \epsilon \{ dPS \}$ $PS = 1 - dPS$	Effet global des différentes voies sur la survie

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des variables, formules et interprétation

Pour formaliser le rôle causal de l'IL34 dans la progression du RCC en utilisant la « *causal toolbox* » :

- Expression de l'IL34 : IL34, niveau d'expression d'IL34 dans le tissu tumoral.
- Stade tumoral : T, paramètre de classification du RCC (par exemple, TNM).
- Incidence métastatique : M, présence ou absence de métastases à distance.
- Survie du patient : PS, durée de survie globale ou sans progression.
- Diminution de la survie : dPS
- Abondance des MD-TAM : MD_TAM, population des macrophages associés à la tumeur dérivée des monocytes.
- Immunité tumorale : Immu, niveau d'activité immunitaire antitumorale.
- Vascularisation tumorale : Vasc, densité ou activité vasculaire dans le TME.

- Traitement thérapeutique : Tx, administration de Sunitinib, anti-PD1, ou Pexidartinib.

1. Effet de l'IL34 sur le TME

$$MD\_TAM = f_1(IL34)$$

$$Immu = f_2(MD\_TAM, IL34)$$

$$Vasc = f_3(MD\_TAM, IL34)$$

2. Impact sur la progression et la survie

$$T = f_4(IL34, MD\_TAM, Immu, Vasc)$$

$$M = f_5(IL34, MD\_TAM, Immu, Vasc)$$

$$dPS = f_6(T, M, Tx)$$

3. Effet du blocage IL34/CSF1R

$$MD\_TAM\_ \{Tx\} = MD\_TAM - g_1(Pexidartinib)$$

$$Immu\_ \{Tx\} = Immu + g_2(Pexidartinib)$$

$$dPS\_ \{Tx\} = dS + g_3(Pexidartinib, Sunitinib, anti-PD1)$$

4. Modélisation causale simplifiée

On peut représenter ces relations sous forme de coefficients de voie (*path coefficients*) :

- β_1 : effet de IL34 sur MD_TAM
- β_2 : effet de MD_TAM sur Immu
- β_3 : effet de MD_TAM sur Vasc
- β_4 : effet combiné sur la progression tumorale (T, M)
- β_5 : effet des traitements sur le TME et la survie

On aura par exemple :

$$MD\_TAM = \beta_1 \times IL34 + \varepsilon_1$$

$$Immu = \beta_2 \times MD\_TAM + \varepsilon_2$$

$$Vasc = \beta_3 \times MD\_TAM + \varepsilon_3$$

$$T = \beta_{41} \times IL34 + \beta_{42} \times MD\_TAM + \beta_{43} \times Immu + \beta_{44} \times Vasc + \varepsilon_4$$

$$M = \beta_{51} \times IL34 + \beta_{52} \times MD\_TAM + \beta_{53} \times Immu + \beta_{54} \times Vasc + \varepsilon_5$$

$$dPS = \beta_{61} \times T + \beta_{62} \times M + \beta_{63} \times Tx + \varepsilon_6$$

Le blocage pharmacologique (Pexidartinib) :

$$MD\_TAM\_ \{Tx\} = MD\_TAM - \beta_7 \times Pexidartinib + \varepsilon_7$$

$$Immu\_ \{Tx\} = Immu + \beta_8 \times Pexidartinib + \varepsilon_8$$

$$dPS\{Tx\} = Sv + \beta_{91} \times Pexidartinib + \beta_{92} \times Sunitinib + \beta_{93} \times anti-PD1 + \varepsilon_9$$

$$PS = 1 - dPS$$

Dans cette analyse, nous n'avons pas tenu compte de la production de IL34 par des cellules tumorales, étant donné que la production de IL34 par les cellules tumorales a été considérée comme implicite.

6.4 Discussion générale : Causalité et Microenvironnement Tumoral

Le thème général décrit dans cette thèse est de confronter le concept de causalité à la science du cancer en prenant comme focus le micro-environnement tumoral. Nous n'avons pas traité l'exposome, même s'il est connu qu'il peut interférer avec le micro-environnement tumoral.

Pour l'identification de mécanismes causaux, nous avons pris deux types de tumeurs. Une tumeur à expansion locale et locorégionale, mais confinée à un territoire tissulaire et une autre tumeur à expansion locale, locorégionale et métastatique touchant de multiples organes. Les mécanismes moléculaires de ces deux types de tumeurs sont différents, mais il y a quand même des thèmes qui sont présents dans les deux types de tumeurs. Ces thèmes sont représentés par l'angiogenèse, le système immunitaire, la réaction stromale, le métabolisme et la dynamique du processus tumoral (binarité Compaction / Diffusion).

Différents points sont à considérer :

(1) Difficultés de validation des schémas causaux

Pour modéliser ces deux types de tumeurs nous avons fait appel à des graphiques acycliques d'une part et d'autres parts à une présentation de différents scénarios (ou modes) dont la probabilité est variable. Dans le cas des graphiques acycliques, la force de l'interaction est représentée par le coefficient de voie qui n'est rien d'autre qu'une probabilité associant deux événements/variables. Ces graphiques permettent de fournir une information sur la spécificité des réseaux causaux pour un certain type de tumeur comme nous l'avons vu pour les tumeurs cérébrales et le carcinome rénal. Il est difficile de clairement associer une valeur de probabilité dérivée du coefficient de régression. Le coefficient de régression peut être déterminé expérimentalement, mais ceci pose le problème du réductionnisme. On peut très bien mesurer le coefficient de voie par des expériences *in vitro*, mais, dans ce cas, on isole l'interaction de son environnement complexe *in vivo* et ceci peut aboutir à une erreur dans la mesure du coefficient de voie.

(2) Comparaison entre tumeurs cérébrales et carcinomes rénaux

Pour ces deux types de tumeurs, de grandes différences existent sur le plan du comportement phénotypique, des voies de signalisation, des régulations moléculaires et des interactions avec le TME. Cependant, ces deux types de tumeurs partagent la binarité « croissance-expansion/compaction » et « diffusion ». La dernière reflète le processus invasif (pour tumeurs cérébrales et carcinome rénal) et métastatique (pour carcinome rénal). Il y a donc une binarité

qui est sous la dépendance de mécanismes similaires de contrôle. Il y a bascule entre deux états (CEC, D) ou deux séquences de basculement (BR et BL).

Les séquences peuvent avoir différentes configurations et permutations en fonction des facteurs et contraintes extérieures (nature de la matrice et sa rigidité, présence de gradients de cytokines et facteurs de croissance, nature et hétérogénéité du TME, interventions thérapeutiques, etc.).

En dehors du fait d'avoir déterminé les deux états et défini les séquences de basculement, il faut attribuer à chaque état ou séquence de basculement une probabilité ou un coefficient de voie et prendre en compte les facteurs modulateurs. On pourra alors simuler les séquences possibles pour prédire la trajectoire tumorale sous différents scénarios.

> On peut modéliser ceci de manière suivante :

$P(\text{CEC} \rightarrow \text{D}) = f(\beta, \text{facteurs moléculaires, environnementaux, thérapeutiques})$

$P(\text{D} \rightarrow \text{CEC}) = g(\beta, \text{facteurs moléculaires, environnementaux, thérapeutiques})$

$P(\text{BR} \rightarrow \text{BL}) = h(\beta, \text{facteurs moléculaires, environnementaux, thérapeutiques})$

$P(\text{BL} \rightarrow \text{BR}) = i(\beta, \text{facteurs moléculaires, environnementaux, thérapeutiques})$

β désigne le coefficient de voie, qui mesure l'intensité de l'interaction entre les événements ($0 < \beta < 1$) et f, g, h et i servent à modéliser la probabilité de transition en fonction de plusieurs paramètres. CEC désigne l'état de « croissance-expansion/compaction », et D l'état de « Diffusion ».

D'une manière plus détaillée :

Ces bascules surviennent à des temporalités différentes et divers scénarios sont possibles :

1-Alternance entre états

On peut modéliser cette alternance entre « croissance-expansion/compaction » (CEC) et « Diffusion » (D) à l'aide de deux variables binaires, chacune représentant un état à chaque transition.

Soit :

- X_k : la variable représentant l'état à la k^{e} transition ($X_k = 0$ pour CEC, $X_k = 1$ pour D).
- n : le nombre total de transitions observées.

L'ensemble des séquences possibles sur n transitions est alors constitué de toutes les combinaisons de 0 et 1, soit 2^n séquences distinctes. Cela se traduit par :

Nombre total de séquences :

Nombre total = 2^n

Si l'on souhaite fixer le nombre d'occurrences de chaque état (par exemple, k transitions en CEC et $n-k$ en D), le nombre de permutations uniques devient :

Nombre de séquences avec k états CEC et n-k états D :

Nombre fixe = $C(n, k) = n! / [k! (n-k)!]$

On peut ensuite introduire une chaîne de Markov binaire où la probabilité de passer d'un état à l'autre est donnée par :

$P(X_{k+1} = j | X_k = i)$, où $i, j \in \{0 \text{ (CEC)}, 1 \text{ (D)}\}$

Ainsi, la dynamique de la tumeur peut être représentée par l'évolution de cette variable binaire X au fil des transitions, modélisant tour à tour les épisodes de croissance locale et de diffusion/métastase, et permettant d'analyser la fréquence, l'ordre, ou les conditions de bascule entre ces deux états.

2-Alternance entre séquences de basculements rapides et lents

Soit BR le basculement rapide et BL le basculement lent, on peut avoir un nombre important de combinaisons avec un n important :

BR-BL-BR-BL-; BR-BL-BL-BR-; BR-BR-BL-BR- ...etc. →

Pour modéliser mathématiquement les alternances entre basculements rapides (BR) et basculements lents (BL), on considère une chaîne de transitions sur n étapes, où chaque étape correspond soit à un BR, soit à un BL. Ce système peut être traité comme une chaîne binaire, ou par une approche combinatoire avec des permutations binaires.

-Représentation des états et des séquences

Chaque séquence de n transitions est une combinaison ordonnée de ces deux états, soit une suite $(X_1, X_2, \dots, X_n)$ où $X_k \in \{BR, BL\}$.

-Nombre total de séquences binaires

À chaque étape, on a 2 choix indépendants : BR ou BL.

- Nombre total de séquences : 2^n

Ce total inclut toutes les alternances possibles entre BR et BL, des suites uniformes (BR-BR-BR...) aux alternances parfaites (BR-BL-BR-BL...).

-Contraintes sur les occurrences : alternance spécifique

Si l'on impose un nombre précis de basculements rapides k et de basculements lents (n-k), alors le nombre de séquences distinctes est :

- Nombre de séquences avec k BR et (n-k) BL : $C(n, k) = n! / [k! (n-k)!]$

Cette formule donne la quantité de permutations uniques selon la répartition des états BR et BL.

-Modélisation (chaîne de Markov) :

On introduit la probabilité de passer d'un état à l'autre :

- $P(X_{k+1} = BR \mid X_k = BR) = p_1$
- $P(X_{k+1} = BL \mid X_k = BR) = 1 - p_1$
- $P(X_{k+1} = BL \mid X_k = BL) = p_2$
- $P(X_{k+1} = BR \mid X_k = BL) = 1 - p_2$

Ce modèle permet d'étudier la dynamique des alternances, en analysant la fréquence des transitions $BR \rightarrow BL$ et $BL \rightarrow BR$, ainsi que la durée moyenne passée dans chaque état.

Supposons que l'on observe un système sur 10 transitions, et que la probabilité d'alternance soit élevée (par exemple, $p_1 \approx 0,2$ et $p_2 \approx 0,8$). On peut alors simuler ou calculer la fréquence attendue des séquences de type $BR-BL-BR-BL...$, la longueur moyenne des séries continue de BR ou de BL et la probabilité d'obtenir une alternance parfaite (c'est-à-dire, aucun état consécutif identique).

Les modèles que nous avons proposés sont plutôt déterministes ainsi que les relations causales qui les composent. Cependant, il semble évident que les réseaux moléculaires impliqués ont également un caractère stochastique. Il y a des fluctuations moléculaires dans les réseaux de signalisation intra et intercellulaire qui peuvent représenter des fluctuations dans différents « *attractor states* » vers lesquels les cellules tumorales pourraient s'engager constituant un ensemble d'états métastables. Comment alors, peut-on concilier cela avec la modélisation causale déterministe ?

(3) Hétérogénéité de la causalité dans le TME

Un autre aspect général est la dimension d'hétérogénéité de la causalité dans le micro-environnement tumoral. L'hétérogénéité est une caractéristique fondamentale de tous les cancers. Cette hétérogénéité existe au niveau spatial, mais aussi au niveau individuel. Au niveau spatial, diverses régions de la tumeur ont des propriétés phénotypiques différentes et possèdent donc des réseaux causaux différents. Ces réseaux causaux sont aussi conditionnés par le placement des cellules tumorales au sein de la tumeur. Les cellules tumorales au centre ou à la périphérie de la tumeur sont génétiquement/épigénétiquement ou métaboliquement fort différentes. Ceci est attesté par exemple par le fait que les cellules au centre sont dépendantes du métabolisme glycolytique, les cellules en périphérie étant plutôt dépendantes du métabolisme oxydatif. Quelles sont les raisons de ces différences ? Deux schémas explicatifs peuvent être proposés. La première est que le placement des cellules tumorales au sein d'un tissu et l'architecture tissulaire

conditionnent ces propriétés : C (Positionnement tissulaire) → E (modifications moléculaires). Ceci est compatible avec la théorie du TOFT décrite au **chapitre IV**. L'autre explication est que des altérations moléculaires surviennent dans les cellules tumorales d'une manière aléatoire qui sont ensuite sélectionnées grâce à la pression de sélection et ceci dicte ensuite leur comportement et positionnement au sein du tissu : C (modifications moléculaires) → E (Positionnement tissulaire). Ceci n'est pas, pour l'instant, tranché, mais expérimentalement, cela est tout à fait envisageable.

(4) « Downward causation »

La notion de « *downwards causation* » dans le micro-environnement tumoral peut être discutée comme une manifestation de l'interaction complexe entre les différents niveaux d'organisation moléculaire, cellulaire et tissulaire en articulant le niveau biologique (phénotypique), moléculaire (génétique, biochimique, etc.) et physique (contraintes physiques, etc.). Pour l'instant, une intégration complète de ces différents niveaux dans la science du cancer n'est que partielle. Nous avons toutefois pris en compte, du moins en partie, ces différents niveaux dans notre analyse conceptuelle. Par exemple, les DAGs sont composés de variables moléculaires et phénotypiques. L'impact de ces deux niveaux est double :

- Les variables moléculaires impactent d'autres variables moléculaires sans répercussion phénotypique
- Les variables moléculaires impactent les variables phénotypiques (direct ou indirect)
- Les variables phénotypiques impactent d'autres variables phénotypiques (direct ou indirect)

(5) Articulation des théories de la causalité avec la science du cancer

Comment les théories philosophiques de la causalité s'articulent-elles avec l'activité scientifique dans le domaine de la cancérologie ? Dans ce cadre, les concepts méthodologiques qui sont de prime abord concernés incluent principalement la conception woodwardienne et les théories probabilistes. La conception de la causalité selon Woodward, se révèle particulièrement pertinente pour l'étude du micro-environnement tumoral (TME), notamment dans le contexte des tumeurs cérébrales et du cancer du rein. Appliquer le cadre woodwardien consiste donc à identifier, parmi l'ensemble des interactions possibles, celles qui répondent au critère d'intervention. Ceci inclut l'action sur une variable par stimulation ou inhibition (p.ex. la stimulation de l'expression d'un certain gène ou le fait d'inhiber une voie métabolique), on peut alors déterminer l'effet sur une autre variable d'intérêt (telle que la prolifération cellulaire, la migration ou la résistance thérapeutique). En fait, la causalité woodwardienne s'articule

parfaitement avec la démarche actuelle dans la recherche sur le cancer et la démarche biomédicale en général et elle offre un cadre rigoureux et opérationnel pour explorer, comprendre et éventuellement manipuler les mécanismes du micro-environnement tumoral. On peut aussi dire que l'interventionnisme de Woodward est le reflet philosophique de la façon dont la science avance et teste ses hypothèses.

Les théories probabilistes de la causalité, et notamment celles de Judah Pearl, ont un intérêt méthodologique (DAGs, « path coefficients », etc.). Actuellement, cependant, ces approches ne sont pas entrées dans la pratique de recherche en cancérologie expérimentale. Dans d'autres domaines de cancérologie comme les études épidémiologiques ou dans le cas des interventions thérapeutiques, l'approche de la causalité du cas unique de Nancy Cartwright et ses critiques des RCTs sont importants à considérer et fournissent une réévaluation de la validité des RCTs dans certains cas.

Certaines théories et concepts de la causalité, hors du champ méthodologique, sont aussi à considérer. Par exemple, la théorie de la singularité s'articule bien avec la vision fondamentalement mécanistique de la recherche expérimentale du cancer, et représente une sorte d'image et de justification ontologique. Nous avons aussi utilisé extensivement la théorie de Mackie et ses conditions INUS dans notre analyse conceptuelle de la causalité. Ceci apporte une clarification conceptuelle de l'apport de certaines variables dans le cadre des réseaux de causalité.

Ci-dessous un tableau récapitulatif :

Aspect étudié	Approche méthodologique	Contribution à la causalité
Modélisation du micro-environnement tumoral	Graphiques acycliques dirigés, scénarios probabilistes	Identification des interactions causales spécifiques selon le type de tumeur, estimation des coefficients de voie, construction des « Mondes » possibles
Dynamique tumorale (binarité compaction/diffusion)	Définition d'états et de séquences de basculement	Attribution de probabilités aux états et séquences, modélisation de la trajectoire tumorale selon divers scénarios
Prise en compte des facteurs modulateurs	Analyse de la matrice, gradients de cytokines, interventions thérapeutiques	Intégration des facteurs environnementaux et thérapeutiques dans la causalité des transitions tumorales
Limites méthodologiques	Discussion sur la mesure expérimentale des coefficients de voie	Réflexion sur les biais réductionnistes et la complexité de l'interprétation causale <i>in vivo</i>
Caractéristiques causales communes et spécifiques	DAGs, SEM et formalisation des interactions et propriétés	Modélisation réductionniste (p.ex. diffusion/compaction), modélisation des propriétés moléculaires et phénotypiques spécifiques

Apport des théories philosophiques	Discussion de la compatibilité des théories philosophiques avec la recherche sur le cancer	Réflexion sur l'adaptabilité, identification des théories compatibles

Tableau 13 : Contribution à la causalité du cancer

7. Impact de l'analyse conceptuelle sur la recherche biomédicale et la pratique médicale

Le concept de causalité a des implications importantes pour la recherche sur le cancer et en général pour toute recherche qui se place dans un contexte biomédical. Ceci concerne différents aspects incluant la conceptualisation mécanistique de différents états possibles d'un réseau d'interactions, la représentation causale des résultats de recherche ainsi que l'inclusion dans un manuscrit et un article scientifique et enfin la pratique médicale.

Nous devons, cependant, d'abord, nous interroger sur l'originalité de notre démarche en comparaison avec d'autres travaux liés à l'étude de la causalité dans le cas du cancer. Je citerai ici quelques travaux représentatifs. Ces travaux concernent en grande partie l'épidémiologie et l'effet des thérapies ciblées et non ciblées²⁴⁰. Un exemple est le « Lifepath project » financé par la Commission européenne (Horizon 2000) qui avait pour but d'étudier les bases biologiques de l'effet des inégalités sociales sur la santé²⁴¹. D'autres exemples incluent les études sur l'association entre facteurs (thérapies, infections virales, etc.) et devenir des patients utilisant des méthodes d'inférence causale²⁴². Une analyse causale a été réalisée par randomisation mendélienne concernant l'interaction des cellules immunitaires et les cellules de GB provenant de la base de données GWAS²⁴³. Seize immunophénotypes ont été identifiés comme associés au GB. Dans une autre étude, les auteurs avaient utilisé la méthode du Cox multivarié pour identifier les gènes associés à la survie²⁴⁴. La causalité génétique a été ensuite appréhendée en comparant la survie observée et contrefactuelle de manière bidirectionnelle. Les auteurs proposaient que des modèles d'apprentissage causaux dans le domaine biomédical avaient leur utilité, mais en soulignant que des gènes significativement associés ne constitueraient pas nécessairement des causes sous-jacentes.

²⁴⁰ Van Amsterdam WAC, S Elias S, Ranganath, ER, Causal Inference in Oncology: Why, What, How and When, *Clinical Oncology*, 2025, 38, 103616.

²⁴¹ Iacobucci G. Socioeconomic status should be seen alongside smoking as mortality risk, say experts. *BMJ.*, 2019;364:l1450.

²⁴² Holst A, Ekman J, Petersson-Ahrholt M, Relander T, Wiebe T, Linge HM. Identifying causal relationships of cancer treatment and long-term health effects among 5-year survivors of childhood cancer in Southern Sweden. *Commun Med.*, 2022, 2:21.

²⁴³ Hou S, Jin C, Shi B, Chen Y, Lin N. Causal inference between immune cells and glioblastoma: a bidirectional Mendelian randomization study. *J Cancer*, 2025, 16(1):171-181.

²⁴⁴ Yu F, Wang R, Chaudhari P, Davatzikos C. Investigating Causal Genetic Effects on Overall Survival of Glioblastoma Patients using Normalizing Flow and Structural Causal Model. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng.*, 2024, 12927:129271F.

Dans une autre étude, les auteurs avaient proposé un nouvel algorithme d'apprentissage automatique, le « *Mutual Hazard Networks* » (MHN) qui permettait d'inférer des modèles de progression à partir de données transversales issues du Cancer Genome Atlas (TCGA)²⁴⁵. Selon les auteurs, le MHN avait montré de meilleures performances en comparaison aux modèles acycliques. Leur analyse incluait différents types de tumeurs, dont le glioblastome.

Ces travaux sont très différents des nôtres. Premièrement, ils n'intègrent pas la réflexion philosophique dans leur démarche. Leurs modélisations utilisent quasi exclusivement des données génétiques (à partir du GWAS, TCGA), excluent des variables phénotypiques et ne s'appuient pas sur des résultats originaux issus de l'expérimentation. Il n'y a pas non plus une interconnexion entre données phénotypiques et moléculaires comme nous l'avons fait dans notre travail. De plus, la prise en compte de la diversité des contextes biologiques est rarement intégrée dans ces approches, ce qui limite la portée de leurs conclusions à des associations essentiellement statistiques, sans validation mécanistique approfondie. Enfin, ces travaux se restreignent, pour une grande partie, au développement d'approches et d'outils pour améliorer l'analyse des données (p.ex. « *machine learning* », etc.), sans véritable réflexion sur la compréhension globale des processus pathologiques sous-jacents ou sur l'intégration des résultats dans une perspective translationnelle et clinique.

Concernant les travaux philosophiques sur la causalité du cancer comme ceux de Vineis, Illari et Russo²⁴⁶, ils se réfèrent principalement à l'épidémiologie, et sont d'une nature très générale et manquent de modélisations. Les auteurs se réfèrent à la thèse de Russo-Williamson (RWT) et à la « *mark transmission theory* » de Wesley Salmon (pour explication cf. théories de causalité).

Les apports de notre travail pour la compréhension de la causalité dans le contexte du cancer sont les suivants :

7.1. Causalité et conceptualisation mécanistique

L'analyse causale permet de fournir des informations sur les effets causaux directs et indirects, les relations parasites et les effets de suppression, les relations entre les variables latentes et observées, les relations causales réciproques et les boucles de rétroaction (non récursives, par opposition aux modèles récursifs).

²⁴⁵ Schill R, Solbrig S, Wettig T, Spang R. Modelling cancer progression using Mutual Hazard Networks. *Bioinformatics*, 2020, 36(1):241-249.

²⁴⁶ Vineis, P., Illari P. & Russo F (2017). Causality in cancer research: a journey through models in molecular epidemiology and their philosophical interpretation. *Emerging Themes in Epidemiology*, 2017,14. 10.1186/s12982-017-0061-7.

Nous avons aussi montré comment la causalité peut être analysée dans le cas des tumeurs cérébrales et du cancer du rein. Ceci implique différentes étapes :

- (1) construction de graphiques acycliques (DAGs)
- (2) détermination de la structure générale des DAGs et validation de la configuration du DAG
- (3) Simulations utilisant différentes valeurs de coefficients de chemin (« *path coefficient* »)
- (4) description formalisée utilisant SEM et probabilités
- (5) modélisation de différents scénarios utilisant une combinaison d'approches (probabiliste, causalité conditionnelle, etc.).
- (6) application des concepts causaux aux travaux scientifiques concrets pour (i) illustrer la faisabilité et la contribution pour une meilleure compréhension des résultats de la recherche et pour (ii) permettre la mise en évidence des circuits de régulations nouveaux pouvant être ciblés.

Le point important est que la détermination du « *path coefficient* » peut être difficile, et donc une façon de le faire est de proposer « différents mondes », c'est-à-dire différents scénarios, et de comparer ces différents mondes à l'occurrence de variables spécifiques obtenues par l'expérience. Nous avons tenté de mettre en œuvre cette démarche dans le cadre de l'analyse causale.

Ce type de modélisation pourrait devenir un outil fondamental pour découvrir d'autres mécanismes à étudier qui, préalablement, n'étaient pas évidents. En outre, en adoptant une approche plus intégrative, on pourrait envisager des analyses causales qui incluent des dimensions supplémentaires telles que celles de la granularité temporelle et spatiale, ou encore l'interdépendance dynamique des systèmes biologiques. Dans le contexte de l'oncologie, cela pourrait permettre de mieux comprendre les relations entre le micro-environnement tumoral et les réponses des cellules cancéreuses aux traitements.

Cette méthodologie pourrait également ouvrir la voie à des applications concrètes en médecine, notamment pour la conception de thérapies ciblées, en identifiant les variables critiques qui influencent les mécanismes pathologiques. Cela pourrait permettre un enrichissement des thérapies anticancéreuses et l'émergence d'une thérapie véritablement causale (transformation des thérapies ciblées en « thérapies causales »). En intégrant ces outils dans la recherche biomédicale, cela pourrait permettre de valider des hypothèses de manière plus rigoureuse et d'explorer des pistes de recherche sous-explorées, renforçant ainsi la compréhension mécanistique des phénomènes observés.

Un problème qu'il faut soulever est, pour le moment, la validation expérimentale des réseaux de causalité. Deux contraintes majeures subsistent : le réductionnisme expérimental et l'holisme théorique. Afin de valider les concepts issus de la modélisation, il est souvent nécessaire de simplifier ces interactions complexes, ce qui conduit à analyser des sous-ensembles très restreints d'interactions, généralement sous forme de systèmes binaires en conditions *in vitro*. Dans ce contexte, l'interventionnisme permet de manipuler spécifiquement certains paramètres du réseau, rendant possible l'estimation de coefficients de voie. Cependant, cette approche comporte le risque d'altérer la pertinence des valeurs obtenues, car elles sont extraites de systèmes artificiellement isolés de leur environnement natif.

Pour contourner ces limitations, il est possible de valider certains aspects des réseaux, notamment par des analyses génomiques ou protéomiques sur des échantillons issus de patients (cf. **chapitre VI** concernant TSP1). Cela permet d'obtenir des indices indirects sur la validité des interactions postulées, bien que la validation exhaustive de l'ensemble du réseau demeure hors de portée avec les outils actuels.

Les avancées technologiques récentes, telles que le développement d'organoïdes multicellulaires, incluant des matrices extracellulaires complexes, offrent de nouvelles perspectives pour l'expérimentation. Ces systèmes, couplés à des outils de manipulation génétique ciblée, pourraient à l'avenir permettre de tester et d'affiner la structure des réseaux causaux en conditions expérimentales plus proches du contexte *in vivo*. Les modèles ainsi validés seraient alors plus fidèles à la réalité des interactions cellulaires et moléculaires au sein du micro-environnement tumoral. La confrontation entre la modélisation théorique et la validation expérimentale demeure donc un défi central.

7.2. Causalité dans la pratique de la recherche biomédicale

Nous avons fait une analyse causale d'articles scientifiques venant de notre propre recherche. Un schéma causal hypothétique peut être dessiné soit au début de l'article soit à la fin pour visualiser la cohérence causale. Cette section pourrait comporter un graphique acyclique illustrant les relations causales estimées, accompagné d'une formulation mathématique détaillant les interactions entre les variables. On peut ainsi identifier les variables confondantes et les différentes topologies des chemins causaux (structure séquentielle, bifurcations, « colliders », facteurs confondants, etc. La discussion pourrait également élargir le cadre de réflexion en intégrant des concepts tels que la stabilité causale, la spécificité causale, le pluralisme ou monisme causal, les causes nécessaires et suffisantes, les conditions INUS, le contexte causal, la granularité de la causalité, la hiérarchie causale, la « downward causation », les dimensions

spatiales de la causalité, les dynamiques expliquées par le couple *explanandum/explanans*, la compétition et la convergence causale, ainsi que le « *causal endpoint* ».

Par ailleurs, une telle approche pourrait favoriser une analyse plus rigoureuse des données expérimentales, offrant une compréhension mécanistique plus précise des phénomènes observés. Cela pourrait également servir de base pour identifier des pistes de recherche sous-explorées ou pour formuler des hypothèses en vue d'expérimentations futures.

L'intégration de ces outils causaux dans les publications scientifiques pourrait aussi encourager une standardisation des méthodes d'analyse causale. Cela façonnerait une culture scientifique axée sur la transparence et la reproductibilité, tout en offrant aux chercheurs un cadre méthodologique robuste pour explorer les interactions complexes entre les facteurs biologiques, environnementaux et génétiques dans des situations biomédicales variées.

En adoptant cette démarche, on sera plus en mesure de relier les conclusions théoriques aux applications pratiques, notamment en médecine clinique et en oncologie. Un aspect important, dans ce contexte, est la relation de la causalité à la « *evidenced-based medicine* » (EBM). La EBM s'appuie essentiellement sur des évidences issues des études cliniques où les mécanismes sont relégués à une place mineure et se situent au plus bas niveau des évidences pour juger, par exemple, de l'efficacité d'une thérapie. La thèse de Russo-Williamson (RWT) est en conflit avec les thèses actuelles de la EBM²⁴⁷. Dans le contexte de la thèse de Russo-Williamson (RWT) laquelle comporte deux aspects, c.a.d. la mise en évidence d'une corrélation et d'un mécanisme, le dernier étant un élément essentiel pour solidifier la revendication d'un lien causal. Il est donc important d'apporter une explication mécanistique d'une intervention thérapeutique. Élucider la complexité des relations causales dans le TME et l'effet des interventions est donc un élément essentiel pour solidifier une affirmation causale d'une thérapie.

7.3 Conséquences des facteurs sociétaux sur la recherche des causalités du cancer

L'activité scientifique et la recherche de la causalité sont intimement liées à la validation par la clinique. L'industrie pharmaceutique finance en grande partie la recherche biomédicale, ce qui a un impact considérable sur l'orientation de l'activité scientifique. L'activité scientifique de domaines entiers est sous la menace d'extinction ou au moins de dévaluation si les résultats cliniques ne sont pas à la hauteur. Citons comme exemple le domaine de l'angiogenèse tumorale.

²⁴⁷ Williamson, J. Establishing Causal Claims in Medicine. *International Studies in the Philosophy of Science*, 2019, 32(1), 33–61.

Ce domaine a été l'un des domaines phares de la cancérologie. De nombreux régulateurs, récepteurs et mécanismes ont été identifiés, et les premiers résultats de translation vers la clinique ont été encourageants. Cependant, l'inhibition de l'angiogenèse, à elle seule, n'a pas pu être confirmée comme une stratégie probante dans de nombreuses tumeurs, car l'amélioration de la survie globale n'a pas tenu ses promesses. En dépit du fait que l'angiogenèse est importante pour la causalité du cancer, le désengagement de l'industrie pharmaceutique a conduit à une nette diminution des recherches impliquant ce mécanisme causal. Cela illustre que la recherche sur la causalité dans le domaine biomédical est fortement influencée par des facteurs sociétaux, des modes et des tendances. Cependant, les intérêts économiques sont aussi à mettre en relation avec les résultats de la recherche clinique qui ont montré des problèmes concernant l'efficacité des inhibiteurs de l'angiogenèse dans un grand nombre de cancers. Dans un langage de causalité, les résultats estimés négatifs pour l'anti-angiogenèse et les résultats positifs pour les inhibiteurs des points de contrôle de l'immunité constituent les variables causales et les conditions sont représentées par les intérêts économiques. Ceci peut être représenté comme suit (Figure 49) :

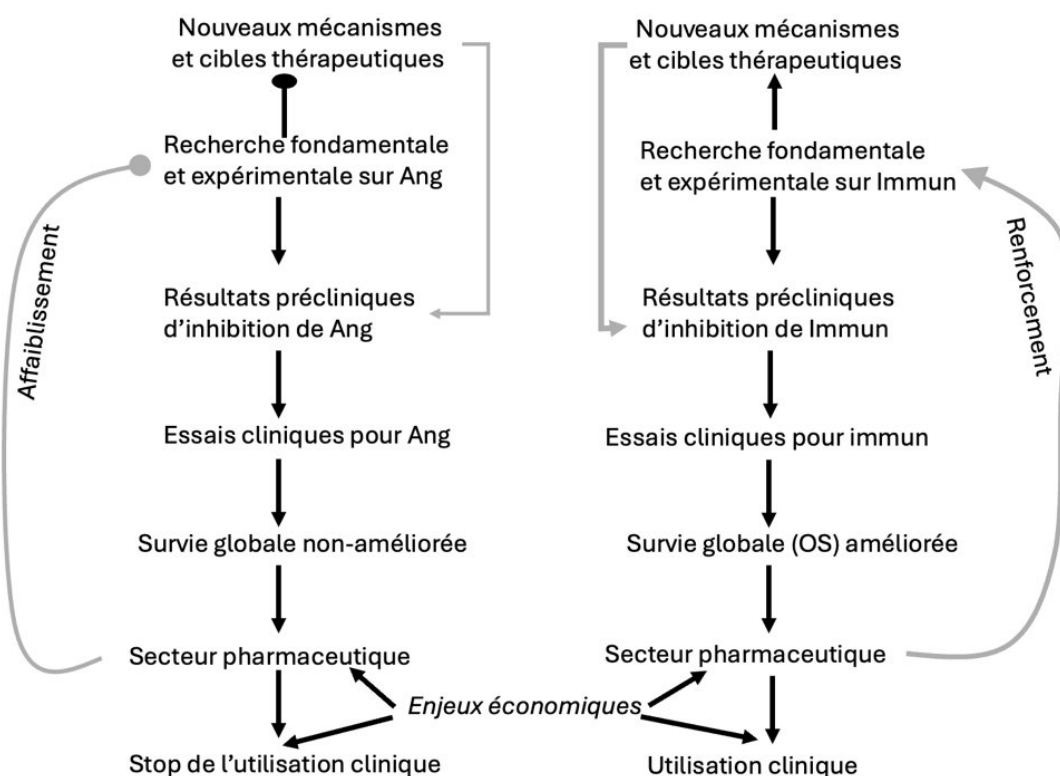


Fig. 49 : Effet des forces sociétales en conjonction avec les résultats cliniques sur l'orientation de la recherche fondamentale et clinique. Les enjeux économiques constituent des conditions, et les autres représentent des variables causales.

Nous pouvons exprimer ceci en langage de probabilité :

$$P(UC \mid SG \wedge EE) > P(UC \mid \neg SG \wedge EE)$$

$$P(UC \mid SG \wedge EE) > P(UC \mid SG \wedge \neg EE)$$

$$P(UC \mid SG \wedge EE) > P(UC \mid \neg SG \wedge \neg EE)$$

$$P(UC \mid SG \wedge \neg EE) > P(UC \mid \neg SG \wedge \neg EE)$$

$$P(UC \mid \neg SG \wedge EE) > P(UC \mid \neg SG \wedge \neg EE)$$

UC représente le résultat d'intérêt (utilisation clinique), SG représente la survie globale améliorée, et EE la présence d'intérêts économiques en tant que conditions. Les inégalités expriment que la probabilité d'observer UC est plus élevée lorsque SG et EE sont toutes deux présentes, comparativement à la situation où l'une ou l'autre, ou les deux sont absentes. Par ailleurs, si l'une est absente, la probabilité est supérieure si les deux sont présentes.

Ceci a néanmoins des effets négatifs dans des domaines de recherche plus fondamentale où la vascularisation est impliquée et cela pourrait empêcher l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ce déplacement d'intérêt illustre comment l'environnement sociétal et économique façonne non seulement l'orientation de la recherche fondamentale et appliquée, mais aussi la perception même des priorités scientifiques. Il en découle une dynamique dans laquelle certaines pistes pourtant prometteuses, comme l'étude approfondie de la vascularisation, risquent d'être reléguées au second plan malgré leur potentiel à ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Par ailleurs, il existe un besoin urgent de diversifier les sources de financement pour éviter que certaines pistes prometteuses ne soient abandonnées prématurément. Une collaboration accrue entre les institutions publiques, les organisations à but non lucratif et les acteurs de la recherche privée pourrait permettre de soutenir des domaines de recherche moins populaires, mais néanmoins cruciaux. En outre, l'intégration systématique de l'analyse causale dans les essais cliniques et les publications scientifiques pourrait renforcer la compréhension des mécanismes sous-jacents et offrir une base solide pour le développement de nouvelles thérapies. Une telle approche contribuerait également à identifier les interactions complexes entre les facteurs biologiques, génétiques et environnementaux, ouvrant la voie à des traitements plus personnalisés et efficaces.

7.4 Impact pour la pratique médicale

7.4.1 Importance de la question causale pour la thérapie du cancer

Cette thèse illustre la complexité causale dans le développement et la diffusion du cancer. Il est clair qu'une approche thérapeutique étroitement ciblée n'a guère de chance de succès en vue de la complexité rencontrée. Cependant, une réduction à des variables essentielles reste nécessaire, mais il est crucial d'identifier les variables réellement actionnables. Ces variables doivent être étudiées dans un contexte global, tenant compte non seulement des mécanismes moléculaires, mais aussi des interactions avec le micro-environnement tumoral, les facteurs génétiques, et les influences extérieures telles que l'environnement ou le mode de vie.

En intégrant des outils analytiques avancés et des technologies émergentes, telles que l'intelligence artificielle, nous pourrions non seulement mieux visualiser les réseaux complexes d'interactions, mais aussi prédire les effets d'interventions spécifiques. Ces modèles pourraient aider à concevoir des thérapies plus personnalisées, en ciblant des mécanismes précis tout en minimisant les effets secondaires.

Finalement, une meilleure compréhension des relations causales complexes pourrait également ouvrir la voie à de nouvelles stratégies de prévention en identifiant des points de contrôle critiques à un stade précoce du développement tumoral. Cela offrirait une opportunité unique d'intervenir avant que les mécanismes pathologiques ne deviennent irréversibles, redéfinissant ainsi la manière dont le cancer est traité et perçu.

7.4.2 Causalité contrefactuelle et pratique médicale oncologique

La médecine clinique, sans qu'elle s'en aperçoive, utilise régulièrement le raisonnement contrefactuel. Ce raisonnement repose sur l'idée de comparer une situation observée avec une situation hypothétique où le traitement ou l'intervention n'aurait pas eu lieu. Par exemple, dans le cadre des essais cliniques, le groupe témoin reflète cette logique en fournissant un point de comparaison pour évaluer l'efficacité d'un traitement. Cependant, lorsqu'on s'appuie uniquement sur des données observationnelles, des variables cachées ou des facteurs confondants peuvent biaiser les résultats et compliquer les démarches diagnostiques ou thérapeutiques.

Pour pallier ces défis, des RCT ont été développés. Cependant, les RCTs ont des limitations et ne peuvent pas être utilisés dans de nombreuses situations (voir Chapitre V Nancy Cartwright). L'alternative est l'intégration d'approches basées sur le raisonnement causal, inspirée par la philosophie. Ces approches permettent non seulement d'identifier les relations de cause à effet, mais aussi de prendre des décisions éclairées en éliminant les ambiguïtés liées aux corrélations.

trompeuses. En combinant cette méthodologie avec des technologies émergentes comme l'intelligence artificielle, la médecine clinique pourrait franchir un nouveau palier dans la personnalisation des traitements et l'optimisation des résultats pour les patients.

Une telle évolution dans l'approche médicale contribuerait à renforcer la validité des décisions thérapeutiques tout en offrant au praticien une vision plus claire des impacts potentiels de chaque intervention sur le patient. Cette synergie entre raisonnement causal et innovation technologique promet une médecine plus précise, plus proactive et mieux adaptée aux besoins de la population.

7.4.3 Manipulation causale (« intervention ») dans la pratique médicale oncologique

Le praticien, à l'aide d'un schéma causal, peut visualiser l'impact des traitements sur les différentes variables, offrant ainsi une manière plus précise de comprendre les relations complexes entre les interventions et leurs effets. Par exemple, un réseau causal peut représenter l'influence d'un traitement sur la survie sans progression, tout en évaluant les interactions inattendues ou secondaires qui pourraient survenir. Ces réseaux permettent d'identifier des variables clés qui peuvent être ajustées pour maximiser les bénéfices tout en minimisant les risques pour le patient.

L'intégration de ces réseaux dans la pratique clinique pourrait être facilitée par des outils technologiques avancés, comme des applications mobiles ou des plateformes numériques accessibles sur des appareils tels que des iPhones ou des iPads. Ces outils offriraient aux cliniciens des visualisations dynamiques et adaptatives des réseaux causaux, les rendant consultables directement au chevet du patient. Cela permettrait un soutien décisionnel en temps réel, aidant les médecins à adapter leurs stratégies thérapeutiques en fonction des données les plus récentes et des besoins spécifiques de chaque individu.

Citons, par exemple, le cas d'un réseau causal conçu pour analyser les interactions complexes au sein du micro-environnement tumoral d'un cancer du rein. Un tel réseau pourrait inclure des variables comme la réponse immunitaire, la vascularisation et les mutations génétiques spécifiques. En simulant différentes interventions, le praticien pourrait déterminer quelle combinaison de traitements aurait le plus grand impact sur la réduction tumorale tout en minimisant les effets secondaires.

Ainsi, l'utilisation de ces outils causaux ne se limite pas à la thérapie, mais pourrait également éclairer des stratégies de prévention. En identifiant des points critiques d'intervention à un stade précoce du développement tumoral, les praticiens pourraient mieux cibler des populations à risque et concevoir des approches préventives sur mesure. Cette avancée promet une médecine

oncologique plus personnalisée, plus efficace et fondée sur une compréhension approfondie des mécanismes causaux sous-jacents.

8. Conclusions et perspectives

L'analyse de la causalité est un aspect largement sous-traité dans le domaine du cancer, en tout cas en ce qui concerne les mécanismes cellulaires et moléculaires tenant compte des interactions entre les cellules tumorales et leur micro-environnement. Il est vrai que la thérapeutique et la pharmacologie utilisent des essais cliniques randomisés (RCT) qui déterminent l'efficacité d'un traitement, mais l'analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires souffre d'un effet d'accumulation d'interactions dont les liens ne sont pas clairement établis. Ceci ressemble à une vaste forêt, comportant beaucoup d'arbres dont le nombre augmente de manière constante. Cela obscurcit la vision de la forêt et masque la vision d'une quelconque structure. Même les efforts des « *Hallmarks* » décrits dans cette thèse n'apportent que peu de réponses et ne clarifient que marginalement la complexité rencontrée.

Cette thèse apporte différents nouveaux éléments concernant la causalité et les mécanismes cellulaires et moléculaires du cancer :

- (1) Un état des lieux de la compréhension des interactions cellulaires et moléculaires du TME
- (2) Une discussion critique de différentes théories philosophiques de causalité et leur utilité comme cadre analytique pour la compréhension du cancer
- (3) Une modélisation des interactions du micro-environnement tumoral en tenant compte des relations causales :
 - > Construction de graphiques acycliques (DAGs) multiniveaux pour deux types de tumeurs
 - > Détermination de la structure générale des DAGs et validation de la configuration du DAG
 - > Simulations utilisant différentes valeurs de coefficients de chemin (« *path coefficient* »)
 - > Description formalisée utilisant SEM et probabilités
 - > Modélisation de différents scénarios utilisant une combinaison d'approches (probabiliste, causalité conditionnelle, etc.)
- (4) Application des concepts causaux aux travaux scientifiques concrets pour (i) illustrer la faisabilité et la contribution pour une meilleure compréhension des résultats de la recherche et pour (ii) permettre la mise en évidence des circuits de régulations nouvelles pouvant être ciblés.
- (5) Discussion générale de l'impact du travail de thèse dans la science et la conceptualisation du cancer
- (6) Discussion des perspectives de l'impact de l'analyse causale du TME en médecine

Il y a des concepts divergents si on analyse les publications de la littérature scientifique ou philosophique. Globalement la littérature scientifique a une approche plus réductionniste et de cellule tumorale centrée. Il y a néanmoins une tendance plus récente à intégrer des éléments micro-environnementaux, même si cela est plutôt orienté avec pour « *primum movens* » la cellule tumorale. Les concepts philosophiques en tant que cadre général de raisonnement ont tendance à privilégier l'environnement, et dans sa forme radicale (TOFT), de totalement amputer la cellule tumorale de l'environnement et de reléguer la génétique au second plan. Ce cadre conceptuel n'est pas tenable quand confronté aux données de la littérature scientifique. La position raisonnable consiste en une interaction bidirectionnelle à valeur égale qui est cependant variable en fonction du type de tumeur. Certains types de tumeurs ont une déterminante « cellule tumorale » forte (p.ex. tumeur de Wilms) d'autres une déterminante micro-environnementale prononcée (p.ex. mélanome). La déterminante micro environnementale est représentée par la vascularisation, le système immunitaire, la matrice cellulaire et acellulaire et le système nerveux. Ces entités jouent un rôle causal qui est aussi fonction du type de tumeur. Elles constituent dans l'ensemble un interactome hypercomplexe à la fois au niveau cellulaire et moléculaire.

La question de la causalité est donc centrale pour appréhender au mieux ces interactions multiples et multiéchelles. Dans la recherche philosophique, de multiples théories de causalité ont été élaborées comme des théories de régularité, de singularité, interventionnistes, contrefactuelles, etc. Quand nous analysons la représentativité et la compatibilité de ces théories avec le problème de la causalité du cancer, et ceci dans le contexte du micro-environnement tumoral, différents points peuvent être considérés. Concernant la représentativité, la théorie de la singularité et interventionnelle est à mentionner plus particulièrement. La théorie de la singularité suppose une interaction spécifique moléculaire ou physique dans notre cas, ce qui correspond bien aux interactions mentionnées ci-dessus. La théorie interventionniste concerne plutôt la méthodologie et vise à prouver une relation causale grâce à une interférence de ce qui est bien le cas pour la problématique du TME. L'interférence est ici plutôt un outil pour établir/solidifier un lien causal. Cependant, ces théories ne sont pas une aide pour concrètement apporter un cadre conceptuel afin d'illuminer les interactions causales dans le TME. En revanche, l'inférence causale développée dans le sillage de Judah Pearl constitue un cadre conceptuel tout à fait pertinent dans le contexte de notre travail. Un autre outil, que nous avons utilisé, est représenté par des « fromages causaux » (« *causal pies* ») qui représentent chacun une cause suffisante pour impacter sur le développement tumoral. Nous avons donc utilisé ces approches pour mieux comprendre les interactions entre la cellule tumorale et son TME.

Nous avons constitué des graphiques acycliques (DAGs), et nous avons choisi de le faire pour deux types de tumeurs : les gliomes diffus et le cancer du rein. Nous voulions faire cela en relation étroite avec la science, et, à cette fin, avons choisi comme exemple nos propres travaux de recherche. Ce choix a été fait pour les raisons suivantes. J'avais conçu et dirigé ces travaux sur le plan expérimental et théorique. Cela a aussi permis d'étendre la portée des travaux et de l'ancrer dans l'analyse philosophique. Par ailleurs, cela représente un exemple de réflexion philosophique qu'un scientifique pourrait avoir à partir de ses propres travaux.

La difficulté de notre travail sur la causalité était d'estimer les coefficients de voie (« path coefficients »). Pour ce faire nous avons fait des simulations et imaginé différents mondes dans lesquels certaines voies sont privilégiées, et donc attribué des « *path coefficients* » a priori. Sur cette base, nous avons élaboré des équations pour formaliser et représenter ces interactions. Si cela s'avérait possible, nous avons pu dériver des coefficients de voies à partir de données concrètes. Nous avons aussi pu réduire, dans le cas des gliomes diffus par exemple, les événements causaux à deux grandes variables ou modules qui sont représentés par la compaction et la diffusion, et ceci peut être modélisé et formalisé.

Nous pouvons résumer l'impact des théories philosophiques concernant la recherche sur le cancer dans le tableau ci-dessous :

Théorie philosophique	Principes clés	Impact sur la recherche du cancer	Exemple d'application
Woodward (Interventionnisme)	La causalité est définie par la possibilité d'intervenir sur une variable et d'observer l'effet sur une autre	Fournit un cadre rigoureux pour identifier des relations causales testables par manipulation expérimentale	Étudier l'effet de l'inhibition d'une voie métabolique sur la prolifération cellulaire dans le micro-environnement tumoral
Théories probabilistes (Pearl, DAGs)	La causalité est modélisée à l'aide de graphiques acycliques dirigés et de coefficients de chemin	Permet de modéliser des réseaux complexes d'interactions et d'analyser des effets directs/indirects	Cartographie des réseaux moléculaires dans les tumeurs cérébrales ou le cancer du rein pour identifier des cibles thérapeutiques
Cartwright (Causalité du cas unique)	Met l'accent sur l'individualité des cas et critique l'universalité des essais randomisés (RCTs).	Réévalue la pertinence et la validité des RCTs, valorise l'étude de cas particuliers.	Analyse de réponses individuelles aux traitements dans des contextes cliniques spécifiques
Mackie (Conditions INUS)	Une cause est une condition INUS : Insuffisante mais non redondante dans un	Clarifie l'apport spécifique de certaines variables dans des réseaux causaux complexes	Détermination des facteurs nécessaires à l'apparition d'un phénotype tumoral particulier

	ensemble Inutile mais Suffisant		
Théorie de la singularité	Met en avant le caractère unique et mécanistique de chaque événement causal	Soutient une approche mécaniste et individualisée de la recherche expérimentale	Étude des trajectoires évolutives singulières de certaines cellules cancéreuses

Tableau 14 : Impact des théories philosophiques de causalité sur la recherche sur le cancer

Un aspect additionnel concerne l'impact potentiel des recherches sur le cancer sur les concepts philosophiques. Nous avons discuté cet aspect dans la partie IV de la thèse. Nous pouvons résumer l'impact sur les théories de la causalité dans le tableau ci-dessous :

Aspect	Contribution à la philosophie des sciences
Modélisation du micro-environnement tumoral	Illustration de la démarche hypothético-déductive par la construction de modèles causaux, permettant de tester expérimentalement des hypothèses sur les interactions biologiques et de quantifier les relations de cause à effet
Dynamique tumorale (binarité compaction/diffusion)	Application de la modélisation probabiliste pour représenter la complexité et l'incertitude inhérentes aux processus biologiques, en soulignant l'importance de la pluralité des états et des trajectoires en biologie
Prise en compte des facteurs modulateurs	Approche systémique mettant en avant l'interdépendance des facteurs et la nécessité d'une vision holistique en sciences, tout en interrogeant la notion de causalité dans des systèmes complexes
Usage de scénarios et interventions pharmacologiques	Réflexion sur l'expérimentation en sciences, la manipulation des variables et l'identification des mécanismes sous-jacents, contribuant au débat sur la validité et la portée des modèles en biologie
Quantification expérimentale des coefficients de voie	Discussion sur la mesure et la quantification en sciences, questionnant le rapport entre données, modèles mathématiques et réalité biologique

Tableau 15 : l'impact de la recherche sur le cancer sur les concepts philosophiques

La question de l'effet des forces sociétales sur la recherche de la causalité du cancer lié au TME est en lien avec le sujet étudié dans cette thèse. Nous avons pu démontrer un changement du cadre causal dû à des intérêts économiques par l'industrie pharmaceutique exemplifié par le changement du focus « Angiogenèse » vers « Immunité ». Ceci a non seulement eu un effet sur le développement de nouvelles molécules pour le traitement du cancer, mais aussi sur la

recherche cognitive de la compréhension du rôle de la vascularisation dans le développement tumoral. Cependant, les intérêts économiques sont aussi à mettre en relation avec les résultats de la recherche clinique qui ont montré des problèmes concernant l'efficacité des inhibiteurs de l'angiogenèse dans un grand nombre de cancers. Les échecs rencontrés dans le domaine de l'anti-angiogenèse, associés aux succès obtenus avec les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire, orientent les préférences de la communauté scientifique vers ce dernier axe de recherche. De plus, des considérations économiques et d'intérêt influencent également ces orientations au détriment des recherches fondamentales sur la vascularisation.

Ce déplacement d'intérêt illustre comment l'environnement sociétal et économique façonne non seulement l'orientation de la recherche fondamentale et appliquée, mais aussi la perception même des priorités scientifiques. Il en découle une dynamique dans laquelle certaines pistes pourtant prometteuses, comme l'étude approfondie de la vascularisation, risquent d'être reléguées au second plan malgré leur potentiel à ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

À cet égard, il devient crucial d'adopter une approche holistique, intégrant à la fois les données issues de la biologie cellulaire, de la philosophie des sciences et des réalités socio-économiques. Ce positionnement transversal permet non seulement de mieux saisir la complexité des réseaux d'interactions au sein du micro-environnement tumoral, mais aussi d'envisager des stratégies de recherche moins vulnérables aux fluctuations des tendances industrielles.

Enfin, tout en reconnaissant l'influence inévitable de facteurs externes sur la recherche biomédicale, notre analyse suggère la nécessité d'établir des cadres méthodologiques robustes et flexibles. Ceux-ci devraient permettre d'identifier et de préserver les domaines d'investigation fondamentale qui, à long terme, pourraient s'avérer essentiels pour la compréhension et le traitement du cancer dans toute sa diversité.

Nous sommes conscients que la modélisation des relations causales dans le TME est incomplète. Nous nous sommes contentés d'une discussion philosophique et d'établir des graphiques acycliques et, sur cette base, d'élaborer des équations théoriques et des algorithmes. Notre effort constitue, à notre connaissance, le premier travail qui vise à conceptualiser la causalité des interactions cellulaires et moléculaires dans le TME.

Notre travail montre qu'un certain nombre de caractéristiques mécanistiques et phénotypiques sont en commun entre gliomes IDH WT, Gliomes IDH mutés et carcinome rénal. Ceci est évident si nous réduisons les variables à un nombre réduit (p.ex. compaction, diffusion). Les différences

s'accroissent cependant si nous analysons la causalité à une granulation plus fine (p.ex. caractéristiques phénotypiques et moléculaires spécifiques). Un schéma unifié du développement tumoral n'est donc guère envisageable dans ces conditions, comme nous l'avons démontré dans notre travail. Placés dans le contexte d'une granulation plus fine, les chemins causaux deviennent donc fort différents. Il faudrait catégoriser mieux les tumeurs en fonction des chemins causaux qu'ils empruntent.

Notre travail se situe donc clairement à l'interface entre la science et la philosophie. Ce n'est ni la science ni la philosophie à proprement parler, prises individuellement. Il combine cependant, des éléments de l'investigation scientifique et philosophique pour apporter une réflexion originale et pour illuminer les relations causales dans le cancer quand on tient compte de l'environnement de la tumeur. Nous sommes bien conscients que la causalité du cancer fait aussi intervenir l'exposome et des facteurs externes, mais notre but, dans le cadre de ce travail, était clairement de traiter les interactions entre tumeur et TME exclusivement. L'exposome aurait introduit une complexité supplémentaire et n'aurait pas contribué, à notre avis, à améliorer notre connaissance des interactions cellulaires et moléculaires du TME.

Pour conclure, sont résumés, dans le tableau ci-dessous, les apports principaux de ce travail de thèse dans le contexte de causalité :

Axe d'apport	Description détaillée	Originalité / Valeur ajoutée	Retombées potentielles	Limites / Ouvertures
Conceptualisation de la causalité dans le TME	Élaboration de graphiques acycliques et de modèles théoriques pour formaliser les interactions cellulaires et moléculaires, accompagnée d'une réflexion philosophique sur causalité et la structure des réseaux causaux	Première tentative d'unification conceptuelle de la causalité dans le TME, combinant outils de modélisation issus des sciences exactes et questionnement philosophique sur la notion de causalité	Possibilité de guider la recherche vers de nouveaux modèles explicatifs et d'orienter le développement d'algorithmes pour l'analyse des données biologiques complexes	Modélisation incomplète ; L'approche reste théorique ; une validation expérimentale future est nécessaire pour asseoir la pertinence des modèles proposés. L'intégration de l'exposome à terme
Remise en question des cadres conceptuels existants (« Hallmarks » du cancer)	Critique de l'universalité des « Hallmarks » en montrant la diversité des réseaux causaux selon les types tumoraux et	Proposition d'une nouvelle manière de classer les tumeurs, basée sur la dynamique réelle des	Favorise le développement de stratégies thérapeutiques personnalisées sur la base de la dominance	Requiert des études approfondies pour affiner la classification causale des tumeurs.

	proposition d'une catégorisation fondée sur les chemins causaux spécifiques	interactions moléculaires et cellulaires plutôt que sur des critères purement phénotypiques ou mécanistiques	causale et l'identification de cibles spécifiques à chaque type tumoral	Nécessite une collecte de données plus fine et une adaptation des outils analytiques pour affiner cette catégorisation
Démarche interdisciplinaire science/philosophie	Intégration d'éléments issus de la philosophie des sciences pour enrichir la réflexion sur les notions de causalité, de modèle et de preuve en biologie du cancer	Approche rare dans le champ de la cancérologie, permettant d'articuler rigueur scientifique et recul critique, avec une réflexion sur les limites épistémologiques des modèles utilisés.	Peut inspirer d'autres travaux à l'interface de disciplines, contribuant à une meilleure compréhension des enjeux méthodologiques et épistémologiques de la recherche biomédicale	Approche encore peu répandue ; La transposition concrète de ces réflexions en pratique de laboratoire demeure à développer.
Délimitation claire du champ d'étude (exclusion de l'exposome)	Justification argumentée de l'exclusion de l'exposome pour concentrer l'étude sur les interactions du micro-environnement tumoral et éviter une complexité excessive	Positionnement méthodologique assumé, permettant d'approfondir la compréhension des interactions locales sans dilution de la problématique	Permet une analyse ciblée et potentiellement plus opérationnelle pour la recherche fondamentale sur le TME	L'exclusion de l'exposome limite la portée globale ; une extension future pourrait intégrer ces facteurs pour une vision plus holistique
Changement de paradigme sous influence sociétale et économique	Analyse du déplacement du focus scientifique, passant de l'angiogenèse à l'immunité, sous l'effet des intérêts économiques et industriels, et démonstration de l'impact de ces facteurs sur la définition des cadres causaux en cancérologie	Mise en lumière du rôle structurant des facteurs externes dans la construction des objets de recherche et des priorités scientifiques, avec une approche interdisciplinaire croisant philosophie des sciences et biologie	Invitation à une vigilance accrue face à la vulnérabilité de la recherche fondamentale et à la nécessité de préserver la diversité des axes explorés pour ne pas négliger des pistes innovantes	Nécessité de préserver la pluralité des axes de recherche pour éviter l'oubli de pistes prometteuses. La prise en compte des influences sociétales reste partielle ; approfondissement possible via une analyse comparative internationale ou multidisciplinaire

Tableau 16 : Apport du travail de thèse à la compréhension de la causalité du cancer

Je laisse le mot de la fin à William Harvey qui écrivit dans de « *Motu Cordis et Sanguinis* » :

*Je suis partisan de la vérité seule, et je peux bien dire que j'ai utilisé tous mes efforts pour tenter de produire quelque chose qui devrait servir le bien, être profitable aux savants et utile aux lettrés ». « Adieu, Docteurs très estimés, et pensez avec indulgence à votre anatomiste » (« *Excercitatio di Moto Cordis et Sanguinis in Animalibus*, » William Harvey, 1628).*

9. ANNEXES

9.1 Articles discutés dans la thèse

Article 1

TRECAN 00751 No. of Pages 19

ARTICLE IN PRESS

Trends in
Cancer

CellPress

Feature Review

Challenges in glioblastoma research: focus on the tumor microenvironment

Andreas Bikfalvi,^{1,*} Cristine Alves da Costa,^{2,26} Tony Avril,^{3,26} Jean-Vianney Barnier,^{4,26} Luc Bauchet,^{5,26} Lucie Brisson,^{1,26} Pierre Francois Cartron,^{6,26} Hélène Castel,^{7,26} Eric Chevet,^{3,26} Hervé Chneiweiss,^{8,26} Anne Clavreul,^{9,26} Bruno Constantin,^{10,26} Valérie Coronas,^{10,26} Thomas Daubon,^{11,26} Monique Dontenwill,^{12,26} Francois Ducray,^{13,26} Natacha Enz-Werle,^{12,26} Dominique Figarella-Branger,^{14,26} Isabelle Fournier,^{15,26} Jean-Sébastien Frenel,^{7,26} Mathieu Gabut,^{13,26} Thierry Galli,^{16,26} Julie Gavard,^{6,26} Gilles Huberfeld,^{17,26} Jean-Philippe Hugnot,^{18,26} Ahmed Idhah,^{19,26} Marie-Pierre Junier,^{8,26} Thomas Mathivet,^{1,26} Philippe Menei,^{9,26} David Meyronet,^{20,26} Céline Mirjolet,^{21,26} Fabrice Morin,^{7,26} Jean Mosser,^{3,26} Elisabeth Cohen-Jonathan Moyal,^{22,26} Véronique Rousseau,^{4,26} Michel Salzet,^{15,26} Marc Sanson,^{19,26} Giorgio Seano,^{23,26} Emeline Tabouret,^{24,26} Aurélie Tchoghandjian,^{24,26} Laurent Turchi,^{25,26} Francois M. Vallette,^{6,26} Sonya Vats,^{16,26} Maité Verreault,^{19,26} and Thierry Vroile^{25,26}

Glioblastoma (GBM) is the most deadly type of malignant brain tumor, despite extensive molecular analyses of GBM cells. In recent years, the tumor microenvironment (TME) has been recognized as an important player and therapeutic target in GBM. However, there is a need for a full and integrated understanding of the different cellular and molecular components involved in the GBM TME and their interactions for the development of more efficient therapies. In this review, we provide a comprehensive report of the GBM TME, which assembles the contributions of physicians and translational researchers working on brain tumor pathology and therapy in France. We propose a holistic view of the subject by delineating the specific features of the GBM TME at the cellular, molecular, and therapeutic levels.

Introduction

GBM is the most common type of malignant primary brain tumor, with an incidence of two to five cases per 100 000 people per year in the USA and Europe [1]. The prognosis for GBM remains poor, with a median survival of ~15 months for patients who receive standard therapy [2] and less than 1 year in population-based studies [1]. GBM is characterized by wild-type forms of *IDH1/2* [3], high proliferation rates, core necrosis, microvascular proliferation, and tumor infiltration. GBM treatment involves surgical resection and radiotherapy together with concomitant chemotherapy with temozolomide (TMZ), also known as the Stupp protocol, a treatment that has not evolved since 2005 [4]. Resistance to treatment is mainly caused by tumor cells escaping resection and/or invading normal brain parenchyma. To date, the mechanisms underlying GBM development remain incompletely understood and current experimental systems only partially recapitulate GBM properties.

The genetics of GBM have been extensively studied [5]. Recent DNA-sequencing techniques at the single cell level have documented the coexistence of different genetic subclones, while single cell RNA sequencing has unveiled different transcriptomic profiles [6]. However, this tumor cell-centric view may have underestimated the role of the TME, which has led to only incremental improvements in the therapeutic response. The TME includes components from the tumor niche as

Highlights

The tumor cell-centric view has underestimated the role of the tumor microenvironment (TME) and failed to translate into therapies that outperform Stupp treatment for glioblastomas (GBMs).

The tumor environment includes components from not only the tumor niche (TME), but also the tumor organismal milieu (macroenvironment).

The TME comprises several compartments, with intricate cellular and molecular interactions both within and between each compartment.

Neurons are recently investigated players in GBM development, which they regulate via GBM cell-neuron synapses.

Many experimental GBM models have been developed, including *in vivo*/ex vivo models in several species as well as 3D *in vitro* models.

Attempts to increase the complexity of 3D models have done so by introducing selected components of the TME.

The various therapeutic approaches in use or developed still require improvement by better defining the combination of the most promising targets within the TME.

Current therapies might also modify the TME and modulate the therapeutic response.

well as the tumor organismal milieu. A consensus review [7] listed the challenges that need to be addressed in neuro-oncology, including research on the brain TME, thereby establishing a close link with neuroscience. The TME controls both tumor growth and invasion in GBM, thus opening new possibilities for therapeutic intervention [8].

However, knowledge of the microenvironmental cues that impact GBM cell properties is sparse. The GBM microenvironment is complex, with intermingling immune cells, mainly represented by myeloid cells/microglia (one of the most abundant cellular constituents of the TME), blood vessels, astrocytes, and extracellular matrix (ECM), which varies across different tumor areas [9]. These interactions have been studied at the cellular and molecular level, such as the role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors (VEGFRs), guidance factors, and positive or negative cues between GBM cells and blood vessels [10]. More recently, an intricate interaction with neurons has been documented [11], but how all of these different elements are spatially and causally integrated is unknown.

The GBM immune landscape has also been explored and compared with brain metastasis using a combination of approaches [12]. The drawback of this work is its purely descriptive nature and the lack of information on how microglia or monocyte-derived macrophages spatially interact with the other components of the TME. Future work should investigate: (i) molecular events (and their dynamics) between tumor cells, neurons, vascular, and immune compartments; (ii) tumor regional heterogeneity; (iii) external constraints and cues regulating the TME and their impact on tumor development; and (iv) the impact of therapeutic interventions in the complex brain tumor environment (Figure 1). Given that both physicians and translational researchers working on brain tumor pathology and therapy, we provide here an extensive review that delineates the specific features of the GBM TME at the cellular, molecular, and therapeutic levels.

Glioblastoma stem cells

Cellular and molecular aspects

The concept of glioblastoma stem cells (GSCs) has provided new insights into GBM pathophysiology. This heterogeneous tumor cell population, which can be quiescent or proliferating, is essential for promoting tumor growth and heterogeneity. Although GSCs were first thought to be rare and confined to specific niches, recent studies point to a more widespread and complex distribution within tumor tissue [13].

Accumulating evidence suggests that GSCs correspond to a cell functional state rather than to a lineage, a novel and provocative concept further reinforced by the demonstration that GBM cells can reversibly adopt or lose stem-like properties in response to TME cues [13]. As such, tumor cells evolve on a continuous undifferentiated–differentiated axis, with epigenetic regulations underlying cell interconversions between these phenotypes [13–16]. Interactions with surrounding normal cells, such as subventricular zone (SVZ) cells of the neural stem cell niche, endothelial cells in the perivascular or hypoxic niche, or with tumor-activated macrophages in the immune niche, are instrumental to promote and maintain a stemness phenotype. GSCs from the SVZ display higher tumorigenicity features than those isolated from other locations [17]. Accordingly, patients with GBM cells in intimate contact with the SVZ exhibit increased multifocal recurrence and a substantial reduction in survival [18]. The crosstalk between GSCs and their non-cancerous neighbors is bidirectional and instrumental for shaping the TME and promoting therapy resistance. GSCs actively participate in perivascular niche formation mainly by the secretion of chemo-attractant and pro-angiogenic factors promoting endothelial cell (EC) proliferation and recruitment of their progenitors [19]. GSCs can also transdifferentiate into vascular/pericyte lineages and ECs [20]. Similarly, GSCs contribute to immune cell infiltration and the formation of a protumorigenic

¹Bordeaux University, INSERM, U1312 BRIC, Tumor and Vascular Biology Laboratory, F-33600, Pessac, France

²Côte d'Azur University, INSERM, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Team "Laboratory of Excellence (LABEX) Distal", F-06560 Nice, France

³Rennes University, Inserm U1242, Centre de Lutte contre le Cancer Eugène Marquis, F-35000 Rennes, France

⁴Institute of Neuroscience Paris-Saclay, UMR9197, CNRS, Univ. Paris-Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

⁵Montpellier University Medical Center, Department of Neurosurgery, F-34090 Montpellier, France

⁶Nantes University, INSERM UMR 1232 CRCINA, LaBCT Institut de Cancérologie de L'Ouest, F-44800 Saint Herblain, France

⁷Normandie University, INSERM U1239, DC2N, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), F-76000 Rouen, France

⁸Sorbonne University, CNRS UMR8246, Inserm U1130, IBPS-Neuroscience Paris Seine, F-75005 Paris, France

⁹Angers University, CHU d'Angers, CRCINA, F-49000 Angers, France

¹⁰Poitiers University, CNRS UMR 6041, Laboratory Channels & Connexins in Cancers and Cell Stemness, F-86000 Poitiers, France

¹¹Bordeaux University, CNRS, IBGC, UMR 5095, F-33 077 Bordeaux, France

¹²Strasbourg University, Laboratoire de Bioimagerie et Pathologie, UMR7021 CNRS, F-67401 Illkirch-Graffenstaden, France

¹³Lyon 1 University, Cancer Research Centre of Lyon (CRCL) INSERM 1052&CNRS UMR5286, Centre Léon Bérard, Lyon 69008, France., F-69622 Villeurbanne, France

¹⁴Aix-Marseille University, Service d'Anatomie Pathologique et de Neuropathologie, Hôpital de la Timone, F-13385 Marseille, France

¹⁵Lille University, Inserm, CHU Lille, U1192, Laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse (PRISM), F-59000 Lille, France

¹⁶Paris University, Institute of Psychiatry and Neuroscience of Paris (IPNP), INSERM U1266, Membrane Traffic in Healthy & Diseased Brain, F-75014 Paris, France. GHU PARIS Psychiatrie & Neurosciences, 75014 Paris, France

¹⁷College de France, Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), CNRS, INSERM, Université PSL, Paris 75005, France

¹⁸Montpellier University, Institut de Génomique Fonctionnelle, CNRS, INSERM, F-34094 Montpellier, France

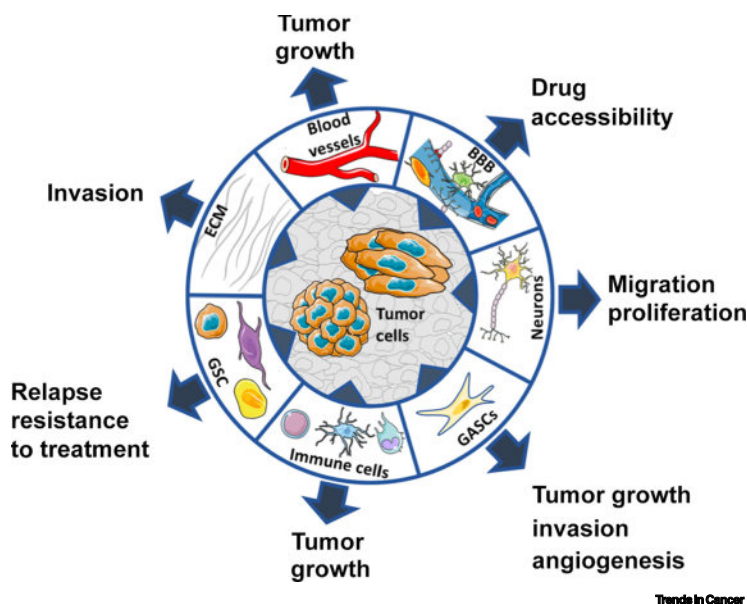


Figure 1. Schematic of the interaction of glioblastoma (GBM) cells with their microenvironment and functional consequences for tumor progression and response to treatment. Different representations of GBM tumor cells (sphere/stem versus adherent/mesenchymal) at the center of the cartoon are indicative of tumor cell heterogeneity. Abbreviations: BBB, blood-brain barrier; ECM, extracellular matrix; GASC, glioma-associated stromal cell; GSC, glioblastoma stem cell (GSC)-specific niches.

¹⁸Sorbonne University, AP-HP, Institut du Cerveau - Paris Brain Institute - ICM, Inserm, CNRS, Hôpitaux Universitaires La Pitié Salpêtrière - Charles Foix, F-75013, Paris, France

²⁰Institute of Neuropathology, Hospices Civils de Lyon, F-69008, Lyon, France

²¹Centre Georges-François Leclerc, UNICANCER, Dijon, France. Inserm U1231, Equipe Cadir, F-21000 Dijon, France

²²Institut Claudius Regaud, NSERM 1037, CRCT Team RADOPT, Département de Radiothérapie, IUCT-Oncopole, F-31100 Toulouse, France

²³Curie Institute Research Center, Tumor Microenvironment Laboratory, PSL Research University, Inserm U1021, CNRS UMR3347, F-91898 Orsay, France

²⁴Aix-Marseille University, CNRS, INP, Inst Neuropathol, F-13005 Marseille, France

²⁵Côte D'Azur University, CNRS, INSERM, Institut de Biologie Valrose, Team INSERM "Cancer Stem Cell Plasticity and Functional Intra-tumor Heterogeneity", F-06108 Nice, France

²⁶The authors belong to the French preclinical brain tumor study group "GrOupe Préclinique de l'Anocef" (GOPA)

*Correspondence: andreas.bikfalvi@u-bordeaux.fr (A. Bikfalvi).

inflammatory environment through the secretion of cytokines and growth factors [21]. In this context, GSCs induce tumor-associated macrophages (TAMs) to adopt an immuno-suppressive phenotype, whereas TAMs secrete factors contributing to GSC maintenance [22]. Therefore, the TME appears to be a key regulator of stemness, whereas GSCs affect the microenvironment. This complex dynamic is instrumental for tumor aggressiveness and, thus, its targeting could improve therapeutic strategies.

Therapeutic implications

GSCs are resistant to current therapies and have a crucial role in tumor recurrence. Indeed, tunneling nanotubes (TNTs), thin membranous open-ended channels connecting distant cells, provide alternative means of connection between GSCs, allowing mitochondrial transfer. GSCs from the metabolic area in the infiltrative zone (FLAIR) defined by MRI spectroscopy in patients treated for GBM have more TNT connections compared with GSCs from the non-metabolic area [23]. Moreover, radiotherapy can stimulate TNT formation and mitochondria transfer in GSCs from the metabolic area (Box 1). These results show the importance of plasticity in GBM cells and metabolic heterogeneity in response to radiotherapy [24]. Scientists have since tried to develop strategies directed at their elimination either by cytotoxic agents [25] or by repressing their stemness properties [26,27].



Box 1. Metabolism in GBM

Primitive brain cancers and brain cells share an affinity for glucose and glutamine [145]. Aberrant glucose and glutamine metabolism is a major metabolic hub stimulating GBM growth and inducing chemoresistance [146]. Numerous studies have shown that GBMs are metabolically plastic and can adapt to nutrient shortage by switching from one carbon source to another, or to alternative energy sources [147]. Furthermore, the microenvironment has been shown to be implicated in metabolic plasticity and reprogramming [148]. Glucose/glutamine interconnection in GBM could be reminiscent of the astrocyte–neuron metabolic interplay in which glutamate to glutamine conversion and reciprocal reaction fuels the tricarboxylic acid (TCA). By contrast, lactate produced in glycolytic cells can be released and then taken up by surrounding cancer cells for making amino acids, nucleic acids and fatty acids through anaplerosis [149]. The microenvironment is one of the major actors in cancer metabolism plasticity, which determines most glioma features, such as migration, cell survival, cell death, EMT, dormancy, and stemness. Mitochondria have a central role in ATP production and redox balance, but are also involved in many cellular processes, such as proliferation and cell death. Thus, changes induced by metabolism affect organelle functions and several cellular processes. Cancer development progression and treatment resistance in GBM is linked to distinct subsets of GSCs [150]. Metabolically, GSCs have a higher plasticity than their normal counterparts (neural stem cells) and their differentiation in proliferating GBM appears to be under the control of several metabolic enzymes, with non-canonical PKM2 activity being crucial in this process [151]. As reported above, original studies have shown that GSCs mainly depend on glycolysis, but recent articles have demonstrated that these cells might prefer mitochondrial oxidative metabolism. The slow-cycling GSCs appear to rely on both glycolysis and oxidative phosphorylation depending on the environmental situation and give rise to metabolically distinct GBM subpopulations [152]. GSC maintenance is also under the control of a methyl donor metabolism, nicotinamide *N*-methyltransferase (NNMT), implicated in epigenetic regulation [15].

GBM vascular compartment

Cellular and molecular aspects

GBM are highly vascularized tumors, in which the endothelium not only fuels tumor growth with oxygen and necessary nutrients, but also provides a protective microenvironment. As such, ECs are active components of tumor development. The formation of new blood vessels in brain tumors leads to disorganized, convoluted, and leaky vascular networks, suggesting abnormal angiogenesis in the tumor. Pro-angiogenic factors are produced by tumor cells, cancer-derived stromal cells, and inflammatory cells [28], leading to the idea that the TME provides an aberrant vascular bed [29]. In the brain tumor ecosystem, metabolic, hypoxic, and inflammatory stressors modulate the production rate and nature of pro-angiogenic factors. Notably, cells within the hypoxic environment, often at the periphery of the necrotic core, release aberrant levels of VEGF, among other pro-angiogenic paracrine factors, which might also trigger enhanced vascular permeability, exacerbated vascular bed inflammation, and edema [29]. In line with this finding, tumor-derived ECs maintain their identity while gaining mesenchymal characteristics, which promotes tumor proliferation, migration, and permeability [30]. Furthermore, tumor-induced angiogenesis might rely on the recruitment of bone marrow-derived endothelial progenitor cells, or other stem cells [31]. Hypoxia also increases local DNA methylation disorder and shifted cell states, which reflects an epigenetically facilitated adaptive stress response [32].

Vasculature is also rerouted for the benefit of the tumor through co-option of pre-existing vessels. This migration of tumor cells toward and along pre-existing vessels provides cancer cells with privileged access to nutrients and oxygen, as well as a trail for invasion [33]. More atypical features, such as vascular mimicry (i.e., the propensity of tumor cells to simulate an endothelial phenotype), might provide additional complexity to the brain TME [34]. This interdependency between cancer cells and vasculature might be even more plastic and dynamic than initially thought, following the discovery of new modalities involved in building a dedicated tumor vasculature, including processes such as *trans*-differentiation by the commitment of GSCs to endothelial and pericyte lineages [35]. This process might be associated with the so-called ‘perivascular niche’, where GSCs and ECs are in close contact [36]. Single cell sequencing of CD31-expressing ECs led identified five clusters when comparing the tumor core to the tumor periphery. Three clusters are present in the tumor core and two in the periphery. Expression profiles of blood–brain barrier (BBB)-associated transporters indicate that the BBB is partially preserved [37]. The variety of

ECs in GBM is further enhanced by the finding that tumor-derived ECs (TDECs), which arise from GBM cell *trans*-differentiation, and tumor-associated vessel ECs (TAVs) are molecularly distinct, although heterogeneity is observed within each group [38].

Future work should better define the different processes involved in vascularizing and perfusing tumors and determine how they dynamically coexist during tumor evolution and in response to treatment. The molecular circuitry driving the adaptability of ECs in hostile conditions remains an open question.

Therapeutic implications

Several clinical studies involving VEGF/VEGFR inhibition have been reported, with mixed outcomes (75 clinical trials, of which 53 involved bevacizumab). Most anti-angiogenic therapies (e.g., bevacizumab, cilengitide, or cediranib) failed to improve the overall survival (OS) and quality of life of patients [39]. There are several possible reasons for this limited efficacy, including VEGF-independent angiogenesis, vessel co-option, and inefficient antiangiogenic factor delivery to the tumor [40]. Alternatively, VEGF is secreted and transported within extracellular vesicles, where it is inefficiently targeted by bevacizumab [41–44].

Efforts have been made to develop novel therapies based on anti-angiogenic factors that target angiogenesis through different mechanisms of action. Recently, regorafenib, an inhibitor of several kinases involved in neoangiogenesis regulation, showed promising results when used as monotherapy for recurrent GBM [45]. Alternative anti-angiogenic therapeutic approaches rely on the targeting of vasculogenesis and vessel co-option through alteration of the CXCR4/CXCL12 axis [46]. As such, the CXCR4 inhibitor plerixafor was evaluated in a Phase 1/2 trial upon continuous infusion during chemoradiation for patients with newly diagnosed GBM. This treatment was well tolerated by patients and was associated with decreasing blood volume in the irradiation field. Other factors involved in vessel co-option included angiopoietin-2, IL8, EGFRvIII, MDGP/FABP3, IRE1 α , CDC42, and Ephrin-B2. The inhibition of angiopoietin-1 and -2 by trebananib for patients with recurrent GBM was well tolerated but did not improve patient survival alone or in combination with bevacizumab [47]. Regarding the targeting of EGFRvIII, the first results of a specific vaccine called rindopepimut were disappointing [48] but new drugs are under investigation [49]. Finally, the MET pathway was explored to disrupt the angiogenic process in GBM. This pathway was suspected to be involved in angiogenesis independent of VEGF and represented an interesting approach alone or in combination with a VEGF inhibitor. However, onartuzumab, a MET inhibitor, used in combination with bevacizumab, yielded inconclusive results [50]. The tyrosine kinase inhibitor cabozantinib was also tested as monotherapy for patients with recurrent GBM who had either benefited or not from previous anti-angiogenic therapy [51,52]. Although it failed in patients who already received bevacizumab, it was associated with a response rate ranging from 14% to 17% in patients naïve to anti-angiogenic therapy, thus opening future opportunities for clinical development.

More recently, combinations with immunotherapy have been proposed. These therapies generally fit into the following categories: targeted molecular inhibitors, vaccine-based therapies, viral therapies, and adoptive T cell therapies. Bevacizumab is the only anti-angiogenic agent that has so far been trialed with immunotherapy in GBM. Bevacizumab has the theoretical advantage of indirectly promoting an immune response by reducing the use of corticosteroids. However, there have not yet been any successful Phase 3 trials in immunotherapy and anti-VEGF combinatorial treatments for GBM. The two best-studied combinations are immune checkpoint inhibitors (ICIs) with bevacizumab and vaccine-based therapies with bevacizumab, such as the Durvalumab (NCT02336165) and Gliovac studies (NCT01903330). Yet, targeting the GBM



TME using a combinatorial strategy (anti-angiogenics and immunotherapy) remains an appealing therapeutic approach.

GBM and the blood–brain barrier

Cellular and molecular aspects

The BBB is an anatomic and biochemical barrier with multiple proteins controlling the transport of various molecules across its cellular and acellular structures. Several mechanisms of transport are described based on molecular weight, liposolubility, electric charge of cargo molecules, or interactions with proteins in circulation or the BBB. Blood pressure is also involved in modulating the traffic of molecules across the BBB. Small lipophilic molecules use passive transcellular and paracellular pathways between and across vascular ECs. Larger or hydrophilic molecules are transported by transcytosis or specific receptor-mediated transport. The efflux pump system is involved in expelling harmful molecules out to the bloodstream [53,54]. In GBM, the BBB is partly disrupted, and the term ‘blood–tumor barrier’ is preferred. However, the BBB remains intact in the bed around the tumor, where invasive cells involved in drug resistance and recurrence are located [55,56].

Therapeutic implications

Overall, antitumor drugs cross the BBB inadequately. The most effective drugs used in neuro-oncology are TMZ and nitrosoureas, with an efficacy for crossing the BBB of 15–30%. Although the dose reaching the tumor cells is limited, increasing the delivered dose can expose the patient to systemic toxicity. Multiple strategies are under development to disrupt, bypass, or overcome the BBB obstacle, such as increasing local or systemic delivery and increasing drug penetration by drug or BBB modulation. Increasing drug delivery relies mainly on high-dose intravenous doses or intra-arterial chemotherapies with modest results in GBM. Another approach to overcome the BBB relies either on the use of carrier agents to promote drug penetration or BBB modulation using drugs or physical interventions [57]. A Phase 2 clinical trial testing TMZ and liposomal doxorubicin showed promising results, with four out of 22 patients with recurrent GBM showing a response [58]. Finally, transient BBB disruption using chemical/physical agents (e.g., hyperosmotic agents or ultrasound) appears a promising approach and is being investigated in GBM clinical trials [55]. Nevertheless, the BBB remains a major factor involved in the chemoresistance of GBM cells.

The GBM neuronal compartment

Cellular and molecular aspects

The effects of neuronal activity and synaptic signaling on GBM dynamics have been studied by grafting the tumor in the visual cortex and controlling light exposure or by optogenetically increasing neuronal activity, resulting in modulation of the number of dividing tumor cells [59]. Neuronal activity-driven GBM growth is first mediated by secreted factors, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF) or the synaptic adhesion molecule Neuroligin-3 [60]. Neuroligin-3 acts on GBM cells, triggers its own secretion (autocrine effect), and favors cell division through the PI3K-Akt-mTOR pathway. The expression of functional receptors for several neurotransmitters in GBM cells constitutes another level of exposure to the neuronal environment. For instance, GBM cells express fully functional dopamine receptors, including the D2 and D4 subtypes [61], the blockade of which affects GBM growth. Glutamatergic excitatory synaptic signaling is a major microenvironmental driver of GBM growth. Extracellular glutamate concentration increases up to 100-fold both in gliomas and their vicinity in humans [62] and mouse models (Box 1). A single dose of sulfasalazine reduces brain glutamate concentration by 20–50%, in correlation with the expression of the cysteine-glutamate antiporter (SXC; SLC7A11) [63]. Direct bona fide synapses from neurons to glioma cells have been documented in animal models and human tissue,

especially in astrocytomas and GBM [11,64]. It was reported that 10–16% of glioma cells contained these synapses, linking axons of pyramidal cells with microtubules of glioma cells, and mainly comprised postsynaptic glutamatergic AMPA receptors, with high rates of edited GluR2 subunits, which allowed for Ca^{2+} permeability. Glutamatergic signaling led to the division and migration of tumor cells [11,64]. GABA also regulates GBM cell proliferation [65]. Glioma cells express ionotropic GABA receptors with a different status according to their state of malignancy, with functional receptors identified on low-grade glioma cells, whereas nonfunctional receptors mostly formed by Theta subunits are expressed by GBM cells [66]. GABA signaling also modulates GBM growth by regulating chloride ion fluxes [67]. However, pharmacological approaches targeting those pathways have not yet translated into efficient clinical strategies.

Therapeutic implications

The fact that glioma stem-like cells can form oncogenic synapses with glutaminergic neurons supports the development of therapies targeting this interaction. Blocking AMPA receptors with the approved antiepileptic drug perampanel resulted in the reduction of glioma proliferation [64] and invasion [11] in animal models, whereas the AMPA antagonist talampanel prolonged the survival of patients [68]. GBM cells also express glutamate metabotropic receptor Grm3. Targeting these receptors by specific inhibitors could constitute an interesting venue for the development of novel therapies [69]. Other potential strategies might include acting directly on glutamine via GLS-mediated glutaminolysis, as reported for SNAP25 [70], repressing glutamate outflow by the Xc system [63], or enhancing glutamate uptake from astrocytes via the upregulation of EAAT2 by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) [71].

The GBM immune compartment

Cellular and molecular aspects

Immune cell infiltration into GBM is controlled by the release of factors from tumor cells (Box 2), which is regulated by specific pathways in tumors cells, such as metabolic pathways and the unfolded protein response (UPR) (Box 3). Furthermore, autophagy (Box 4) might impact directly on the TME by modifying the immune response. The immune response can be divided into adaptive and innate immunity.

Box 2. The GBM secretome

The secretome corresponds to the material released by cells (proteins and metabolites) into the extracellular space, either using conventional (e.g., the secretory pathway) or unconventional mechanisms. Secreted proteins account for 9–15% of the total human proteome. The GBM microenvironment is impacted by tumor and stromal cell secretion, which are major factors in tumor aggressiveness. Secretome analysis in the human GBM cell line U87 showed high levels of proteins, such as ADAM9, ADAM10, Cathepsin B, Cathepsin L1, Semaphorin7A, Semaphorin3A, and Neuropilin1 [153]. Some of these proteins are proteases, which might help cell detachment and migration. GBMs also secrete cytokines, such as IL1 β , IL6, IL8, or IL18, which are associated with poor prognosis, either through conventional or unconventional routes. Cytokines, such as IL1 β and IL18, are secreted via autophagy-mediated secretion [154]. A secretory reticulophagy route was recently shown to mediate the release of reticulons in a VAMP7-dependent manner and this pathway was increased in cells defective in degradative reticulophagy [155,156]. Therefore, it will be important to characterize unconventional secretion, such as that of endoplasmic reticulum elements, in GBM, its potential effect on tumor development and communication with neurons. For a long time, the functional consequences of the close proximity between GBM cells and neurons were not well understood, but there is now ample evidence to suggest that they participate in a mutually beneficial relationship. Secreted molecules from neurons or the neuronal secretome modulate the GBM microenvironment and impact glioma growth and survival prognosis. Reciprocally, GBM cells produce metabolites that can be secreted into the extracellular space, such as lactate, glutamine, or glutamate. A lactate shuttle has been identified between glycolytic astrocytes and oxidative neurons. The release of glutamate has dual consequences. First, it results in enhanced neuronal activity or hyperexcitability, which sometimes manifests as seizures and can even cause neuronal death to create more space for GB expansion. Second, it has prosurvival effects on GBM cells [157]. This indicates the existence of positive feedback loops because GBMs can enhance neuronal activity by secreting glutamate, thereby fueling their own growth in turn. The characterization of molecules secreted as part of the neuronal secretome likely to impact GB progression opens new avenues for disease treatment and management.

Box 3. The unfolded protein response in GBM

The UPR is an adaptive mechanism triggered in response to endoplasmic reticulum (ER) stress. It is transduced by three sensors: protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), inositol-requiring enzyme 1 alpha (IRE1alpha, referred to as IRE1 hereafter), and activating transcription factor 6 (ATF6), and is a key factor in cancer development. GBM cells are exposed to cellular stresses that trigger the UPR. Exploring the role of the UPR showed the involvement of ATF6, IRE1, and PERK in different aspects of GBM pathophysiology [158]. The ATF6 arm of the UPR is involved in GBM resistance to radiotherapy [159]. The UPR also regulates GBM stemness [160] and pharmacological inhibition of PERK limits ER stress-induced GSC death, thus highlighting PERK as an important regulator of GSC growth and differentiation.

IRE1 has been identified as a key regulator of GB aggressiveness associated with tumor growth, neo-angiogenesis, tumor migration/invasion properties, and proinflammatory processes [158]. Moreover, IRE1 signaling has an active role in tumor immune reshaping, in particular of monocytes/macrophages and neutrophils [161]. IRE1 signaling also contributes to the organization of the tumor architecture, favoring tumor growth, infiltration, and mesenchymal cell phenotypes *in vivo* [162,163]. Antagonistic effects of IRE1 signaling towards XBP1 mRNA non-conventional splicing or RNA degradation were described in tumor invasion, neo-angiogenesis, and the inflammatory response, influencing GBM aggressiveness [161]. Patients with GBM characterized by high IRE1 activity had a poorer prognosis and displayed increased immune, angiogenic, and migration markers. Overall, IRE1 represents an appealing therapeutic target in GBM, and several IRE1 inhibitors are currently available, targeting either its kinase or RNase activities [164]. A recent preclinical study using a mouse model recapitulating the SOC for patients with GBM confirmed the efficacy of such IRE1 inhibitors [165]. Thus, the UPR controls major features related to GB aggressiveness and represents an actionable pathway to improve disease management.

Adaptive immunity

Early studies report the presence of rare infiltrating lymphocytes within tumors, mainly CD4 and CD8 T cells. These cells represent 4–40% of infiltrating immune cells [72]. Such variability was associated with biological heterogeneity, the methods used [e.g., immunohistochemistry (IHC) or fluorescence-activated cell sorting (FACS)], or the characterization performed after *in vitro* expansion [73]. Reduced immune T cell infiltration is attributed to the high immunosuppressive properties displayed by GBM cells, including TGF β secretion [74], and, thus, GBM is defined as an immunologically cold tumor [75]. These initial observations are further explained by the increased

Box 4. Autophagy in GBM

Autophagy is a multistep process of protein/organelle quality control that maintains cell homeostasis under different cellular stress inducers. Autophagy can be associated with either a protumorigenic or tumor-suppressive response depending on various parameters, including the cellular context, type of stimulus, and phase of tumor development. Current data describing a role of macroautophagy (referred to as autophagy hereafter) and chaperone-mediated autophagy (CMA) in TME regulation in GBM are summarized here.

Several studies have demonstrated the link between key players in gliomagenesis and autophagy regulation. Notably, it has been shown that p53, a key tumor suppressor involved in GBM etiology, controls the transcription of two master regulators of mitophagy: PRKN and PINK1 [166]. Interestingly, p53 and PRKN protein levels are inversely correlated according to the grade of gliomas [167] and decreased PRKN microenvironment levels lead to increased tumor progression [168]. The reciprocal relationships between autophagy and the immune system point toward autophagy as an important GB TME modulator. Autophagy promotes tumor progression by increasing the phagocytotic activity of macrophages and by inhibiting inflammasome-mediated responses of microglial cells. It might also foster tumor evolution by either stimulating the differentiation of monocytes into anti-inflammatory M2 macrophages or by delaying monocyte polarization into proinflammatory M1 macrophages [169]. Autophagy has also been shown to decrease tumor activity by inducing an inflammatory response in neutrophils [170].

CMA is a type of autophagy responsible for the lysosomal degradation of cytosolic proteins harboring the KFERQ consensus motif. CMA is constitutively activated in cancer cells [171] and tightly linked to TME regulatory stresses [172]. CMA is important in maintaining aerobic glycolysis in cancer cells and in the catabolism of cell cycle regulatory proteins [173]. Analysis of patient biopsies indicated an increase in the CMA makers LAMP1 and LAMP2A after treatment with TMZ [174]. In addition, CMA has been linked to microglial cell functions in neurodegenerative diseases, providing a potential link to the innate immune response, which might be relevant in GB [175]. Cellular interactions between perivascular and GB cells are important for tumor progression. CMA-defective pericytes led to a reduction in GB development compared with CMA-competent pericytes [176]. In brief, studies to analyze the role of the various types of autophagy in TME impact on GB development are still needed and could lead to the identification of new therapeutic pipelines.

naïve T cell sequestration in the bone marrow compartment in patients with GBM, resulting in a reduced number of T cells at the periphery and in the tumor site, a phenomenon linked to tumor-induced Sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1) loss on the T cell surface [76]. Recently, single-cell analysis of GBM-infiltrating T cells from human glioma unveiled four major T cell clusters, including CD4 (conventional and regulatory), CD8, and cycling T cells [77]. Among the CD8 T cell cluster, one predominant subtype comprised cytotoxic T cells that express not only a cytotoxicity related-gene signature (including perforin-1 and granzymes), but also natural killer (NK) cell-related genes that negatively modulate cytotoxic functions, such as that encoding the inhibitory receptor CD161. This finding opens avenues to target new molecular pathways to transform GBMs from immunologically 'cold' to 'hot' tumors using novel immunotherapy approaches.

Innate immunity

NK cells recognize target cells lacking major histocompatibility complex (MHC) expression. They represent crucial antitumor response agents when cytotoxic T lymphocytes are compromised. NK cells can target GBM cells because these cells express low levels of MHC. GBM cells, including GSCs, are recognized and killed by NK cells *in vitro* [78,79], and high CD56⁺ CD16⁺ activated NK cells are associated with favorable patient outcomes [80]. However, limitations remain to challenging NK cell efficiency in GBM. First, the number of GBM-infiltrating NK cells remains low, representing <1% of all infiltrated immune cells [12]. Second, GBM-infiltrating NK cells harbor a reduced expression of tumor-sensing NK cell-activating receptors, such as NKp30, NKG2D, DNAX accessory molecule-1 (DNAM1), or surface molecules, including CD317 and CD210. Moreover, GBM tumor cells, including GSCs, are directly responsible for NK cell inactivation by expressing immunosuppressive CD7312 and overexpressing MHC class I [81,82].

The most abundant cells in GBM are tumor-associated macrophages (TAMs). These constitute up to 40% of the tumor mass and correspond to brain-resident microglia and bone marrow-derived myeloid cells. TAMs contribute to tumor heterogeneity and tumor progression. As innate immune cells, TAMs express Toll-like receptor-2, the activation of which leads to the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-14, which is necessary for MMP2 release and GBM invasion. TAM infiltration has been associated with poor outcomes in patients with GBM, and in preclinical mouse models of GBM. TAMs also promote GSC proliferation, a mesenchymal phenotype, and resistance to radiotherapy and anti-VEGF therapy [83].

The TME modulates the response to radiotherapy because hypoxia is a major factor for resistance in several tumors, including GBM. Preclinical studies showed that radiation-induced hypoxia prompts an increase in stromal cell-derived factor-1 (SDF1/CXCL12) secretion [84]. This signaling pathway has been targeted in GBM animal models, leading to macrophage exclusion and improvement of local control and survival after radiotherapy [85]. In addition, radiotherapy promotes the expression of tumor antigens along with the translocation of calreticulin to the tumor cell surface, leading to their phagocytosis [86]. This results in cGAS/STING activation and the subsequent induction of interferon β (IFN β) [87]. Interestingly, whereas hypo-fractionated radiotherapy (3 $\times$ 8 Gy) induced an immune cell death through cGAS/STING, 12–18 Gy induced the DNA exonuclease Trex1, thus clearing DNA fragments from the cytosol and inhibiting tumor immunogenicity [88].

Neutrophils, the first line of innate immune defense, are present in the TME as tumor-associated neutrophils (TANs) and can be polarized toward a proinflammatory N1 phenotype in the presence of IFN β or to a protumoral N2 phenotype in the presence of TGF β . Whereas the N1 phenotype inhibits tumor growth and induces the immune response, the N2 phenotype, which is prominent



in GBM, promotes tumor growth, stemness, invasion, and angiogenesis, and suppresses immune responses [89]. Moreover, myeloid cell content changes during tumor evolution and standard-of-care (SOC) therapy. In early-stage tumors, proinflammatory microglia are predominant, whereas in end-stage tumors, anti-inflammatory macrophages and protumorigenic myeloid-derived suppressor cells are present [90]. TMZ decreased myeloid-derived suppressor cells and, when combined with irradiation, intratumoral Granzyme B⁺ CD8⁺ T cells influx into the tumor. Brain meningeal lymphatic vasculature can also be remodeled using ectopic expression of VEGF-C, thus enhancing immune surveillance and T cell-mediated immunity against GBM cells [91].

Therapeutic implications

Four main immunotherapeutic approaches are considered in GBM: (i) ICIs, (ii) cell, vaccine and dendritic cell (DC) therapies; (iii) oncolytic viruses; and (iv) immune cytokine inhibitors. The main immunotherapy approaches, stimulating the antitumor activities of cytotoxic T cells through inhibition of immune checkpoints, failed to improve the survival of patients with GBM [92]. The current perspectives for ICIs in brain tumors are to refine their administration schedule, to combine ICIs or to test new ICIs (e.g., LAG3, TIM3 or TIGIT inhibitors). ICI efficacy is based on the ability of T cells to infiltrate the tumor and on the development of an environment that is favorable to cytotoxic responses. These conditions are rarely met in GBM because of the abundance of immunosuppressive TAMs. Resistance to ICIs can be circumvented by depleting tumor macrophages with a CSF1R1 receptor inhibitor [93].

One of the most promising cell therapy approaches are chimeric antigen receptor (CAR)-T cells, comprising a modified T cell receptor containing a single-chain variable antibody fragment (scFv) against a tumor-associated antigen. In neuro-oncology, several CAR-T cells are under investigation, targeting EGFRvIII, HER2, and IL13R α 2. First results obtained from Phase 1/2 trials suggested an acceptable safety profile with promising results [94,95]. Recently, a CAR-engineered NK cell that targets both wild-type EGFR and EGFRvIII mutant has been developed, with promising results in mice.

Vaccination and DCs also present an attractive method for actively targeting GBM. First results using EGFRvIII vaccination reported disappointing results in a Phase 3 trial [48] but personalized approaches, based on patient tumor antigen expression profiles, appear promising despite the complexity of their management [96]. DCs pulsed by tumor-specific peptides, lysates, or antigens can also enhance antitumor T cell responses. Different DC-based vaccinations have been evaluated, showing interesting response rates and excellent safety profiles [97]. However, this approach remains challenging and expensive.

Another immunogenic active approach is the use of oncolytic viruses, which can selectively infect and kill tumor cells. The aim of using these viruses is to turn an immunosuppressive microenvironment into an immune-supporting environment. Various oncolytic viruses are under investigation, including herpes virus, parvovirus, adenovirus, and cytomegalovirus. In a Phase 1/2 trial, an oncolytic H-1 parvovirus was injected before and during surgical resection of recurrent GBM [98]. This virus was able to cross the BBB, spread through the tumor, and trigger an immunogenic stimulus, opening promising perspectives. Similar results were observed in another early-development clinical trial using an oncolytic reovirus, the results of which support the combination of oncolytic viruses and PD1 blockade [99].

Finally, among the different cytokines implicated in the immunosuppressive GBM TME, tumor cell-secreted CSF1 might be involved in the switch of tumor-resident macrophages/microglia

to an immunoinhibitory phenotype. Conversely, TAM depletion by LyG6 antibodies prolonged survival in a GBM mouse model [100], whereas the combination of the arginine-depleting agent ADI-PEG20 with irradiation led to almost-complete tumor eradication in an immunocompetent mouse model by promoting microglial recruitment and M2 to M1 polarization [101]. The first results of phase II trial evaluating the CSF-1 receptor inhibitor alone showed no efficacy [102] but additional studies are ongoing.

Few clinical trials have aimed to optimize irradiation with immunotherapy. In one trial, immunotherapy was added to irradiation in combination with bevacizumab [103]. In another trial, stereotactic $3 \times 8\text{Gy}$ re-irradiation in the presence or absence of the anti-PDL1 durvalumab (NCT02866747) was compared. The use of tumor-treating fields (TTFields) as adjuvant treatment after standard radiochemotherapy in patients with *de novo* GBM also increased progression-free survival and OS [104], and presented, beside disrupting mitosis, the capacity to induce immunogenic cell death. In models other than GBM, TTFields increase peritumoral lymphocyte infiltration compared with nontreated animals [105]. The combination of such a device with standard radiochemotherapy is being investigated for *de novo* GBM (Trident EF-32).

GBM-associated stromal cells

Cellular and molecular aspects

The GBM TME also harbors glioma-associated stromal cells (GASCs). These cells have phenotypic and functional properties similar to those of mesenchymal stem cells (MSCs) and cancer-associated fibroblasts (CAFs) [106]. GASCs are present in human low-grade gliomas (LGGs) and GBMs, mostly around blood vessels, but also in tumor tissue. Cultured GASCs have properties similar to MSCs, such as adhesion to plastic, expression of surface antigens characteristic of MSCs (CD73, CD90, and CD105), mesenchymal differentiation potential, and lack of tumorigenesis potential. They also have phenotypic and functional properties in common with CAFs, such as expressing markers FSP1/S100A4 and promoting angiogenesis, invasion, and tumor growth by secreting soluble factors and extracellular vesicles [106]. The origin of GASCs has yet to be determined. They might arise from the *trans*-differentiation of local brain cells, such as astrocytes, pericytes, vascular smooth muscle cells, or ECs. GASCs can also originate from bone marrow-derived MSCs. They are not a homogeneous stromal population, given that GASCs isolated from LGGs and GBMs present different proteomic profiles and cancer cell adhesion capacities [107]. Furthermore, GASCs might also differ between gliomas with the same histological classification. Two peritumoral microenvironments can be found in patients with GBM: a peripheral microenvironment containing GASCs with tumor-promoting and angiogenic properties, and another containing GASCs without such properties [108]. The genetic background of tumor cells could account for these different GASC statuses. GASCs might also have prognostic value in gliomas because the percentage of GASCs in GBMs [109] inversely correlates with overall survival. These cells, which complicate our understanding of the GBM TME, should not be ignored. Thus, additional studies on the impact of GASCs on the response to treatment are urgently required.

Therapeutic implications

Given their tumor-supporting functions, GASCs are promising new targets for glioma treatment. However, additional studies are required to identify candidate target molecules. One way to circumvent this problem is by using the properties of these cells to trap, rather than target, tumor cells [110]. The concept of tumor cell traps, which emerged from the ecological trap strategy, is designed to attract residual brain cancer cells surrounding the surgical cavity into the cavity, where they are trapped within a biomaterial support that can be targeted by treatment, such as stereotactic radiosurgery [111–113]. Molecules or particles with radio-sensitizing and/or chemotherapeutic characteristics could also be embedded within the biomaterial to improve tumor cell



destruction. Given that GASCs increase the invasiveness of GBM cells, a bacterial cellulose scaffold that was loaded with GASC-conditioned medium was evaluated for use as a trap matrix. The bacterial cellulose membranes released and attracted tumor cells *in vitro* [110]. Once attached to the surface of the membrane, tumor cells were unable to move on, go through, or escape the membrane, even when an attractive medium was present in close proximity [110]. However, further studies are needed to improve the chemotaxis properties of bacterial cellulose membranes to ensure the diffusion of chemoattractants over large distances and at high enough concentrations to trap GBM cells that infiltrate tissues several centimeters away from the resection cavity.

Extracellular matrix in GBM

Cellular and molecular aspects

ECM remodeling and stiffening is associated with a poorer prognosis [114]; however, analysis of ECM components and their spatial distribution in samples from patients with GBM is limited. Given that the brain is a soft tissue, its ECM differs from that of other solid organs. Elasticity of normal brain and brain tumors, measured using shear wave elastography, showed a stiffness increase from 7.3 kPa for normal brain to 11.4–33.1 kPa in GBM of different grades [115]. This observation was confirmed in preclinical models, with heterogeneous GBM tissues becoming softer as hypoxic/necrotic areas develop over time or, conversely, stiffer in zones of dense cell-containing abnormal vascular components [116]. At the molecular level, these differences in tissue stiffness result from modifications in the ECM composition in GBM. Accordingly, increased amounts of hyaluronic acid (HA) are detected in the ECM surrounding the tumor, as a result of locally increased HA synthase 1–3 activity, which promotes ECM remodeling and invasion of GBM cells [117]. Furthermore, tenascins, glycosaminoglycans, laminins, fibronectins, and collagens secreted by tumor cells or by stromal cells also contribute to ECM softening [118].

Mechanical stress has been previously shown to specifically control Rho GTPase [119]. Myosin II appears essential for migration properties by squeezing nuclei upon stiffness [120], suggesting an ECM-induced promotion of glioma invasiveness. *In vitro* biochemical investigations established that the morphology and the migratory behavior of GBM cells were inversely correlated with HA density [121], suggesting that a major requirement for glioma invasion is linked, at least in part, to the interaction between HA and its cognate receptor CD44. This finding also indicates that reduced HA leads to more flexibility [122] and, in turn, could favor the degradation of the surrounding ECM by MMPs, such as MMP2, MMP9, and MMP13, allowing tumor cells to invade surrounding brain tissue [123].

A pro-invasive network of matrix collagens, collagen-interacting proteins, and collagen-processing enzymes is present in mesenchymal tumors and transcriptionally regulated by IRF3. The expression levels of these collagens significantly correlated with GBM progression and OS [124]. In addition to its fibrous composition, the ECM dynamically controls fluid concentrations and gradients of chemokines within the tumor bulk and in the periphery, via GBM-induced secretion of different enzymes, including hyaluronidases, MMPs, disintegrin, metalloproteinases with thrombospondin sequence (ADAMTs), cathepsins, urokinases (uPAs), and tissue plasminogen activators (TPAs). This leads to chemokine and growth factor accumulation, either by increased production or by the release of pre-adsorbed ligands, such as the CXC family of chemokines or TGF β [125] following ECM degradation, which control GBM invasion and progression. ECM components or ECM-entrapped secreted proteins also have the ability to modify the immune landscape of GBM. For example, M2 TAMs (known to exhibit protumoral functions) are recruited through Integrin $\alpha v \beta 3$ in the tumor by GSC-secreted periostin to promote malignant growth [126]. Tenascin-C impairs T cell infiltration in tumor nodules [127]. Osteopontin overexpressed in GBM microenvironment by immune cells is required for M2 macrophage gene signature maintenance and recruitment to the tumor [128]. However, dynamic changes in brain ECM during

GBM development and progression are not yet extensively characterized or understood. Recently, comprehensive work demonstrated how the compression exerted by GBM on the surrounding brain tissue causes vascular perfusion defects and death of adjacent neurons, likely contributing to extra-tumoral ECM remodeling [129].

Therapeutic implications

Targeting ECM in GBM appears an attractive strategy based on the altered expression of components responsible for many aspects of tumor progression. Hyaluronan is the most studied component [130], with HA oligomers, hyaluronidases, or HA synthesis inhibitors yielding promising results in preclinical studies, despite not yet reaching clinical applications. Among the HA synthesis inhibitors, 4MU induced senescence and decreased CD44 and RHAMM in glioma cells independently of its effect on HA and, thus, is an alternative therapy [131] requiring more investigation. HA was also identified as a therapeutic target in oncolytic adenovirus immunotherapy. ICOVIR17, a conditionally replicating adenovirus expressing soluble hyaluronidase, mediates degradation of HA when directly injected in GBM in mice, resulting in virus spread and antitumor efficacy [132]. Moreover, ICOVIR17 dramatically modified the immune landscape in immunocompetent GBM mice by increasing tumor-infiltrating CD8⁺ T cells and glioma-associated macrophages, and upregulating PDL1 [133]. The combination of ICOVIR17 with anti-PD1 therapy led to increased survival in mice, suggesting strong preclinical evidence in support of a clinical trial.

Other ECM molecules have also been targeted. A brevican deglycosylated form (dg-Bcan), which accumulates specifically in GBM, could be targeted by a dg-Bcan-targeting peptide (BTP-7) specifically homing to GBM [134], enabling drug delivery with therapeutic effects [135]. Similarly, a tumor-penetrating Tenascin-C binding peptide (PL3 peptide) was used to coat nanoparticles, which then accumulated at Tenascin-C- and NRP1 receptor-positive areas in clinical GBM samples. When loaded with pro-apoptotic factors, these PL3-guided nanoparticles provoked GBM caspase-3-dependent apoptosis and decreased vascularization associated with mouse survival [136]. This finding led to the creation of a bispecific Tenascin-C and fibronectin-targeted peptide (PL1 peptide), which also shows antiglioma activity [137]. Recent development of an antibody-cytokine fusion or immunocytokines, based on an L19 antibody specific for the tumor-associated extra epitope B of fibronectin in fusion with IL12 or TNF α , showed promising results in mouse models. The fusion promoted tumor-infiltrating lymphocytes and increased proinflammatory cytokines within the TME [138], which resulted in L19/TNF α -induced GBM necrosis. This compound is now being tested in a pilot trial in patients with GBM (NCT03779230). Targeting the ECM brings new hope to being able to provide therapeutic alternatives that not only remodel the GBM microenvironment (in particular to enhance anti-tumoral immunity), but also, when used in combination, guide therapeutics inside tumors or promote immune attack.

Concluding remarks

Although no significant improvements in the survival of patients with GBM have been seen in the general population since 2005, two important Phase 3 randomized clinical trials reported positive results in two subgroups of patients with newly diagnosed GBM. First, the EF-14 clinical (NCT00916409) showed that TTFelds plus SOC improved progression-free survival and OS in patients with newly diagnosed GBM in good clinical condition (i.e., Karnofsky performance score ≥ 70) after the concurrent radiochemotherapy part of the SOC [104]. Second, the CeTeG/NOA-09 (NCT01149109) clinical trial reported that lomustine added to SOC increased the OS of patients with MGMT-methylated newly diagnosed GBM [139] (a more complete list of current clinical trials is provided in Table S1 in the supplemental information online). Nevertheless, novel therapeutic targets, such as those derived from the study of the TME, must be identified to increase the therapeutic efficacy.

Outstanding questions

What are the molecular events and their dynamics that occur between tumor cells and the nervous, vascular, and immune compartments?

What contributes to tumor regional heterogeneity?

How can 3D GBM models be improved to account for the complexity of the TME?

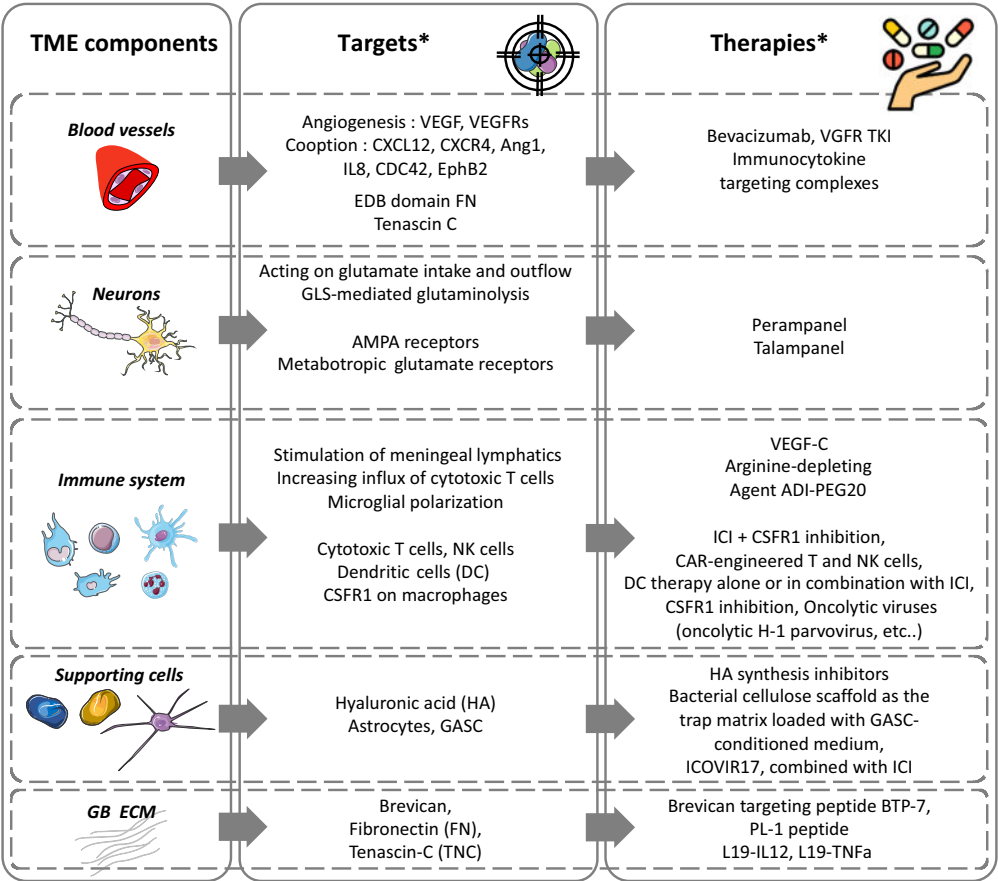
What are the external constraints and cues regulating the TME and what is their impact on tumor development?

What is the impact of therapeutic intervention on a complex brain tumor environment?

Which therapeutic strategies that associate with TME/tumor cell-targeting combinations contribute to an improved outcome of the disease?



Many components of the GBM environment have been reported in the literature, such as vascular and immune components, neurons, and ECM. They interact closely with GSCs or differentiated GBM cells through a network of growth factors, cytokines, and chemokines. Figure 2 summarizes



[* current and potential]

Trends in Cancer

Figure 2. Cellular and molecular actors and potential targets and therapeutic interventions in glioblastoma (GBM). Abbreviations: ADI-PEG20, pegylated arginine deiminase; AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; Ang, angiotensin; CAR, chimeric antigen receptor; CDC42, cell division control protein 42 homolog; CSFR1, colony-stimulating factor receptor-1; CXCL, CXC chemokine; CXCR, CXC chemokine receptor; DC, dendritic cell; ECM, extracellular matrix; EDB, extra domain-B; EphB2, ephrin B2; FN, fibronectin; GASC, glioma-associated stromal cell; GB-ECM, glioblastoma-extracellular matrix; GLS, glutaminase; HA, hyaluronic acid; ICI, immune checkpoint inhibitor; IL8, interleukin-8; L19-IL12, L19 antibody-bound interleukin-12; L19-TNFa, L19 antibody-bound TNF α ; NK, natural killer; PL1 peptide, 12-mer targeting peptide selectively interacts with both TNC-C and FN-EDB; TKI, tyrosine kinase inhibitor; TKI, tyrosine kinase inhibitor; VEGF(R), vascular endothelial growth factor (receptor); VEGF, vascular endothelial growth factor.

the cellular and molecular actors and potential targets and therapeutic interventions in GBM. This variety of cell–cell and molecular interactions reflects the heterogenous state of GBMs, of which tumor cell plasticity is a main feature. New technologies [e.g., *in vivo* imaging, artificial intelligence, single cell (sc)RNA sequencing or single nucleus (sn)RNA sequencing, or spatial gene expression] combined with more sophisticated and controlled experimental models are likely to provide relevant novel information to improve our understanding of the GBM TME (Box 5). These might, in turn, contribute to the identification of actionable targets for the development of effective therapeutic strategies (e.g., TME-based tumor traps). Finally, current therapeutic approaches impact the components of the TME through different means, which modulate and modify the therapeutic response. For example, neurosurgical actions alone or in combination with the frequent use of steroid therapy can impact the TME and surrounding brain tissue [140]. Although tumor surgical resection has shown modest effects when used as a stand-alone approach, it can be coupled with local therapy in GBM. Approaches to local drug delivery have included the use of implantable, controlled-release polymer systems [141], delivery into the cerebrospinal fluid (CSF) or a cyst cavity (often using an implanted reservoir [142]), and catheter-based convection-enhanced delivery (CED) [143]. Other therapeutic agents have been investigated (reviewed in [144]). For instance, there are studies using intra-arterial cerebral infusion of anti-angiogenics in relapsed GBM (NCT01269853), opening of the BBB by using a sonocloud-9 device (NCT04614493), infusion of B7-H3 CAR-T in recurrent GBM (NCT04077866), or administration of autologous DCs in primary GBM (NCT04115761).

Although results are limited, these methodologies are promising for targeted local drug diffusion with innovative and effective delivery tools (scaffold or fluidic) for delivery to the tumor and surrounding central nervous system of novel therapeutic agents (CAR-T cells, ICIs, chemo- or targeted therapies). For instance, medical devices, including Ommaya reservoirs, convection-enhanced delivery reservoirs, and *in situ* biodegradable devices, are interesting strategies to increase local drug delivery. A Phase 3 clinical trial reported the efficacy of carmustine wafers in high-grade gliomas, although statistical significance was not reached for GBM [141]. Thus, understanding how to either enhance or minimize these effects for treatment improvement represents a major challenge (see Outstanding questions).

Box 5. Experimental and preclinical GBM models

Improved models of GBM are needed to faithfully recapitulate the landscape of GBM states and TMEs and to contribute to a thorough understanding of the developmental cues yielding GBM heterogeneity. Current models include standard *in vitro* models, rodent implant, or genetically engineered models (GEMMs), and chick or quail, microfluidic or assembloid engineered models.

Rodent implant models for GBM have provided valuable information about various molecular regulations, but are limited. Indeed, syngeneic systems do not recapitulate the genetics of human tumors and xenotransplanted cell lines or patient-derived xenograft (PDX) models lack a fully competent immune system. GEMMs do not recapitulate the genetics of human tumors or their invasive behavior. As an alternative with fewer ethical issues, avian-embryo models have been developed for short-term studies [177]. Microfluidic or bioprinted models are generated with optically clear material-based microchannels networks containing cells and/or matrix to recreate *in vitro* tissue or organ structure and function [178]. Different types of microfluidic device exist, such as the 3D organotypic microfluidic platform [179], the 3D bioprinted tumor vascular model [180] or a microchannel set-up mimicking the GBM microenvironment [181]. These microfluidic-derived models provide some improvement over existing models but have still limitations, such as lacking developmental dynamics, plasticity, and a relevant immune cell component. This complex tissue system maintains the cytoarchitecture of the brain with functional astrocytes and neurons for 2 weeks but lacks functional vessels, a problem also seen in brain/GBM organoids. Micro- and macrovessel engineering has been performed to provide artificial vascularized tissue for functional studies and tissue vascularization. The emergence of organ-on-a-chip technologies has attracted much attention [182]. These technologies aim to create bioactive artificial tissues from cultured cells, often using microfluidic techniques.



Acknowledgments

We apologize deeply to colleagues whose work could not be cited in this review because of space constraints. This work was funded by grants from: EU Transcan ERA Net Consortium grant 'GliomaPRD' (2018-2021); ARC research grant 'Fondation ARC' 2018-2019 Role of PRL phosphatases in angiogenesis; Labellisation ARC 'GliomaGuide' (2018-2020); 'Conseil Régional d'Aquitaine' (2018-20019), Ligue Contre le Cancer (2017-2021) to A.B.; INCa PLBIO17-220 to M.G.; INCa PLBIO17-20 to E.C.; Cancéropôle Grand-Ouest to E.C., F.V., J.G., and L.B.; INCa PLBIO20-23 to T.D., E.C., and G.S.; INCa PLBIO21-24, Ligue Contre le Cancer, Plan Cancer, Fondation ARC, ARTC, Cancéropôle Grand Sud Ouest to T.D.; la Ligue Contre le Cancer (Comité Charente Maritime) to B.C. and V.C.; and ARTC-sud to E.T. All authors belong to the French Preclinical Brain Tumor Study Group 'GrOupe Préclinique de l'Anocel' (GOPA).

Declaration of interests

None declared by authors.

Supplemental information

Supplemental information to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2022.09.005>.

References

- Ostrom, Q.T. *et al.* (2021) CBRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2014-2018. *Neuro-Oncol.* 23, iii-iii105
- Fabbro-Peray, P. *et al.* (2019) Association of patterns of care, prognostic factors, and use of radiotherapy-temozolomide therapy with survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a French national population-based study. *J. Neuro-Oncol.* 142, 91-101
- Louis, D.N. *et al.* (2021) The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol.* 23, 1231-1251
- Stupp, R. *et al.* (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987-996
- DeWeerd, S. (2018) The genomics of brain cancer. *Nature* 561, S54-S55
- Gonzalez Castro, L.N. *et al.* (2021) Decoding cancer biology one cell at a time. *Cancer Discov.* 11, 960-970
- Aldape, K. *et al.* (2019) Challenges to curing primary brain tumours. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 16, 509-520
- Kowal, J. *et al.* (2019) Re-education of macrophages as a therapeutic strategy in cancer. *Immunotherapy* 11, 677-689
- Perus, L.J.M. and Walsh, L.A. (2019) Microenvironmental heterogeneity in brain malignancies. *Front. Immunol.* 10, 2294
- Bikfalvi, A. (2018) *A Brief History of Blood and Lymphatic Vessels*, Springer
- Venkataramani, V. *et al.* (2019) Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression. *Nature* 573, 532-538
- Klemm, F. *et al.* (2020) Interrogation of the microenvironmental landscape in brain tumors reveals disease-specific alterations of immune cells. *Cell* 181, 1643-1660
- Almairac, F. *et al.* (2020) ERK-mediated loss of miR-199a-3p and induction of EGFR1 act as a "toggle switch" of GBM cell dedifferentiation into NANOG- and OCT4-positive cells. *Cancer Res.* 80, 3236-3250
- El-Habr, E.A. *et al.* (2017) A driver role for GABA metabolism in controlling stem and proliferative cell state through GHB production in glioma. *Acta Neuropathol. (Berl)* 133, 645-660
- Jung, J. *et al.* (2017) Nicotinamide metabolism regulates glioblastoma stem cell maintenance. *JCI Insight* 2, 90019
- Natsume, A. *et al.* (2013) Chromatin regulator PRC2 is a key regulator of epigenetic plasticity in glioblastoma. *Cancer Res.* 73, 4559-4570
- Tohghandjani, A. *et al.* (2012) Cortical and subventricular zone glioblastoma-derived stem-like cells display different molecular profiles and differential in vitro and in vivo properties. *Ann. Surg. Oncol.* 19, S608-S619
- Khaila, J. *et al.* (2017) Subventricular zones: new key targets for glioblastoma treatment. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 12, 67
- Seano, G. (2018) Targeting the perivascular niche in brain tumors. *Curr. Opin. Oncol.* 30, 54-60
- Guelfi, S. *et al.* (2016) Vascular transdifferentiation in the CNS: a focus on neural and glioblastoma stem-like cells. *Stem Cells Int.* 2016, 2759403
- Deshors, P. *et al.* (2019) Ionizing radiation induces endothelial transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells through the Tie2 signaling pathway. *Cell Death Dis.* 10, 816
- Wu, A. *et al.* (2010) Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro-Oncol.* 12, 1113-1125
- Laprie, A. *et al.* (2008) Proton magnetic resonance spectroscopic imaging in newly diagnosed glioblastoma: predictive value for the site of postradiotherapy relapse in a prospective longitudinal study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 70, 773-781
- Pinto, G. *et al.* (2021) Patient-derived glioblastoma stem cells transfer mitochondria through tunneling nanotubes in tumor organoids. *Biochem. J.* 478, 21-39
- Assad Kahn, S. *et al.* (2016) The anti-hypertensive drug prazosin inhibits glioblastoma growth via the PKC δ -dependent inhibition of the AKT pathway. *EMBO Mol. Med.* 8, 511-526
- Piccirillo, S.G.M. *et al.* (2006) Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 444, 761-765
- Fareh, M. *et al.* (2012) The miR-302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. *Cell Death Differ.* 19, 232-244
- Red-Horse, K. *et al.* (2007) Endothelium-microenvironment interactions in the developing embryo and in the adult. *Dev. Cell* 12, 181-194
- Le Guellec, A. *et al.* (2011) Jumping the barrier: VE-cadherin, VEGF and other angiogenic modifiers in cancer. *Biol. Cell.* 103, 593-605
- Huang, M. *et al.* (2016) c-Met-mediated endothelial plasticity drives aberrant vascularization and chemoresistance in glioblastoma. *J. Clin. Invest.* 126, 1801-1814
- Das, S. and Marsden, P.A. (2013) Angiogenesis in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 369, 1561-1563
- Johnson, K.C. *et al.* (2021) Single-cell multimodal glioma analyses identify epigenetic regulators of cellular plasticity and environmental stress response. *Nat. Genet.* 53, 1456-1468
- Griveau, A. *et al.* (2018) A glial signature and Wnt7 signaling regulate glioma-vascular interactions and tumor microenvironment. *Cancer Cell* 33, 874-889
- El-Hallani, S. *et al.* (2010) A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain J. Neurol.* 133, 973-982
- Cheng, L. *et al.* (2013) Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* 153, 139-152
- Calabrese, C. *et al.* (2007) A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 11, 69-82

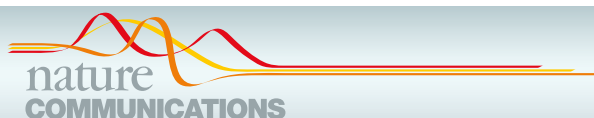
37. Xie, Y. *et al.* (2021) Key molecular alterations in endothelial cells in human glioblastoma uncovered through single-cell RNA sequencing. *JCI Insight* 6, e150861
38. Carlson, J.C. *et al.* (2021) Identification of diverse tumor endothelial cell populations in malignant glioma. *Neuro-Oncol.* 23, 932–944
39. Clavreul, A. *et al.* (2019) Nanocarriers and nonviral methods for delivering antiangiogenic factors for glioblastoma therapy: the story so far. *Int. J. Nanomedicine* 14, 2497–2513
40. Martin, J.D. *et al.* (2019) Normalizing function of tumor vessels: progress, opportunities, and challenges. *Annu. Rev. Physiol.* 81, 505–534
41. Treps, L. *et al.* (2017) Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 6, 1359479
42. Skog, J. *et al.* (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10, 1470–1476
43. Ma, S. *et al.* (2021) CD63-mediated cloaking of VEGF in small extracellular vesicles contributes to anti-VEGF therapy resistance. *Cell Rep.* 36, 109549
44. Simon, T. *et al.* (2018) Shedding of bevacizumab in tumour cells-derived extracellular vesicles as a new therapeutic escape mechanism in glioblastoma. *Mol. Cancer* 17, 132
45. Lombardi, G. *et al.* (2019) Regorafenib compared with lomustine in patients with relapsed glioblastoma (REGOMA): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 20, 110–119
46. Belotti, D. *et al.* (2021) Alternative vascularization mechanisms in tumor resistance to therapy. *Cancers* 13, 1912
47. Lee, E.Q. *et al.* (2020) NRG/RTOG 1122: a phase 2, double-blinded, placebo-controlled study of bevacizumab with and without trebananib in patients with recurrent glioblastoma or gliosarcoma. *Cancer* 126, 2821–2828
48. Weller, M. *et al.* (2017) Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 18, 1373–1385
49. Rosenthal, M. *et al.* (2019) Safety, tolerability, and pharmacokinetics of anti-EGFRvIII antibody-drug conjugate AMG 595 in patients with recurrent malignant glioma expressing EGFRvIII. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 84, 327–336
50. Cloughesy, T. *et al.* (2017) Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter Phase II Study of Onartuzumab Plus Bevacizumab Versus placebo plus bevacizumab in patients with recurrent glioblastoma: efficacy, safety, and hepatocyte growth factor and O6-methylguanine-DNA methyltransferase biomarker analyses. *J. Clin. Oncol.* 35, 343–351
51. Cloughesy, T.F. *et al.* (2018) Phase II study of cabozantinib in patients with progressive glioblastoma: subset analysis of patients with prior antiangiogenic therapy. *Neuro-Oncol.* 20, 259–267
52. Wen, P.Y. *et al.* (2018) Phase II study of cabozantinib in patients with progressive glioblastoma: subset analysis of patients naïve to antiangiogenic therapy. *Neuro-Oncol.* 20, 249–258
53. Castro Dias, M. *et al.* (2019) Structure and junctional complexes of endothelial, epithelial and glial brain barriers. *Int. J. Mol. Sci.* 20, E5372
54. Engelhardt, B. *et al.* (2017) The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat. Immunol.* 18, 123–131
55. Drăgan, A. *et al.* (2016) Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma. *Expert. Rev. Neurother.* 16, 1285–1290
56. Sarkaria, J.N. *et al.* (2018) Is the blood-brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. *Neuro-Oncol.* 20, 184–191
57. Hersh, D.S. *et al.* (2016) Evolving drug delivery strategies to overcome the blood brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* 22, 1177–1193
58. Chua, S.L. *et al.* (2004) Phase 2 study of temozolomide and Caelyx in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncol.* 6, 38–43
59. Tantillo, E. *et al.* (2020) Differential roles of pyramidal and fast-spiking GABAergic neurons in the control of glioma cell proliferation. *Neurobiol. Dis.* 141, 104942
60. Venkatesh, H.S. *et al.* (2015) Neuronal activity promotes glioma growth through neuropilin-3 secretion. *Cell* 161, 803–816
61. Dolma, S. *et al.* (2016) Inhibition of dopamine receptor D4 impedes autophagic flux, proliferation, and survival of glioblastoma stem cells. *Cancer Cell* 29, 859–873
62. Marcus, H.J. *et al.* (2010) In vivo assessment of high-grade glioma biochemistry using microdialysis: a study of energy-related molecules, growth factors and cytokines. *J. Neuro-Oncol.* 97, 11–23
63. Robert, S.M. *et al.* (2015) SLC7A11 expression is associated with seizures and predicts poor survival in patients with malignant glioma. *Sci. Transl. Med.* 7, 289ra86
64. Venkatesh, H.S. *et al.* (2019) Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature* 573, 539–545
65. Young, S.Z. and Bordey, A. (2009) GABA's control of stem and cancer cell proliferation in adult neural and peripheral niches. *Physiology* 24, 171–185
66. Smits, A. *et al.* (2012) GABA-A channel subunit expression in human glioma correlates with tumor histology and clinical outcome. *PLoS ONE* 7, e37041
67. Habela, C.W. *et al.* (2009) Chloride accumulation drives volume dynamics underlying cell proliferation and migration. *J. Neurophysiol.* 101, 750–757
68. Grossman, S.A. *et al.* (2010) Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and temozolomide in research studies in the United States. *Clin. Cancer Res.* 16, 2443–2449
69. Wirsching, H.G. *et al.* (2021) Negative allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor 3 target the stem-like phenotype of glioblastoma. *Mol. Ther. Oncolytics* 20, 166–174
70. Huang, Q. *et al.* (2021) SNAP25 inhibits glioma progression by regulating synapse plasticity via GLS-mediated glutaminolysis. *Front. Oncol.* 11, 698835
71. de Groot, J.F. *et al.* (2005) The excitatory amino acid transporter-2 induces apoptosis and decreases glioma growth in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 65, 1934–1940
72. Dunn, G.P. *et al.* (2012) Cancer immunoceding in malignant glioma. *Neurosurgery* 71, 201–222 discussion 222–223
73. Yang, I. *et al.* (2010) CD8+ T-cell infiltrate in newly diagnosed glioblastoma is associated with long-term survival. *J. Clin. Neurosci.* 17, 1381–1385
74. Avril, T. *et al.* (2011) Mechanisms of immunomodulation in human glioblastoma. *Immunotherapy* 3, 42–44
75. Quail, D.F. and Joyce, J.A. (2017) The microenvironmental landscape of brain tumors. *Cancer Cell* 31, 326–341
76. Chongsathidkiet, P. *et al.* (2018) Sequestration of T cells in bone marrow in the setting of glioblastoma and other intracranial tumors. *Nat. Med.* 24, 1459–1468
77. Mathewson, N.D. *et al.* (2021) Inhibitory CD161 receptor identified in glioma-infiltrating T cells by single-cell analysis. *Cell* 184, 1281–1298
78. Castriconi, R. *et al.* (2009) NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties. *J. Immunol. Baltim. Md.* 1950 182, 3530–3539
79. Gras Navarro, A. *et al.* (2014) NK cells with KIR2DS2 immunogenotype have a functional activation advantage to efficiently kill glioblastoma and prolong animal survival. *J. Immunol.* 193, 6192–6206
80. Mostafa, H. *et al.* (2016) Immune phenotypes predict survival in patients with glioblastoma multiforme. *J. Hematol. Oncol.* 9, 77
81. Friese, M.A. *et al.* (2003) MICA/NG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Res.* 63, 8996–9006
82. Kepp, O. *et al.* (2017) Extracellular nucleosides and nucleotides as immunomodulators. *Immunol. Rev.* 280, 83–92
83. Zhang, C. *et al.* (2017) Tumor purity as an underlying key factor in glioma. *Clin. Cancer Res.* 23, 6279–6291
84. Goffart, N. *et al.* (2017) CXCL12 mediates glioblastoma resistance to radiotherapy in the subventricular zone. *Neuro-Oncol.* 19, 66–77
85. Thomas, R.P. *et al.* (2019) Macrophage exclusion after radiation therapy (MERT): a first in human Phase I/II trial using a CXCR4 inhibitor in glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 25, 6948–6957
86. Gameiro, S.R. *et al.* (2014) Radiation-induced immunogenic modulation of tumor enhances antigen processing and calreticulin exposure, resulting in enhanced T-cell killing. *Oncotarget* 5, 403–416
87. Deng, L. *et al.* (2014) Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice. *J. Clin. Invest.* 124, 687–695



88. Vanpouille-Box, C. *et al.* (2017) DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat. Commun.* 8, 15618
89. Khan, S. *et al.* (2020) Role of neutrophils and myeloid-derived suppressor cells in glioma progression and treatment resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1954
90. Lakshmanachetty, S. and Mitra, S.S. (2022) Mapping the tumor-infiltrating immune cells during glioblastoma progression. *Nat. Immunol.* 23, 826–828
91. Song, E. *et al.* (2020) VEGF-C-driven lymphatic drainage enables immunosurveillance of brain tumours. *Nature* 577, 689–694
92. Reardon, D.A. *et al.* (2020) Effect of nivolumab vs bevacizumab in patients with recurrent glioblastoma: the CheckMate 143 Phase 3 randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 6, 1003
93. Antonios, J.P. *et al.* (2017) Immunosuppressive tumor-infiltrating myeloid cells mediate adaptive immune resistance via a PD-1/PD-L1 mechanism in glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 19, 796–807
94. Brown, C.E. *et al.* (2016) Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy. *N. Engl. J. Med.* 375, 2561–2569
95. O'Rourke, D.M. *et al.* (2017) A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci. Transl. Med.* 9, eaaa0984
96. Hill, N. *et al.* (2019) Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. *Nature* 565, 240–245
97. Liao, L.M. *et al.* (2018) First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *J. Transl. Med.* 16, 142
98. Geletneky, K. *et al.* (2017) Oncolytic H-1 parvovirus shows safety and signs of immunogenic activity in a first Phase I/IIa glioblastoma trial. *Mol. Ther.* 25, 2620–2634
99. Samson, A. *et al.* (2018) Intravenous delivery of oncolytic reovirus to brain tumor patients immunologically primes for subsequent checkpoint blockade. *Sci. Transl. Med.* 10, eaam7577
100. Fujita, M. *et al.* (2010) Role of type 1 IFNs in anti-glioma immunosurveillance—using mouse studies to guide examination of novel prognostic markers in humans. *Clin. Cancer Res.* 16, 3409–3419
101. Hajji, N. *et al.* (2022) Arginine deprivation alters microglial polarity and synergizes with radiation to eradicate non-arginine-auxotrophic glioblastoma tumors. *J. Clin. Invest.* 132, e142137
102. Butowski, N. *et al.* (2016) Orally administered colony stimulating factor 1 receptor inhibitor PLX3397 in recurrent glioblastoma: an Ivy Foundation Early Phase Clinical Trials Consortium phase II study. *Neuro-Oncol.* 18, 557–564
103. Salehbjani, S. *et al.* (2021) Hypofractionated stereotactic re-irradiation with pembrolizumab and bevacizumab in patients with recurrent high-grade gliomas: results from a phase I study. *Neuro-Oncol.* 23, 677–686
104. Stupp, R. *et al.* (2017) Effect of tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma: a randomized clinical trial. *JAMA* 318, 2306–2316
105. Karanam, N.K. and Story, M.D. (2021) An overview of potential novel mechanisms of action underlying Tumor Treating Fields-induced cancer cell death and their clinical implications. *Int. J. Radiat. Biol.* 97, 1044–1054
106. Clavreul, A. and Menei, P. (2020) Mesenchymal stromal-like cells in the glioma microenvironment: what are these cells? *Cancers* 12, E2628
107. Taghipour, M. *et al.* (2017) Comparative proteomic analysis of tumor mesenchymal-like stem cells derived from high grade versus low grade gliomas. *Cell J.* 19, 250–258
108. Clavreul, A. *et al.* (2015) Identification of two glioblastoma-associated stromal cell subtypes with different carcinogenic properties in histologically normal surgical margins. *J. Neuro-Oncol.* 122, 1–10
109. Shahar, T. *et al.* (2017) Percentage of mesenchymal stem cells in high-grade glioma tumor samples correlates with patient survival. *Neuro-Oncol.* 19, 660–668
110. Autier, L. *et al.* (2019) A new glioblastoma cell trap for implantation after surgical resection. *Acta Biomater.* 84, 268–279
111. van der Sanden, B. *et al.* (2013) Translation of the ecological trap concept to glioma therapy: the cancer cell trap concept. *Future Oncol.* 9, 817–824
112. Njberg, M. *et al.* (2019) Reversing the tumor target: establishment of a tumor trap. *Front. Pharmacol.* 10, 887
113. Kasapidou, P.M. *et al.* (2021) Hyaluronic acid-based hydrogels loaded with chemoattractant and anticancer drug - new formulation for attracting and tackling glioma cells. *Soft Matter* 17, 10846–10861
114. Miroshnikova, Y.A. *et al.* (2016) Tissue mechanics promote IDH1-dependent HIF1 α -tenascin C feedback to regulate glioblastoma aggression. *Nat. Cell Biol.* 18, 1336–1345
115. Chauvet, D. *et al.* (2016) In vivo measurement of brain tumor elasticity using intraoperative shear wave elastography. *Ultraschall. Med. Stuttg. Ger.* 1980 37, 584–590
116. Schregel, K. *et al.* (2018) Characterization of glioblastoma in an orthotopic mouse model with magnetic resonance elastography. *NMR Biomed.* 31, e3840
117. Perrin, S.L. *et al.* (2019) Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. *Biochem. Soc. Trans.* 47, 625–638
118. Mahesparan, R. *et al.* (2003) Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropathol. (Berl)* 105, 49–57
119. Torsoni, A.S. *et al.* (2005) RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H1488–H1496
120. Ivkovic, S. *et al.* (2012) Direct inhibition of myosin II effectively blocks glioma invasion in the presence of multiple motogens. *Mol. Biol. Cell* 23, 533–542
121. Rao, S.S. *et al.* (2013) Glioblastoma behaviors in three-dimensional collagen-hyaluronan composite hydrogels. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5, 9276–9284
122. Chen, J.W.E. *et al.* (2017) The combined influence of hydrogel stiffness and matrix-bound hyaluronic acid content on glioblastoma invasion. *Macromol. Biosci.* 17. <https://doi.org/10.1002/mabi.201700018>
123. Manini, I. *et al.* (2018) Role of microenvironment in glioma invasion: what we learned from in vitro models. *Int. J. Mol. Sci.* 19, E147
124. Pencheva, N. *et al.* (2017) Identification of a druggable pathway controlling glioblastoma invasiveness. *Cell Rep.* 20, 48–60
125. Ferrer, V.P. *et al.* (2018) Glioma infiltration and extracellular matrix key players and modulators. *Glia* 66, 1542–1565
126. Zhou, W. *et al.* (2015) Perlestin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat. Cell Biol.* 17, 170–182
127. Huang, J.Y. *et al.* (2010) Extracellular matrix of glioblastoma inhibits polarization and transmigration of T cells: the role of Tenascin-C in immune suppression. *J. Immunol.* 185, 1450–1459
128. Wei, J. *et al.* (2018) Osteopontin mediates glioblastoma-associated macrophage infiltration and is a potential therapeutic target. *J. Clin. Invest.* 129, 137–149
129. Seano, G. *et al.* (2019) Solid stress in brain tumours causes neuronal loss and neurological dysfunction and can be reversed by lithium. *Nat. Biomed. Eng.* 3, 230–245
130. Pibuel, M.A. *et al.* (2021) The scrambled story between hyaluronan and glioblastoma. *J. Biol. Chem.* 296, 100549
131. Pibuel, M.A. *et al.* (2021) Antitumor effect of 4MU on glioblastoma cells is mediated by senescence induction and CD44, RHAMM and p-ERK modulation. *Cell Death Discov.* 7, 280
132. Martinez-Quintanilla, J. *et al.* (2015) Encapsulated stem cells loaded with hyaluronidase-expressing oncolytic virus for brain tumor therapy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 23, 108–118
133. Kiyokawa, J. *et al.* (2021) Modification of extracellular matrix enhances oncolytic adenovirus immunotherapy in glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 27, 889–902
134. von Spreckelsen, N. *et al.* (2021) Targeting glioblastoma using a novel peptide specific to a deglycosylated isoform of brevicain. *Adv. Ther.* 4, 2000244

135. Cho, C.F. *et al.* (2022) A tumor-homing peptide platform enhances drug solubility, improves blood-brain barrier permeability and targets glioblastoma. *Cancers* 14, 2207
136. Lingasamy, P. *et al.* (2020) Tumor-penetrating peptide for systemic targeting of Tenascin-C. *Sci. Rep.* 10, 5809
137. Lingasamy, P. *et al.* (2019) Bi-specific tenascin-C and fibronectin targeted peptide for solid tumor delivery. *Biomaterials* 219, 119373
138. Weiss, T. *et al.* (2020) Immunocytokines are a promising immunotherapeutic approach against glioblastoma. *Sci. Transl. Med.* 12, eabb2311
139. Herflinger, U. *et al.* (2019) Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* 393, 678–688
140. Otvos, B. *et al.* (2021) Preclinical modeling of surgery and steroid therapy for glioblastoma reveals changes in immunophenotype that are associated with tumor growth and outcome. *Clin. Cancer Res.* 27, 2038–2049
141. Westphal, M. *et al.* (2003) A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (GliaGel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-Oncol.* 5, 79–88
142. Bolardi, A. *et al.* (1996) Interstitial chemotherapy with mitoxantrone in recurrent malignant glioma: preliminary data. *J. Neuro-Oncol.* 27, 157–162
143. Laske, D.W. *et al.* (1997) Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors. *Nat. Med.* 3, 1362–1368
144. D'Amico, R.S. *et al.* (2021) Convection-enhanced drug delivery for glioblastoma: a review. *J. Neuro-Oncol.* 151, 415–427
145. Bi, J. *et al.* (2018) Targeting cancer's metabolic co-dependencies: a landscape shaped by genotype and tissue context. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Rev. Cancer* 1870, 76–87
146. Lin, J. *et al.* (2019) The roles of glucose metabolic reprogramming in chemo- and radio-resistance. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38, 218
147. Oizel, K. *et al.* (2017) Efficient mitochondrial glutamine targeting prevails over glioblastoma metabolic plasticity. *Clin. Cancer Res.* 23, 6292–6304
148. Gouirand, V. *et al.* (2018) Influence of the tumor microenvironment on cancer cells metabolic reprogramming. *Front. Oncol.* 8, 117
149. Vander Heiden, M.G. *et al.* (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033
150. Lan, X. *et al.* (2017) Fate mapping of human glioblastoma reveals an invariant stem cell hierarchy. *Nature* 549, 227–232
151. Morfouace, M. *et al.* (2014) Control of glioma cell death and differentiation by PKM2-Oct4 interaction. *Cell Death Dis.* 5, e1036
152. Hoang-Minh, L.B. *et al.* (2018) Infiltrative and drug-resistant slow-cycling cells support metabolic heterogeneity in glioblastoma. *EMBO J.* 37, e98772
153. Formolo, C.A. *et al.* (2011) Secretome signature of invasive glioblastoma multiforme. *J. Proteome Res.* 10, 3149–3159
154. Almiron Bonnin, D.A. *et al.* (2018) Glioma cell secretion: a driver of tumor progression and a potential therapeutic target. *Cancer Res.* 78, 6031–6039
155. Vats, S. and Galli, T. (2021) Introducing secretory reticulophagy/ER-phagy (SERP), a VAMP7-dependent pathway involved in neurite growth. *Autophagy* 17, 1037–1039
156. Wojnacki, J. *et al.* (2020) Role of VAMP7-dependent secretion of reticulon 3 in neurite growth. *Cell Rep.* 33, 108536
157. Savaraj, J.P. *et al.* (2019) Early glioma is associated with abnormal electrical events in cortical cultures. *Med. Biol. Eng. Comput.* 57, 1645–1666
158. Obacz, J. *et al.* (2017) Endoplasmic reticulum proteostasis in glioblastoma-From molecular mechanisms to therapeutic perspectives. *Sci. Signal.* 10, eaal2323
159. Dadey, D.Y.A. *et al.* (2016) The ATF6 pathway of the ER stress response contributes to enhanced viability in glioblastoma. *Oncotarget* 7, 2080–2092
160. Peñaranda-Fajardo, N.M. *et al.* (2019) ER stress and UPR activation in glioblastoma: identification of a noncanonical PERK mechanism regulating GBM stem cells through SOX2 modulation. *Cell Death Dis.* 10, 690
161. Lhomond, S. *et al.* (2018) Dual IRE1 RNase functions dictate glioblastoma development. *EMBO Mol. Med.* 10, e7929
162. Dejeans, N. *et al.* (2012) Autocrine control of glioma cells adhesion and migration through IRE1 α -mediated cleavage of SPARC mRNA. *J. Cell Sci.* 125, 4278–4287
163. Drogat, B. *et al.* (2007) IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 67, 6700–6707
164. Langlais, T. *et al.* (2021) Structural and molecular bases to IRE1 activity modulation. *Biochem. J.* 478, 2953–2975
165. Le Reste, P.J. *et al.* (2020) Local intracerebral inhibition of IRE1 by MKC8866 sensitizes glioblastoma to irradiation/chemotherapy in vivo. *Cancer Lett.* 494, 73–83
166. Goiran, T. *et al.* (2018) Nuclear p53-mediated repression of autophagy involves PINK1 transcriptional down-regulation. *Cell Death Differ.* 25, 873–884
167. Viotti, J. *et al.* (2014) Glioma tumor grade correlates with parkin depletion in mutant p53-linked tumors and results from loss of function of p53 transcriptional activity. *Oncogene* 33, 1764–1775
168. Rouland, L. *et al.* (2021) Therapeutic potential of parkin as a tumor suppressor via transcriptional control of cyclins in glioblastoma cell and animal models. *Theranostics* 11, 10047–10063
169. Zhang, Y. *et al.* (2012) Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation. *Blood* 119, 2895–2905
170. Bhattacharya, A. *et al.* (2015) Autophagy is required for neutrophil-mediated inflammation. *Cell Rep.* 12, 1731–1739
171. Kon, M. *et al.* (2011) Chaperone-mediated autophagy is required for tumor growth. *Sci. Transl. Med.* 3, 109a117
172. Hubbi, M.E. and Hu, H. (2013) Kshitz null, Ahmed I, Levchenko A, Semenza GL. Chaperone-mediated autophagy targets hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) for lysosomal degradation. *J. Biol. Chem.* 288, 10703–10714
173. Hubbi, M.E. *et al.* (2014) Cyclin-dependent kinases regulate lysosomal degradation of hypoxia-inducible factor 1 α to promote cell-cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E3325–E3334
174. Natsumeda, M. *et al.* (2011) Induction of autophagy in temozolomide treated malignant gliomas. *Neuropathology* 31, 486–493
175. Liu, L. *et al.* (2018) Ac2-26 induces I κ B degradation through chaperone-mediated autophagy via HSPB1 in NCM-treated microglia. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 76
176. Valdor, R. *et al.* (2019) Glioblastoma ablates pericytes antitumor immune function through aberrant up-regulation of chaperone-mediated autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 20655–20665
177. Clarke, K. *et al.* (2015) Inference of low and high-grade glioma gene regulatory networks delineates the role of md3 in establishing multiple hallmarks of cancer. *PLoS Genet.* 11, e1005325
178. Sonthier-Phelps, A. *et al.* (2019) Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat. Rev. Cancer* 19, 65–81
179. Truong, D. *et al.* (2019) A three-dimensional (3D) organotypic microfluidic model for glioma stem cells – vascular interactions. *Biomaterials* 196, 63–77
180. Ozturk, M.S. *et al.* (2020) High-resolution tomographic analysis of in vitro 3D glioblastoma tumor model under long-term drug treatment. *Sci. Adv.* 6, 7513–7519
181. Prahli, L.S. *et al.* (2020) Predicting confined 1D cell migration from parameters calibrated to a 2D motor-clutch model. *Biophys. J.* 118, 1709–1720
182. Pollet, A.M.A.O. and den Toonder, J.M.J. (2020) Recapitulating the vasculature using organ-on-chip technology. *Bioengineering* 18, 17

Article 2 (Article original)



ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08480-y>

OPEN

Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development

Thomas Daubon^{1,2,3,4}, Céline Léon^{1,2}, Kim Clarke⁵, Laetitia Andrique^{1,2}, Laura Salabert^{1,2}, Elodie Darbo⁶, Raphael Pineau⁷, Sylvaine Guérit^{1,2}, Marlène Maitre⁸, Stéphane Dedieu⁹, Albin Jeanne^{9,10}, Sabine Bailly¹¹, Jean-Jacques Feige¹¹, Hrvoje Miletic^{3,12}, Marco Rossi¹³, Lorenzo Bello¹³, Francesco Falciani⁵, Rolf Bjerkvig^{3,4,14} & Andr  as Bikfalvi^{1,2}

We undertook a systematic study focused on the matricellular protein Thrombospondin-1 (THBS1) to uncover molecular mechanisms underlying the role of THBS1 in glioblastoma (GBM) development. THBS1 was found to be increased with glioma grades. Mechanistically, we show that the TGF   canonical pathway transcriptionally regulates THBS1, through SMAD3 binding to the THBS1 gene promoter. THBS1 silencing inhibits tumour cell invasion and growth, alone and in combination with anti-angiogenic therapy. Specific inhibition of the THBS1/CD47 interaction using an antagonist peptide decreases cell invasion. This is confirmed by CD47 knock-down experiments. RNA sequencing of patient-derived xenograft tissue from laser capture micro-dissected peripheral and central tumour areas demonstrates that THBS1 is one of the gene with the highest connectivity at the tumour borders. All in all, these data show that TGF  1 induces THBS1 expression via Smad3 which contributes to the invasive behaviour during GBM expansion. Furthermore, tumour cell-bound CD47 is implicated in this process.

¹INSERM U1029, Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale, 33615 Pessac, France. ²University Bordeaux, 33615 Pessac, France. ³KG Jebsen Brain Tumor Research Center, University of Bergen, 5020 Bergen, Norway. ⁴Norlux Beuro-Oncology, Department of Biomedicine, University of Bergen, 5020 Bergen, Norway. ⁵Computational Biology Facility, University of Liverpool, Liverpool L69 7ZB, UK. ⁶UMR1218 ACTION, Bioinformatic Center CBI, University of Bordeaux, 33076 Bordeaux, France. ⁷Animal Facility, University Bordeaux, 33615 Pessac, France. ⁸INSERM U1215, Neurocenter Magendie, Pathophysiology of Addiction Group, 33076 Bordeaux, France. ⁹CNRS UMR 7369, MEDyC, 51687 Reims, France. ¹⁰SATT Nord, 59800 Lille, France. ¹¹INSERM U1036, Grenoble 38000, France. ¹²Department of Pathology, Haukeland University Hospital, 5020 Bergen, Norway. ¹³Neurosurgical Oncology Unit, Department of Oncology and Hemato-Oncology, Humanitas Research Hospital, Universita Degli Studi di Milano, 20089 Rozzano, Milan, Italy. ¹⁴Oncology Department, Luxembourg Institute of Health, 84, Val Fleuri 1526, Luxembourg. These authors contributed equally: Rolf Bjerkvig, Andr  as Bikfalvi. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.D. (email: thomas.daubon@u-bordeaux.fr) or to A.B. (email: andreas.bikfalvi@u-bordeaux.fr)

Gliomas are classified by the WHO in four grades where glioblastoma (GBM) represents the most aggressive form¹. GBMs are diagnosed based on their neuropathological features including mitotic activity, diffuse invasion, and extensive angiogenesis and necrosis, the latter associated with blood–brain barrier disruption². Cell invasion represents a key challenge for effective drug delivery and may be induced by anti-VEGF therapy³.

The extracellular matrix (ECM), composed of fibrous proteins and glycoproteins, was first acknowledged for its scaffolding role, but is now recognised to have a role in numerous physiological and pathological processes⁴. This includes tumour development and metastasis⁵, where there is a striking difference between the ECM of normal tissue as compared with tumours⁶. The thrombospondins, a family of five members (THBS1–5), are important components of the ECM⁷. THBS1 was first discovered in platelets but has now been shown to have an important role in cancer development^{8,9}. Besides having a direct role in regulating tumour cell behaviour, THBS1 also exhibits functions in the tumour vasculature¹⁰. Numerous studies on several cancer types including GBM¹¹ indicate that THBS1 can modulate immune responses as well as GBM vascularisation¹². However, the precise contributions of THBS1 in GBM development as well as its regulation have not yet been fully determined.

Crosstalk between tumour and endothelial cells are driven by several factors including VEGF and TGFβ1, the latter being known to have a central role in GBM development¹³. We have previously shown that THBS1 is expressed in tumour blood vessels and in specific patient-derived xenograft (PDX) models¹⁴. It has been proposed that THBS1 activates TGFβ1 via its type 1 domain by mobilising its active form from the Latent Activating Protein (LAP)¹⁵. However, this may apply only to some but not all tumour types and it is still a matter of debate¹⁶. It has also not been established how TGFβ1 itself is able to regulate THBS1 expression¹⁷. THBS1 interacts with many effector proteins, including α6β1 or α4β1 integrins, as well as with cell-surface receptors such as CD36 and CD47⁷. THBS1/CD47 interactions have been reported to be important in vascularisation and tumour progression¹⁸, but have not been associated with GBM growth.

In this study, global expression analysis revealed THBS1 to be upregulated in high-grade gliomas and to be associated with a poor prognosis. Furthermore, we found that TGFβ1 activation was not regulated by THBS1 in GBM, but on the contrary, TGFβ1 induced THBS1 expression through direct transcriptional activation via SMAD3. Our data show that THBS1 is not only involved in the regulation of angiogenesis in GBM, but also impacts the invasive behaviour of glioma cells and that THBS1/CD47 interactions contributes to this process. Finally, we performed gene expression analysis by RNA-sequencing after microdissection of central and peripheral tumour areas in a human PDX model^{3,19}. We show striking differences between both areas in the tumour and stromal cell compartments. In this analysis, *THBS1* was the gene with the highest connectivity in the peripheral tumour areas.

Results

THBS1 is differently expressed between the glioma grades. THBS1 has a role in tumour invasion in vivo in prostate cancer⁹ and medulloblastoma²⁰, but its putative role in GBM invasion has not been explored so far. We have previously shown that THBS1 is expressed in tumour blood vessels and in specific PDX models¹⁴. According to The Cancer Genome Atlas (TCGA), THBS1 expression is found to be increased in GBMs when compared to grade II and III tumours (Supplementary Fig. 1A), and linked to

patient survival (Supplementary Fig. 1B). TGFβ1 expression was only slightly upregulated in high-grade gliomas (Supplementary Fig. 1A) and linked to survival (Supplementary Fig. 1B).

THBS1 was assessed for expression in patient samples of glioma grade II, III and IV by immunohistochemistry (IHC) (Fig. 1a). THBS1 was expressed at higher levels in GBM when compared to glioma grades II, III, or normal brains (Fig. 1b). When patient GBM tumour samples from multiple areas were analysed by IHC, a specific pattern of THBS1 staining was seen in the central tumour area and at the location of invasive cells (Supplementary Fig. 2A, B). THBS1 was detected in both, tumour vessels and tumour cells, the latter being enhanced in the peripheral invasive areas (margin) (Supplementary Fig. 2A, B). Significant colocalisation between THBS1 and the hypoxia marker CAIX (Carbonic Anhydrase IX) was detected in the patient GBM core, but only single positive cells (CAIX or THBS1) were detected in the invasive area (Supplementary Fig. 2C).

The P3 human xenograft model has previously been characterised in several studies^{3,21,22}. P3 give rise to tumours that show a close resemblance to human GBMs, exhibiting a necrotic core surrounded by pseudo-palisading cells as well as angiogenic and invasive areas¹⁴. IHC of P3 xenografts demonstrated higher THBS1 deposits within invasive areas (Fig. 1c, right panel) (Nestin staining of the invasive area of the corpus callosum is shown in Fig. 1c, left panel).

TGFβ1 controls THBS1 expression via SMAD3 binding. We have previously shown that inactivation of the stress response protein IRE1 leads to a change from an angiogenic to an invasive phenotype in U87 tumours²³. In this case, *THBS1* was found to be the most upregulated gene at both the mRNA and protein level²³. Western blot analyses confirmed THBS1 upregulation in U87 IRE1dn cells, in which Xbp1 is not spliced, as compared with U87 control cells (Supplementary Fig. 3A). Furthermore, TGFβ1 activity was found increased in IRE1dn vs control cells as demonstrated by measurements of active TGFβ1 (Supplementary Fig. 3B) and nuclear localisation of P-SMAD2 (Supplementary Fig. 3C). This suggested a link between TGFβ activity and THBS1 expression in our glioma model. To investigate the putative involvement of THBS1 in direct TGFβ activation, U87wt cells transfected with a SMAD luciferase reporter were incubated with recombinant THBS1 to monitor TGFβ activation (Supplementary Fig. 3D). Alternatively, U87wt cells stimulated with recombinant THBS1 were probed by western blot for TGFβ effectors (P-SMAD2 and FIBRONECTIN), and for PHOSPHO-AKT as a control of THBS1 receptor activation (Supplementary Fig. 3E, left panel). Under these conditions, THBS1 did not modulate the TGFβ pathway in the presence or absence of LSKL peptide, a putative inhibitor of THBS1/latent-activating protein interaction²⁴ (Supplementary Fig. 3D–E). However, P-AKT increase was seen after short-term THBS1 stimulation (Supplementary Fig. 3E, right panel). Furthermore, we demonstrated that knockdown of THBS1 in U87 IRE1dn cells, which endogenously express high levels of THBS1²³ (Supplementary Fig. 3A), had no effect on both the concentration of active TGFβ in the medium (200–300 pg/10⁶ cells, Supplementary Fig. 3F) or TGFβ activity measured by nuclear P-SMAD2/3 accumulation (Supplementary Fig. 3G). These results indicate that THBS1 has no direct role in TGFβ activation in the glioma model.

The patient-derived cell line P3 and U87 cells similarly responded to short-term TGFβ1 induction by increasing SMAD2 and SMAD3 phosphorylation (Supplementary Fig. 4A). After longer TGFβ1 stimulation, we found an increase in THBS1 expression in both P3 and U87 cells (respectively, 2.6 ± 0.007 - and 6.94 ± 0.17 -fold increase of THBS1 mRNA, 1.95 ± 0.16 - and

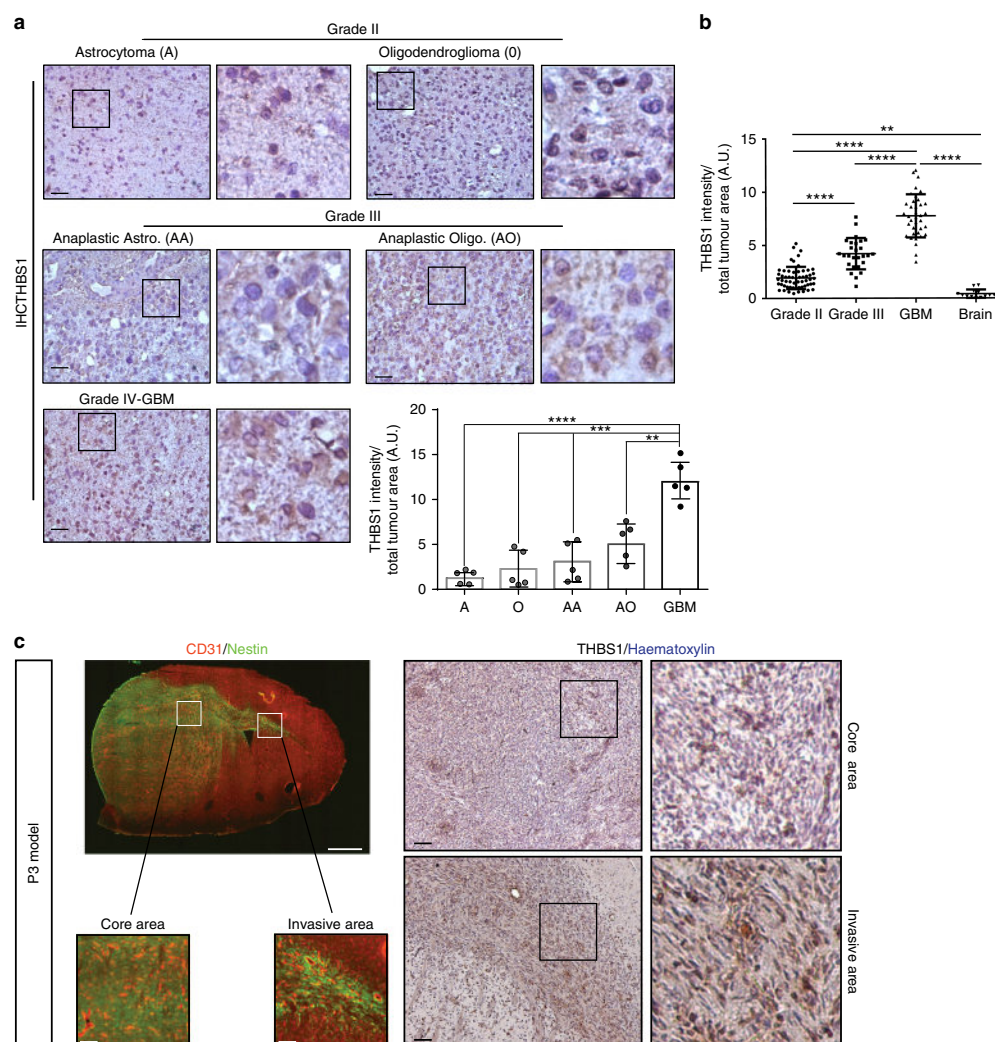
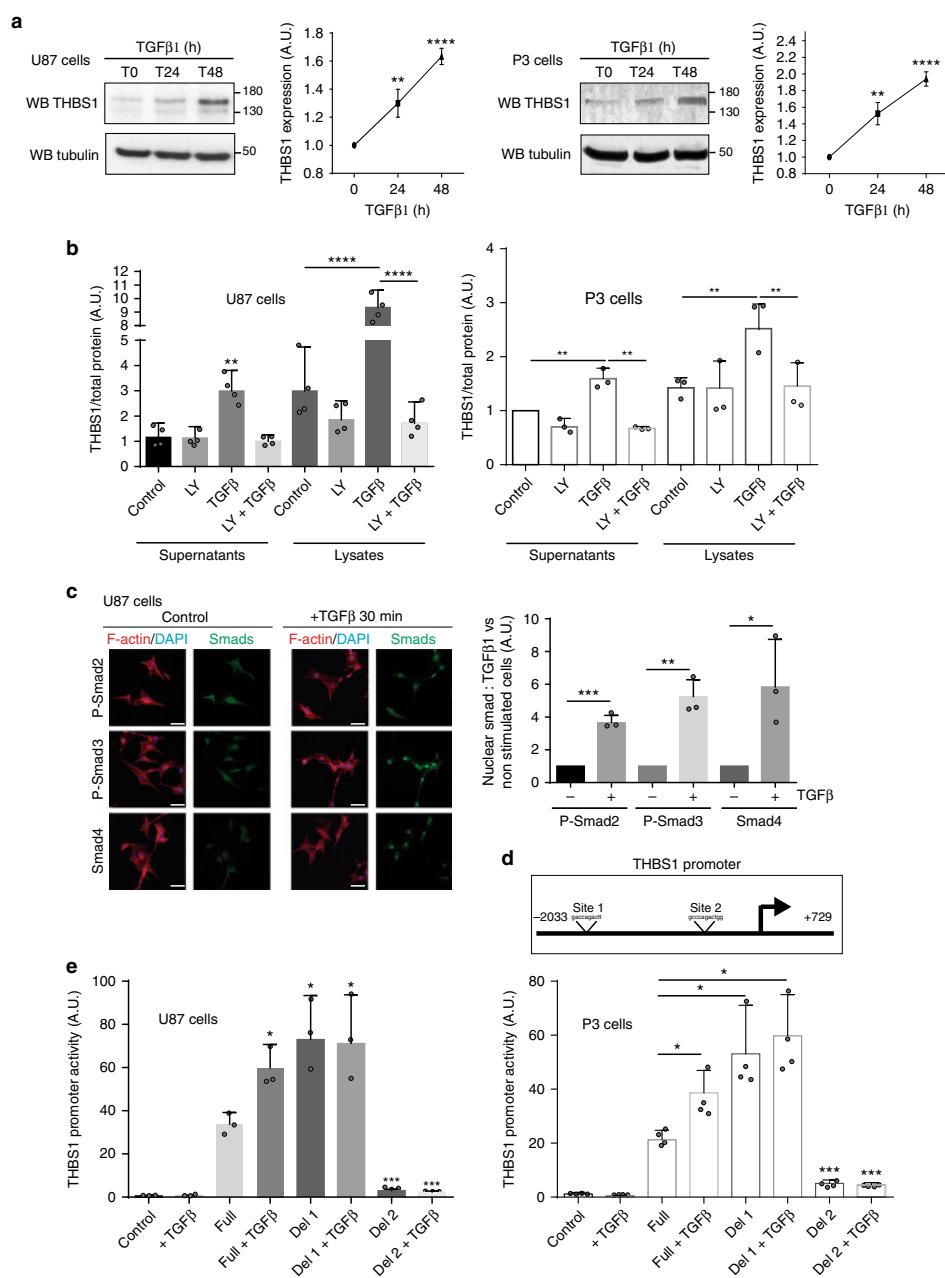


Fig. 1 THBS1 is a marker of high-grade glioma. **a** Immunohistochemistry (IHC) of THBS1 in patient samples from grade II astrocytomas and oligodendrogliomas (upper panels), grade III anaplastic astrocytomas and anaplastic oligodendrogliomas (middle panels) and grade IV glioblastomas (lower panels). Magnification of tumour areas is shown in each panel on the right hand side. Scale: 50 μ m. Quantification of THBS1 staining by IHC profiler from Fiji software. A, astrocytomas ($n = 5$); O, oligodendrogliomas ($n = 5$); AA, anaplastic astrocytomas ($n = 5$); AO, anaplastic oligodendrogliomas ($n = 5$); and GBM, glioblastomas ($n = 5$). The graph represents the results as means $\pm$ s.d. $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$; $^{****}P < 0.0001$; ns not significant (ANOVA). **b** Quantification of THBS1 staining by using tissue microarrays. 121 patients were analysed using TMA (Biomax), and IHC with anti-THBS1 antibodies. 57 were of grade II, 27 of grade III and 37 of GBM-grade IV. The graph represents the results as means $\pm$ s.d. $^{**}P < 0.01$; $^{****}P < 0.0001$ (ANOVA). **c** Left panels: immunofluorescence stainings of CD31 (red) and Nestin (green) of a P3 tumour section. Images below represent core and invasive areas. Scales: 500 μ m (upper panel) and 20 μ m (lower panels). Right panels: IHC for THBS1 in samples representing core and invasive areas in P3 tumours, counterstained with haematoxylin. THBS1 is expressed in invasive areas of P3 tumours. Scale: 50 μ m

1.67 $\pm$ 0.07-fold increase of THBS1 protein expression) (Fig. 2a). To corroborate our observations, we stimulated two other patient-derived cell lines (BL9 and BL13) with recombinant TGF β 1, and observed a time-dependent increase in THBS1 expression (Supplementary Fig. 4B). THBS1 expression was only increased after TGF β 1 stimulation, not after TGF β 2, EGF, PDGF-

BB, or IL-1 β stimulation (Supplementary Fig. 4C). Immunostaining revealed that THBS1 appeared as small aligned dots along cell protrusions that were further increased under TGF β 1 stimulation (Supplementary Fig. 4D). THBS1 expression and secretion were measured by ELISA in both cell extracts and in the extracellular environment (free-THBS1) (Fig. 2b). Induction by TGF β 1 was



completely blocked by the specific TGFβ receptor inhibitor, LY2157299, in cell lysates, but also in supernatants (Fig. 2b). To analyse canonical downstream signalling of TGFβ1, immunostainings for P-SMAD2, P-SMAD3 and SMAD4 were performed. All SMAD proteins were found to be located in the nuclei of U87

cells after TGFβ1 stimulation (Fig. 2c). Only binding sites for Smad3 were found in the human THBS1 promoter. These are located at -1125/-1115 for site 1 and at -110/-100 for site 2 (Fig. 2d). Importantly, SMAD3 silencing by siRNAs decreased TGFβ1-induced THBS1 expression with a stronger effect for

Fig. 2 THBS1 expression is regulated by TGF β 1 via SMAD3 promoter binding. **a** Analysis of THBS1 expression in protein extracts from non-treated or TGF β 1-treated U87 (left) and P3 (right) cells (24 or 48 h treatment). TGF β 1 was used at a concentration of 5 ng/ml. The graphs represent quantifications of THBS1 signal normalised to Tubulin ($n = 3$). Densitometry analysis (right panels) is represented as fold induction compared to control. Student's t -test P -value: ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$. **b** ELISA experiment performed on U87 (left) and P3 (right) cell supernatants or lysates, treated with 5 ng/ml of TGF β 1, 10 μ M of TGF β 1R inhibitor LY2157299 or combination treatment for 48 h. The graph represents a mean of four (U87) or three (P3) independent experiments as fold induction to non-treated cells. **c** Representative immunofluorescence images of starved U87 control or TGF β 1-treated cells (30 min TGF β 1 treatment with a concentration of 5 ng/ml) showing nuclear translocation of P-SMAD2, P-SMAD3 or SMAD4. Staining: Smads (green), Phalloidin for F-Actin (red) and DAPI for nuclei (blue). Scale bars: 10 μ m. The graph on the right represents a mean of three independent experiments (100 cells analysed in each), as fold induction vs non-treated cells. **d** Schematic representation of SMAD3-binding sites on THBS1 promoter. Binding site 1 is located at -1125/-1115 and binding site 2 at -110/-100 on the THBS1 promoter. **e** Luciferase promoter activity was measured by transfecting a PGL3 vector containing the full-length THBS1 promoter (Full) or inserts deleted either in binding site 1 (Del1) or binding site 2 (Del2). A GFP plasmid was used as a control. U87 (left) and P3 (right) cells were starved for 24 h and treated with 5 ng/ml of recombinant TGF β 1. The results are represented of three (U87) or four (P3) independent experiments. All graphs are represented as means $\pm$ s.d. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, not significant (ANOVA)

SMAD3-2 siRNA (Supplementary Fig. 5A, B). To acquire a deeper understanding of THBS1 transcriptional regulation, we mutated the putative SMAD3-binding sites on the THBS1 promoter and transduced P3 and U87 cells with these constructs. Luciferase experiments showed that THBS1 promoter activity is inhibited when the second SMAD3-binding site was mutated, while increased when the first binding site was mutated (Fig. 2e). These results indicate a direct role for canonical TGF β 1 signalling in controlling THBS1 transcriptional activity via SMAD3.

THBS1 impacts on tumour expansion and invasion. First, a THBS1 shRNA strategy was employed to inhibit THBS1 expression in U87wt cells. THBS1 expression was strongly reduced with both shRNAs (Supplementary Fig. 6A). Furthermore, invasion was significantly decreased in THBS1-knockdown U87 cells compared to control cells (Supplementary Fig. 6B). In P3 spheroids, THBS1-knockdown (Supplementary Fig. 7A) led to a significant reduction in cell invasion when tested in a collagen type I invasion assay (Fig. 3a). Knockdown THBS1 spheroids were then orthotopically implanted in mice, and tumours were then analysed by IHC (Supplementary Fig. 7B). Differences in vessel type were found in the THBS1-depleted tumours when compared to control, with a decrease in small vessel number (<10 μ m length) and an increase in medium size vessels (between 10 and 20 μ m length) (Fig. 3b). Contra-lateral invasion was significantly decreased by more than 49% for P3 THBS1-1 shRNA tumours and 76% for P3 THBS1-2 shRNA tumours in comparison with shRNA control tumours (Fig. 3b). Survival was significantly increased for mice implanted with P3 tumours transduced with either one of the THBS1 shRNA constructs (Fig. 3c). To reinforce these results, we performed a gain-of-function experiment by expressing THBS1 in P3 cells using a lentiviral construct. Overexpression was ascertained by western-blot and immunofluorescence (Fig. 3d). In this experiment, invasion of THBS1-overexpressing cells was increased (Fig. 3d).

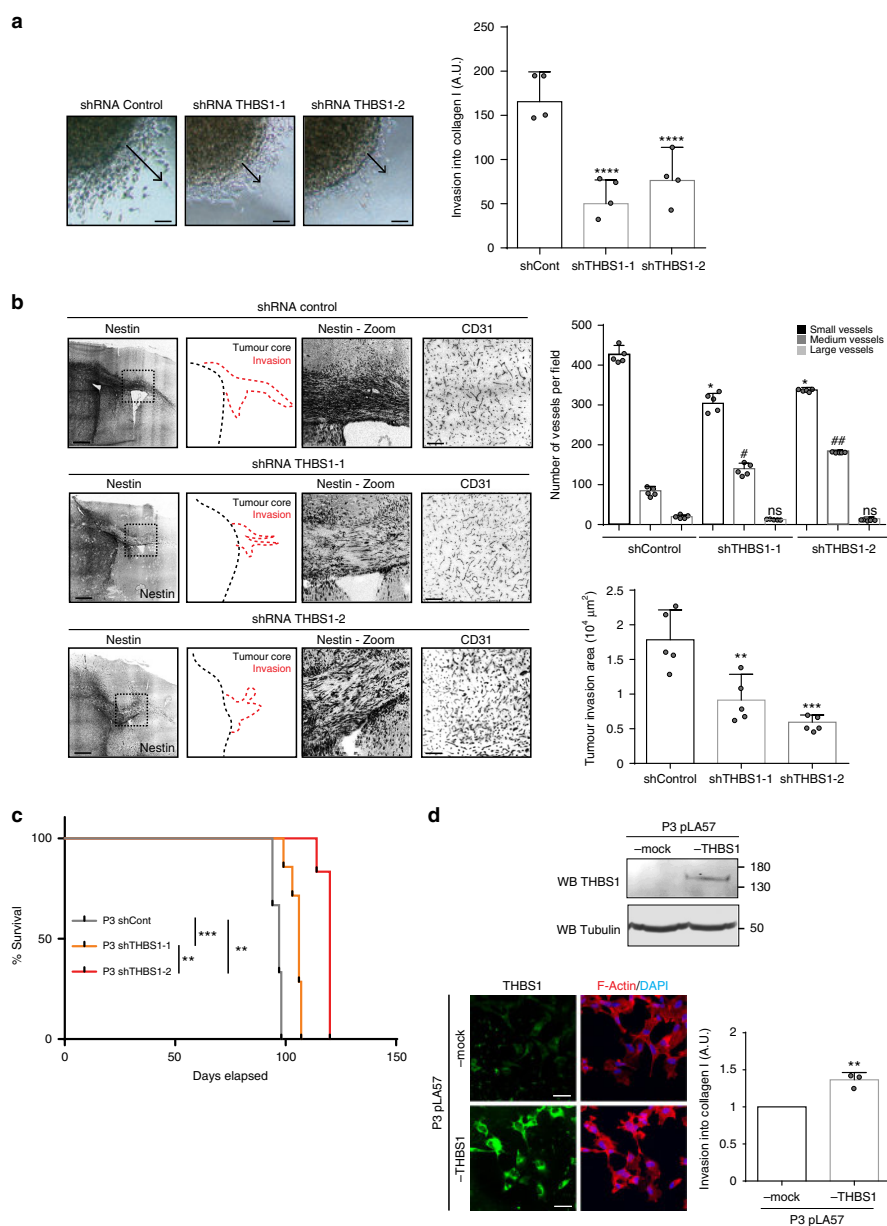
Hypoxia increased THBS1 expression through TGF β 1 activation. Anti-angiogenic therapy using anti-VEGF antibodies (bevacizumab) is commonly used for the treatment of recurrent GBMs²⁵. Tumour hypoxia and a subsequent increase in HIF1 α expression are consequences of bevacizumab treatment in vivo, which may lead to increased local invasion²⁶. Since it has been recently shown that bevacizumab treatment leads to an increase in TGF β 1 mRNA expression in GBM²⁷, we wanted to further assess the function of THBS1 following bevacizumab treatment. Bevacizumab-treated U87 tumours exhibited some invasive borders characterised by THBS1 deposits in the vicinity of invasive strands (Supplementary Fig. 8A). In bevacizumab-untreated P3

tumours, THBS1 deposits were already observed in peripheral areas but not in the tumour core (Fig. 4a). This was further confirmed by laser-capture microdissection and qPCR analysis where THBS1 mRNA was found significantly increased in the invasive area when compared with the tumour centre (Fig. 4b). In bevacizumab-treated P3 tumours, an increase in THBS1 expression was seen in the tumour core by western blot (Fig. 4a). Moreover, under in vitro hypoxic conditions, P3 and U87 cells increased THBS1 expression, as demonstrated by western blot (Fig. 4c and Supplementary Fig. 8B). Hypoxia activated the SMAD pathway as revealed by luciferase reporter experiments (Fig. 4d and Supplementary Fig. 8C), and we showed by using ELISA that THBS1 expression and secretion was inhibiting using LY2157299 (Fig. 4e and Supplementary Fig. 8D). In the highly angiogenic U87 glioma model treated with bevacizumab, silencing of THBS1 by shRNA led to a decrease in tumour expansion and invasion (Supplementary Fig. 8E). Survival was significantly increased when both THBS1 shRNA-transduced U87 and P3 tumours were treated with bevacizumab (Fig. 4f and Supplementary Fig. 8F).

CD47/THBS1 interaction is involved in GBM expansion. It has recently been shown that TAX2, a 12 amino-acid peptide stretch of CD47, specifically inhibits the THBS1/CD47 interaction, causing necrosis in various tumour models^{18,28}. In particular, TAX2 inhibits THBS1/CD47 interactions at the surface of endothelial cells. P3 cells highly express CD47 (Supplementary Data 1) while exhibiting low CD36 in vivo expression (Supplementary Data 1).

Since hypoxia induces THBS1 expression (Fig. 4c), we treated P3 spheroids with TAX2 or control peptide under hypoxic conditions (Fig. 5a). In this case, TAX2 significantly inhibited hypoxia-induced in vitro cell invasion (Fig. 5a). We next investigated the effect of the various treatments on tumour development in vivo. Blood vessel density was modified in all treatment groups with a strong effect of the TAX2 + bevacizumab combination on small vessels (Fig. 5b). Combination treatment inhibited contra-lateral and single-cell invasion in the P3 intracranial tumour model in comparison to bevacizumab treatment alone (Fig. 5c). Survival was increased when animals were treated with combinatory treatment (Fig. 5d).

CD47 is a key player of GBM invasion. We have furthermore reinforced our results by silencing CD47 in both P3 and U87 cells. We have used single-cell track migration as well as spheroid invasion assay. The spheroid invasion assay in collagen I with CD47-silenced P3 cells showed significant reduction of invasion (Fig. 6a, b). The single-cell migration track assay with CD47-silenced U87 cells demonstrated significant inhibition of cell



migration in comparison to U87 control cells (Supplementary Fig. 9A, B). Next, we have conducted in vitro invasion experiments in P3 shRNA CD47 or control cells stimulated or not with purified full-length THBS1. The results show that knockdown of CD47 significantly impairs THBS1-induced tumour cell invasion (Fig. 6c). Furthermore, survival studies in mice implanted with P3 CD47 knockdown or control cells showed significant increase in survival times in the CD47 knockdown group (Fig. 6d).

THBS1 is the gene with highest connectivity. To reinforce our results at a global scale, we performed transcriptomics analysis via RNA-sequencing of P3 tumours. GFP-labelled tumour cells from both invasive and angiogenic areas of P3 were visualised and then laser-microdissected prior to RNA isolation and sequencing (Fig. 1c). Gene expression profiling and data analysis were performed with respect to human and mouse RNA independently using Xenome (Supplementary Data 1). Principle component

Fig. 3 THBS1 controls invasion and growth of P3 tumour. **a** P3 cells were transduced with shRNA control or shRNA THBS1 (−1 and −2). P3 spheroid invasion was measured in collagen I gels after 24 h. Arrows represent the migration distance from the spheroid core. Scale: 50 μ m. The graph represents the invasion results as means $\pm$ s.d. of four independent experiments each done in 6–8 replicates for each condition. **** P < 0.0001 (ANOVA). **b** Control shRNA or THBS1 shRNA-transduced P3 cells were xenotransplanted into Rag2C $^{-/-}$ mice. Representative images of tumours with invasive areas are shown by Nestin staining (grey) with schematic representations (invasion in red dashed lines and tumour mass in black dashed lines). Scale: 200 μ m. The graphs on the right represent the number of small (<10 μ m), medium (between 10 and 20 μ m), large blood vessels (>20 μ m) (upper panel) and the invasion area (lower panel) of control shRNA and THBS1-1/-2 shRNA-transduced P3 tumours (average of 5 tumours with 8 sections/tumour analysed; * means comparison of small vessels; # means comparison of medium size vessels). The graphs represent results as means $\pm$ s.d. (n = 5 tumours analysed per group). * P < 0.05; # P < 0.05; ## P < 0.01; ns, not significant (ANOVA). **c** Kaplan–Meier survival curves of xenotransplanted mice with shTHBS1-1 (orange line), shTHBS1-2 (red line) or shControl (grey line) transduced P3 cells, based on the presence of neuropathological features (n = 8 mice per group); P -values were calculated with log-rank test, ** P -value < 0.01, *** P -value < 0.001. **d** P3 cells were transduced with pLA57-control or pLA57-THBS1 lentiviral constructs. Analysis of THBS1 and Tubulin expression in protein extracts from pLA57-control or pLA57-THBS1 P3 cells by western blot (Upper panel) and by immunostaining (lower left panel), THBS1 (green) and F-actin (red) and nuclei (blue). Scale bar: 10 μ m. pLA57-control or pLA57-THBS1 P3 cell spheroid invasion was measured in collagen I gels after 24 h. The graph represents the results as means $\pm$ s.d. of three independent experiments each done in 6–8 replicates for each condition, ** P < 0.01 (Student t -test)

analysis of the RNA-sequencing data confirmed distinct transcriptional profiles for central and invasive tumour areas (Supplementary Fig. 10A). Differential expression analysis revealed gene signatures comprising 520 genes that were higher expressed in invasive areas and 1035 genes that were higher in central areas for P3 tumours (Supplementary Fig. 10B and Supplementary Data 2). Functional analysis of the gene signatures revealed enrichment of Gene Ontology terms being highly relevant to glioma biology (Supplementary Data 3). As expected, central areas showed higher expression of multiple genes related to blood vessel development, cell adhesion, inflammation, cell migration and neurogenesis, whereas invasive areas expressed higher levels of genes controlling chemotaxis, cell migration and cell communication. To further assess potential cellular networks involved in these processes, we used Ingenuity Pathway Analysis to search within the invasive and angiogenic gene signatures for potential secreted molecules involved in cell communication (Supplementary Data 2). This analysis identified TNF and TGFB1 as the most significantly overlapping regulators with 47 and 36 targets, respectively. As previously mentioned, TGFB1 is known to control many processes of GBM development, and interestingly 20 out of its 36 targets were expressed higher in invasive areas (Supplementary Fig. 10C). While focusing on the invasive area, we further compared overexpressed genes that may contribute to communication between the stromal compartment and the tumour. Tumour Thrombospondin-1 (THBS1), Annexin II (ANXA2) and PDGFB were found to have the highest connectivity with genes of the stromal compartment (Fig. 7 and Supplementary Data 3). THBS1 has high connectivity in the invasive compartment of P3 tumours with collagens, TGFB1 and integrins (Fig. 7). The significance of the role of THBS1 is supported by an independent laser-capture microdissection and qPCR analysis, which showed increase of THBS1 mRNA in the invasive area when compared to the tumour core (Fig. 4b). These data are in agreement with the functional analysis described above and, thus, support a role of THBS1 in tumour cell invasion in GBM.

Discussion

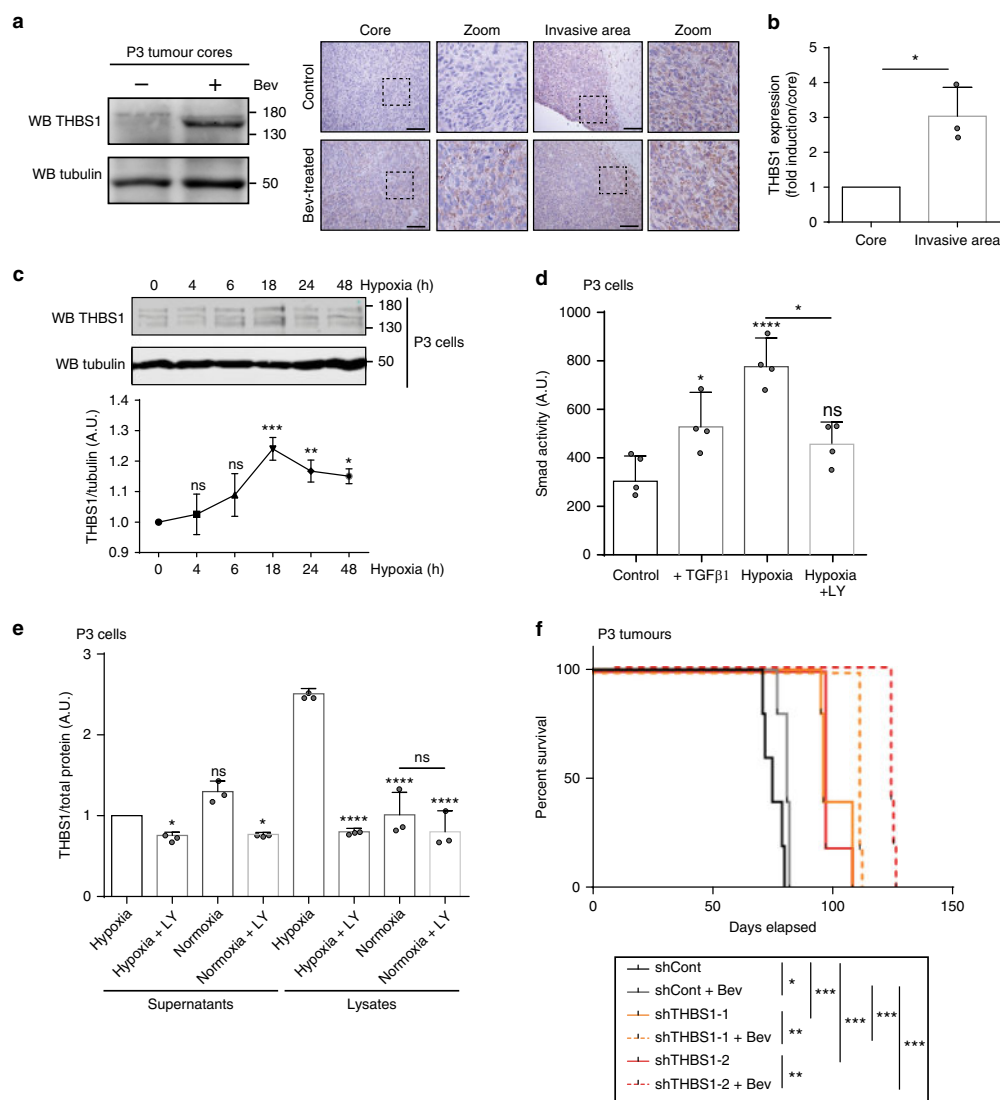
GBMs represent one of the most challenging tumours to treat based on their location and their invasive behaviour in the brain. These tumours also display an extensive cellular heterogeneity. Therefore, elucidating the mechanisms of tumour progression is important for the development of new and effective therapies.

In this article, we focused our attention on THBS1 to determine its involvement in GBM development. We showed that (1) THBS1 expression is greater in high-grade glioma patients

samples when compared with low-grade gliomas; (2) THBS1 expression is regulated by TGF β 1 via SMAD3-binding sites; (3) THBS1 is both expressed in tumour cells and vessels; (4) tumour-derived THBS1 is involved in GBM invasion and expansion; (5) anti-angiogenic treatment increases THBS1 expression through hypoxia-induced TGF β 1; (6) tumour cell-bound CD47 is involved in THBS1 effects; (7) network analysis demonstrates THBS1 as the gene with the highest connectivity in the invasive compartment.

The thrombospondin family has been shown to be involved in tumour development and progression in several types of cancer²⁹. THBS1 has been shown to impair GBM growth and vascularisation³⁰. Since THBS1 is a matricellular protein with a plethora of regulatory functions, we set out to further elucidate its role through a systematic analysis using multiple cell models and assays with a focus on tumour cell invasion.

A classical paradigm for TGF β activation relies on the idea that stretching of the TGF β -LAP protein by THBS1 is involved in this process²⁴. However, in our study, treatment of cells with purified THBS1 did not increase fibronectin expression and did not lead to smad phosphorylation in the reporter assay. We then knocked down endogenous THBS1 in cells that highly over-express this molecule and also produce significant amounts of active TGF β 1. This did not alter active TGF β 1 concentrations in the medium, which indicates that THBS1 does not activate TGF β 1 in this case. We therefore sought to determine whether, on the contrary, TGF β 1 was able to regulate THBS1 expression in GBM. THBS1 expression has been reported to be regulated by FGF, PDGF or E2F1³¹, but only a few reports exist to support regulation of THBS1 by the TGF β pathway^{32,33}. In our study, only TGF β 1 but not TGF β 2, EGF, PDGF-BB or IL10 stimulated THBS1 expression. TGF β 1-mediated induction of THBS1 is regulated through SMAD3 phosphorylation and nuclear translocation. To obtain insights into the transcriptional regulation, we mutated the two SMAD3-binding motifs in the THBS1 promoter. One is located at −1125/−1115, whereas the second corresponds to a −110/−100 site. We demonstrated that these two domains have opposite effects on THBS1 transcription. The first one activates THBS1 transcription while the second one drives inhibitory signals. The net result of THBS1 activation by TGF β 1 may be due to the ratio of Smad binding to site 1 and 2 where binding to site 2 will be favoured. The existence of different target sites has been published for E2F1 with one activator and one repressor target sequences³⁴. The control of THBS1 transcription may involve more SMAD3 interactors for defining this positive and negative effects. Further studies on THBS1 gene regulation will be performed for elucidating this phenomenon.



Our data are in apparent contradiction with the results of Seliger and collaborators³⁵. These authors reported that THBS1 expression is increased by lactate and that this in turn contributes to TGFβ2 activation. Our data are completely opposed to these published results and one can only speculate about the reason of these differences. TGFβ activation was only studied by the authors in the HTZ-349 cell line and not any other standard or patient-derived glioma cell lines. The authors also studied TGFβ2 activation and not TGFβ1 activation. On the contrary, our study provides robust data that are highly consistent in standard and patient-derived cell lines.

As noted in this article, we have used the U87 cell line for a number of functional experiments. Recently, a doubt has been

cast on the origin of this cell line³⁶. Furthermore, U87 cells classically grow as a very compact and round angiogenic tumour in vivo. In our study, we have used both U87 cells and cells from patient-derived tumours. The results derived from TGFβ1 and THBS1 functional analysis were consistent for both U87 and patient-derived cell lines. In addition, we analysed another U87-derived cell line, U87 IRE1dn, which have very high THBS1 levels and a pronounced invasive phenotype in vitro and in vivo²³.

Experiments carried out on the U87 cell line showed impairment of in vitro invasion after THBS1 silencing. In vivo, mouse survival was increased in animals xenografted with U87 THBS1-knockdown tumours when treated with anti-angiogenic therapy. This is also consistent with the results obtained with the P3

Fig. 4 THBS1 is induced by hypoxia through TGF β 1 activation. **a** Protein extracts from P3 tumour cores were analysed by western blot probed with anti-THBS1 and anti-Tubulin antibodies (left panel). Representative images of P3 control or bevacizumab-treated tumours stained for THBS1 (brown) and counterstained with haematoxylin (blue) are shown (right panels). Images represent the core and the invasive areas of both tumours. Scale bars: 100 μ m. **b** qPCR of *THBS1* transcript from the core or the invasive area of P3 tumours, after laser microdissection. Three independent tumours were analysed, results are represented as means $\pm$ s.d. and compared to the tumour core. * $P < 0.05$ (Student *t*-test). **c** Immunoblots of protein extracts from P3 cells exposed to hypoxia (1% O_2) for 4, 6, 18, 24 or 48 h, and probed with anti-THBS1 or anti-Tubulin antibodies. The graph below represents ratios of THBS1 and Tubulin signal intensities. Results are represented as means $\pm$ s.d. of three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, non-significant (Student *t*-test, comparison to time 0). **d** P3 cells were incubated under normoxia (21% O_2) or hypoxia (1% O_2) for 48 h and stimulated or not with 5 ng/ml of recombinant TGF β 1 or 10 μ M of LY2157299. Cells were transfected with SRE construct and luciferase activity was assessed. Results are represented as means $\pm$ s.d. of four independent experiments. **e** ELISA experiments performed on P3 cell lysates and supernatants. Cells were treated or not with 10 μ M of TGF β R inhibitor LY2157299, in normoxic or hypoxic conditions for 48 h. The graph represents three independent experiments as fold induction in comparison to non-treated cells (mean $\pm$ s.d.). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; ns, non-significant (ANOVA). **f** Kaplan-Meier survival curves of mice with intracranially implanted control (grey lines), THBS1-1 (orange lines) or THBS1-2 (red lines) shRNA-transduced P3 cells. Animals were treated or not with Bevacizumab (Bev) ($n = 7$ mice per group); *P*-values were calculated with log-rank test; * P -value < 0.05 ; ** P -value < 0.01 ; *** P -value < 0.001 .

tumour model where THBS1-knock down in combination with bevacizumab treatment led to a marked inhibition of both in vitro and in vivo invasion, with a significant impact on mouse survival. A decrease in tumour mass was also observed under these conditions. Taken together, these data indicate that THBS1 has a role in both tumour expansion and invasion. THBS1 inhibition reinforces the effect of anti-angiogenic treatments.

Bevacizumab treatment is known to decrease neo-angiogenesis and restores, to some extent, the blood-brain barrier³⁷. This therapy may also induce evasive resistance through upregulation of pro-invasive molecules via HIF1 α expression³. Hypoxia has previously been shown to induce THBS1 expression^{9,38}, but the mechanistic link was not established in these studies as no HIF1 α binding sequence is present in the *THBS1* promoter. Indeed, our data showed that hypoxia leads to TGF β 1 activation and nuclear accumulation of Smad transcription factors in GBM, which is consistent with the observation that the TGF β 1 promoter exhibits a hypoxia-responsive element³⁹. Furthermore, as described above, we demonstrated mechanistically how Smad3 induces THBS1 expression.

A mimicking peptide based on the CD36-activating sequence of THBS1 was developed (ABT-510), but had disappointing results in clinical trials⁴⁰. Other molecules are, at present, under development²⁸. One of those, the TAX2 peptide, is aimed at targeting the interaction between THBS1 and CD47. CD47 is expressed in endothelial cells, macrophages, and also in tumour cells⁴¹. This finding that was confirmed in our glioma cell lines and tumours models. TAX2 as a stand-alone treatment showed inhibitory activity in vitro under hypoxia in P3 cells and impaired single-cell invasion in vivo. TAX2 alone also reduced vascular density to some extent. TAX2 combined with bevacizumab led to an inhibition of contra-lateral tumour invasion in the same tumour model. This indicates that the CD47-THBS1 interaction has a complex role in GBM development by acting on angiogenesis, tumour invasion and expansion. These data are reinforced by CD47 knock down in glioma cells, which demonstrated inhibition of migration, invasion and an increase in survival. Our results are in agreement with recently published data where the authors identified cell-surface signatures for GBM using a systems biology approach⁴². The authors showed that CD47, besides other regulatory molecules, exhibited positive enrichment after TGF β treatment and that knock down of CD47 inhibited U87 migration. Furthermore, a computational model of THBS1 regulation has been recently established that links hypoxia-TGF β -THBS1. This also supports our experimental work⁴³.

To reinforce our data, we choose a non-biased approach by performing RNA-sequencing of central and invasive areas in the intracranial P3 model. Firstly, we identified several important

players for GBM development including TGF β 1. Most strikingly, *THBS1* was among the most connected genes in our analysis in the invasive area, which supports the functional analysis described above.

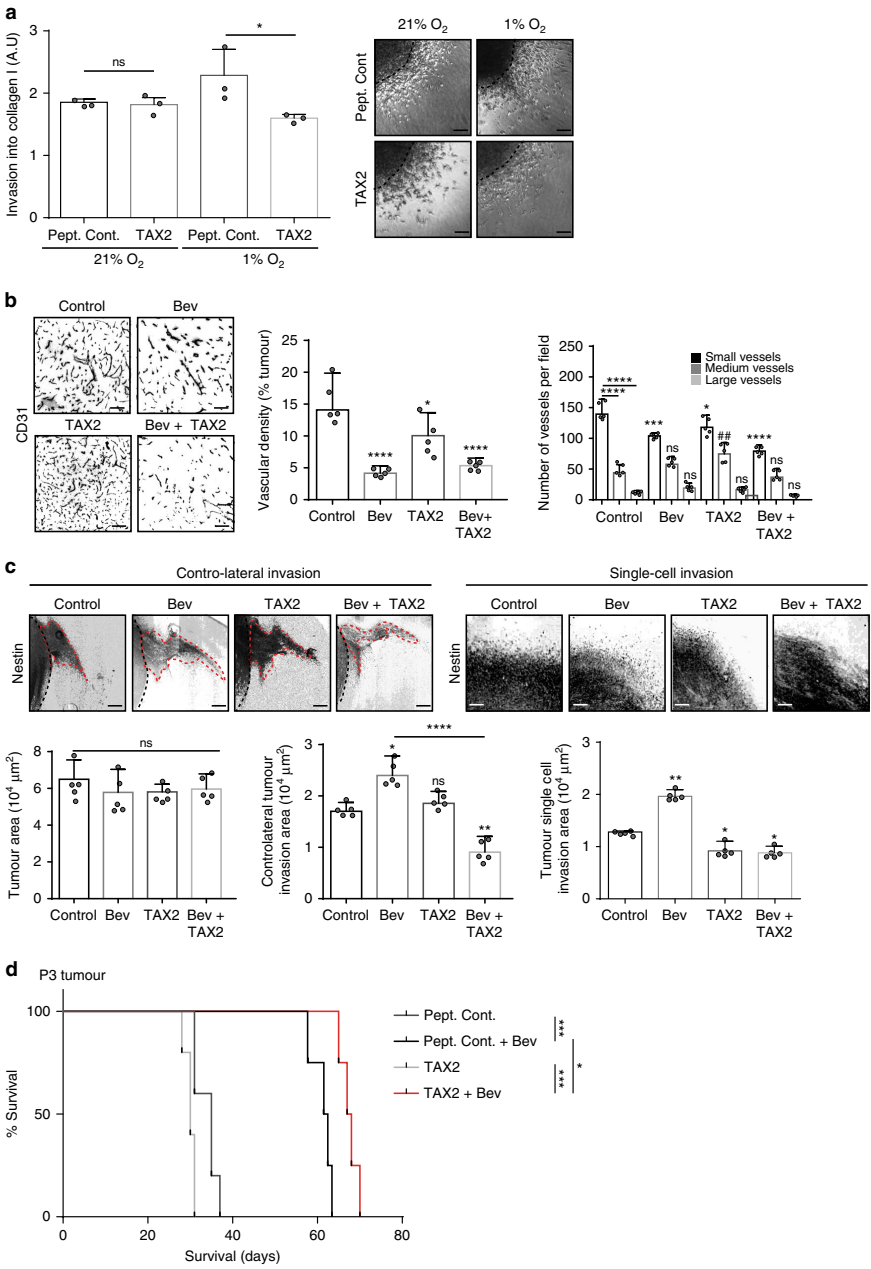
Taken together, our results indicate that THBS1 has an important role in the development of GBM and that a reversed signalling pathway from TGF β 1 to THBS1 is involved. THBS1 may not only act in the angiogenic core of the tumour but also in areas of tumour cell invasion. Furthermore, tumour cell-bound CD47 is important for THBS1 activity in tumour cell invasion (Fig. 8). Finally, THBS1 inhibition may be therapeutically important for reinforcing the efficacy of current anti-GBM treatments by not only acting at the vascular compartment, but also on invasive processes in the tumour periphery.

Methods

Ethical issues. Male RAGy2C^{-/-} mice were housed and treated in the animal facility of Bordeaux University ("Animalerie Mutualisée Bordeaux"). All animal procedures have been done according to the institutional guidelines and approved by the local ethics committee (agreement number: 4611).

Patient material. Patients with preoperative MR imaging studies suggesting a presumptive diagnosis of GBM (defined as intracerebral mass lesion with contrast enhancement area at post gadolinium T1-weighted MR) were included in the study. Volumetric FLAIR and post gadolinium T1-weighted images of these patients were obtained in the preoperative period and loaded into the neuronavigation plan (Brainlab workstation) to be available during surgery for intraoperative tracking. At surgery, various samples were collected at the peripheral region of the tumour (invasive area defined as FLAIR abnormalities around and distant from post gadolinium T1 contrast enhancement ring) or at the tumour core (defined as contrast enhancement area at the tumour ring in post gadolinium T1-weighted images). The site of collection was registered every time on the neuronavigation system and data were stored and collected for subsequent analysis. Part of the samples was immediately frozen and stored in the tumour bank. Another part of the samples was sent for routine histological and molecular analysis (IDH1 mutation, MGMT promoter methylation status, 1p/19q codeletion, ATRX expression). Only patients with a histological diagnosis of GBM and IDH1wt profile were included. Patients gave their consent prior tissue analysis according to the clinical guidelines. Informed written consent was obtained from all subjects (Department of Neurosurgery, Humanitas, Milano according to Humanitas ethical committee regulations, or from the Haukeland Hospital, Bergen, Norway). The patient molecular profile is detailed in Supplementary Table 1.

Intracranial tumour xenografts. U87, P3 spheroids were stereotactically implanted into the brains of randomly chosen RAGy2C^{-/-} mice (8–12 weeks old). Briefly, GBM spheroids (5 spheroids of 10⁴ cells per mouse) were implanted into the right cerebral cortex using a Hamilton syringe fitted with a needle (Hamilton, Bonaduz, Switzerland) and following the procedure already described⁴⁴. Mice were treated with 10 mg/kg (mouse weight) of bevacizumab, or 10 mg/kg (mouse weight) of TAX2, LSKL or control peptides. Mouse survival was based on the presence of neuropathological features (body position, fur quality, eye position) and weight. A minimum of 7 mice per group was chosen to yield enough statistical power ($P = 0.05$), except for one experiment in which 5 mice per group were used (Fig. 5d).



Reagents and antibodies. The detailed information of all antibodies (primary and secondary) used in this study is listed in Supplementary Tables 4 and 5. The sequences of siRNA Smad3 are listed in Supplementary Table 6. The primer sequences used for RTqPCR are listed in the same table. TGFβ1 recombinant protein was purchased from Peprotech (100-21), purified THBS1 (R&D System, 3074-TH-050), recombinant TGFβ2 (Peprotech, 100-35B), EGF (Peprotech, AF100-15), PDGF-BB (Sigma, SRP3138) and IL-1b (RD Systems, 201-LB/C). TAX2 peptide (CEVSQLLKGDAC) and scramble control peptide (LSVDES-KAQGIL) were synthesised and purified by Genecust (Dudelange, Luxembourg) and controlled for composition and purity through electrospray ionisation-mass

Fig. 5 THBS1/CD47 interaction in P3 tumour invasion and growth. **a** P3 cells were included into collagen I gels and then incubated in normoxia (21 % O₂) or hypoxia (1 % O₂). P3 spheroid invasion was measured in collagen I gels after 24 h. Scale: 50 μ m. The graph represents the results as means $\pm$ s.d. of three independent experiments, each done in 6–8 replicates for each condition. * P < 0.05; ns, non-significant (ANOVA). **b** P3 tumours were treated with 10 mg/kg (BW) of bevacizumab (Bev), control peptide (control), TAX2 alone (TAX2) or in combination (Bev + TAX2). Tumours sections were stained with anti-CD31 antibody. Scale: 20 μ m. The graphs below represent the vascular density (left panel) and the quantification of vessel types according to size (right panel: small vessels < 10 μ m; medium size vessels between 10 and 20 μ m; large vessels > 20 μ m) (average of 5 tumours with 8 sections/tumour analysed). Results are represented as means $\pm$ s.d. * P < 0.05; *** P < 0.001; **** P < 0.0001 for small vessel comparison; ## P < 0.01 for medium vessel comparison; ns, non-significant (ANOVA). **c** P3 tumours were stained for Nestin (grey) to evaluate contra-lateral or single-cell invasions (black dashed lines around tumour edges and red dashed lines around invasive areas). Scale: 100 μ m. The graphs below represent core (left panel), contra-lateral invasion (medium panel) and single-cell invasion (right panel) areas of tumours from treated and untreated mice (average of 5 tumours with 8 sections/tumour analysed). Results are represented as means $\pm$ s.d. * P < 0.05; ** P < 0.01; **** P < 0.0001; ns, non-significant (ANOVA). **d** Kaplan–Meier survival curves of P3 xenotransplanted mice treated with control peptide, TAX2 and bevacizumab alone or in combination (n = 5 mice per group); P -values were calculated with log-rank test; * P -value < 0.05; *** P -value < 0.001

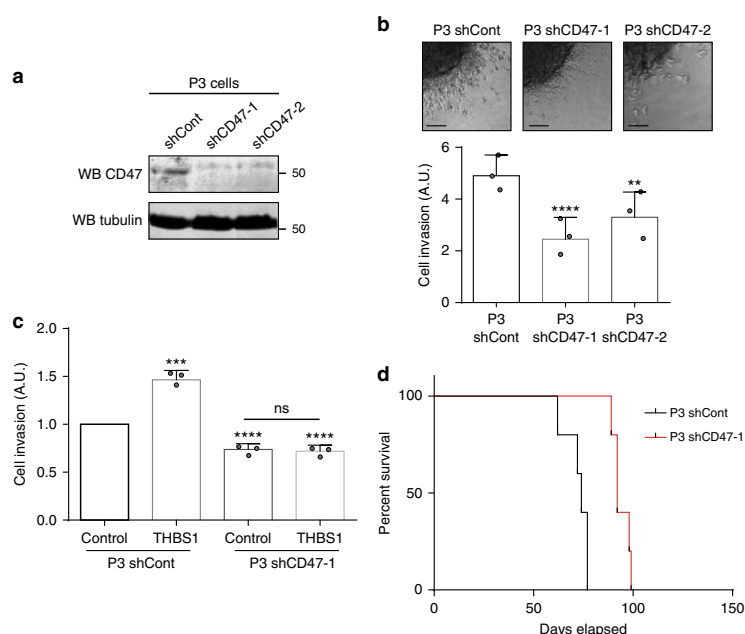


Fig. 6 Tumour-associated CD47 controls glioma cell invasion and motility. **a** Immunoblots of protein extracts from control or CD47-1/-2 shRNA-transduced P3 cells probed with anti-CD47 or anti-Tubulin antibodies. **b** P3 cells were transduced with control or CD47 (–1 and –2) shRNAs. P3 spheroid invasion was measured in collagen I gels after 24 h. Scale: 50 μ m. The graph below represents the results as means $\pm$ s.d. of three independent experiments each done in 6–8 replicates for each condition. ** P < 0.01; **** P < 0.0001 (ANOVA). **c** Effect of THBS1 on P3 cells transduced with control or CD47-1 shRNAs. Full-length THBS1 was used at a concentration of 10 μ g/ml and invasion in collagen I gels was measured after 24 h. The results are expressed as means $\pm$ s.d. of three independent experiments each done in 6–8 replicates for each condition. ** P < 0.01; **** P < 0.0001; ns, non-significant (ANOVA). **d** Kaplan–Meier survival curves of mice bearing control or CD47-1 shRNA-transduced P3 tumours (n = 5 mice per group); P -values were calculated with log-rank test; *** P -value < 0.001

spectrometry (ESI-MS) and HPLC. Peptides were solubilized in the appropriate culture medium for in vitro assays (DMEM or Neurobasal medium), or in normal saline solution (0.9% (w/v) NaCl) for in vivo experiments. Cells were treated with 10 μ g/ml of Tunicamycin (Sigma) or 10 μ M of LY2157299 (TGF β receptor 1 inhibitor or Galunisertib). Animals from the treatment group received one weekly i.p. injection of bevacizumab (10 mg/kg) every 2 days all along the experiment.

Laser capture microdissection and RNA-sequencing. Coronal brain sections (30 μ m thickness) were made using a CM3050-S microtome (Leica, Wetzlar, Germany) and mounted on 1 mm polyethylene-naphthalate membrane glass slides (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Germany) that have been pretreated to

inactivate RNase. Subsequently, sections were, dehydrated in a series of pre-cooled ethanol baths (40 s in 95% and twice 40 s in 100%) and air-dried. Laser microdissection of samples was performed using a PALM MicroBeam microdissection system version 4.6 equipped with the P.A.L.M. RoboSoftware (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Germany). Laser power and duration were adjusted to optimise capture efficiency. Microdissection was performed at $\times 5$ magnification. Four tumours were analysed for each condition, and five caps were collected for each tumour type. Samples were collected in adhesives caps and resuspended in a guanidine isothiocyanate-containing buffer (RLT buffer from RNeasy minikit, Qiagen, Chatsworth, USA) with 10 μ l/ml β -mercaptoethanol, and stored at -80 $^{\circ}$ C until extraction was done. Total RNA was extracted from microdissected tissues using the RNeasy mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the

P3 model : invasive molecular network

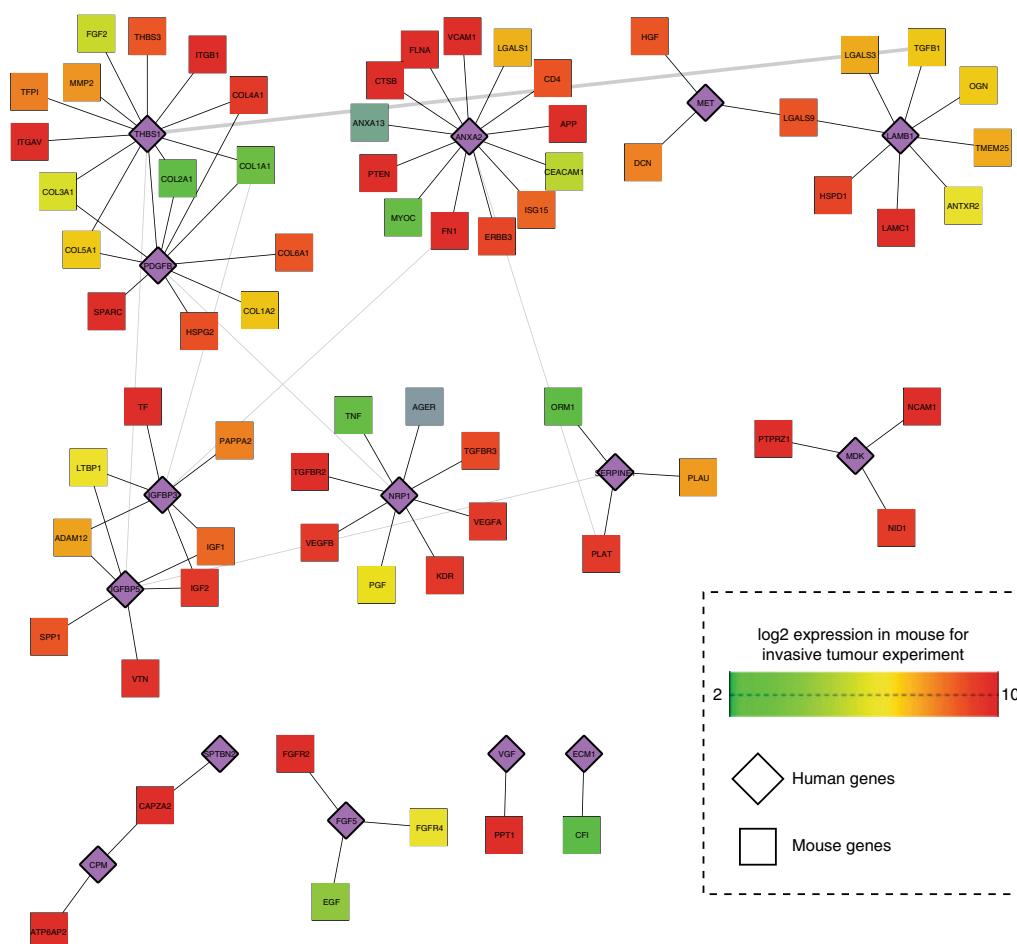


Fig. 7 Transcriptional analysis highlights THBS1 as central regulator of GBM invasion. A network of proteins encoded by genes that are overexpressed in the invasive area of P3 tumours when compared to the core area, or are expressed by the host. Relationships in the network represent known protein-protein interactions. Human genes are represented in purple and mouse genes are colour coded according to their expression (green (2) – red (10); normalised counts in log₂ scale)

manufacturer's protocol. The integrity of the RNA was checked by capillary electrophoresis using the RNA 6000 Pico Labchip kit and the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Massy, France), and quantity was estimated using a Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, USA). The RNA integrity number (RIN) above 7/8.

RNA-sequencing for P3 tumours. Overall, 500 ng was used as input material for a Low Input Ribozero treatment using the Epicentre Ribo-Zero Gold Kit–Low Input (HMR), and subsequently purified using Ampure XP beads. The samples were then analysed on the Agilent 2100 Bioanalyzer and all of the depleted RNA was used as input material for the ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Preparation protocol. Following 14 cycles of amplification, the libraries were purified using Ampure XP beads. Each library was quantified using Qubit, and the size distribution assessed using the Bioanalyzer.

These final libraries were pooled in equimolar amounts using the Qubit and Bioanalyzer data. The quantity and quality of each pool was assessed by the

Bioanalyzer and subsequently by qPCR using the Illumina Library Quantification Kit from Kapa on a Roche Light Cycler LC480II according to manufacturer's instructions.

The template DNA was denatured according to the protocol described in the Illumina User guide and loaded at 12.5 pM or 13 pM concentration. The sequencing was carried out on two lanes of an Illumina HiSeq2500 at 2 × 125 bp paired-end sequencing with v4 chemistry.

Bioinformatics analysis. Reads quality filtering, species assignment and genomic alignment: Read quality check and filtering has been performed using NGS QC Toolkit v.2.3.3⁴⁵ with default parameters. Less than 1% of the reads has been discarded at this step. Unpaired reads have been kept and represent 0.005% of the data. In order to assign the reads to Human and Mouse, we have used Xenome v.1.0.1⁴⁶. It is a two-step process. During the first step, we created the genome index files built from EMBL release 84 (Human GRCh38 and Mouse mm10). We used the index files to classify the sequence as host or graft separately for paired

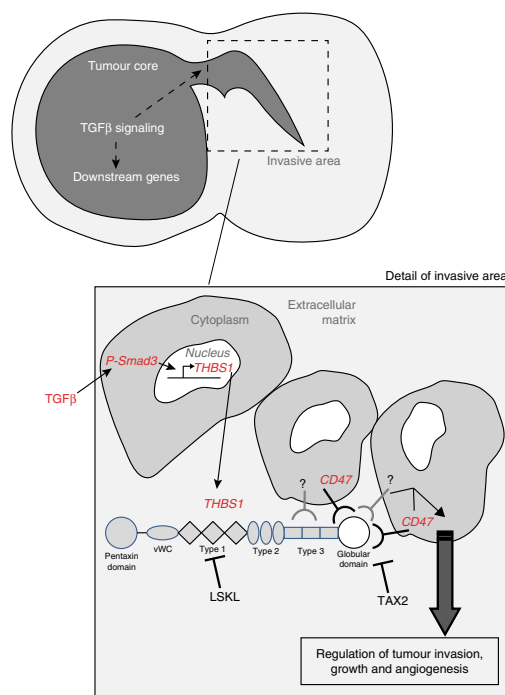


Fig. 8 Proposed model for GBM invasion TGFβ1 is expressed in both the core and the invasive areas in GBM. THBS1 is transcriptionally regulated via SMAD3, which binds to regulatory elements in the *THBS1* gene. THBS1 will then be released and act on tumour cell invasion and expansion. The interaction with CD47 is critical in this process

and single reads. The genomic alignment was performed with Bowtie⁴⁷ with default parameters on the same reference genomes as used for Xenome. Reads with quality mapping score lower than 10 were discarded.

Differential expression between the tumour core and invasive areas: We first assigned reads to hg38 (human) and mm10 (mouse) gene models retrieved from⁴⁸. Using the R packages GenomicFeatures and GenomicAlignments⁴⁹, 25,446 and 24,423 genes were analysed in human and mouse respectively. In order to compute differential expression, we performed two-class comparisons between tumour core and invasive samples using the R package DESeq2⁵⁰. Differentially expressed genes were defined by using an upper threshold on the *P*-value of 0.01 after correction for multiple testing using the method of Benjamini and Hochberg⁵¹.

Functional enrichment: The R packages ClusterProfiler⁵² and DOSE⁵³ were used to identify functional enrichment in groups of genes in human and mouse. These packages give access to the Gene Ontology (GO) categories (molecular function, biological process, cellular component), KEGG pathways, the Disease Ontology (DO) and the Network of Cancer Genes (NCG).

Network building: Protein–protein interaction networks representing putative signalling events occurring in the invasive tumour microenvironment/ECM were constructed as followed (i) Mouse expression data were annotated using human orthologs of mouse genes retrieved from Ensembl release 85 and used for subsequent analysis (www.ensembl.org/). (ii) Host and tumour data were subset for genes that were associated to Gene Ontology terms Extracellular Space (GO:0005615), Extracellular Region (GO:0005576) and External side of plasma membrane (GO:0009897). (iii) Genes expressed by the host were determined as present in the extracellular compartment if their average expression was higher than 2. (iv) Genes expressed in tumours and overexpressed in invasive regions were selected from the differential expression analysis. (v) Non-redundant interactions between proteins represented by the gene sets identified in (iii) and (iv) were retrieved from BIOGRID v. 3.4.140⁵⁴. (vi) Visualisation of the resulting network was performed using Cytoscape⁵⁵ and the community clustering algorithm GLay within the Clustermaker plugin (www.cgl.ucsf.edu/cytoscape/cluster/clustermaker.shtml).

THBS1/TGFβ1 expression between GBM grades: Analysis of THBS1 and TGFβ1 expressions in gliomas of various grades was performed using data from Sun et al.⁵⁶. The fold changes are represented in log2 scale. This gives a log2 fold change of $8.59 - 6.32 = 2.27$. To convert this to a linear fold change, we calculate 2 to the power of 2.27 ($2^{2.27} = 4.82$).

Cell culture and transfection. All cells used for phenotypic and functional studies have been further characterised more in detail by cGH array (P3) and by cell authentication (U87) using Promega Powerplex21 Kit (Eurofins, GE). The U87 (ATCC) and P3 glioma cell lines were regularly tested for contamination and were all mycoplasma free. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 5% antibiotics (Penicillin and Streptavidin) and 5% L-glutamine. U87 cells were cultured at 37 °C, 5% CO₂ and split at 70–90% of confluence with 0.25% Trypsin. P3 spheroids were extracted for P3 tumours and cultured in agar-layered flasks for few weeks. The patient-derived cell lines P3, BL9 and BL13 were isolated by enzymatic digestion from P3 tumours or from patient samples (BL9 and BL13) and then cultured in Neurobasal Medium (NBM, Thermo Fisher Scientific) supplemented with B27, 0.2% heparin (100 U) and 20 ng/ml basal FGF. Cell transfection was performed using GeneCellin Reagent (Eurobio) according to the manufacturer instruction, for luciferase plasmids (see Methods below). Cells were also cultured in hypoxic conditions (1% O₂).

Small interfering RNA knockdown experiments. For transient inhibition of Smad3 expression, cells were transfected with annealed siRNA. Transfections were performed using lipofectamine RNAimax kit (Fisher 10601435) in accordance with the manufacturer protocol, with a final concentration of 20 nM in media without antibiotics. After transfection, cells were washed twice with PBS and fresh complete media was added for 48 h.

shRNA constructs, lentiviral production and cell infection. The shRNA target sequences for THBS1 and CD47 are listed in Supplementary Table 6. Gain-of-Function experiments were assessed by overexpressing full-length human THBS1 in a pcDH1 lentiviral vector (Invitrogen). The lentiviral particles were produced by transfecting HEK293T with pMD2.G (VSV-G, viral envelope) and psPAX2 (packaging construct) with 20 µg of bacterial plasmids. Viruses were collected after 48 h of transfection and then filtered (0.22 µm filter). Infectious particles were titrated with scale infections of U87 cells.

RNA extraction, semi-quantitative and quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from cells using the TriZol reagent protocol (Invitrogen). After quantification, reverse transcription was done with 2 µg of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Human THBS1, human CD47 and β-Actin mRNA expression levels were measured by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) using Power SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) on StepOne (Applied Biosystems), according to the manufacturer's protocol. Primer sequences are listed in Supplementary Table 7. The relative abundance of transcripts was calculated by using β-actin transcript quantity as standard. The quantitative RT-PCR experiments were carried out in triplicate on RNA isolated from three independent cell cultures.

Promoter and luciferase reporter assay. Wild-type THBS1 promoter was amplified by PCR using platinum pfu (Invitrogen), sequenced and cloned in pGL3-basic vector at *SacI* and *NheI* sites. Del1 and Del2 mutants were amplified by PCR, sequenced and cloned at the same sites. Luciferase promoter activity was measured by quantifying Renilla and Firefly Luciferase activities with the microplate reader Infinite F200 Pro (TECAN) using the Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega), according to the manufacturer's instructions. U87 cells were transfected with the pRL-TK vector and either with plasmids carrying the full-length promoter of THBS1, or Del1 or Del2 mutants for promoter studies.

For SMAD reporter assay, cells were transfected with SBE4-luc vector containing SMAD responsive elements. For promoter studies, a control pEGFP plasmid was used to assess transfection efficiency. The pRL-CMV vector (Promega) allowed control and normalisation of the transfection. All transfections and measurements were performed in five different wells and repeated at least three times.

Western blot. Two procedures were used for protein lysis, depending of the proteins of interest. (1) Cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and dissolved in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1% TritonX-100, 1 mM EDTA) supplemented with protease and phosphatase inhibitors cocktails (Roche). Protein concentration was quantified by Bradford assay (Euromedex). Cell lysates were resuspended in Laemmli Buffer (62.5 mM Tris pH 6.8, 10% glycerol, 2.5% SDS, 2.5% β-mercaptoethanol). (2) Cells were washed twice in PBS and directly lysed in Laemmli Buffer. All protein extracts were then boiled for 5 min and separated by SDS-PAGE. Proteins were electroblotted onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Fisher Scientific, 10344661). Membranes were incubated with blocking buffer (EuroBio 927-40003)

ARTICLE

NATURE COMMUNICATIONS | <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08480-y>

for 1 h, probed overnight at 4 °C with the primary antibodies of interest, followed by detection using secondary antibodies coupled to Fluorophores (Supplementary Table 5) and Odyssey infra-red imaging system (Li-Cor Biosciences, Nebraska, US). Densitometry analysis was performed using Fiji software. Uncropped immunoblots are depicted in Supplementary Figures 11 and 12.

Human THBS1 ELISA. The Quantikine ELISA for Human THBS1 (R&D Systems) was used according to the manufacturer's protocol. Proteins from lysates were extracted with 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1% TritonX-100, 1 mM EDTA supplemented with protease and phosphatase inhibitors cocktails (Roche). Protein contents from lysates and supernatants were determined by using the BCA protein assay kit (Pierce).

Indirect immunofluorescence staining. Cells were seeded on glass coverslips and fixed 10 min with 4% paraformaldehyde at room temperature, then washed in PBS. Cells were permeabilised 10 min with 0.1% TritonX-100, washed in PBS and incubated for 1 h with blocking buffer (PBS containing 2% FBS and 1% BSA) at room temperature. Cells were incubated with primary antibodies diluted in blocking buffer overnight at 4 °C, washed with PBS, and incubated with secondary antibodies diluted in blocking buffer (Supplementary Table 5). DAPI was used to label nuclei (Fisher Scientific, 10374168). Coverslips were mounted using Prolong Gold antifade reagent (Fisher Scientific, 11559306).

Histological and immunohistological analyses. Tissues embedded in OCT were cut in frozen sections of 10 µm using the microtome LEICA CM1900. For histological analyses, frozen sections were stained with haematoxylin and eosin. For immunofluorescence on histological sections, frozen sections were processed as described in the indirect immunofluorescence staining section.

Patient paraffin-embedded sections were deparaffinised in xylene and hydrated serially in 100, 95, and 80% ethanol. Endogenous peroxidase was quenched in 3% H₂O₂ in PBS for 1 h. Slides were then incubated with antibodies (Supplementary Table 4) overnight at 4 °C. Sections were washed three times in PBS, and antibody binding was revealed using the Ultra-Vision Detection System anti-Polyvalent HRP/DAB kit according to the manufacturer instructions (Lab Vision). Finally, the slides were counterstained with haematoxylin and washed in distilled water. After dehydration and mounting, THBS1 expression localisation was analysed by using IHC profiler from Fiji® Software. For THBS1 immunostaining, tissue microarrays were used to compare patient grade samples (numbers B17016c and B17015a, BioMax, US).

Invasion assays in collagen I gels. P3 spheroids were prepared 3 days respectively before inclusion by seeding of 10⁴ cells in neurobasal medium with 0.4% methylcellulose (Sigma) in a U-bottom 96 wells plate (Falcon). A solution of 1 mg/ml of collagen I (Fisher Scientific) was prepared in PBS with 7.2 mM NaOH. After 30 min of incubation on ice, spheroids were individually picked, washed in PBS and included in the collagen solution. After 45 min at 37 °C in a cell incubator, neurobasal medium with the different treatments is added. P3 spheroid invasion areas are measured after 24 h with Fiji software. The total area was delineated by two independent investigators as well as the central spheroid core. An invasive index was calculated by the ratio of the total spheroid surface and the spheroid core.

Invasion assays on U87 cells. U87 cells were seeded on 0.2 mg/ml Matrigel coatings into a ImageLock 96 well plate. The day after, wounds were created using Incucyte™ wound maker and a 2 mg/ml Matrigel layer was deposited on top of the cells. The plate was then processed for invasion using Incucyte™ device.

Quantifications of vascular density, invasive index. Vascular density: This was estimated as the ratio of the vessel surface (CD31 staining) to the total tumour surface (Nestin staining). Each experiment was analysed with an average of 5 tumours with 8 sections/tumour using Fiji software⁵⁷. Evaluation of vessel length: 3–4 images stained with CD31 were analysed for evaluating blood vessel quality (small vessels < 10 µm length, medium vessels between 10 and 20 µm length, and large vessels > 20 µm length) using counter from Fiji⁵⁷.

Invasive index: This was estimated by measuring the surface of the invasive area (mm²). Each experiment was analysed with an average of 5 tumours with 8 sections/tumour using Fiji⁵⁷.

Live-cell microscopy. To assess cell motility, U87 cells were seeded at a density of 2 × 10⁴ cells per well on Matrigel coated glass bottom 24-well plates (Greiner), as published before⁵⁸. Hoechst 33342 (10 ng/ml) was added to label the nuclei. Live-cell imaging was performed with a Eclipse Ti Nikon video microscope coupled with NIS analysis software, based on a ×10 NA 0.30 objective lens (Nikon), a Hamamatsu Digital CCD C10600-10B camera, and an environmental chamber to maintain cells at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere (Life Imaging Services). Videos were acquired every 15 min for a period of 24 h in brightfield and blue filters (Hoechst 33342). Mean cell displacements were calculated with the ImageJ plugin TrackMate. The software was used to automatically track nuclei and characterise their trajectories among stacks of images.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using the Graphpad software. Multiple comparisons were performed with one-way analysis of variance, followed by Tukey post hoc tests and with one-way ANOVA Bonferroni multiple comparison test. Statistical comparison between two groups was performed by using the Mann–Whitney *U* test.

Survival analysis were analysed by using log-rank test.

Reporting summary. Further information on experimental design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

All data are available within the Article and Supplementary Files, or available from the corresponding authors on reasonable request. Transcriptomics data are available from the SRA: PRJNA320047 or the European Nucleotide Archive PRJEB23786. We have also uploaded supplementary material to the Figshare repository (for e.g.: https://figshare.com/articles/Differentially_expressed_genes_between_core_and_invasion_GBM_areas_RNAseq/7472036).

Received: 20 March 2017 Accepted: 9 January 2019

Published online: 08 March 2019

References

- Louis, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**, 97–109 (2007).
- Kotliarova, S. & Fine, H. A. SnapShot: glioblastoma multiforme. *Cancer Cell.* **21**, 710–710 e711 (2012).
- Keunen, O. et al. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 3749–3754 (2011).
- Murphy-Ullrich, J. E. & Sage, E. H. Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biol.* **37**, 1–14 (2014).
- Friedl, P. & Alexander, S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* **147**, 992–1009 (2011).
- Frantz, C., Stewart, K. M. & Weaver, V. M. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell. Sci.* **123**, 4195–4200 (2010).
- Adams, J. C. & Lawler, J. The thrombospondins. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **36**, 961–968 (2004).
- Filleur, S. et al. In vivo mechanisms by which tumors producing thrombospondin 1 bypass its inhibitory effects. *Genes Dev.* **15**, 1373–1382 (2001).
- Firlej, V. et al. Thrombospondin-1 triggers cell migration and development of advanced prostate tumors. *Cancer Res.* **71**, 7649–7658 (2011).
- Lawler, J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J. Cell. Mol. Med.* **6**, 1–12 (2002).
- de Fraipont, F. et al. Expression of the thrombospondin 1 fragment 167–569 in C6 glioma cells stimulates tumorigenicity despite reduced neovascularization. *Oncogene* **23**, 3642–3649 (2004).
- Ma, Y. et al. Glioma-derived thrombospondin-1 modulates cd14+ cell tolerogenic properties. *Cancer Invest.* **33**, 152–157 (2015).
- Seoane, J., Le, H. V., Shen, L., Anderson, S. A. & Massague, J. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* **117**, 211–223 (2004).
- Bougnaud, S. et al. Molecular crosstalk between tumour and brain parenchyma instructs histopathological features in glioblastoma. *Oncotarget* **7**, 31955–31971 (2016).
- Schultz-Cherry, S., Lawler, J. & Murphy-Ullrich, J. E. The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **269**, 26783–26788 (1994).
- Daniel, C. et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta in fibrotic renal disease in the rat in vivo. *Kidney Int.* **65**, 459–468 (2004).
- Faherty, N. et al. CCN2/CTGF increases expression of miR-302 microRNAs, which target the TGFbeta type II receptor with implications for nephropathic cell phenotypes. *J. Cell. Sci.* **125**, 5621–5629 (2012).
- Jeanne, A. et al. Identification of TAX2 peptide as a new unpredicted anti-cancer agent. *Oncotarget* **6**, 17981–18000 (2015).
- Eskilsson, E. et al. EGFRvIII mutations can emerge as late and heterogeneous events in glioblastoma development and promote angiogenesis through Src activation. *Neuro. Oncol.* **18**, 1644–1655 (2016).
- Zhou, L. et al. Silencing of thrombospondin-1 is critical for myc-induced metastatic phenotypes in medulloblastoma. *Cancer Res.* **70**, 8199–8210 (2010).
- Fack, F. et al. Bevacizumab treatment induces metabolic adaptation toward anaerobic metabolism in glioblastomas. *Acta Neuropathol.* **129**, 115–131 (2015).

22. Campos, B. et al. Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clin. Cancer Res.* **16**, 2715–2728 (2010).
23. Auf, G. et al. Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 15553–15558 (2010).
24. Ribeiro, S. M., Poczekatek, M., Schultz-Cherry, S., Villain, M. & Murphy-Ullrich, J. E. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **274**, 13586–13593 (1999).
25. Cohen, M. H., Shen, Y. L., Keegan, P. & Pazdur, R. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Oncologist* **14**, 1131–1138 (2009).
26. McIntyre, A. & Harris, A. L. Metabolic and hypoxic adaptation to anti-angiogenic therapy: a target for induced essentiality. *EMBO Mol. Med.* **7**, 368–379 (2015).
27. Piao, Y. et al. Acquired resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma is associated with a mesenchymal transition. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4392–4403 (2013).
28. Jeanne, A., Schneider, C., Martiny, L. & Dedieu, S. Original insights on thrombospondin-1-related antireceptor strategies in cancer. *Front. Pharmacol.* **6**, 252 (2015).
29. Kazerounian, S., Yee, K. O. & Lawler, J. Thrombospondins in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 700–712 (2008).
30. Kragh, M., Quistoff, B., Tenan, M., Van Meir, E. G. & Kristjansen, P. E. Overexpression of thrombospondin-1 reduces growth and vascular index but not perfusion in glioblastoma. *Cancer Res.* **62**, 1191–1195 (2002).
31. Ji, W., Zhang, W. & Xiao, W. E2F-1 directly regulates thrombospondin 1 expression. *PLoS ONE* **5**, e13442 (2010).
32. Janat, M. F. & Liao, G. Transforming growth factor beta 1 is a powerful modulator of platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* **150**, 232–242 (1992).
33. Pohlers, D. et al. Constitutive upregulation of the transforming growth factor-beta pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res. Ther.* **9**, R59 (2007).
34. Ayrault, O., Andrique, L. & Seite, P. Involvement of the transcriptional factor E2F1 in the regulation of the rRNA promoter. *Exp. Cell Res.* **312**, 1185–1193 (2006).
35. Seliger, C. et al. Lactate-modulated induction of THBS-1 activates transforming growth factor (TGF)-beta2 and migration of glioma cells in vitro. *PLoS ONE* **8**, e78935 (2013).
36. Allen, M., Bjerke, M., Edlund, H., Nelander, S. & Westermarck, B. Origin of the U87MG glioma cell line: good news and bad news. *Sci. Transl. Med.* **8**, 354re353 (2016).
37. Thompson, E. M., Frenkel, E. P. & Neuwelt, E. A. The paradoxical effect of bevacizumab in the therapy of malignant gliomas. *Neurology* **76**, 87–93 (2011).
38. Osada-Oka, M., Ikeda, T., Akiba, S. & Sato, T. Hypoxia stimulates the autocrine regulation of migration of vascular smooth muscle cells via HIF-1alpha-dependent expression of thrombospondin-1. *J. Cell. Biochem.* **104**, 1918–1926 (2008).
39. Hung, S. P., Yang, M. H., Tseng, K. F. & Lee, O. K. Hypoxia-induced secretion of TGF-beta1 in mesenchymal stem cell promotes breast cancer cell progression. *Cell Transplant.* **22**, 1869–1882 (2013).
40. Anderson, J. C. et al. ABT-510, a modified type 1 repeat peptide of thrombospondin, inhibits malignant glioma growth in vivo by inhibiting angiogenesis. *Cancer Biol. Ther.* **6**, 454–462 (2007).
41. Zhang, M. et al. Anti-CD47 treatment stimulates phagocytosis of glioblastoma by M1 and M2 polarized macrophages and promotes M1 polarized macrophages in vivo. *PLoS ONE* **11**, e0153550 (2016).
42. Ghosh, D. et al. A cell-surface membrane protein signature for glioblastoma. *Cell Syst.* **4**, 516–529.e517 (2017).
43. Zhao, C., Isenberg, J. S. & Popel, A. S. Transcriptional and post-transcriptional regulation of thrombospondin-1 expression: a computational model. *PLoS Comput. Biol.* **13**, e1005272 (2017).
44. Auf, G. et al. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1alpha and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC Cancer* **13**, 597 (2013).
45. Patel, R. K. & Jain, M. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS ONE* **7**, e30619 (2012).
46. Conway, T. et al. Xenome—a tool for classifying reads from xenograft samples. *Bioinformatics* **28**, i172–i178 (2012).
47. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**, 357–359 (2012).
48. Karolchik, D. et al. The UCSC table browser data retrieval tool. *Nucleic Acids Res.* **32**, D493–D496 (2004).
49. Lawrence, M. et al. Software for computing and annotating genomic ranges. *PLoS Comput. Biol.* **9**, e1003118 (2013).
50. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
51. Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N. & Golani, I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav. Brain Res.* **125**, 279–284 (2001).
52. Yu, G., Wang, L. G., Han, Y. & He, Q. Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* **16**, 284–287 (2012).
53. Yu, G., Wang, L. G., Yan, G. R. & He, Q. Y. DOSE: an R/Bioconductor package for disease ontology semantic and enrichment analysis. *Bioinformatics* **31**, 608–609 (2015).
54. Stark, C. et al. BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res.* **34**, D535–D539 (2006).
55. Shannon, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504 (2003).
56. Sun, L. et al. Neuronal and glioma-derived stem cell factor induces angiogenesis within the brain. *Cancer Cell* **9**, 287–300 (2006).
57. Schindelin, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
58. Daubon, T., Spuul, P., Alonso, F., Fremaux, I. & Genot, E. VEGF-A stimulates podosome-mediated collagen-IV proteolysis in microvascular endothelial cells. *J. Cell. Sci.* **129**, 2586–2598 (2016).

Acknowledgements

This work was supported by grants from INSERM (recurrent funding), and from the “Ligue contre le Cancer” to A.B. and by Helse Vest, Haukeland Hospital, The Norwegian Research Council and Stiftelsen Kristian Gerhard Jebsen Research Foundation for R.B. T.D. was a recipient of Norwegian Cancer Society. LCM facility is supported by LabEX BRAIN ANR-10-LABX-43 and FRM DGE20061007758. We thank A. Barre for first bioinformatics analysis of RNA-sequencing results. Library generation and sequencing were performed by L. Rainbow, C. Nelson and A. Lucaci, and the bioinformatics work was performed by R. Gregory at The Centre for Genomic Research, University of Liverpool and P. Koldjaer for performing RNA-sequencing. We also thank M. Delugin, J. Massiere, M. Poulet and T. Chouleur for preliminary experiment, the Bordeaux Imaging Center for Nanozoomer use, M.P. Algeo, M.A. Derieppe, M. Campistron for animal treatments and care.

Author contributions

T.D., C.L., L.S. and S.G. performed experiments; K.C., F.F. and E.D. performed bioinformatics RNA-sequencing and analysis; R.P. and L.A. implanted animals; L.A. constructed luciferase THBS1 reporter; M.M. performed LCM experiments; M.M., S.B., J.-J.F., S.D., A.J. provided advice and reagents; H.M., M.R. and L.B. analysed patient material; T.D., A.J., S.D., R.B. and A.B. discussed the results; A.B. supervised research; T.D., R.B. and A.B. wrote the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08480-y>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Journal peer review information: *Nature Communication* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Article 3 (Conceptuel)

Seminars in Cell and Developmental Biology 155 (2024) 52–57



Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Cell and Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semcdb



Review

New insights into the role of thrombospondin-1 in glioblastoma development

Andreas Bikfalvi^{a,*}, Joris Guyon^b, Thomas Daubon^c

^a Bordeaux University, INSERM, U1312 BRIC, Tumor and Vascular Biology Laboratory, F-33615 Pessac, France

^b Service de Pharmacologie médicale, CHU de Bordeaux, 33615 Bordeaux, France

^c Bordeaux University, CNRS, IBGC, UMR 5095, F-33 077 Bordeaux, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Glioblastoma
Thrombospondin
Tumor invasion

ABSTRACT

Glioblastoma (GB), the most malignant subtype of diffuse glioma, is highly aggressive, invasive and vascularized. Its median survival is still short even with maximum standard care. There is a need to identify potential new molecules and mechanisms, that are involved in the interactions of GB cells with the tumor microenvironment (TME), for therapeutic intervention. Thrombospondin-1 (TSP1) is a multi-faceted matricellular protein which plays a significant role in development, physiology and pathology including cancer. Recent studies have pinpoint an important role of TSP1 in GB development which will be summarized and discussed herein. We will discuss studies, mainly from preclinical research, which should lead to a deeper understanding of TSP1's role in GB development. We will also discuss some issues with regard to the use of this knowledge for the clinic.

1. Introduction

The extracellular matrix (ECM) is an important player in tumor development by favoring or limiting tumor growth, invasion, and metastasis. One important component is the matricellular family of thrombospondins which is composed of 5 members (TSP1–5).

TSP1 was first discovered in platelets [1] and has been shown to have an important role in cancer development [2,3]. TSP1 regulates tumor cell behavior via direct and indirect mechanisms. Direct effects are mediated through the effect on cell motility and the indirect effects to an action on the vasculature. TSP1 is produced by tumor cells and the TME, and TSP1 is associated with both tumor cells [4] and with the vasculature [5]. Tumor cell-associated and vascular cell-associated TSP1 may have distinct roles.

The thrombospondin family has been shown to be involved in other disease states, besides cancer, such as fibrotic diseases [6] because of its role in TGF β induction and collagen fibril assembly [7]. Furthermore, regulatory functions in angiogenesis and immune regulation have been described as well as the regulation of cardiovascular function and responses to stress via CD47 [8].

TSP1 impacts tumor development and progression in several types of cancer such as melanoma, breast and lung carcinoma, and glioblastoma (GB) [9–13]. We and others have in particular focused on the role of

TSP1 in diffuse gliomas [14–17]. Among the most prevalent diffuse gliomas are IDH wt and IDH mutant gliomas. Glioblastomas, the most malignant subtype of diffuse gliomas is of IDH wt subtype, are highly aggressive, invasive and vascularized. Their median survival still ranges from 9 to 12 months even with maximum standard care (extent of resection, Temozolomide (TMZ) chemo- and radiotherapy). The genetics of these tumors has been extensively studied [18,19], but this has not led to major improvements of the clinical outcome. Thus, there is a need to identify potential new targets, that are involved in the interactions of GB cells with the TME, for therapeutic intervention.

In this review article, we will summarize the current findings of the role of TSP1 in GB development and invasion. We will discuss studies, mainly from preclinical research, which should lead to a deeper understanding of TSP1's role of in GB development. We will also discuss some issues with regard to the use of this knowledge for the clinic.

2. *In vitro* and *in vivo* effects and phenotypic modulation of GB by TSP1 when compared to other tumor types

The role of TSP1 in GB has been first described in the 2000's mainly on rodent cell lines [9,10] but also on some human cell lines [16]. Controversial results were reported as TSP1 was found to exhibit pro- or anti-tumor activity.

* Corresponding author.

E-mail address: andreas.bikfalvi@u-bordeaux.fr (A. Bikfalvi).

<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2023.09.001>

Received 31 August 2023; Received in revised form 5 September 2023; Accepted 6 September 2023

Available online 9 September 2023

1084-9521/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The direct effect of TSP1 on GB invasion was also more recently assessed by our laboratory in a systematic study [17]. These results are summarized as follows: Laser-capture microdissection and qPCR analysis showed that THBS1 mRNA was found significantly increased in the invasive area when compared with the tumor center. Knock-down of TSP1 using shRNA strategy led to significant decrease in GB cell invasion when tested in a 3D collagen type I invasion assay. Mice intracranially implanted with TSP1 knock-down cells had a better survival than control mice albeit the number of small vessels was decreased and medium size vessels increased. Contra-lateral invasion was significantly decreased in GB THBS1 KD tumors when compared to control. Gain-of-function experiments by overexpressing TSP1 in GB cells led to an increase in invasion. TSP1 expression was increased by hypoxia in vitro as well as by bevacizumab treatment. In bevacizumab-treated tumors, showing higher invasion rate [20], THBS1 KD reduced tumor growth. This was reinforced by pharmacological inhibition using TAX2, a small peptide fragment of TSP1, which blocks the interaction between TSP1/CD47 [21]. These results indicate an overall tumor promoting effect of TSP1 in GB acting mainly on invasion. For this effect, CD47 expression on the tumor cell surface seems to be required.

Earlier studies are in agreement with a pro-tumor role of TSP1 in GB. For example, antisense-mediated reduction in TSP1 expression reduces cell motility in the T98G-G7 malignant glioma cell [22]. Nevertheless, it has also been reported that overexpression of TSP1 reduced growth and vascular index but not perfusion in glioblastoma [16]. The authors reported a retarded growth velocity but no difference in overall tumor size. Angiogenesis was impaired but not vessel perfusion. The authors used classical adherent cell lines, and did not investigate invasion which is different from our study. In this context, a phase 1 clinical study in GB has been conducted with ABT 510, a TSP-1 mimetic peptide, a non-peptide analog which inhibits potentially angiogenesis by competing with TSP1 for binding to CD36 in endothelial cells. It is not established whether this molecule acts on GB cells directly where CD47 and not CD36 is required [23]. No phase II was then performed in GB, leading on suspicion of adverse effects on patients.

Comparing our results to other tumor models, the differences are striking. In melanoma, for instance, TSP1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor, thus exhibiting an antitumor effect mediated by the inhibition of the tumor vasculature. This has been convincingly supported in studies using GEMM models of breast cancers [4]. Furthermore, it has been shown that TSP1 suppresses proliferation and spheroid formation of A549 lung carcinoma, HCT116 colorectal carcinoma, and HeLa cervical carcinoma cells [24–27].

The tumor inhibiting role of TSP1 is supported by additional studies. Targeted overexpression of TSP1 in the epidermis delayed and reduced premalignant epithelial hyperplasia induced by chemical carcinogens and UVB [28]. Furthermore, spontaneous mammary adenocarcinoma formation in TgN-neu mice and loss of *Thbs1* increased mammary adenocarcinomas in these mice and osteosarcoma incidence. On the contrary, these results were not observed in some other malignancies in mice lacking p53 [29]. In a metastatic model of prostate cancer, implantation of tumor cells in *Thbs1* KO mice resulted in increased tumor size [30].

These data are not in agreement with our results on GB and with data published by others, and the reason must be explained. At present, one can only speculate about the reason for these differences. They may be due to the specific nature of the tumor micro-environment in GB. Indeed, GB is embedded in a tissue with high content of nervous system components, including neurons, astrocytes, oligodendrocytes, and microglial cells. Furthermore, the tumor-vasculature interactions seem to be a mix between cooption and neoangiogenesis. Finally, the cerebral matrix is of different composition and stiffness which crucially impacts cell motility. It has been nicely described by several investigators how matrix stiffness influences the invasion behavior of GB cells, stiffer matrices inducing a more collective invasive phenotype [31,32].

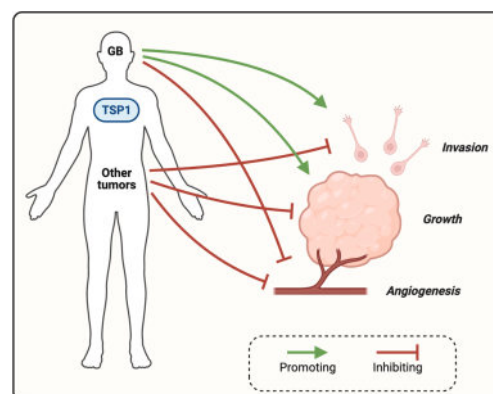


Fig. 1. Effect of TSP1 in GB in comparison to other tumor types. Schematic figure showing distinct effects of TSP1 in GB and other tumors in term of growth, invasion and angiogenesis.

This leads to two conclusions: (1) it is difficult to derive a general concept for TSP1 in tumor development, and our understanding has to be adapted to different tumor types. This is similar to our understanding of the role of CXCR3 chemokine receptors since their action is also context specific, and is different between CXCR3A (activator, expressed on GB cells) and CXCR3B (inhibitor, expressed in the TME) and between GB and other tumor types [33]. (2) Another interpretation of this conundrum is that GB represents an out-layer from a general scheme of “TSP1-dependent tumor inhibition” and has to be treated separately.

In Fig. 1 the effects of TSP1 on GB cells in comparison to other tumor cell types are depicted.

3. The TSP1-TGFβ1 connection in GB

TSP1 is expressed in tumor blood vessels in specific patient-derived

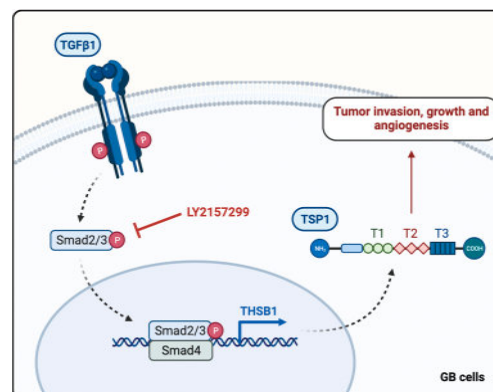


Fig. 2. The TSP1 – TGFβ1 connection in GB. *THBS1* is transcriptionally regulated via TGFβ1 through SMAD3. TSP1 will then be produced, which contains several domains including properdin-like type I repeats (T1), epidermal growth factor-like type II repeats (T2) and type III repeats with an arginylglycylaspartic acid sequence (T3). After release, TSP1 has various effects on tumor development by stimulating tumor expansion and invasion and by modulating angiogenesis. The use of LY2157299, as a TGFβR antagonist, inhibits TSP1 synthesis.

xenograft (PDX) models and in tumor cells. There is evidence that these different forms have different roles and cellular targets. Nevertheless, the general paradigm is that TSP1 activates TGF β 1 via its type 1 domain by mobilizing its active form from the Latent Activating Protein (LAP) [34]. This has been shown in several tumor types but not in GB [35]. It is known that TSP1 interacts with many effector proteins such as integrins (α 6 β 1 or α 4 β 1) or cell-surface receptors (CD36 and CD47) via different protein domains. Furthermore, TSP1 binds to growth factors such as FGF2 or VEGF to reduce neoangiogenesis [36].

We have investigated more recently the interplay between TGF β 1 and TSP1 in GB [17]. We first ruled out an indirect effect of TSP1 on TGF β 1 activation. Treatment of cells with purified TSP1 did not increase fibronectin expression and did not lead to SMAD phosphorylation. Functional inhibition of GB-derived endogenous TSP1 did not alter active TGF β 1 concentrations in the medium, which indicates that TSP1 does not activate TGF β 1 in this case. Hypoxia, which activated the TGF β 1 pathway with SMAD phosphorylation, also induced TSP1 expression. Furthermore, TSP1 expression and secretion were inhibited using LY2157299, an inhibitor of the TGF β 1 receptor 1. This goes against the general paradigm of TGF β 1 activation by TSP1 and points to an opposite relationship in GB where TGF β 1 can induce TSP1 expression.

This was reinforced by the observation that TGF β 1 induces TSP1 via promoter-bound phosphorylated SMAD3. Two motifs in the *THBS1* gene are involved in its regulatory function: motif 1 is activating gene expression and motif 2 is inhibitory. In the presence of TGF β 1, phospho-SMAD3 binding is mainly on site 2. The specific interactors of SMAD3 involved in TSP1 regulation remain to be identified (Fig. 2).

Others have reported a link between TSP1 and TGF β 2. In this case, lactate is inducing TSP1 expression which in turn activates TGF β 2 [37]. TGF β 2 is relatively similar to TGF β 1 and thus the mechanisms should be compatible, which is not the case in GB. The authors have used the HTZ-349 cell line and not patient-derived glioma cell lines which may explain these differences.

4. The TSP1-microtubule and neuronal connection in GB

4.1. The microtubule network between tumor cells

GB cells form extensions, called Microtubes (MTs) connecting tumor cells between themselves. Tumor cells are also able to form MT with other cell types located in the TME. MTs are localized more in cells at the invasive front. An important promoter of TM formation is Growth Associated Protein 43 (GAP43) as well as Connexin 43, a major gap junction protein. MT allows the transfer of signalling molecules between cells as well as other cellular content. TM networks were extensively observed in GB patient samples but also in patient-derived xenografts by using intravital imaging [38,39]. They were found more present in astrocytoma than in oligodendroglioma. We have recently shown that TSP1 promotes MT formation via the previously described pathway TGF β 1-SMAD3. By using TSP1-knockdown patient-derived cells or cells treated with LY2157299 (a TGFBR1 inhibitor), an important decrease of MT formation was observed in vivo by intravital imaging over weeks [39].

4.2. The TSP1 – neuronal connection

Glioma cells and neurons are connected through glutaminergic neuro-glioma synapses. Neuronal input has been shown to promote tumor growth and invasion [40–42]. Furthermore, glioma cells secrete neurotransmitters and synaptogenic factors to induce neuron excitability, reinforcing bidirectional interactions between neurons and glioma cells.

Recent research has reported an unexpected role of TSP1 in this context, TSP1 as a synaptogenic molecule for glioma-neuron synapses [43]. This is based on older observations including the identification of

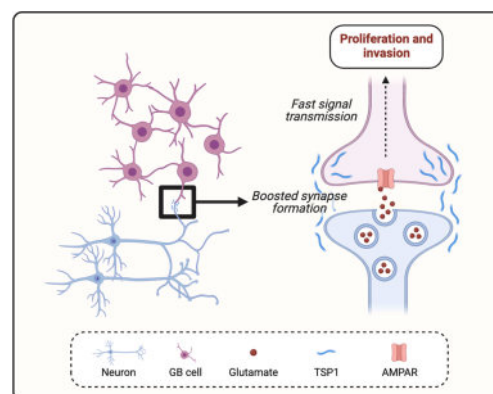


Fig. 3. TSP1 and the neuro-glioma connection. Connectivity between neurons and GB cells can be established via microtubes, where a synapse can be formed between a presynaptic neuron and a postsynaptic GB cell. The secretion of TSP1 promotes the formation of synapses enabling the neurotransmission of glutamate, an excitatory amino acid which, by binding to the tumor cell, favors tumor proliferation and invasion. GB, glioblastoma; TSP1, thrombospondin 1; AMPAR, α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionate receptor.

thrombospondins as the astrocyte-secreted proteins that promoted CNS synaptogenesis [44] as well as the gabapentin receptor α 2 δ 1 as a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis [45].

In this recent study, single-cell RNA-sequencing of patient tumor samples has revealed that TSP-1 is predominantly expressed by glioblastoma cells within high-functionally connected (HFC) intra-tumoral regions. In patients during wake surgery, when intracranial brain recordings during lexical retrieval language tasks are performed coupled with site-specific tumor tissue biopsies and cell biology experiments, gliomas were found to remodel functional neural circuitry including task-relevant neural responses. Highly enriched brain regions with glioblastoma cells exhibit a distinct synaptogenic and neuronotrophic phenotype dependent on the secretion of TSP1. In animal models, patient-derived glioblastoma cells from HFC regions are characterized by a proliferative and invasive phenotype which is stimulated by neuronal activity. Patient survival is negatively correlated with high-functional connectivity index and TSP1 expression which contributes to synaptogenesis. In addition, TSP1 participates significantly in the glioma-induced neuronal changes [43]. When TSP1 was inhibited with gabapentin – which inhibits binding of TSP1 on calcium channel subunit α 2 δ -1, GB proliferation was decreased. Thus, according to this study, TSP1 participates in high-grade gliomas to the remodeling of neuronal circuits which both promotes tumor progression and impairs cognition.

Another important study, in line with the previous observation, demonstrated that high neuronal activity within GB is linked to immunosuppression, and that TSP1 is critically involved in this context [46]. Authors performed a *Thbs1* CRISPR-Cas9 knockout in syngeneic intracranial tumor models which suppressed synaptogenesis and glutamatergic neuronal hyperexcitability. This reinforces the contention of the synaptogenic properties of TSP1 in line with the other studies described above. In parallel, an immunomodulatory effect was observed with the restored antigen-presentation and pro-inflammatory responses. Moreover, infiltrations of pro-inflammatory TAMs and CD8⁺ T-cells was observed in TSP1 knockout tumors, inducing a better overall survival in the corresponding mice. This was, furthermore, reinforced by pharmacological inhibition of glutamatergic excitatory signals which reprogrammed TAMs and prolonged survival. These data point therefore to an indirect role of TSP1 on the immune system via its synaptogenic

Table 1
The molecular mechanisms described to date for a role of TSP1 in Glioblastoma development.

Targeted entity	Underlying Mechanism	potential means of intervention	Reference
Matrix	Stabilizing collagen matrix	Interfering with collagen crosslinking sites	[47]
CD47*	Direct binding of TSP1 to CD47 on tumor cells	Anti-CD47 antibodies or mimetics	[17]
CD36*(1)	Potential effects on the tumor vasculature and on FA transport	CD36 blockade (antibodies, peptidomimetics)	[48]
CD36 (2)	Potential direct effect on tumor cells via CD36	Induction of dead receptor up-regulation by 3TSR	[49]
TGFβ-TSP1 axis*	Induction of TSP1 transcription by TGFβ	Interfering with transcription factors that bind to domain 1 in TSP1 promoter	[17]
Growth factor interactions*	Potential effects on the tumor vasculature	Blockade of FGF/TSP1 interactions or of VEGF/VEGFR2 signalling by specific antibodies, peptides or mimetics	[50,51]
Immune * regulatory network	-Direct effect: induction of NO -Via TGFβ1 -Via Neuronal activity	Pharmacological blockade of glutaminergic neuroglioma receptors	[46]
Synaptogenesis*	Stabilizing of glutaminergic synapses	Pharmacological blockade of glutaminergic neuroglioma receptors	[43]
Galectins	TSP1/galectin interaction	?	?
Calcium influx	TSP1-CD47 Ca2 ⁺ induction	Ca2 ⁺ chelators	[52] (but not in GB)

CD36, cluster of differentiation 36, also known as platelet glycoprotein 4, fatty acid translocase (FAT), scavenger receptor class B member 3 (SCARB3); **CD47**, CD47 Antigen (Rh-Related Antigen, Integrin-Associated Signal Transducer); **FA**, fatty acid; **FGF**, Fibroblast growth factor; **NO**, Nitrous oxide; **3TSR**, Three thrombospondin type 1 repeats; **TSP1**, thrombospondin1; **TGFβ1**, Transforming growth factor β1; **VEGF**, Vascular Endothelial Growth Factor.

effect on glutaminergic neurons. However, direct immunomodulation has been described for TSP1 with a broad array of cellular targets which seems at odds with the data described above. However, as indicated above, TSP1 has a rather unusual role in GB that is different to other solid tumor types (see discussion above), and, if true, this could explain the absence of a direct effect for TSP1 on immunomodulation.

Altogether, these results indicate that TSP1 has important functions in GB development which points to a complex network of molecular interactions implicating neurons and immune cells (Fig. 3).

These observations are in line with the tumor promoting function of TSP1 in GB development described earlier by us [17,39]. Future studies will probably further widen the TSP1-GB interaction map by integrating the vasculature and other components of the TME.

5. Molecular mechanisms of TSP1 action in GB

The molecular mechanisms described to date for a role of TSP1 in GB are summarized in Table 1. Some of these are more firmly established than others (marked with an Asterix).

6. Conclusions

TSP1 represents an interaction-surface with multiple molecular contacts that forcefully impacts the tumor cell phenotype and behavior

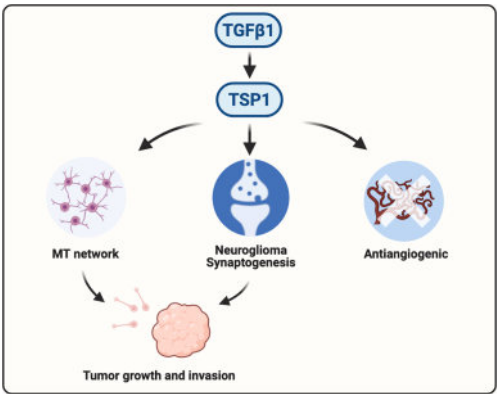


Fig. 4. A provisional general concept of TSP1's role in GB development. Thrombospondin-1 (TSP1) is synthesized through the action of transforming growth factor β1(TGFβ1), favors the formation of tumor microtubes connecting tumor cells between themselves mainly at invasive borders, stimulates neuroglioma synaptogenesis and modulates angiogenesis. The net results of these events is enhanced tumor growth and invasion.

by signaling through CD47 or CD36. It may also be a bystander module that modifies the properties of external factor either positively or negatively and thus behaves like a molecular switch. TSP1 is, in essence, a multifaceted molecule which acts in a context specific manner, which is the case for GB. This most likely depends on the TSP1-receptors that are expressed on the tumor cells or in the TME (CD36, CD47, etc.) and on the presence of growth factors, cytokines or other matrix molecules.

Despite this complexity, a general concept of TSP1's role in GB development seems to emerge from the studies outlined above:

- (1) TSP1 favors GB development and invasion. This has been documented in many experimental models; it mainly depends on the presence of CD47 on tumor cells (albeit in one study tumor cell-associated CD36 has also been described, but provides most likely a minor contribution since CD36 is not expressed or expressed at low levels in most GB cells). This is different from other tumor types where the TME is mainly targeted and an inhibitory effect is seen.
- (2) TSP1 expression is induced by TGFβ1 in GB which seems different from other solid tumors where TSP1 activates TGFβ1 by dissociating it from the LAP.
- (3) TSP1 is implicated in the induction of a MT network between GB cells. These networks are pronounced at the tumor edges and seem to be important for tumor cell invasion
- (4) TSP1 is implicated in synaptogenesis between tumor cells and neurons. This impacts GB development and invasion
- (5) TSP1 has immunomodulatory activity in GB probably via neuroglioma synapses. The detailed mechanism is not known.

A provisional general concept of TSP1's role in GB development is illustrated in Fig. 4.

The specific molecular details still need to be uncovered. Nevertheless, these five items may constitute a suitable framework for further investigations.

Declaration of Competing Interest

There is no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

The authors research has been funded by the National Cancer Institute (INCA), The "Ligue contre le Cancer", The Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), The Plan Cancer (INSERM), The University of Bpideaux.

References

- [1] N.L. Baenziger, G.N. Brodie, P.W. Majerus, A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 240–243, <https://doi.org/10.1073/pnas.68.1.240>.
- [2] T. Huang, L. Sun, X. Yuan, H. Qiu, Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression, *Oncotarget* 8 (2017) 84546–84558, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19165>.
- [3] S. Kazerounian, K.O. Yee, J. Lawler, Thrombospondins in cancer, *Cell Mol. Life Sci.* 65 (2008) 700–712, <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7486-z>.
- [4] J.C. Rodriguez-Manzanique, T.F. Lane, M.A. Ortega, R.O. Hynes, J. Lawler, M. L. Iruela-Arispe, Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 12485–12490, <https://doi.org/10.1073/pnas.171460498>.
- [5] J.S. Isenberg, L.A. Ridnour, J. Dimitry, W.A. Frazier, D.A. Wink, D.D. Roberts, CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 26069–26080, <https://doi.org/10.1074/jbc.M605040200>.
- [6] J.E. Murphy-Ullrich, M.J. Suto, Thrombospondin-1 regulation of latent TGF- β activation: a therapeutic target for fibrotic disease, *Matrix Biol.* 68–69 (2018) 28–43, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.12.009>.
- [7] N.J. Galvin, P.M. Vance, V.M. Dixit, B. Fink, W.A. Frazier, Interaction of human thrombospondin with types I–V collagen: direct binding and electron microscopy, *J. Cell Biol.* 104 (1987) 1413–1422, <https://doi.org/10.1083/jcb.104.5.1413>.
- [8] D.D. Roberts, T.W. Miller, N.M. Rogers, M. Yao, J.S. Isenberg, The matricellular protein thrombospondin-1 globally regulates cardiovascular function and responses to stress via CD47, *Matrix Biol.* 31 (2012) 162–169, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.01.005>.
- [9] F. de Fraipont, M. Keramidas, M. El Atifi, E.M. Chambaz, F. Berger, J.J. Feige, Expression of the thrombospondin-1 Fragment 167–569 in C6 glioma cells stimulates tumorigenicity despite reduced neovascularization, *Oncogene* 23 (2004) 3642–3649, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207438>.
- [10] S. Filleur, O.V. Volpert, A. Degeorges, C. Voland, F. Reihel, P. Clezardin, N. Bouck, F. Cabon, In vivo mechanisms by which tumors producing thrombospondin-1 bypass its inhibitory effects, *Genes Dev.* 15 (2001) 1373–1382, <https://doi.org/10.1101/gad.193501>.
- [11] A. Jeanne, T. Sarazin, M. Charle, C. Moali, C. Fichel, C. Boulagnon-Rombi, M. Calleaert, M.-C. Andry, E. Diesis, F. Delolme, et al., Targeting ovarian carcinoma with TSP-1:CD47 antagonist TAX2 activates anti-tumor immunity, *Cancers* 13 (2021) 5019, <https://doi.org/10.3390/cancers13195019>.
- [12] B. Sid, B. Langlois, H. Sartelet, G. Bellon, S. Dedieu, L. Martiny, Thrombospondin-1 enhances human thyroid carcinoma cell invasion through urokinase activity, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 1890–1900, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.023>.
- [13] V. Firlej, J.R.R. Mathieu, C. Gilbert, L. Lemonnier, J. Nakhle, C. Gallou-Kabani, B. Guarmit, A. Morin, N. Prevarskaya, N.B. Delongchamps, et al., Thrombospondin-1 triggers cell migration and development of advanced prostate tumors, *Cancer Res.* 71 (2011) 7649–7658, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0833>.
- [14] Y.K. Choi, C.K. Kim, H. Lee, D. Jeoung, K.S. Ha, Y.G. Kwon, K.W. Kim, Y.M. Kim, Carbon monoxide promotes VEGF expression by increasing HIF-1 α protein level via two distinct mechanisms, translational activation and stabilization of HIF-1 α protein, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 32116–32125, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.131284>.
- [15] M. Tenan, G. Fulci, M. Albertoni, A.C. Diserens, M.F. Hamou, M. El Atifi-Borel, J. J. Feige, M.S. Pepper, E.G. Van Meir, Thrombospondin-1 Is Downregulated by Anoxia and Suppresses Tumorigenicity of Human Glioblastoma Cells. *J. Exp. Med.* 191 (2000) 1789–1798, <https://doi.org/10.1084/jem.191.10.1789>.
- [16] A.D. Kraft, D.A. Johnson, J.A. Johnson, Nuclear factor E2-Related Factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult, *J. Neurosci.* 24 (2004) 1101–1112, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3817-03.2004>.
- [17] T. Daubon, C. Leon, K. Clarke, L. Andrique, L. Salabert, E. Darbo, R. Pineau, S. Guerit, M. Maitre, S. Dedieu, et al., Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development, *Nat. Commun.* 10 (2019) 1146, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08480-y>.
- [18] A.P. Patel, I. Tirosh, J.J. Trombetta, A.K. Shalek, S.M. Gillespie, H. Wakimoto, D. P. Cahill, B.V. Nahed, W.T. Curry, R.L. Martuza, et al., Single-cell RNA-Seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma, *Science* 344 (2014) 1396–1401, <https://doi.org/10.1126/science.1254257>.
- [19] C. Neftci, J. Laffy, M.G. Filbin, T. Hara, M.E. Shore, G.J. Rahme, A.R. Richman, D. Silverbush, M.L. Shaw, C.M. Hebert, et al., An integrative model of cellular states, plasticity, and genetics for glioblastoma, *Cell* 178 (2019) 835–849, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024>, e21.
- [20] O. Keunen, M. Johansson, A. Oudin, M. Sanzey, S.A. Rahim, F. Fack, F. Thorsen, T. Taxt, M. Bartos, R. Jirik, et al., Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (2011) 3749–3754, <https://doi.org/10.1073/pnas.1014480108>.
- [21] A. Jeanne, E. Sick, J. Devy, N. Floquet, N. Belloy, L. Theret, C. Boulagnon-Rombi, M.-D. Diebold, M. Dauchez, L. Martiny, et al., Identification of TAX2 peptide as a new unpredicted anti-cancer agent, *Oncotarget* 6 (2015) 17981–18000, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4025>.
- [22] K. Amagasaki, A. Sasaki, G. Kato, S. Maeda, H. Nukui, H. Naganuma, Antisense-mediated reduction in thrombospondin-1 expression reduces cell motility in malignant glioma cells, *Int. J. Cancer* 94 (2001) 508–512, <https://doi.org/10.1002/ijc.1497>.
- [23] J.C. Anderson, J.R. Grammer, W. Wang, L.B. Nabors, J. Henkin, J.E. Stewart, C. L. Gladson, ABT-510, a modified type 1 repeat peptide of thrombospondin, inhibits malignant glioma growth in vivo by inhibiting angiogenesis, *Cancer Biol. Ther.* 6 (2007) 454–462, <https://doi.org/10.4161/cbt.6.3.3630>.
- [24] D.L. Weinstat-Saslow, V.S. Zabrenetzky, K. VanHoutte, W.A. Frazier, D.D. Roberts, P.S. Steeg, Transfection of Thrombospondin 1 Complementary DNA into a Human Breast Carcinoma Cell Line Reduces Primary Tumor Growth, Metastatic Potential, and Angiogenesis, *Cancer Res* 54 (1994) 6504–6511.
- [25] R.J. Jin, C. Kwak, S.G. Lee, C.H. Lee, C.G. Soo, M.S. Park, E. Lee, S.E. Lee, The Application of an Anti-Angiogenic Gene (Thrombospondin-1) in the Treatment of Human Prostate Cancer Xenografts, *Cancer Gene Ther.* 7 (2000) 1537–1542, <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700266>.
- [26] M. Streit, P. Velasco, L.F. Brown, M. Skobe, L. Richard, L. Riccardi, J. Lawler, M. Detmar, Overexpression of Thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas, *Am. J. Pathol.* 155 (1999) 441–452, [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65140-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65140-1).
- [27] M.-P. Wu, M.-J. Young, C.-C. Tzeng, C.-R. Tzeng, K.-F. Huang, L.-W. Wu, C.-Y. Chou, A novel role of thrombospondin-1 in cervical carcinogenesis: inhibit stroma reaction by inhibiting activated fibroblasts from invading cancer, *Carcinogenesis* 29 (2008) 1115–1123, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn077>.
- [28] S. Mirzoeva, X. Tong, B.B. Bridgeman, M.P. Plebanek, O.V. Volpert, Apigenin inhibits UVB-induced skin carcinogenesis: the role of thrombospondin-1 as an anti-inflammatory factor, *Neoplasia* 20 (2018) 930–942, <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.07.005>.
- [29] S. Chauhan, S. Danielson, V. Clements, N. Edwards, S. Ostrand-Rosenberg, C. Fenselau, Surface glycoproteins of exosomes shed by myeloid-derived suppressor cells contribute to function, *J. Proteome Res.* 16 (2017) 238–246, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00811>.
- [30] B.A. Kerr, K.S. Harris, L. Shi, J.S. Willey, D.R. Soto-Pantoja, T.V. Byzova, Platelet TSP-1 controls prostate cancer-induced osteoclast differentiation and bone marrow-derived cell mobilization through TGF- β 1, *Am. J. Clin. Exp. Urol.* 9 (2021) 18–31.
- [31] P.G. Gritsenko, P. Friedl, Adaptive adhesion systems mediate glioma cell invasion in complex environments, *J. Cell Sci.* 131 (2018) jcs216382, <https://doi.org/10.1242/jcs.216382>.
- [32] A. Acharekar, K. Bachal, P. Shirke, R. Thorat, A. Banerjee, N. Gardi, A. Majumder, S. Dutt, Substrate stiffness regulates the recurrent glioblastoma cell morphology and aggressiveness, *Matrix Biol.* 115 (2023) 107–127, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2022.12.002>.
- [33] C. Billotet, C. Quemener, A. Bikfalvi, CXCR3, a double-edged sword in tumor progression and angiogenesis, *Biochim. Et. Biophys. Acta (BBA) - Rev. Cancer* 1836 (2013) 287–295, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.08.002>.
- [34] S. Schultz-Cherry, J. Lawler, J.E. Murphy-Ullrich, The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 26783–26788.
- [35] D. Ramchandani, V. Mittal, Thrombospondin in tumor microenvironment, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1272 (2020) 133–147, https://doi.org/10.1007/978-3-030-48457-6_8.
- [36] G. Colombo, B. Margosio, L. Ragona, M. Neves, S. Bonifacio, D.S. Annis, M. Stravalaci, S. Tomaselli, R. Giavazzi, M. Rusnati, et al., Non-peptidic thrombospondin-1 mimics as fibroblast growth factor-2 inhibitors: an integrated strategy for the development of new antiangiogenic compounds, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 8733–8742, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.085605>.
- [37] C. Seliger, P. Leukel, S. Moeckel, B. Jachnik, C. Lottz, A. Brawanski, M. Proescholdt, U. Bogdahn, A.-K. Bosserhoff, et al., Lactate-modulated induction of THBS-1 activates transforming growth factor (TGF)- β 2 and migration of glioma cells in vitro, *PLoS One* 8 (2013), e78935, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078935>.
- [38] M. Osswald, E. Jung, F. Sahm, G. Solecki, V. Venkataramani, J. Blaes, S. Weill, H. Horstmann, B. Wiestler, M. Syed, et al., Brain tumor cells interconnect to a functional and resistant network, *Nature* 528 (2015) 93–98, <https://doi.org/10.1038/nature16071>.
- [39] J.V. Joseph, C.R. Magaut, S. Storevik, L.H. Geraldo, T. Mathivet, M.A. Latif, J. Rudewicz, J. Guyon, M. Gambaretti, F. Haukas, et al., TGF- β promotes microtubule formation in glioblastoma through thrombospondin 1, *Neuro Oncol.* (2021) noab212, <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab212>.
- [40] H.S. Venkatesh, T.B. Johung, V. Caretti, A. Noll, Y. Tang, S. Nagaraja, E.M. Gibson, C.W. Mount, J. Polepalli, S.S. Mitra, et al., Neuronal activity promotes glioma growth through neuropilin-3 secretion, *Cell* 161 (2015) 803–816, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.012>.
- [41] H.S. Venkatesh, W. Morishita, A.C. Geraghty, D. Silverbush, S.M. Gillespie, M. Arzt, L.T. Tam, C. Espenel, A. Ponnuswami, L. Ni, et al., Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits, *Nature* 573 (2019) 539–545, <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1563-y>.

- [42] V. Venkataramani, D.I. Tanev, C. Strahle, A. Studier-Fischer, L. Fankhauser, T. Kessler, C. Körber, M. Kardorff, M. Ratliff, R. Xie, et al., Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression, *Nature* 573 (2019) 532–538, <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1564-x>.
- [43] S. Krishna, A. Choudhury, M.B. Keough, K. Seo, L. Ni, S. Kakaizada, A. Lee, A. Aabedi, G. Popova, B. Lipkin, et al., Glioblastoma remodelling of human neural circuits decreases survival, *Nature* 617 (2023) 599–607, <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06036-1>.
- [44] K.S. Christopherson, E.M. Ullian, C.C.A. Stokes, C.E. Mulowney, J.W. Hell, A. Agah, J. Lawler, D.F. Mosher, P. Bornstein, B.A. Barres, Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis, *Cell* 120 (2005) 421–433, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.020>.
- [45] C. Eroglu, N.J. Allen, M.W. Susman, N.A. O'Rourke, C.Y. Park, E. Ozkan, C. Chakraborty, S.B. Mulinyawe, D.S. Annis, A.D. Huberman, et al., Gabapentin receptor Alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis, *Cell* 139 (2009) 380–392, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.025>.
- [46] T. Nejo, S. Krishna, C. Jimenez, A. Yamamichi, J.S. Young, S. Lakshmanachetty, T. Chen, S.S.S. Phyu, H. Ogino, P. Watchmaker, et al., Glioma-neuronal circuit remodeling induces regional immunosuppression, *bioRxiv* 2023 (2023), <https://doi.org/10.1101/2023.08.04.548295>.
- [47] S. Rosini, N. Pugh, A.M. Bonna, D.J.S. Hulmes, R.W. Farndale, J.C. Adams, Thrombospondin-1 promotes matrix homeostasis by interacting with collagen and lysyl oxidase precursors and collagen cross-linking sites, *Sci. Signal* 11 (2018) eaar2566, <https://doi.org/10.1126/scisignal.aar2566>.
- [48] C. Tanase, A.M. Enciu, E. Codrici, I.D. Popescu, M. Dudau, A.M. Dobri, S. Pop, S. Mihai, A.-A. Gheorghisan-Galateanu, M.E. Hinescu, Fatty acids, CD36, thrombospondin-1, and CD47 in glioblastoma: together and/or separately? *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 604, <https://doi.org/10.3390/ijms23020604>.
- [49] S.H. Choi, K. Tamura, R.K. Khajuria, D. Bhere, I. Nesterenko, J. Lawler, K. Shah, Antiangiogenic variant of TSP-1 targets tumor cells in glioblastomas, *Mol. Ther.* 23 (2015) 235–243, <https://doi.org/10.1038/mt.2014.214>.
- [50] B. Margosio, D. Marchetti, V. Vergani, R. Giavazzi, M. Rusnati, M. Presta, G. Taraboletti, Thrombospondin 1 as a scavenger for matrix-associated fibroblast growth factor 2, *Blood* 102 (2003) 4399–4406, <https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0893>.
- [51] X. Zhang, S. Kazerounian, M. Duquette, C. Perruzzi, J.A. Nagy, H.F. Dvorak, S. Parangi, J. Lawler, Thrombospondin-1 modulates vascular endothelial growth factor activity at the receptor level, *FASEB J.* 23 (2009) 3368–3376, <https://doi.org/10.1096/fj.09-131649>.
- [52] R. Bissinger, P. Petkova-Kirova, O. Mykhailova, P.-A. Oldenborg, E. Novikova, D. A. Donkor, T. Dietz, A.A.M. Bhuyan, W.P. Sheffield, M. Grau, et al., Thrombospondin-1/CD47 signaling modulates transmembrane cation conductance, survival, and deformability of human red blood cells, *Cell Commun. Signal* 18 (2020) 155, <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00651-5>.

Article 4 (Article original)



Received: 29 June 2024 | Revised: 4 March 2025 | Accepted: 26 March 2025
DOI: 10.1002/ijc.35441

RESEARCH ARTICLE

Tumor Markers and Signatures



A strategy for multimodal integration of transcriptomics, proteomics, and radiomics data for the prediction of recurrence in patients with IDH-mutant gliomas

Tiffanie Chouleur¹ | Christèle Etchegaray² | Laura Villain^{3,4,5} | Antoine Lesur⁶ | Thomas Ferte^{3,4,5,7} | Marco Rossi⁸ | Laetitia Andrique¹ | Costanza Simoncini² | Anne-Sophie Giacobbi⁹ | Matteo Gambaretti¹⁰ | Egesta Lopci¹¹ | Bethania Fernandes¹² | Gunnar Dittmar⁶ | Rolf Bjerkvig^{13,14} | Boris Hejblum^{3,4,5} | Rodolphe Thiébaut^{3,4,5,7} | Olivier Saut² | Lorenzo Bello¹⁰ | Andreas Bikfalvi¹

¹INSERM U1312 BRIC, University of Bordeaux, Pessac, France²INRIA, University of Bordeaux Inria Monc, IMB, UMR 5251, Talence, France³INSERM Bordeaux Population Health Research Center, SISTM team, UMR 1219, University of Bordeaux, Bordeaux, France⁴INRIA Bordeaux Sud Ouest, SISTM team Talence, Talence, France⁵Vaccine Research Institute, VRI, Hôpital Henri Mondor, University of Bordeaux, Créteil, France⁶Luxembourg Institute of Health, Strassen, Luxembourg⁷CHU Pellegrin, Groupe Hospitalier Pellegrin, Bordeaux, France⁸Neurosurgical Oncology Unit, Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, IRCCS Galeazzi Sant'Ambrogio, Milano, Italy⁹Laboratoire de Biologie Computationnelle et Quantitative (LCQB), UMR 7238 CNRS, Université Sorbonne, Paris, France¹⁰Department of Oncology and Hemato-Oncology, Neurosurgical Oncology Unit, Università degli Studi di Milano and IRCCS Galeazzi Sant'Ambrogio, Milano, Italy¹¹Nuclear Medicine Unit, Humanitas Research Hospital, Milano, Italy¹²Pathology Unit, Humanitas Research Hospital, Milano, Italy¹³Department of Biomedicine and KG Jebsen Brain Tumor Research Center, University of Bergen, Bergen, Norway¹⁴Department of Neurosurgery, Qilu Hospital of Shandong University, Shandong, China

Correspondence

Andreas Bikfalvi, University of Bordeaux,
INSERM U1312 BRIC, 33600 Pessac, France.
Email: andreas.bikfalvi@u-bordeaux.fr

Funding information

ERA-NET GliomaPRD; TRANSCAN Joint

Abstract

Isocitrate dehydrogenase-mutant gliomas are lethal brain cancers that impair quality of life in young adults. Although less aggressive than glioblastomas, IDH-mutant gliomas invariably progress to incurable disease with unpredictable recurrence. A better

Abbreviations: ATRX, Alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked; ATXN10, Ataxin-10; DEGs, Differential expressed genes; EIF4H, Eukaryotic translation initiation factor 4H; EOR, Extent of resection; ERK1, Extracellular signal-regulated kinase-1; ERK2, Extracellular signal-regulated kinase-2; FLAIR, Fluid-attenuated inversion recovery; GSVA, Gene set variation analysis; HRs, Hazard ratios; IDH-mutant, Isocitrate dehydrogenase mutant; ITGAV, Integrin alpha-V; KRT19, Keratin19; LASSO, Least Absolute Shrinkage and Selection Operator; MAPK, Mitogen activated protein kinase; MRI, Magnetic resonance imaging; NCAM1, Neural cell adhesion molecule 1; PET, Positron-emission tomography; RANO criteria, Response Assessment in Neuro-Oncology Criteria; Ras gene, Rat sarcoma oncogene; RF, Random forest; RUNX3, Runt-related transcription factor 3; SCRT2, Scratch Family Transcriptional Repressor 2; SUVmax, Maximum standardized uptake value; SUVratio, Standardized uptake value ratio; VOI, Volume of interest; ¹¹C-METH PET, C¹¹-methionine PET.

Tiffanie Chouleur, Christèle Etchegaray, and Laura Villain have contributed equally to this study.

Previous presentations: Part of the paper has been published in the thesis of Tiffanie Chouleur. link: <https://theses.fr/2022BORD0371>.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2025 The Author(s). *International Journal of Cancer* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of UICC.

Transnational Call 2016, Association pour la Recherche sur le Cancer, MOH, Lombardy Foundation for Biomedical Research (FRRB), NCS/RCN); University Bordeaux

classification of patient risk of recurrence is needed. Here, we describe a multimodal analytical pipeline integrating imaging, transcriptomic, and proteomic profiles using machine learning to improve patient stratification with novel signatures of patient risk of recurrence based on gene expression, protein level, and imaging. Additionally, we describe the biological characteristics of IDH-mutant glioma subtypes categorized by positron emission tomography (PET) and histology, and we reinforce the integration of positron emission tomography (PET) metrics in the classification of IDH-mutant gliomas. We identify a gene signature (KRT19, RUNX3, and SCRT2) and a protein signature (ATXN10, EIF4H, ITGAV, and NCAM1) associated with an increased risk of early recurrence. Furthermore, we integrated these markers with imaging-derived features, obtaining a better stratification of IDH-mutant glioma patients in comparison to histomolecular classification alone.

KEYWORDS

IDH-mutant glioma, multimodal integration, proteomic, radiomic, transcriptomic

What's new?

Isocitrate dehydrogenase (IDH)-mutant gliomas typically affect young adults and invariably progress toward increasingly malignant phenotypes, despite treatment. Recurrence often is unpredictable, however, indicating a need for a deeper understanding of factors that drive disease return. Here, the authors devised a multilevel strategy to provide a roadmap for monitoring the evolution of IDH-mutant gliomas. Transcriptomic and proteomic analyses identified biological characteristics categorizable by positron emission tomography and histology. The genes KRT19, RUNX3, and SCRT2 and, similarly, a specific protein signature were found to predict recurrence. Integration of imaging features with molecular signatures significantly improved signature-based stratification of patients by recurrence risk.

1 | INTRODUCTION

Adult diffuse gliomas are the most common primary brain tumors. Although the incidence rate of newly diagnosed cancers is <1%, gliomas are associated with a high recurrence frequency and low survival rate.¹ According to the World Health Organization (WHO) classification of 2021, adult diffuse gliomas are divided into two categories based on isocitrate dehydrogenase (IDH) gene status: IDH-wildtype and IDH-mutant gliomas.² IDH-wildtype gliomas, including glioblastomas, exhibit aggressive biological behavior and a poor prognosis. In contrast, IDH-mutant gliomas, including astrocytoma (IDH-mutated) and oligodendroglioma (IDH-mutated and 1p/19q-codeleted), exhibit less aggressive biological behavior, and their prognosis is less influenced by tumor grade. Isocitrate dehydrogenase-mutant gliomas usually occur in younger populations and are typically associated with seizures, which impair the ability of patients to maintain a social and working life.³ Recent therapeutic advances postponed the onset of recurrence using maximal surgical resection, upfront chemo/radiotherapy, and treatment by the IDH inhibitor Vorasidenib.^{4–6} However, IDH-mutant gliomas invariably progress toward a more malignant phenotype, with various recurrences occurring among patients. The interindividual heterogeneity in disease progression complicates the prediction of early recurrence.⁷ Classifying patients according to their

risk of recurrence is an unmet need. An improved risk stratification of IDH-mutant glioma patients can aid neuro-oncologists in the clinical routine for diagnosis, treatment, and follow-up.

Imaging data, including magnetic resonance imaging (MRI) and positron emission tomography (PET), are routinely acquired during patient care. Conventional and advanced imaging features are used for tumor characterization and presumptive diagnosis. At present, additional imaging features can be extracted as quantifiable data by radiomics, which converts radiologic images into computable data in a high-throughput fashion.⁸ These data describe different aspects of the image, such as texture, volume, shape, and intensity, with a quantitative resolution that is not identifiable by the human eye and is currently used in routine clinical work. Imaging reveals interindividual heterogeneity, such as differences in metabolic activity and tumor volume, which may provide insight into patient prognosis.⁹ After a radiological image is acquired, it is reconstructed and processed, after which the volume of interest (VOI) is delineated. Several features are quantified and can be used as prognostic factors in a similar way as genetic biomarkers. As a fundamental part of the diagnosis, specimens from patient tumors are collected to detect validated biomarkers (e.g., IDH mutation and 1p/19q codeletion) and used to stratify patients according to treatment and prognosis. Additional gene and protein biomarkers may be further identified to better stratify IDH-

mutant glioma patients. However, none of the available imaging or genetic approaches are fully integrated into a multiparametric pipeline to describe differences in tumor behavior aimed at predicting IDH-mutant glioma outcomes at the individual patient level.

Both imaging features and molecular biomarkers can be quantified by radiomics, transcriptomics, and proteomics. The complexity of omics data represents a challenge that requires sophisticated tools such as machine learning approaches. Machine learning is a branch of artificial intelligence that aims at establishing complex relationships or patterns from empirical data.¹⁰ The predictive ability of such models can then be evaluated, and the most relevant features can be identified and used to stratify patients according to the risk of recurrence. For this reason, we collected transcriptomic, proteomic, radiomic (derived from both MRI and PET images), and clinical data from a new cohort of patients with IDH-mutant gliomas and used machine learning to provide a pipeline for the prediction of recurrence.

Here, we provide a comprehensive multilayered strategy comprising (1) the biological characterization of different subtypes of IDH-mutant gliomas categorized by positron emission tomography (PET) and histological status, (2) the integration of positron emission tomography (PET) metrics in the classification of IDH-mutant gliomas, and (3) patient stratification comprising novel signatures of the risk of recurrence based on gene or protein expression and imaging. Overall, this multilevel strategy provides a roadmap for monitoring the evolution of IDH-mutant gliomas and for improving the integrated diagnosis and thus therapeutic decision.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Clinical data and patients

This study was conducted on 160 patients with diagnosed gliomas who underwent surgery at the Neurosurgical Oncology Unit of the University of Milan from May 2012 to June 2018. The patient inclusion criteria were as follows: (1) had glioma confirmed by histo-molecular analysis, (2) had a mutation in the IDH gene, and (3) had full MR and MET-PET images available (Figure 1A and Table S1).

The exclusion criteria included patients without full clinical, imaging, or pathologic information at admission or follow-up. The samples were further restricted for analysis based on the quality of the RNA and proteins extracted. All patients provided written informed consent for the surgical procedure, which was approved by the Ethical Committee IRB-1299 Humanitas Research Hospital.

Prior to surgery, all patients underwent ¹¹C-METH PET in accordance with standard procedures as previously described.¹¹ Briefly, PET scans were quantified based on the maximum standardized uptake value (SUVmax) and SUVratio. The SUVratio was obtained by the ratio between the count rate in a region of interest drawn on the area of the tumor with the highest SUVmax and the count rate in a

corresponding region on the contralateral side. Patient tumors were then classified by trained nuclear medicine doctors (E. L.) into PET-negative (PET^{neg}) tumors and PET-positive (PET^{pos}) tumors according to the SUVratio (threshold 1.5). (Figure 1B).¹²

Additionally, tumors were classified as astrocytoma and oligodendroglioma according to WHO classification on the basis of histological and molecular features (ATRX mutation and 1p/19q deletion). Recurrence of the tumor was defined in all cases according to RANO criteria: an increase >25% of FLAIR alteration or appearance of new contrast enhancement.¹³

Magnetic Resonance Imaging was performed following a protocol given in Supplementary Materials and Methods (Data S1).

Quality control and sequencing coverage of samples are summarized in Table S1 and in Data S1 (Materials and Methods section).

2.2 | Survival analysis and gene set variation analysis

See Supplementary Materials and Methods (Data S1).

2.3 | Identification of genes and proteins linked with the risk of recurrence via random forest

To identify the genes and proteins linked to patient risk of recurrence, we performed survival random forest (RF) analysis using the randomForestSRC package in R.¹⁴ Given that the results can vary due to the random nature of the method, we repeated the analysis 10 times to identify genes and proteins linked to the risk of recurrence. Genes and proteins with an importance value above 0.003 were considered linked to recurrence. This threshold was determined by a visual check of the distribution of the variable importance. Volcano plots and heatmaps were generated as described in the previous section.

2.4 | Quality control of patients RNAseq data

For quality control see Table S2.

2.5 | Aggregation of relevant genes and proteins as signatures

For details, see Supplementary Materials and Methods (Data S1).

2.6 | Image preprocessing and feature computation

Image preprocessing and radiomics features computation methods are detailed in Supplementary Materials and Methods (Data S1).

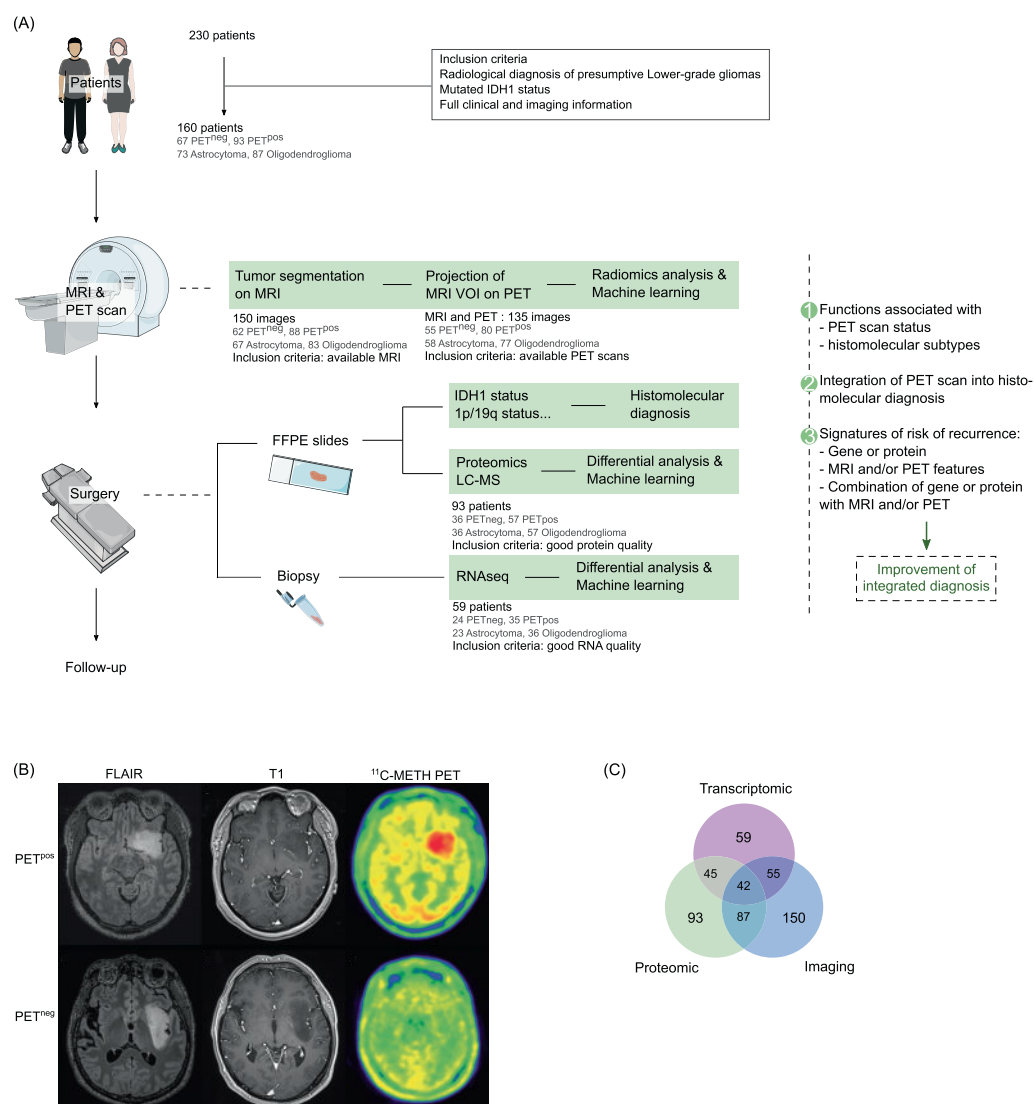


FIGURE 1 Characteristics of the patients included in the study. (A) Overview of the study describing the procedures (MRI, PET, and surgery) with the data and sample collection throughout patient follow-up (left panel), analyses performed (middle panel) and outcomes (right panel). VOI: Volume of interest; FFPE: Formalin-fixed paraffin-embedded; LC-MS: Liquid chromatography-mass spectrometry. (B) Representative ^{11}C -METH PET scan from PET^{POS} and PET^{NEG} patients (left to right: FLAIR [fluid attenuated inversion recovery], T1 post gadolinium and ^{11}C -METH PET). (C) Venn diagram displaying the number of patients included in each type of data collected during the study.

2.7 | Imaging analysis for recurrence analysis

The imaging analysis used the Scikit-learn Python library,¹⁵ for predicting PET or histological status. Prediction of recurrence-free survival used the scikit survival¹⁶ and pysurvival¹⁷ libraries.

Three types of recurrence risk signatures were identified from the Cox Proportional Hazard model possibly together with LASSO penalization: $RadiomicScore_{COX}$, $RadiomicScore_{LASSO,IR}$, and $RadiomicScore_{LASSO,COX}$. For details, see Supplementary Materials and Methods (Data S1).

2.8 | Cross-analysis of gene, proteomic, and imaging signatures

According to the cross-analysis between the biological and imaging data, 56 patients had both MRI and gene signature data, 89 had both MRI and protein signature data, and 44 patients had imaging, transcriptomic, and proteomic data (Figure 1C). For details, see Supplementary Materials and Methods (Data S1).

3 | RESULTS

3.1 | Overview of the study

For establishing our analytical pipeline, 160 patients diagnosed with IDH-mutant gliomas (Figure 1A) with an average age of 41 years were included. The demographic profile, clinical features, treatment modalities, and follow-up data are displayed in Table S1. Overall, the average follow-up duration was 4.2 years, and 46% of the patients experienced recurrence. Most patients (77%) underwent total resection of the tumor. Regarding the histomolecular classification, 87 tumors were oligodendroglioma, and the remaining 73 were astrocytoma. Based on ^{11}C -methionine PET (^{11}C -METH PET) uptake, the tumors were classified into PET^{pos} (Figure 1B, top panel) and PET^{neg} (Figure 1B, bottom panel) groups. Clinical, imaging, and genetic data were acquired throughout the patient follow-up, as shown in Figure 1A. The number of patients in each analysis is visualized on a Venn diagram (Figure 1C). These data were then processed and analyzed via machine learning.

3.2 | Distinct biological characteristics according to PET status and histology

We first examined the prognostic value of PET status and histological status in predicting the onset of recurrence. Recurrence-free survival analysis revealed a non-significant trend towards later recurrence in the PET^{neg} group than in the PET^{pos} group (Figure 2A) and in the oligodendroglioma group compared to the astrocytoma group (Figure 2B). We then performed transcriptomic and proteomic profiling of IDH-mutant glioma patients based on their PET status and histology. By performing a gene set variation analysis (GSVA), we identified transcriptomic (Figure 2C) and proteomic (Figure 2D) differences between the PET groups. PET^{pos} tumors were enriched in acute inflammatory response, regulation of the BMP signaling pathway, and response to hyperoxia, while PET^{neg} tumors were enriched in cell-cell adhesion, central nervous system development, and intrinsic apoptotic signaling (Figure 2C,D). In addition, we found 730 differentially expressed genes (DEGs) and 13 differentially expressed proteins (DEPs) that were good predictors of the groups (Brier score <0.25, Figure S1A–F and Table S3). The DEGs were associated with

several Gene Ontology (GO) terms, including immune-related functions (positive regulation of myeloid leukocyte-mediated immunity, leukocyte proliferation, the microglial pathogen phagocytosis pathway, and interleukins); cell-cell adhesion; the ERK1 and ERK2 cascades; positive regulation of superoxide anion generation; angiogenesis; synapse pruning; and calcium-mediated signaling (Figure S2G).

As for the PET status, transcriptomes and proteomes clustered by histomolecular diagnosis. The GSVA identified transcriptomic variations between the histological groups. Astrocytomas were characterized by the regulation of fatty acids and neurotransmitter secretion, while oligodendrogliomas were characterized by the regulation of glycolytic processes and glial cell proliferation (Figure 2E). Moreover, 112 DEGs were identified (Figure S2A–C and Table S3). These genes participate in molecular functions such as peroxidase activity and oxidoreductase (Figure S2D). Altogether, astrocytomas and oligodendrogliomas as well as PET^{neg} and PET^{pos} IDH-mutant gliomas express different transcriptomes and proteomes, suggesting distinct biological functions. The pathways associated with the differences in gene and protein expression could serve in therapeutic strategies. However, the difference in recurrence-free survival was not significant.

3.3 | Prediction of PET status and histomolecular diagnosis by imaging features

We then investigated whether imaging features could predict the PET status. Principal component analysis and UMAP did not reveal any clusters related to PET status (Figure S3A). Univariate analysis identified four MRI FLAIR texture features for predicting PET status: Busyness_{MR,NGTDM} measuring the magnitude of change from a voxel to its neighbors (corrected p -value = 0.015); GrayLevelNonUniformity_{MR,GLRLM} measuring the dissimilarity in gray-level intensity values (corrected p -value = 0.036), Strength_{MR,NGTDM} quantifying the definition of regions within the image (corrected p -value = 0.037), and SmallAreaLowGrayLevelEmphasis_{MR,GLSZM} measuring the proportion of small zones with low gray-level values in the image (corrected p -value = 0.047). The Pearson correlations of the genes are shown in Figure S3B. Together with their boxplots (Figure S3C), this suggests that MRIs of PET^{neg} gliomas exhibit a spatial distribution of intensity values that is smoother and more similar. The structures in the image are better defined, and there is a larger proportion of small zones in the image with lower gray-level intensities. In contrast, MRIs of PET^{pos} gliomas show less uniformity in intensity levels, a smaller zone definition, and a smaller proportion of small zones with low gray-level values. We also found significant correlations between several imaging features and DEGs (Table S4). However, these differences in texture and correlations with DEGs were not sufficient to predict PET status from MRI data by machine learning analysis (AUC = 0.63 ± 0.11 , Brier score = 0.26 ± 0.05). Additionally, no improvement in prediction performance was observed for imaging features compared to

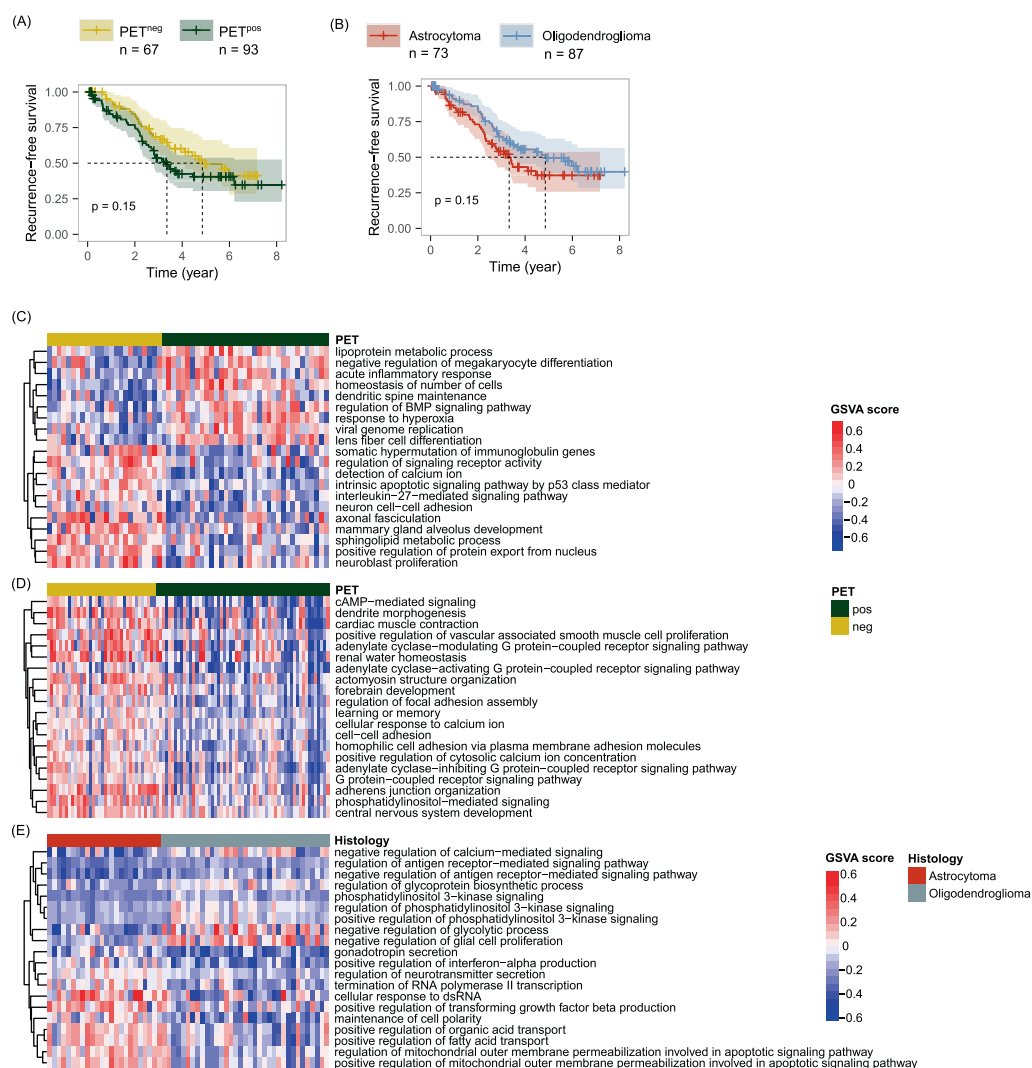


FIGURE 2 PET^{neg} and PET^{pos} gliomas as well as astrocytoma and oligodendroglioma have similar recurrence probabilities but distinct biological properties. (A, B) K-M curves showing no significant difference in recurrence probability between PET^{neg} and PET^{pos} or between astrocytoma and oligodendroglioma patients. Log-rank p -value = 0.15. (C,D) Heatmaps of GSVA results for the PET groups obtained via transcriptomics and proteomics. (E) Heatmap of GSVA results for the histology group and transcriptomics data. p -value < 0.05. The gene sets are associated with GO terms and biological pathways. Only the 20 most significant pathways are displayed.

DEGs (AUC = 0.97 ± 0.05 for genes alone, AUC = 0.95 ± 0.08 for genes and imaging features together).

Similarly, MRI-FLAIR and PET images could not predict the histomolecular status of patients (data not shown). The SUV ratio was determined by univariate analysis (corrected p -value = 0.03). However, the machine learning analysis was not successful (AUC = 0.57 ± 0.12 , Brier score = 0.28 ± 0.05 for PET

features; AUC = 0.57 ± 0.10 , Brier score = 0.27 ± 0.05 for PET +MRI radiomic features).

The images did not improve the predictive performance of the DEGs (AUC = 0.93 ± 0.06 for genes alone, AUC = 0.9 ± 0.10 for genes and imaging features together). Finally, 127 genes were significantly correlated with imaging features with absolute Spearman correlations above 0.5 (Table S4).

3.4 | Integration of PET metrics into histomolecular diagnosis

To determine the prediction efficiency of combining PET and histological subtypes, patients were divided into four groups based on their PET status and histomolecular diagnosis. The frequency of each group is shown in Figure 3A. Uptake of ^{11}C -METH was more frequent among oligodendrogliomas (63 patients out of 87) than among astrocytomas (30 out of 73). PET^{neg} oligodendroglioma patients had a better prognosis than PET^{pos} astrocytoma patients did (Figure 3B). This classification of patients resulted in a significant stratification model for IDH-mutant gliomas not achieved by positron emission tomography (PET) or histology alone. We then explored the transcriptomes and proteomes of PET^{neg} oligodendrogliomas and PET^{pos} astrocytoma. We found several pathways differentiating the four groups, including BMP signaling, cell differentiation, cell cycle, and apoptosis

(Figure 3C). In addition, 59 DEGs were found between PET^{pos} astrocytoma and PET^{neg} oligodendroglioma (Figure S4A–C) and were involved in pathways related to cancer, Ras signaling, MAPK signaling, regulation of the actin cytoskeleton, embryonic stem cell pluripotency, and type 1 fibroblast growth factor receptor binding (Figure S4C). These pathways revealed distinct clinically relevant biological functions of PET^{neg} oligodendroglioma and PET^{pos} astrocytoma.

3.5 | Gene and protein signatures of recurrence risk

To establish gene and protein signatures associated with IDH-mutant glioma recurrence, we used machine learning random forest (RF) analysis. We found 15 genes and 15 proteins linked to recurrence in all RF iterations (Figure S5A–D and Table S5). To determine the list

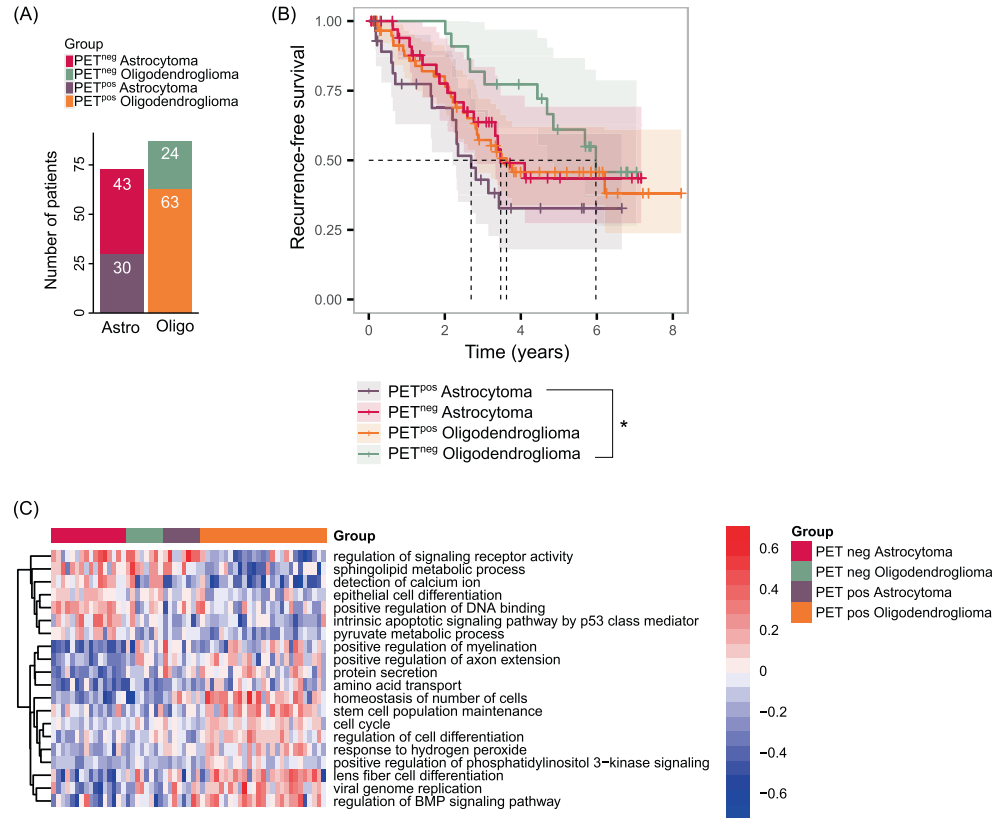


FIGURE 3 Integration of PET data into the classification of IDH-mutant glioma patients. (A) Distribution of patients according to PET status and histology. The chi-square test p -value = 0.000258. (B) K–M curves showing the difference in RFS based on PET and histological stratification. The log-rank p -value = 0.017. (C) Heatmap of the GSEA with transcriptomics results. p -value < 0.05. The gene sets are associated with GO terms and biological pathways. Only the 20 most significant pathways are displayed.

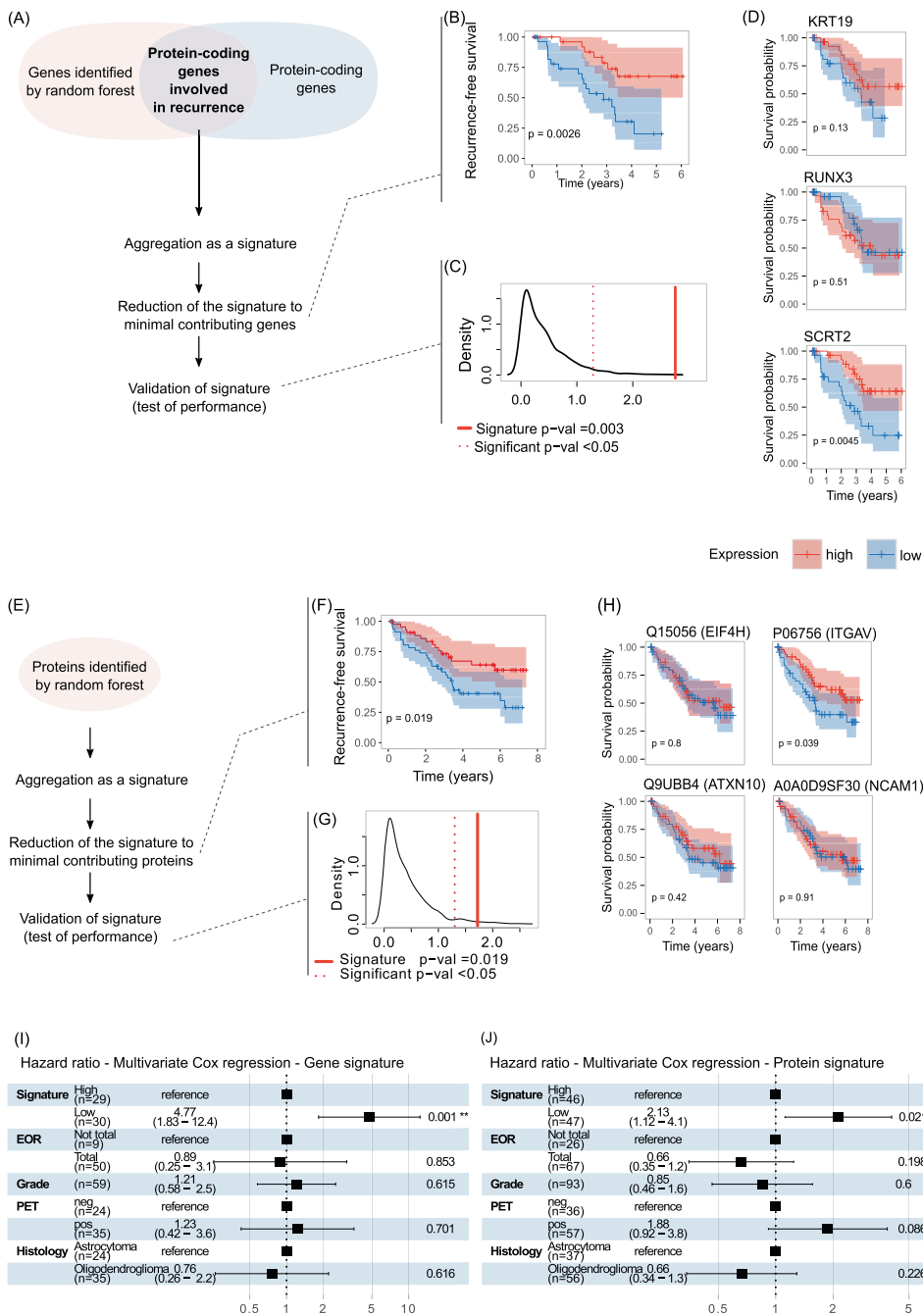


FIGURE 4 Legend on next page.

of clinically relevant genes, we investigated the predictive value of the 15 genes involved in recurrence. Individually, the genes and proteins were mostly not predictive (Figure S5E, F). We then investigated whether these genes formed a signature able to predict the risk of recurrence. The general strategy is described in Figure 4A. The genes KRT19, RUNX3, and SCRT2 formed the minimal gene signature for predicting IDH-mutant glioma recurrence (Figure 4B). Our signature based on KRT19, RUNX3, and SCRT2 expression was more predictive than the 1000 random signatures of equivalent size (Figure 4C). Finally, as depicted by their survival curves, only SCRT2 was classified as a favorable prognosis factor, while KRT19 and RUNX3 were associated with a tendency for favorable and unfavorable prognosis, respectively (Figure 4D). Similarly, a protein-based signature was established (Figure 4F). The minimal signature predicting recurrence of IDH-mutant glioma, composed of Ataxin-10 (ATXN10), eukaryotic translation initiation factor 4H (EIF4H), integrin alpha-V (ITGAV), and neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1) (Figures 4F and S5B), was more predictive than the random signatures (Figure 4G). Finally, as depicted by its survival curve, only ITGAV was associated with good prognosis (Figure 4H). After adjusting for clinical variables (extent of resection [EOR], grade, PET status, and histology), the signatures displayed significant hazard ratios (HRs) and remained independent prognostic factors for the prediction of recurrence risk (Figure 4I, J). In the sub-cohort of patients who underwent total tumor resection, both gene and protein signatures were still significant (log-rank p -value = 0.016 with 46 patients and log-rank p -value = 0.037 with 69 patients, respectively). A propensity score matching analysis was subsequently performed to evaluate the effects of potential risk factors (i.e., EOR, adjuvant therapy, age, grade, PET status, and histology). Patient characteristics before and after propensity score matching are displayed in Table S1. In the 34 patients matched for the gene signature, the signature remained significant (log-rank p -value = 0.0043; Figure S5G), unlike the protein signature in the 48 matched patients (log-rank p -value = 0.36; Figure S5H). In the sub-cohort of patients who underwent total tumor resection, propensity score matching analysis showed reduced significance levels for the gene signature (log-rank p -value = 0.061) and for the protein signature (log-rank p -value = 0.124), which may be due to the reduced patient numbers (32 patients for the gene signature, and 44 patients for the protein signature).

Gliomas with a high score in gene and protein signatures were enriched in categories related to response to cytokine stimulus, antigen presentation, and neuron cell-cell adhesion, while gliomas with a low score were enriched in categories related to apoptotic signaling, adaptive immune response, and response to hypoxia (Figure S6).

Altogether, the molecular signatures, especially the gene signature, efficiently stratify IDH-mutant glioma patients by their risk of recurrence.

3.6 | Imaging-based signatures of recurrence risk

To establish imaging-based signatures of recurrence risk, we considered either MRI FLAIR images alone, PET images alone, or combined. Imaging features were selected for their scores in the univariate Cox model and/or LASSO (see Materials and Methods). In all types of images, the time-dependent Brier score showed a good prediction score in a 2-year interval (Brier score <0.2; Figure S7A–C). Patient characteristics for all signatures, before and after propensity score matching, are given in Table S1. Table S6 shows the results when signatures are applied to the sub-cohort of patients that underwent total tumor resection.

For MR FLAIR images, we identified 12 signatures, for which high scores were associated with a higher risk of recurrence (Table S6). The sparsest feature, *RadiomicScore*_{LASSO,COX,0.9}, was composed of the shape features *Maximum2DDiameterRow*_{MRI,MORPH} and *VoxelVolume*_{MRI,MORPH} (Spearman correlation of 0.75; Figures S7D and S8). It remained significant in the sub-cohort of patients with total tumor resection, while it was not anymore in the TCIA validation cohort. We identified another signature, *RadiomicScore*_{LASSO,318}, for which high scores were associated with a lower risk of recurrence, with p -values of 0.073 in our dataset and 0.018 in the TCIA validation cohort (Figure S5A,B and Table S6). This signature was composed of the shape feature *Sphericity*_{MRI,MORPH} and the texture feature *JointAverage*_{MRI,GLCM} (Spearman correlation of -0.09; Figure S7D), where a high score characterizes round shapes and homogeneous textures (Figure 5C). This signature was not found significant in the sub-cohort with total tumor resection.

For PET images alone, we found five signatures (Table S6). The most relevant gene set was *RadiomicScore*_{LASSO,79} (p -value = 0.042; Figure 5D), which was still relevant in the sub-cohort of total tumor resection (p -value = 0.046). It is a marker of poor prognosis and is composed of the first-order features *Kurtosis*_{PET,FIRSTORDER}, *Entropy*_{PET,FIRSTORDER} and the shape feature *LeastAxisLength*_{PET,MORPH} (Figures 5E and S7E). A high score for this signature indicates tumors with larger smallest diameters and less homogeneity in intensity values.

By combining MR FLAIR and PET images, we further improved the radiomic signatures (Table S6). Their performances in log-rank tests are given in Table S7, and their respective Spearman correlations are shown in Figure S7F. All 24 signatures were obtained by

FIGURE 4 Prognostic significance of the genes and proteins linked to recurrence. (A, E) Strategy used to determine and validate the recurrence gene signature and protein signature, respectively. For a detailed description, see the Materials and Methods section. (B, F) The minimal signature for recurrence based on genes and proteins. A log-rank p -value <0.05 was used. (C, G) Significance of the signature compared to 1000 random signatures. (D) Recurrence-free survival of patients stratified according to SCRT2, KRT19, and RUNX3 expression based on the median cutoff. A log-rank p -value <0.05 was used. (H) Recurrence-free survival of patients stratified according to ATXN10, EIF4H, ITGAV, and NCAM1 protein levels based on the median cutoff. A log-rank p -value <0.05 was used. (I, J) Forest plots of the association between signatures and risk of recurrence according to multivariate Cox regression analysis.

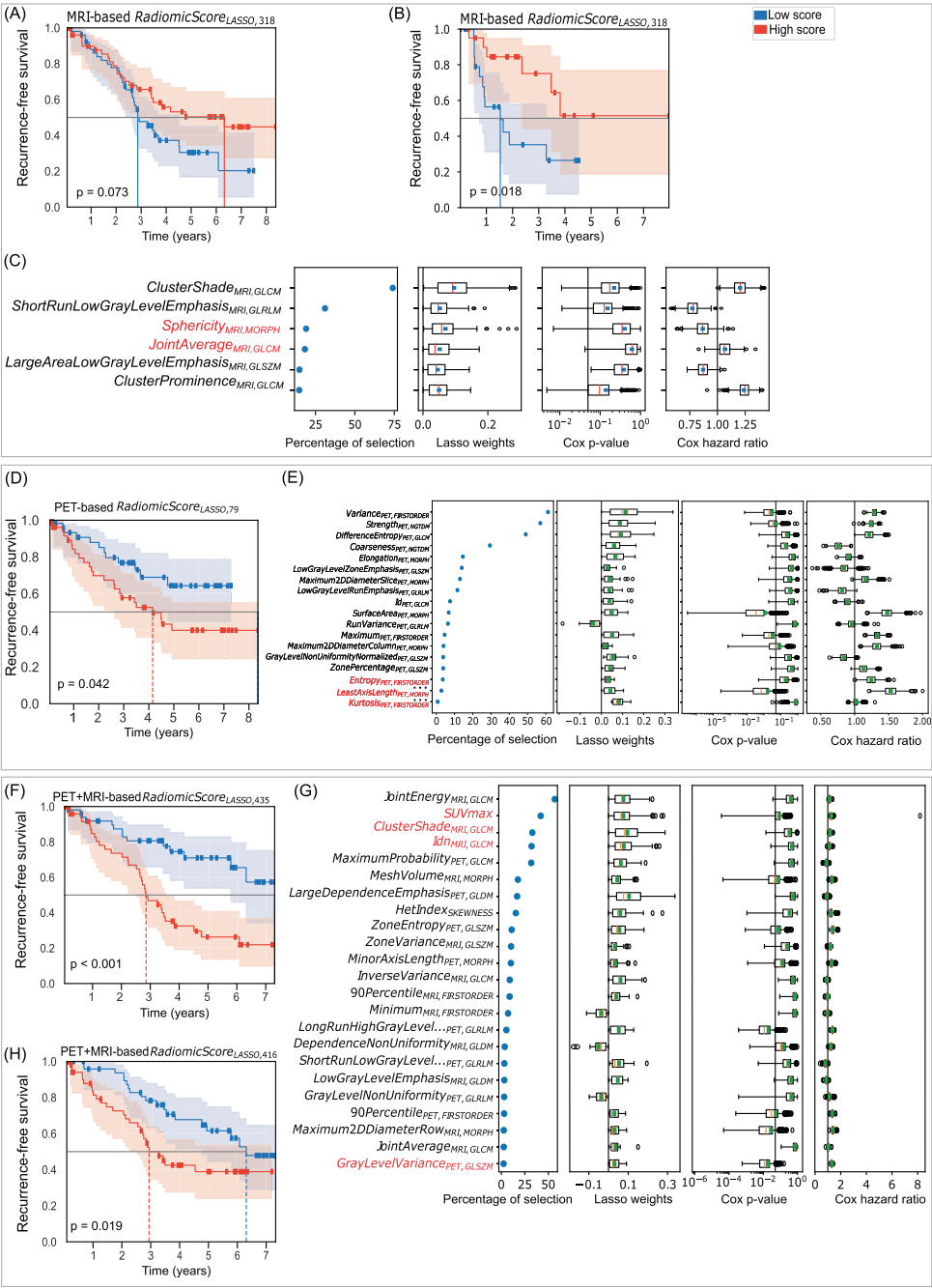


FIGURE 5 Legend on next page.

the LASSO-based procedure, and the single feature *SmallAreaLowGrayLevelEmphasis_{PET, GLSZM}* was identified from the log-rank test (p -value = 0.031). The most significant signature was *RadiomicScoreLASSO*, 435 (p -value <0.001; Figure 5F). Two MRI features and one PET texture feature were combined (Figure 5G): *ClusterShade_{MRI, GLCM}*, which measures the cooccurrence of intensity values; *Idn_{MRI, GLCM}*, which measures the local image homogeneity; and *GrayLevelVariance_{PET, GLSZM}*, which measures the variance in gray-level intensities among zones of the same intensity values. A high score in this signature was associated with local intensity homogeneity but large-scale heterogeneity of MRI with heterogeneous gray-level intensities of PET. This signature is a marker of poor prognosis. It remained significant in the sub-cohort of total tumor resection (p -value = 0.019). The *RadiomicScore_{LASSO, 416}* was also a marker of poor prognosis (p -value = 0.019; Figure 5H) while no longer significant in the sub-cohort of patients with total tumor resection. It is composed of *SUVmax* and *ClusterShade_{MRI, GLCM}*. A high score in this signature is proportional to the *SUVmax* and heterogeneity of the cooccurrence of intensity values on MRI. In addition to these signatures, we found that eight DEGs related to recurrence risk were correlated with MRI or PET features, such as the *SUVmean*, shape, first-order and GLCM/GLRLM/GLSZM texture features (Table S6).

In summary, radiomic signatures that remain significant when taking into account EOR with an STV = 0 include MRI-based *RadiomicScore_{LASSO, COX, 0.9}*, PET-based *RadiomicScoreLASSO*, 79, and several mixed MRI + PET-based signatures such as *RadiomicScoreLASSO*, 435.

3.7 | Multimodal signatures of recurrence risk integrating genetic, proteomic, and imaging characteristics

Having established independent signatures based on transcriptomic, proteomic, and imaging data, we next analyzed these data to obtain improved signatures (Figure 6A). First, we found no correlations between radiomic features and molecular signatures. The composition and performance score of the cross-signatures based on either the MRI or PET datasets are given in Table S7. For the cross-signatures highlighted below in the MR and PET datasets, patient characteristics after propensity score matching are displayed in Table S2.

We first tested the integration of imaging features into the gene signature (Table S7). Ten MRI features improved the gene signature (five at p -value <0.05 and another five at p -value <0.1; Table S6). The most significant cross-signature was based on *SmallAreaLowGrayLevelEmphasis_{MRI, GLSZM}*, which quantifies the correlation of small zones with low-intensity values (p -value = 0.021; Figure 6B). We tested the 10 cross-signatures in the validation TCIA cohort using independent scaling and the median value. Although none of the differences were significant at a p -value <0.05, the most significant cross-signature, with a p -value = 0.080 (p -value = 0.062 in our cohort), was based on the first-order feature *10Percentile_{MRI, FIRSTORDER}* (Table S7 and Figure 6B). In the dataset of patients with both transcriptomic and PET images, we found five relevant cross-signatures: four based on GLCM and GLRLM texture features; the most significant one involving *Id_{PET, GLCM}*, which measures local homogeneity in the image (p -value = 0.001; Figure 6C); and the most interpretable one involving *SUVmean* (or *SUVnorm*) (p -value = 0.007; Figure 6C). Taken together, these cross-signatures completed the gene signature with the spatial repartition of lower intensity values in both images and were associated with good prognosis.

Similarly, the protein signature was improved by integrating imaging features. We identified five significant protein + MRI cross-signatures and three significant protein + PET cross-signatures (p -value <0.05; Table S7). All these factors were associated with a good prognosis. Among the integrated imaging features, we found an MRI feature, *RootMeanSquared_{MRI, FIRSTORDER}*, which quantified the magnitude of the intensity (Figure 6D), and a first-order PET feature, *Kurtosis_{PET, FIRSTORDER}*, which quantified the concentration intensity distribution around the mean (Figure 6E). Other cross-signatures included one MRI and two PET texture features (e.g., *SmallAreaEmphasis_{MRI, GLSZM}*) and three first-order MRI features.

Overall, integrating an imaging feature—MRI or PET—into our molecular signatures significantly improved the performance of these signatures in stratifying patients with IDH-mutant glioma according to the risk of recurrence. When available, a validation cohort could highlight some cross-signatures with a p -value <0.10. In the sub-cohort of patients that underwent total tumor resection, the cited transcriptomics-based cross-signatures remained significant at most at the level of 6% (Table S7). For proteomics-based cross-signatures, three MRI-based cross-signatures (among which *RootMeanSquared_{MRI, FIRSTORDER}*) remained significant, while it was no longer the case for PET-based cross-signatures.

FIGURE 5 Radiomic signatures of recurrence risk. (A–C) MRI-based radiomic signature. (A) Recurrence-free survival of patients stratified by the MRI-based radiomic signature. (B) Recurrence-free survival of patients in the validation dataset stratified by the MRI-based radiomic signature after propensity score matching. (C) Description of features selected by LASSO, with their selection rate in LASSO, LASSO nonzero weight distribution, and Cox statistics. (D, E) PET-based radiomic signature with (D) recurrence-free survival of patients stratified by the signature and (E) the features selected by LASSO. (F–H) MRI + PET-based radiomic signatures with (F, H) recurrence-free survival of patients stratified by the signatures 435 and 416, respectively, and (G) the features selected by LASSO. The 435 signature was composed of *ClusterShade_{MRI, GLCM}*, *Idn_{MRI, GLCM}*, and *GrayLevelVariance_{PET, GLSZM}*; the 416 signature was composed of *SUVmax* and *ClusterShade_{MRI, GLCM}*. All Kaplan–Meier curves are shown after propensity score matching. Log-rank p -values <0.05 except for (A), for which the p -value <0.10. In red, features selected in the signatures.

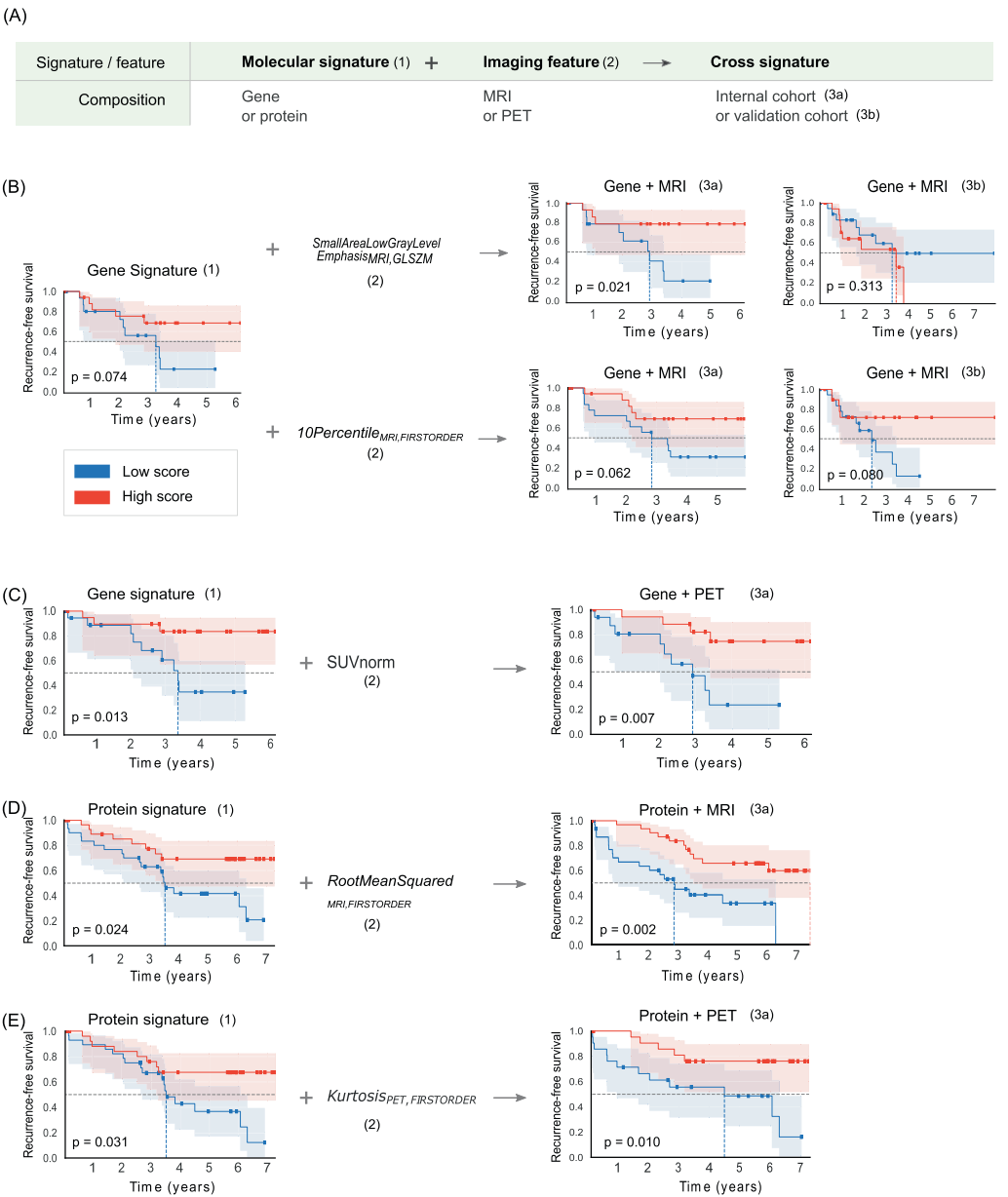


FIGURE 6 Cross signatures of recurrence risk. (A) General workflow showing the molecular signature associated with imaging features to obtain cross-signatures that were tested in our cohort or the validation cohort. (B–E) Kaplan–Meier curves of the indicated signatures after propensity score matching. For each cross-signature, we first calculated the molecular signature (1) on the basis of the MRI or PET datasets and the imaging features of interest (2); finally, we calculated the cross-signature by combining the molecular signature and the imaging features in our dataset (3a) and the validation cohort (3b) when available. (B) Gene signature in the MRI dataset, the two identified MRI features individually, and the resulting cross-signatures. (C) Gene signature in the PET dataset associated with SUVnorm to construct the cross-signature. (D) The protein signature in the MRI dataset associated with the MRI feature of interest was used to construct the cross-signature. (E) The protein signature in the PET dataset associated with the PET feature of interest was used to construct the cross-signature.

4 | DISCUSSION

In this study, we provide a methodological roadmap to gain insights into IDH-mutant glioma progression and the risk of recurrence. We used an unbiased approach combining imaging and molecular data as well as artificial intelligence.

Transcriptomic and proteomic analyses revealed molecular differences between the PET^{neg} and PET^{pos} groups as well as between the astrocytoma and oligodendroglioma subtypes, with PET status providing the most differences. This suggests that each of these four groups could be considered distinct biological entities and highlights potential differential targeting strategies adapted to the molecular profiles of each one of them. In addition, there was a tendency for better recurrence-free survival in PET^{neg} patients than in PET^{pos} patients and in oligodendroglioma patients than in astrocytoma patients. This finding is in line with previous studies establishing PET status as a prognostic factor for progression-free survival^{11,18,19} and identifying oligodendrogliomas as better recurrence-free and overall survival.^{20–23} The difference with our current study may reside in the variability of inclusion criteria as well as the cohort size. Additionally, by combining histological subtypes and PET data, we improved the discrimination of patient risk of recurrence. As a result, patients with PET^{neg} oligodendroglioma had better recurrence-free survival than patients with PET^{pos} astrocytoma. Although not yet part of standard practice, PET is commonly used to assess tumor texture at diagnosis and during therapy.²⁴ Here, we reinforce the contention that PET status combined with histomolecular diagnosis is useful for predicting the evolution of IDH-mutant gliomas.

We also established a three-gene signature and a four-protein signature, with higher scores associated with longer recurrence-free survival. KRT19, RUNX3, and SCRT2 constituted the transcriptional signature, and ATXN10, EIF4H, ITGAV, and NCAM1 constituted the protein-based signature. These genes and proteins have been described to be involved in central nervous system development, tumor progression, and tumor suppression (Table S8 for more details). Some of these genes are involved in neuronal development, such as SCRT2,²⁵ ATXN10, and NCAM1,²⁶ but their role in cancer is unclear. Others are known to be involved in cancer. While KRT19 has prognostic value in glioblastoma,²⁷ our study reveals for the first time its association with the recurrence of IDH-mutant gliomas. Other markers, such as RUNX3,²⁸ EIF4H,²⁹ and integrin α V,³⁰ have already been described in cancers, including glioblastoma, but have prognostic value opposite to that of the one found here, highlighting the importance of stratifying cancers into subtypes. Overall, the genes and proteins identified here may not only be significant biomarkers for IDH-mutant gliomas but also play a functional role in tumor progression. These factors may constitute promising novel therapeutic targets that need further exploration.

We identified several radiomic signatures for determining the risk of recurrence. One of them was a morphological score obtained from the association of the maximum 2D diameter in the images and the VOI of the tumor. Pre-operative tumor volume is a known but debated prognostic factor in low-grade glioma, and the results of this

analysis seem to confirm its relevance.^{6,31} *RadiomicScore*_{LASSO,318} showed a log-rank test *p*-value <0.10 after propensity score matching in both datasets and <0.05 in the validation dataset. This signature, composed of shape and texture features, quantifies the roundness and homogeneity of the texture of the VOI and is associated with a better prognosis. Five PET-based signatures of recurrence risk were also identified; these signatures included first-order features combined with either morphological or GLRLM texture features. Finally, combining MRI and PET features, most often texture features, yielded numerous signatures of the risk of recurrence. Their composition was redundant, suggesting that some combinations of PET and MRI features were relevant across several cross-validation folds.

We further improved our molecular signatures by integrating radiomic features. Both the gene and protein signatures were improved by first-order and texture MRI features that quantify the magnitude and spatial repartition of lower intensity values. The same biological signatures were also improved by the other first-order and texture PET features. Using transcriptomic and MRI data from the TCGA/TCIA cohort of IDH-mutant gliomas, we confirmed the relevance of the cross-signature at the 0.10 level via *10Percentile*_{MRI,FIRSTORDER}.

Few radiomic studies have focused on IDH-mutant gliomas for recurrence risk prediction. T2-weighted MR images of 85 LGG patients were used to construct a radiomic score that relied on texture features.³² While the signature, similar to our *RadiomicScore*_{COX}, was predictive of IDH status, it was derived from a cohort of both wild-type and IDH-mutant gliomas, unlike in our study. The incremental value of MRI features for clinical and IDH status features was assessed for LGG.^{33,34} However, IDH-mutant glioma patients were not specifically investigated in these studies, and no minimal radiomic signature was established. Another study reported an IDH-mutant-specific T2-weighted MRI signature for lower-grade gliomas and a signature for overall survival-based recurrence risk in IDH-mutant glioma patients.³⁵ The signature was based on univariate Cox analysis without clinical covariates and was computed on a single training set of 118 patients. Risk stratification was based on a threshold optimized on the training set. Kaplan–Meier analysis and the log-rank test were performed on the whole dataset of 109 patients (patients with very short OS were excluded) without propensity score matching. The signature is based on 12 radiomic features, mostly shape- and wavelet-filtered first-order features. We computed the signature of these genes on our FLAIR images and assessed its relevance as a risk factor for overall survival. In our analysis, we corrected the images for N4 bias and used a voxel size of 0.5³ mm³. Since the cutoff value was not given explicitly, we split the cohort from the median value in our dataset. The signature was not significant in our dataset (*p*-value = 0.679 for 120 patients). With our approach, we constructed a minimal radiomic signature for PFS based on MRI-FLAIR and MET-PET images obtained from a multivariate Cox model with LASSO-based variable selection. Cross-validation was used to minimize the dependency on the datasets. We believe that this approach will improve the generalization power of the signatures

we established. We showed that MRI and PET images could provide valuable information for stratifying patients according to their recurrence risk. Radiomic approaches are based on many steps that involve variability and uncertainties, such as image acquisition, preprocessing, feature computation, and analysis pipelines. There is an ongoing effort to untangle these aspects to improve the robustness and reproducibility of the results.^{36,37}

The extent of resection (EOR) is a prognostic factor for IDH-mutant gliomas⁶ and was included in the multivariate analyses and propensity score matching, thus excluding a potential confounding effect in our interpretation of the different signatures discussed here. Of note, a majority of patients (77%) in our cohort underwent total tumoral resection, and 23% had subtotal, partial resection, or a biopsy. Since most of the patients had total tumor resection with a RTV = 0, this diminishes the value of investigating the effect of RTV on our molecular and imaging signatures in the context of our work (see Figure S9). When, nevertheless, a stringent criterion of RTV = 0 was applied to our signature, the cited signatures and cross-signatures showed good significance levels; although the PET-related protein cross-signatures were no longer significant, the latter most likely because of a decrease in the number of patients.

Homo- and hemizygous deletions of *CDKN2A* are other proposed prognostic factors and double the median progression-free survival of patients with IDH-mutated astrocytoma.^{2,38} Although, in our patient cohort, we did not collect information on copy number variation of *CDKN2A/B*, our signatures identify a group of patients with a median recurrence-free survival beyond two times that of the high-risk group. Our study is also of particular interest in the context of the recent therapeutic development with the drug Vorasidenib that targets specifically IDH.⁴ In this context of heterogeneous tumors, it is important to determine which patients would benefit from this treatment. Our study constitutes a first step in this direction.

In summary, we provide a pipeline for a multiparametric analysis of IDH-mutant gliomas, which includes genomic, proteomic, and radiomic data, which may be of translational significance. We first reinforced the importance of including PET status in existing histomolecular diagnosis methods to improve patient stratification. We established independent gene, protein, and radiomic signatures of the risk of recurrence. The prognostic significance of radiomic features associated with molecular data was further improved compared to that of genomic, proteomic, or radiomic signatures alone. This study also identified potential therapeutic targets for IDH-mutant gliomas that should be functionally validated in further studies.

4.1 | Limitations of the study

The multiparametric pipeline described in the article was not fully validated in an independent cohort with the entire set of analytical tools (transcriptomic, proteomics, Radiomics and PET for each patient). Validation cohorts were only available for MRI and transcriptomic data. Other cohorts, including PET images and proteomics, were missing. The small sample size and lack of harmonization of the MRI datasets between our

cohort and the TCIA cohort further limited our study. In the validation dataset, some clinical information was missing, such as the type of treatment received or the extent of resection. Facing these challenges, we considered a significance level of 0.10 for signatures in both datasets. In addition, the molecular and imaging signatures were identified in the same dataset, so the analysis of cross-signatures has only descriptive power.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Tiffanie Choleur: Investigation; formal analysis; writing – original draft; writing – review and editing; visualization. **Christèle Etchegaray:** Investigation; formal analysis; writing – original draft; writing – review and editing; data curation. **Laura Villain:** Formal analysis; investigation; writing – original draft. **Antoine Lesur:** Resources; data curation. **Thomas Ferté:** Data curation. **Marco Rossi:** Writing – review and editing; resources. **Laetitia Andrique:** Investigation. **Costanza Simoncini:** Investigation. **Anne-Sophie Giacobbi:** Investigation. **Matteo Gambaretti:** Resources. **Egesta Lopci:** Investigation. **Bethania Fernandes:** Investigation. **Gunnar Dittmar:** Data curation; resources. **Rolf Bjerkvig:** Conceptualization; funding acquisition; writing – review and editing. **Boris Hejblum:** Supervision. **Rodolphe Thiébaud:** Supervision; conceptualization; writing – review and editing; funding acquisition. **Olivier Saut:** Conceptualization; writing – review and editing; supervision; funding acquisition. **Lorenzo Bello:** Conceptualization; funding acquisition; writing – review and editing; supervision. **Andreas Bikfalvi:** Conceptualization; funding acquisition; writing – original draft; writing – review and editing; project administration; supervision.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

RNA-seq data have been deposited in the GEO database (GSE226321). Proteomic data have been deposited at ProteomeXchange (PXD038040 on ProteomeXchange Consortium via PRIDE). The de-identified image data are available on the Zenodo Research Depository for EU projects (<https://zenodo.org>, <https://zenodo.org/records/13833983>), and all source code is publicly available on Github (https://gitlab.inria.fr/cetchega/transcan_idh-mutant_lgg_radiomics).

Further information is available from the corresponding author upon request.

ETHICS STATEMENT

All patients provided written informed consent for the surgical procedure, which was approved by the Ethical Committee IRB-1299 Humanitas Research Hospital.

ORCID

Andreas Bikfalvi  <https://orcid.org/0000-0003-4138-5229>

REFERENCES

1. Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, Wrensch MR. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nat Rev Neurol*. 2019; 15:405–417. doi:[10.1038/s41582-019-0220-2](https://doi.org/10.1038/s41582-019-0220-2)

2. Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro Oncol*. 2021;23:1231-1251.
3. Joona R, Waqas M, Khan I. Diffuse low-grade glioma: changing concepts in diagnosis and management—a review. *Asian J Neurosurg*. 2019;14:356-363.
4. Mellinghoff IK, van den Bent MJ, Blumenthal DT, et al. Vorasidenib in IDH1- or IDH2-mutant low-grade glioma. *N Engl J Med*. 2023;389:589-601.
5. Weller M, van den Bent M, Preusser M, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2021;18:170-186. doi:10.1038/s41571-020-00447-z
6. Hervey-Jumper SL, Zhang Y, Phillips JJ, et al. Interactive effects of molecular, therapeutic, and patient factors on outcome of diffuse low-grade glioma. *J Clin Oncol off J Am Soc Clin Oncol*. 2023;41:2029-2042.
7. Nicholson JG, Fine HA. Diffuse glioma heterogeneity and its therapeutic implications. *Cancer Discov*. 2021;11:575-590.
8. Singh G, Manjila S, Sakla N, et al. Radiomics and radiogenomics in gliomas: a contemporary update. *Br J Cancer*. 2021;125:641-657. doi:10.1038/s41416-021-01387-w
9. García-Figueiras R, Baleato-González S, Padhani AR, et al. How clinical imaging can assess cancer biology. *Insights Imaging*. 2019;10(1):28. doi:10.1186/s13244-019-0703-0
10. Sotoudeh H, Shafaat O, Bernstock JD, et al. Artificial intelligence in the management of glioma: era of personalized medicine. *Front Oncol*. 2019;9:1-11.
11. Lopci E, Riva M, Olivari L, et al. Prognostic value of molecular and imaging biomarkers in patients with supratentorial glioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2017;44:1155-1164.
12. Law I, Albert NL, Arbizu J, et al. Joint EANO/EANO/RANO practice guidelines/SNMMI procedure standards for imaging of gliomas using PET with radiolabelled amino acids and [(18)F]FDG: version 1.0. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2019;46:540-557.
13. Wen PY, van den Bent M, Youssef G, et al. RANO 2.0: update to the response assessment in neuro-oncology criteria for high- and low-grade gliomas in adults. *J Clin Oncol*. 2023;41(33):5187-5199. doi:10.1200/JCO.23.01059
14. Ishwaran BH, Kogalur UB, Blackstone EH, Lauer MS. Random survival forests. *Ann Appl Stat*. 2008;2:841-860.
15. Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, et al. Scikit-learn: machine learning in python. *J Mach Learn Res*. 2011;12:2825-2830.
16. Pölsterl S. Scikit-survival: a library for time-to-event analysis built on top of scikit-learn. *J Mach Learn Res*. 2020;21:1-6.
17. Fotso S, Others. *PySurvival: Open source package for survival analysis modeling*. Python package 1.0, 2019. <https://pysurvival.io/>
18. Nariai T, Tanaka Y, Wakimoto H, et al. Usefulness of L-[methyl-11C] methionine-positron emission tomography as a biological monitoring tool in the treatment of glioma. *J Neurosurg*. 2005;103:498-507.
19. Ninatti G, Sollini M, Bono B, et al. Preoperative [11C]methionine PET to personalize treatment decisions in patients with lower-grade gliomas. *Neuro Oncol*. 2022;24:1546-1556.
20. Takeuchi H, Hosoda T, Kitai R, et al. Clinicopathological features in the recurrence of oligodendroglioma and diffuse astrocytoma. *Brain Tumor Pathol*. 2012;29:140-147.
21. Okamoto Y, di Patre P-L, Burkhard C, et al. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol [Internet]*. 2004;108:49-56. doi:10.1007/s00401-004-0861-z
22. Zeng L, Mei Q, Li H, Ke C, Yu J, Chen J. A survival analysis of surgically treated incidental low-grade glioma patients. *Sci Rep*. 2021;11:1-9. doi:10.1038/s41598-021-88023-y
23. Network TCGAR. Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. *N Engl J Med*. 2015;372:2481-2498.
24. Albert NL, Weller M, Suchorska B, et al. Response Assessment in Neuro-Oncology working group and European Association for Neuro-Oncology recommendations for the clinical use of PET imaging in gliomas. *Neuro Oncol*. 2016;18:1199-1208.
25. Nakakura EK, Watkins DN, Schuebel KE, et al. Mammalian scratch: a neural-specific snail family transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:4010-4015.
26. Zecchini S, Bombardelli L, Decio A, et al. The adhesion molecule NCAM promotes ovarian cancer progression via FGFR signalling. *EMBO mol Med*. 2011;3:480-494.
27. Hou Z, Yang J, Wang H, Liu D, Zhang H. A potential prognostic gene signature for predicting survival for glioblastoma patients. *Biomed Res Int*. 2019;2019:1-10.
28. Steponaitis G, Kazlauskas A, Vaitiekienė P, Deltuva VP, Mikicunias M, Skiriūtė D. Oncosuppressive role of RUNX3 in human Astrocytomas. *J Oncol*. 2019;5:1232434.
29. Krassnig S, Wohlrab C, Golob-schwarzl N, et al. A profound basic characterization of eifs in gliomas: identifying eif3i and 4h as potential novel target candidates in glioma therapy. *Cancers Basel*. 2021;13:1482-1487.
30. Ellert-Mikaszewska A, Poleszak K, Pasierbinska M, Kaminska B. Integrin signaling in glioma pathogenesis: from biology to therapy. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):888. doi:10.3390/ijms21030888
31. Rossi M, Gay L, Ambrogio F, et al. Association of supratotal resection with progression-free survival, malignant transformation, and overall survival in lower-grade gliomas. *Neuro Oncol*. 2021;23:812-826.
32. Qian Z, Li Y, Sun Z, et al. Radiogenomics of lower-grade gliomas: a radiomic signature as a biological surrogate for survival prediction. *Aging (Albany NY)*. 2018;10:2884-2899.
33. Choi YS, Ahn SS, Chang JH, et al. Machine learning and radiomic phenotyping of lower grade gliomas: improving survival prediction. *Eur Radiol*. 2020;30:3834-3842.
34. Park CJ, Han K, Kim H, et al. Radiomics risk score may be a potential imaging biomarker for predicting survival in isocitrate dehydrogenase wild-type lower-grade gliomas. *Eur Radiol*. 2020;30:6464-6474.
35. Liu X, Li Y, Li S, et al. IDH mutation-specific radiomic signature in lower-grade gliomas. *Aging (Albany NY)*. 2019;11:673-696.
36. Alberto T, Wee L, Dekker A, Gillies R. Repeatability and reproducibility of radiomic features: a systematic review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2018;102:1143-1158.
37. Orlhac F, Nioche C, Klyuzhin I, Rahmim A, Buvat I. Radiomics in PET imaging: a practical guide for newcomers. *PET Clin*. 2021;16:597-612.
38. Kocakavuk E, Johnson KC, Sabedot TS, Reinhardt HC, Noushmehr H, Verhaak RGW. Hemizygous CDKN2A deletion confers worse survival outcomes in IDHmut-noncodel gliomas. *Neuro Oncol*. 2023;25(9):noad095. doi:10.1093/neuonc/noad095

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Chouleur T, Etchegaray C, Villain L, et al. A strategy for multimodal integration of transcriptomics, proteomics, and radiomics data for the prediction of recurrence in patients with IDH-mutant gliomas. *Int J Cancer*. 2025;1-15. doi:10.1002/ijc.35441

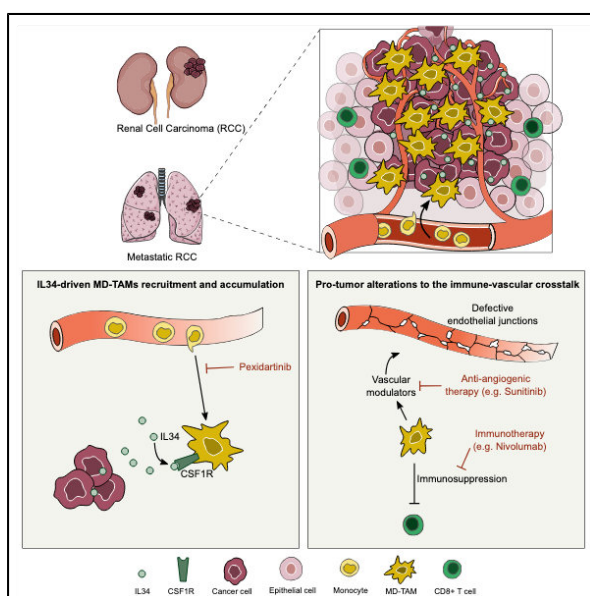
Article 5 (Article original)

iScience

Article

Targeting the IL34-CSF1R axis improves metastatic renal cell carcinoma therapy outcome via immune-vascular crosstalk regulation

Graphical abstract



Authors

Andrea Emanuelli, Wilfried Souleyreau, Tiffanie Chouleur, ..., Diether Lambrechts, Thomas Mathivet, Andreas Bikfalvi

Correspondence

andreas.bikfalvi@u-bordeaux.fr

In brief

Molecular biology; Cancer

Highlights

- IL34 expression positively correlates with progression of RCC in patients
- IL34-CSF1R axis drives the migration of MD-TAMs in the TME
- IL34-controlled MD-TAMs drive RCC via the tumor immune-vascular crosstalk regulation
- CSF1R inhibitor pexidartinib blocks the protumor activities of the IL34-CSF1R axis



Emanuelli et al., 2025, iScience 8, 112752
 June 20, 2025 2025 The Author(s). Published by Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2025.112752>

CellPress

Article

Targeting the IL34-CSF1R axis improves metastatic renal cell carcinoma therapy outcome via immune-vascular crosstalk regulation

Andrea Emanuelli,¹ Wilfried Souleyreau,¹ Tiffanie Chouleur,¹ Bram Boeckx,^{2,3} Yasmine Pobiedonoscew,⁴ Lindsay Cooley,¹ Marie-Alix Derieppe,⁵ Julie Martineau,⁵ Damien Ambrosetti,⁶ Jean-Christophe Bernhard,⁷ Catherine M. Sawai,⁴ Diether Lambrechts,^{2,3} Thomas Mathivet,¹ and Andreas Bikfalvi^{1,8,*}

¹University of Bordeaux, INSERM, U1312 BRIC, Tumor and Vascular Biology Laboratory, Pessac, France

²Laboratory of Translational Genetics, Department of Human Genetics, VIB-KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium

³VIB Center for Cancer Biology, 3000 Leuven, Belgium

⁴University of Bordeaux, INSERM, U1312 BRIC, Modeling Transformation and Resistance in Leukemia Laboratory, Bordeaux, France

⁵Animalerie Mutualisée, Service Commun des Animaleries, Université de Bordeaux, 33000 Bordeaux, France

⁶Department of Pathology, University Côte d'Azur, CHU Nice, Nice, France

⁷Urology Department, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France

⁸Lead contact

*Correspondence: andreas.bikfalvi@u-bordeaux.fr

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2025.112752>

SUMMARY

Current therapies ultimately fail to eradicate metastatic renal cell carcinoma (RCC). Validated biomarkers and a better understanding of the mechanisms causing therapy resistance are still needed. Here we demonstrate that interleukin-34 (IL34) is associated with poor prognosis, metastasis, and therapy resistance in RCC. In mice, single-nucleus RNA sequencing and phenotyping reveal that the IL34-enriched tumor microenvironment displays immunosuppression and nonfunctional vasculature, two key features of therapy resistance. Mechanistically, IL34 increases migration of monocyte-derived tumor-associated macrophages (MD-TAMs) in primary tumors and lung metastases through colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R). Blockade of CSF1R by the Food and Drug Administration-approved drug pexidartinib contrasts MD-TAMs accumulation observed in the IL34-enriched microenvironment and improves response to sunitinib or anti-PD1 treatment to reduce metastatic growth. Altogether, our data highlight the role of the IL34-CSF1R axis in regulating the tumor immune-vascular crosstalk in RCC and indicate pexidartinib as a therapeutic alternative in combination with current therapies.

INTRODUCTION

Kidney cancer accounts for approximately 156,000 deaths worldwide annually, and its mortality rate is projected to double by 2050.¹ Renal cell carcinoma (RCC) represents approximately 85%–90% of kidney cancers, and surgery is the first-line treatment for primary RCC. However, metastatic RCC is diagnosed in one-third of patients and has a low five-year survival rate—close to 10%.^{2,3} Current RCC therapies target two main features of the tumor microenvironment (TME): the immune system (e.g., immune checkpoint inhibitors) and the tumor vasculature (e.g., blockers of the vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor (VEGFR) axis).^{4,5} However, such therapies are rarely curative, and drug resistance is almost inevitable. Thus, more effective therapeutic approaches to eradicate RCC are urgently needed. The scarcity of knowledge about the pathological mechanisms driving progression and the lack of validated targetable biomarkers are the two main reasons for treatment failure.⁶

In our previous study, we investigated the transcriptomic changes in renal cancer cells during tumor progression in a mu-

rine RCC model and identified interleukin-34 (IL34) as a potential driver.⁷ IL34 regulates the development of mononuclear phagocytic cells in the bone marrow. In tumors, IL34 can perform pleiotropic functions depending on the cellular and molecular context.^{8,9} Four different receptors for this cytokine have been described (CSF1R, TREM2, Syndecan-1, and PTP- ζ), and they are likely to activate distinct signaling pathways.^{10,11} For example, in lung and colon cancers, IL34 sustains tumor growth by promoting cancer cell proliferation and survival through CSF1R activation,^{12,13} whereas in glioblastoma cells, IL34 inhibits tumor proliferation through PTP- ζ activation.¹⁴ The expression of *IL34* is heterogeneous among cancer types, and high IL34 levels can represent either a poor prognostic factor (i.e., liver and lung cancers)^{15,16} or a favorable prognostic factor (i.e., cervical or head and neck cancers; see the “prognostic summary” of IL34 at the Human Protein Atlas: www.proteinatlas.org). The function of IL34 in RCC has never been described.

In this work, we undertook different approaches to investigate the role of IL34 in the biology and therapeutic response of





metastatic RCC. In both the KIRC-TCGA and the UroCCR cohorts, high *IL34* expression correlated with an increased tumor stage, an increased incidence of distant metastases, and a reduced survival in patients. In a syngeneic mouse model, the IL34-enriched TME attracted more monocyte-derived tumor-associated macrophages (MD-TAMs), which negatively altered tumor immunity and vasculature, the two protumor features targeted by current RCC therapy. Mechanistically, the IL34-CSF1R axis promoted their migration rather than enhancing their proliferation. Furthermore, single-nucleus RNA sequencing (snRNA-seq) analysis of MD-TAM cluster revealed that an IL34-enriched TME changed the expression of genes with potential roles in driving immunosuppression and vascular alterations. Finally, in a mouse model of metastatic RCC, blockade of the IL34-CSF1R axis with the Food and Drug Administration (FDA)-approved drug pexidartinib prevented MD-TAMs accumulation in the TME and improved the response to sunitinib or anti-PD1 therapy.

RESULTS

IL34 expression is associated with cancer progression in a mouse model of RCC and in patients

In our previous work,⁷ we identified *IL34* as a potential biomarker of RCC progression, as its expression was gradually upregulated in serially implanted Renca cells in a cell passage-dependent manner (Figure S1A) and was concomitant with an increase in tumor aggressiveness. The expression of the *Csf1* gene, which encodes the other ligand of CSF1R, remained unchanged. Secreted IL34 was increased in the supernatant of Renca cells isolated from the latest passage (P6) compared with that of the parental (P0) cells (Figure S1B) and in the plasma of the serially passaged tumor-bearing mice (Figure S1C). In the KIRC-TCGA cohort, increased *IL34* expression was associated with reduced survival in RCC patients (Figure 1A), increased tumor grade, and increased incidence of distant metastases (Figures 1B and 1C). These clinical findings were further corroborated by histological analysis via tissue microarrays of primary tumors from RCC patients at Bordeaux University Hospital (UroCCR cohort, Table 1). Consistently, high IL34 protein levels were significantly associated with a higher Fuhrman grade, incidence of distant metastases, and reduced patient survival (Figures 1D–1F).

Tumor immunity is the stromal component most impacted by an IL34-enriched TME

To gain insight into the protumor mechanisms occurring in an IL34-enriched TME, we generated GFP-Renca cells overexpressing IL34 (IL34-OE) or a control vector (Ctrl, Figure S1D). *In vitro* cell proliferation assays via crystal violet staining revealed that secreted IL34 did not affect the proliferation of Renca cells, ruling out an autocrine mechanism for tumor progression (Figure S1E). Similar results were also obtained using the human RCC cell line 786-O (Figures S1F and S1G). Therefore, we hypothesized that stromal components of the TME might drive IL34-dependent cancer progression. To this end, we performed snRNA-seq analysis of tumors or lung metastases generated via a syngeneic mouse model of RCC to explore the biological impact of an IL34-enriched TME. Either GFP-Renca Ctrl or

IL34-OE cells were orthotopically implanted for primary tumor generation (i.e., PT_Ctrl and PT_IL34-OE) or injected into the tail vein to study the TME of lung metastasis (i.e., IVLM_Ctrl and IVLM_IL34-OE). Of the 10 orthotopically implanted mice 2 underwent primary tumor resection, and after 2 additional weeks, tumor-derived lung metastases were collected (i.e., LateLM_Ctrl and LateLM_IL34-OE). The lungs of mice that did not survive tumor resection were also collected to gain insights into the early steps of the lung metastatic process (i.e., EarlyLM_Ctrl and EarlyLM_IL34-OE). In these samples, no visible nodules were observed at the time of sacrifice. Samples from up to 5 mice per group were pooled and processed for nuclear isolation and cDNA library construction (Figure S2). By snRNA-seq analysis, we annotated 5 major clusters: cancer cells, endothelial cells, epithelial cells, fibroblasts, and immune cells (Figures 2A and 2B). Fractions of identified cellular populations differed between samples on the basis of implantation-extraction modality (Figure 2C). On the other hand, only immune cells were consistently affected by the overexpression of IL34 in all modes of implantation (Figure 2D). Among the known receptors of IL34, *Csf1r* was predominantly expressed in the immune cluster, indicating that the IL34-CSF1R axis could be responsible for the regulation of the tumor immune microenvironment (Figure 2E). Therefore, we further analyzed the immune compartment and identified 12 major clusters: MD-TAMs, lung-resident macrophages (LR-Mac), monocytes, proliferating MD-TAM and LR-Mac, neutrophils, three different populations of dendritic cells (resting, activated, and plasmacytoid), T cells, B cells, and gamma-delta T cells (Figures 2F and 2G). Among immune populations, *Csf1r* was highly expressed in the myeloid compartment, especially in MD-TAM (Figure 2H). Western blot analysis of tumor cells and murine bone marrow-derived macrophages (BMDMs) confirmed that CSF1R was expressed in monocyte-derived macrophages (Figure 2I). Furthermore, in primary tumors and lung metastases, histological co-staining of CSF1R-positive cells with either F4/80 (an MD-TAM marker) or Ly6G (a neutrophil marker) revealed that the majority of CSF1R-positive cells were MD-TAMs (Figure S3A). Taken together, these data suggest a potential role for the IL34-CSF1R axis in RCC tumor progression through its impact on the biology of monocyte-derived TAMs in the TME.

An IL34-enriched TME is characterized by the accumulation of MD-TAMs in different preclinical models of RCC

To further corroborate our snRNA-seq data, we analyzed the expression of specific markers for different cell populations involved in innate and adaptive immunity via RT-qPCR of Renca-generated tumors. Overexpression of *IL34* mainly upregulated the expression of markers of the myeloid lineage (e.g., *Itgam/CD11b*), particularly MD-TAMs (e.g., *Adgre1-F4/80* or *Csf1r*; Figure 3A). Histological analysis revealed that IL34-OE tumors were enriched in MD-TAMs compared with control tumors (Figure 3B). The levels of CSF1, the other ligand of CSF1R, remained unchanged in IL34-OE cancer cells (Figure S1D), indicating that the increase in MD-TAMs was a direct consequence of an IL34-enriched TME. IL34-dependent accumulation of MD-TAMs was also observed in xenograft models of renal tumors

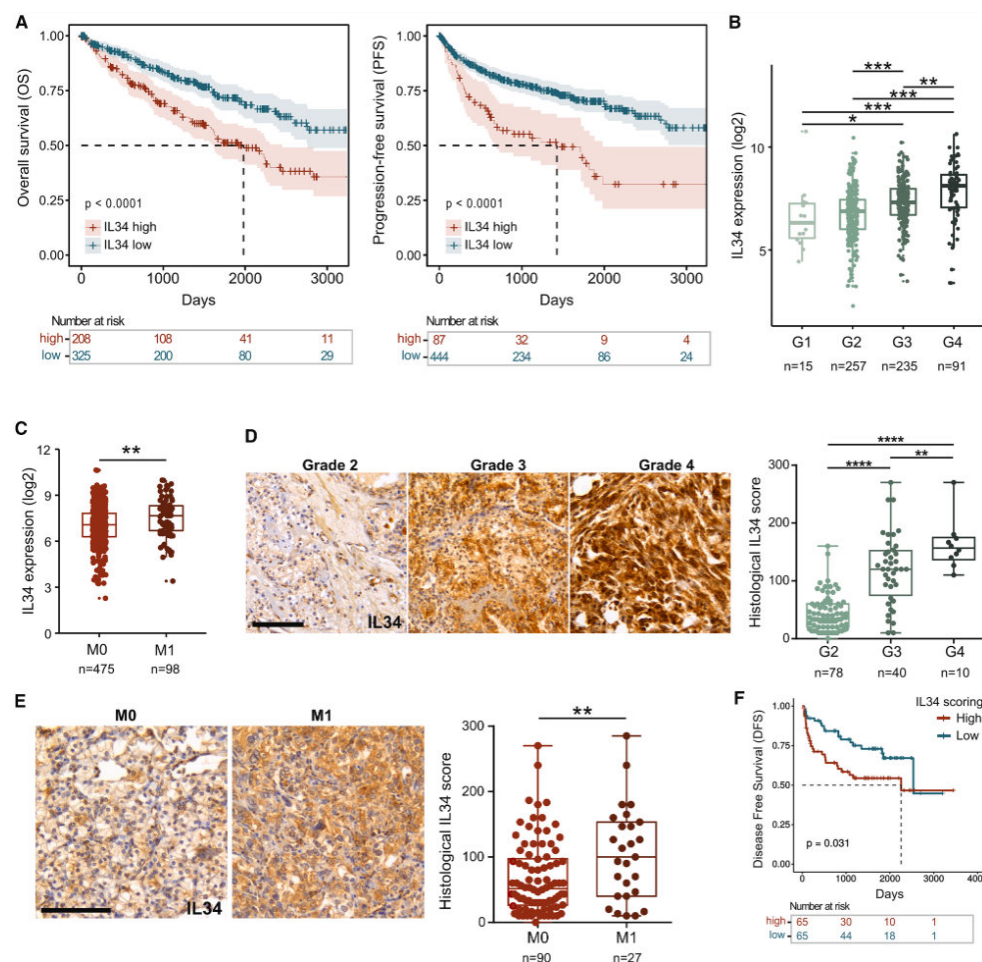


Figure 1. Analysis of IL34 expression in RCC patients KIRC-TCGA and UroCCR cohorts)

(A) Kaplan-Meier curves showing overall and progression-free survival in the KIRC-TCGA patient cohort. An optimal cutoff point was used to split the data into two groups on the basis of high and low IL34 gene expression. Log rank test, p values are indicated in the figure.

(B and C) (B) Gene expression of IL34 in patient tumors stratified according to Fuhrman grade in the TCGA cohort. Median, min to max. Kruskal-Wallis test. (C) Gene expression of IL34 in patient tumors stratified according to the presence of distant metastases in the TCGA cohort. Median, min to max. Permutation Student's t test.

(D) (Left) Representative images of histological analysis of IL34 expression in RCC patient tumors from the UroCCR cohort. (Right) Quantification of the IL34 score stratified according to Fuhrman grade. Median, min to max. One-way ANOVA. Scale bar, 100 μ m.

(E) (Left) Representative images of IL34 expression in RCC patient tumors (UroCCR cohort). (Right) Quantification of the IL34 score on the basis of the absence or presence of distant metastases (M0 or M1, respectively). Median, min to max. Mann-Whitney U test. Scale bar, 100 μ m.

(F) Kaplan-Meier curves showing the progression-free survival of patients in the UroCCR cohort. The median value was used to stratify patients into two groups on the basis of high and low histological IL34 scores. Log rank test, p values are indicated on the figure.

For all panels, number of patients per group and p values are indicated on the figure; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.



Table 1. UroCCR patients

		IL34 score	
		Low, <i>n</i>	High, <i>n</i>
Sex			
M	76 (59.4)	40	36
F	41 (32.0)	19	22
N/A	11 (8.6)		
Age			
>60	60 (46.9)	31	29
<60	57 (44.5)	28	29
N/A	11 (8.6)		
TNM			
T1-T2	77 (60.1)	40	37
T3-T4	40 (31.3)	19	21
N/A	11 (8.6)		
N0	106 (82.8)	58	48
N1-N2	10 (7.8)	1	9
N/A	12 (9.4)		
M0	90 (70.3)	51	39
M1	27 (21.1)	8	19
N/A	11 (8.6)		
Fuhrman grade			
G1	0 (0.0)	0	0
G2	78 (60.9)	58	20
G3	40 (31.3)	7	33
G4	10 (7.8)	0	10

F, female; M, male; N/A, not applicable.

F, female; M, male; N/A, not applicable.

generated from the human RCC cell lines 786-O and Caki2 (Figure 3C). Similarly, analyses of IL34-OE lung metastases also revealed increased expression of markers for the myeloid lineage (Figure 3D) and a greater number of MD-TAMs than controls (Figure 3E).

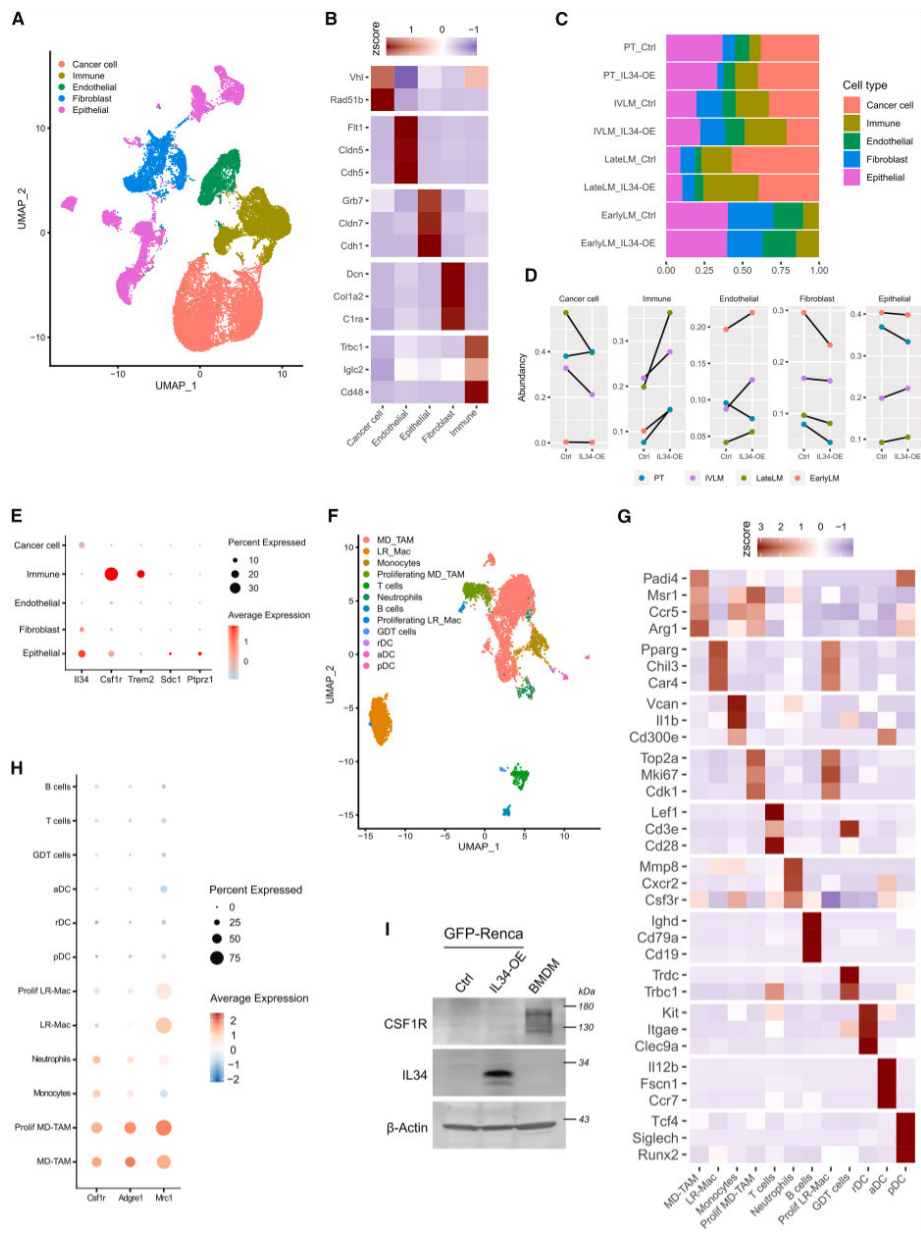
The IL34-CSF1R axis regulated MD-TAMs accumulation by enhancing their migration

We investigated whether IL34 could drive MD-TAMs accumulation by increasing their proliferation or monocyte migration in the TME through CSF1R. As expected, histological analysis revealed that the number of CSF1R-positive cells was greater in the IL34-enriched TME than in the control samples (Figure 4A). However, quantification of proliferating CSF1R-positive (Figure 4B) or MRC1-positive cells (known markers for mature MD-TAMs, Figure S3B) by Ki67 staining excluded an effect of IL34 on TAM proliferation. We next investigated the role of IL34 in stimulating MD-TAMs migration. To this end, we performed a transwell migration assay using murine BMDMs. First, by treating BMDMs with 1 μ g/mL recombinant mouse IL34 protein, we demonstrated that IL34 could directly increase their migration *in vitro* (Figure 4C). Coculture with either mouse or human RCC cell lines confirmed that IL34-OE cancer cells could enhance BMDMs migration. Conversely, the IL34-driven migration of BMDMs was abolished upon treatment with the CSF1R inhibitor pexidartinib (Figure 4D). Next, to contrast IL34-depen-

dent MD-TAMs accumulation *in vivo*, we undertook a pharmacological approach to inhibit their recruitment to the TME of lung metastases. To this end, the mice were treated with 40 mg/kg pexidartinib for up to 2 weeks and sacrificed the same day. Immunohistochemistry (IHC) analysis confirmed that IL34-enriched metastases had a significantly increased number of MRC1-expressing F4/80+ TAMs (Figure 4E). F4/80+ MRC1+ TAMs are known to have protumor functions and are indicative of MD-TAM (Figure 2H). In pexidartinib-treated mice, the number of protumor MD-TAMs strongly decreased and their IL34-dependent accumulation was not observed. Importantly, in tumor-free mice, pexidartinib treatment was safe at concentrations up to 40 mg/kg since it did not affect the body weight (Figure S4A). Next, using a blood analyzer, we counted the number of circulating leukocytes to estimate the potential effects of systemic CSF1R blockade on the hematopoietic system. This analysis revealed that eosinophils and granulocytes were not significantly affected by pexidartinib, whereas monocytes were reduced by up to 50% in treated mice (Figure S4B). In addition, fluorescence-activated cell sorting analysis of circulating monocytes revealed that pexidartinib did not affect the percentage of vessels patrolling monocytes (i.e., Ly6C^{low}) or monocytes able to extravasate into tissues and differentiate into macrophages and DCs (i.e., Ly6C^{high}; Figure S4C).¹⁷ Taken together, these data suggest that depletion of MD-TAMs in lung metastases could be due only in part to systemic myelosuppression and strongly indicate that the IL34-CSF1R axis regulates MD-TAMs accumulation in the TME by enhancing their migration.

The IL34-enriched TME contributed to tumor immunosuppression and vascular leakage through MD-TAMs accumulation

TAMs are known to promote cancer progression and resistance to therapy by expressing molecules that can alter tumor immunity and vasculature, the two major targets of RCC therapy. We thus tested whether the IL34-driven accumulation of TAMs could negatively impact these two stromal components. First, murine BMDMs expressed PD-L1 and VEGF, two main protumor proteins that mediate immunosuppression, tumor angiogenesis, and vessel permeability, respectively (Figure 5A). In accordance with our data, in IL34-enriched lung metastases, the number of F4/80+PD-L1+ TAMs was significantly greater than that in controls, whereas pexidartinib treatment strongly reduced their recruitment and abolished the IL34-dependent accumulation observed in untreated mice (Figure 5B). Next, we analyzed the tumor vasculature in our murine models. A typical VEGF-related feature of a reduced response to therapy is decreased tumor vasculature functionality or increased vessel permeability.^{18,19} Histological analysis of the vasculature of primary tumors revealed a reduction in VE-cadherin expression in IL34-OE samples, a sign of augmented vascular leakage (Figure 5C). Importantly, this phenotype was associated with an increase in vessel-associated CSF1R-positive cells (Figure 5D), indicative of enhanced recruitment of MD-TAMs. Next, we corroborated these results by performing an *in vivo* Miles assay to assess the role of IL34-CSF1R axis in regulating tumor vascular permeability. Compared with control tumors, vessel leakage was significantly increased in IL34-OE samples. In



legend on next page)



pexidartinib-treated mice, no IL34-dependent increase in vessel permeability was observed (Figure 5E), suggesting that IL34-driven vascular dysfunction in untreated mice was generated by increased recruitment of MD-TAMs. Also, in the placebo group, the growth of IL34-OE primary tumors was augmented than control mice, whereas we did not observe such a difference in treated mice (Figure S5A). Next, IHC analysis of vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) expression in vessels of lung metastases confirmed the data obtained in primary tumors (Figure 5F). Taken together, our results confirmed the involvement of the IL34-CSF1R axis in RCC progression through the regulation of the immune-vascular crosstalk in the TME. Finally, we investigated whether an IL34-enriched TME could polarize MD-TAMs into a protumor phenotype. Analysis of the differentially expressed genes (DEGs) in the MD-TAM cluster revealed that an IL34-enriched TME regulated the expression of various genes with either known or unknown roles in TAM or cancer progression (Tables S1 and S2). In particular, within the IL34-OE samples, genes whose expression was upregulated more than 2-fold included *Lyz2*, *Hsp90b1*, *Gas6*, *Pltp*, and *Gm*. Conversely, only the *Psap* and *Ctsd* genes were downregulated more than 2-fold (Figure 5G). These genes are known to have different cellular functions, including the regulation of pro- or antitumor phenotypes in TAMs.^{20–28}

Pexidartinib, in combination with sunitinib or anti-PD1 therapy, improved therapeutic outcome in the metastatic RCC model

We then tested pexidartinib as a cotreatment for metastatic RCC in our preclinical model. To this end, 4 days after the tail vein injection of Ctrl or IL34-OE Renca cells, we treated the mice for 2 weeks with pexidartinib alone or in combination with sunitinib or anti-PD1 (i.e., the 2 first-line drugs for metastatic RCC) and measured the size of the metastases in the lungs via GFP staining (Figure 6A). In the placebo group, the surface covered by IL34-OE metastases was significantly 2 times larger than that in the control group (mean GFP area: 1.68 vs. 3.36 mm²), confirming the protumor role of IL34. This difference was eliminated in all the treated mice. Compared with placebo, pexidartinib or anti-PD1 monotherapy did not significantly reduce metastatic growth, whereas sunitinib alone was effective only in the IL34-OE groups (3.36 vs. 1.93 mm²). However, compared with the placebo, the combination of pexidartinib with either sunitinib or an anti-PD1 antibody significantly reduced metastatic growth in IL34-OE-treated mice. In particular, in Ctrl mice, the mean GFP-positive area slightly decreased between placebo and combined therapy (1.68 vs. 0.96 or 0.95 mm² for placebo vs.

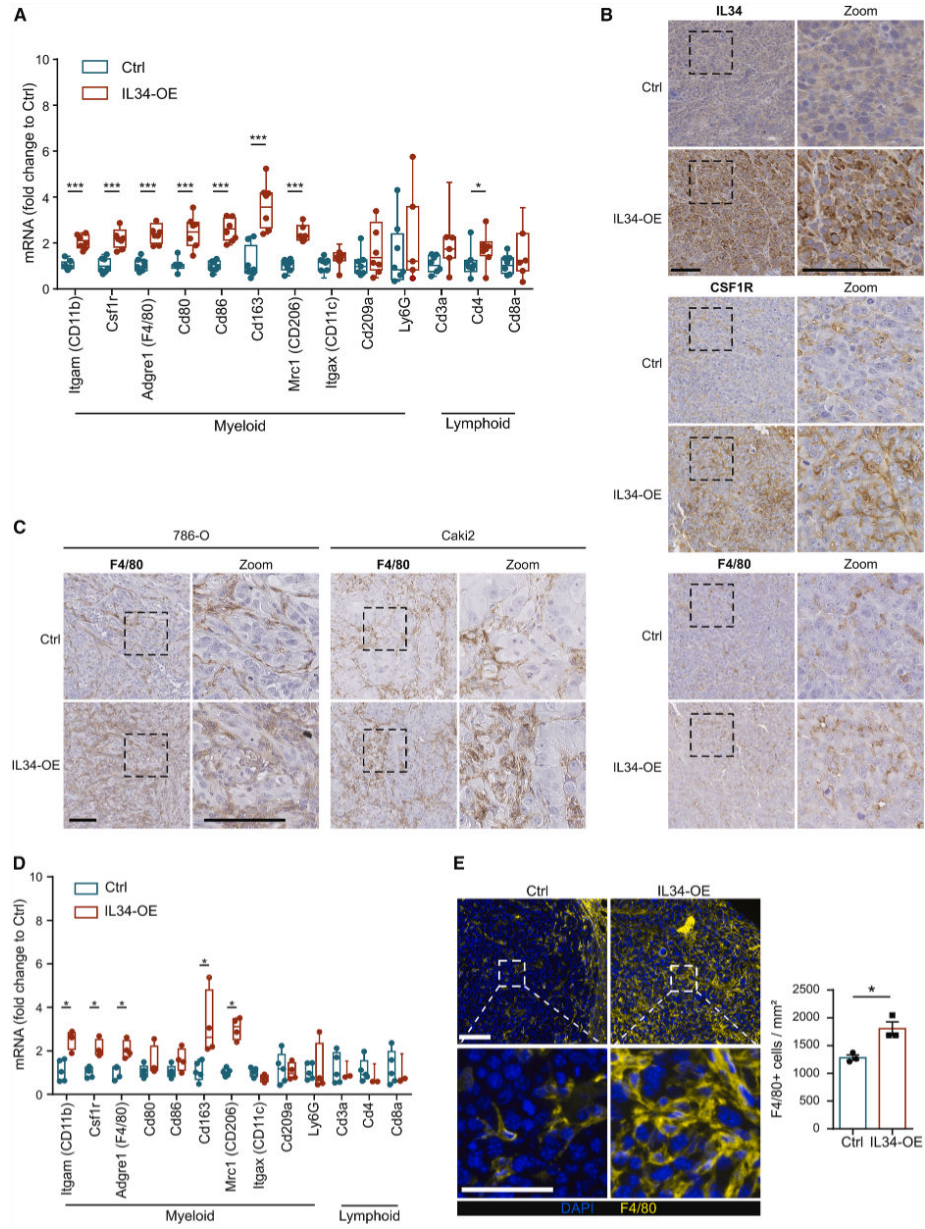
Pexid-Sunit or Pexid-aPD1, respectively), whereas in IL34-OE mice, the GFP area was almost 3 times reduced in Pexid-Sunit mice (3.36 vs. 1.18 mm²) and 2.1 times reduced in the Pexid-aPD1 group (3.36 vs. 1.58 mm²). To gain insight into the TME changes that could mediate the therapeutic effects, we subsequently analyzed the infiltration of protumor MD-TAMs and the levels of immunosuppression and vascular dysfunction. First, we observed a significant reduction in the number of protumor MD-TAMs in pexidartinib-treated mice, either alone or in combination with sunitinib or anti-PD1 therapy (Figure 6B). The infiltration of cytotoxic CD8⁺ T cells was unchanged among control mice and in IL34-OE mice treated with pexidartinib alone. However, sunitinib or anti-PD1 therapy, either alone or in combination with pexidartinib, significantly increased the number of T cells in the IL34-OE metastases (Figure 6C). Finally, compared with placebo, sunitinib treatment normalized the metastatic vasculature either alone or in combination with pexidartinib, whereas in IL34-OE mice, such an effect was also observed after pexidartinib treatment (Figure 6D).

In RCC patients, increased IL34 expression is correlated with MD-TAMs infiltration, immunosuppression, and resistance to anti-PD1 therapy

To test the translational significance of our findings, we analyzed various patient cohort databases. By performing Gene Ontology (GO) enrichment analysis, we determined that the genes whose expression significantly correlated with *IL34* expression in the KIRC-TCGA database were involved in immune-related biological processes (Figure 7A). This analysis confirmed that IL34 has a major effect on the regulation of the tumor immune micro-environment in RCC patients. In particular, in line with our findings, *IL34* expression correlated with the expression of *CSF1R* or *CD68* (markers for myeloid cells and human macrophages, respectively) in both the KIRC-TCGA and UroCCR cohorts (Figure 7B). We also analyzed the correlation between *IL34* and *CD274* (coding for PD-L1) expressions and found a positive correlation in the UroCCR cohort. However, in the TCGA cohort this correlation was inverted (Figure S6A), indicating that in real world *CD274* gene status might not be the ideal marker to identify immunosuppressive TAM in human RCC. Instead, we found that *IL34* expression positively correlated with a gene signature specific to immunosuppressive TAM of RCC patients (i.e., CD38+MSR1+MRC1-, Figure S6B).²⁹ Furthermore, IL34 expression correlated with *PDCD1* or *CTLA4* (markers of T cell exhaustion) in both the KIRC-TCGA and the UroCCR cohorts (Figure 7B). Finally, we investigated whether high levels of IL34 in patients can affect the response to nivolumab, an anti-PD1

Figure 2. Single-nucleus RNA-seq of primary tumors and lung metastases generated from GFP-Renca cells

- (A) UMAP representation of the major cell types of 39,681 cells.
- (B) Heatmap showing the normalized expression of marker genes for each major cell type.
- (C) Fraction of cell type composition per library. PT, primary tumor; IVLM, intravenous-generated lung metastasis; LateLM, late-stage tumor-derived lung metastasis; EarlyLM, early-stage tumor-derived lung metastasis.
- (D) Abundance of each cell type in control (Ctrl) and IL34-overexpressing (IL34-OE) Renca-injected mice.
- (E) Dot plot showing the expression of *Il34*, *Csf1r*, *Trem2*, *Sdc1*, and *Ptprz1* per cell type.
- (F and G) (F) UMAP representation of the subclustering of the 7,207 cells in the immune compartment. (G) Heatmap showing the normalized expression of marker genes for each immune subtype.
- (H) Dot plot showing the expression of *Csf1r*, *Adgre1*, and *Mrc1* per immune subtype.
- (I) Western blot analysis of CSF1R protein expression in murine Renca cancer cells and BMDMs.



legend on next page)

antibody used to treat metastatic RCC. To this end, we analyzed the CheckMate CM-025 cohort by stratifying patients based on the expression of IL34 in the two treated groups (i.e., nivolumab or everolimus).³⁰ Patients with high *IL34* expression were less responsive to anti-PD1 therapy than patients with low *IL34* expression (Figure 7C). The expression of *IL34* was not predictive of the response to the previous RCC standard-of-care mTOR inhibitor everolimus, which exerts a wide range of anti-neoplastic effects by targeting cancer and stromal cells.³¹ Notably, the levels of the twin cytokine *CSF1* were not predictive of therapy response (Figure S6C). Thus, these data highlight the importance of IL34 in mediating levels of immunosuppression and, in particular, response to immunotherapy in RCC patients.

DISCUSSION

Although surgical resection offers a viable option for patients with localized RCC tumors, patients with metastatic RCC (i.e., one-third of diagnosed cases) still lack effective alternatives. The failure of treatment resides in the absence of validated biomarkers and limited knowledge of the biological processes occurring during RCC progression.^{4,6,32} Building on our previous work, which identified IL34 as a potential biomarker, we have investigated the role of IL34 in RCC biology to address an unmet medical need. In this work we have provided a comprehensive analysis of the IL34-CSF1R axis in the regulation of the immune-vascular crosstalk both in the primary tumors and metastases of RCC.

In RCC patients, *IL34* expression is increased in late-stage tumors and is correlated with worse survival. In contrast to previous studies, our experiments excluded IL34-dependent effects on cancer cell proliferation, which could explain patient outcomes. In fact, the IL34-CSF1R axis was demonstrated to sustain tumor cell growth and survival via an autocrine effect in different preclinical tumor models.^{12,13,33} Here, using a validated mouse model for preclinical studies of RCC, the upregulation of *IL34* in cancer cells led to the accumulation of monocyte-derived TAMs through CSF1R. Interestingly, the IL34-CSF1R-dependent accumulation of MD-TAMs originated from enhanced chemotaxis of circulating monocytes rather than a proliferative effect on TAMs. The role of the IL34-CSF1R axis in macrophage migration was also observed during embryogenesis in two different studies conducted in zebrafish.^{34,35} In cancer, using a model of osteosarcoma, Ségalliny et al. reported that IL34 promoted TAM recruitment into tumors, possibly by enhancing monocyte adhesion to activated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) monolayers via a CSF1R-independent mechanism.³⁶ In the literature, evidence of the direct involvement of the IL34-

CSF1R axis in TAM migration, especially in the TME of the metastasis, is unclear. Different studies showed a positive correlation between IL34 and pro-tumor TAMs infiltration in primary tumors. However, this was mainly due to the role of IL34 in altering TAMs polarization toward the pro-tumor M2-type phenotype.^{12,37–40}

TAMs are generally categorized into two main functionally contrasting subtypes: the proinflammatory M1 type, which typically performs antitumor functions, and the anti-inflammatory M2 type, which leads to tumor progression by promoting tumor occurrence and metastasis and tumor angiogenesis and inhibiting the T-cell-mediated antitumor immune response.⁴¹ Previous studies have demonstrated the role of IL34 in regulating TAMs polarization toward a protumor phenotype through the upregulation of classical M2-type markers (e.g., MRC1/CD206).⁴² Our snRNA-seq analysis revealed a potential new gene signature of protumor MD-TAM polarization driven by IL34. For example, the genes whose expressions were most upregulated were *Lyz2*, *Hsp90b1*, *Gas6*, *Pltp*, and *Gm*. Although the functions of *Gas6*, *Pltp*, and *Gm* in regulating the angiogenic and immunosuppressive properties of TAMs have been previously described (see Table S2), the roles of *Lyz2* and *Hsp90b1* in these cells remain elusive. *Lyz2* is highly expressed in monocyte-derived macrophages and promotes neuronal repair after optic nerve injury.²⁰ This tissue repair behavior aligns with the classical characteristics of anti-inflammatory or M2-type TAMs. *Hsp90b1* expression is correlated with poor prognosis, advanced stages, and immunosuppression in different types of cancer, including RCC.²¹ However, *Hsp90b1* expression and function in TAMs have never been described. On the other hand, an IL34-enriched TME downregulated *Psap* and *Ctsd* genes, whose expression is associated with proinflammatory pathways,^{27,28} which are often activated in M1-type TAMs. This analysis revealed that the IL34-CSF1R axis could also perform protumor functions by regulating MD-TAMs behavior in addition to their recruitment to the TME. Further studies are needed to address whether IL34 can drive such polarization by directly interacting with the MD-TAMs population or through another stromal component.

The increase in MD-TAMs infiltration in solid tumors correlates with resistance to therapy in most cancers through various mechanisms.⁴³ In this work, MD-TAMs contributed to increased immunosuppression and vessel permeability, two primary protumor features that hinder cancer therapy. In RCC patients, *IL34* expression was correlated with the expression of markers of TAMs and exhausted T cells in two independent patient cohorts (UroCCR and KIRC-TCGA). In addition, analysis of the CheckMate 025 cohort indicated that, unlike *CSF1*, *IL34* expression could predict the response to anti-PD1 therapy. These

Figure 3. IL34 regulates the immune TME by accumulating monocyte-derived TAMs in primary tumors and lung metastases

(A) RT-qPCR analysis of bulk RNA extracted from whole mouse renal tumors generated from IL34-OE ($n = 5$ –7 mice per group) or Ctrl ($n = 5$ –7 mice) Renca cells. Median, min to max. Mann-Whitney U test, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.
 (B) Immunohistochemistry (IHC) showing the expression of IL34, CSF1R, or F480 in Renca-generated orthotopic tumors. Scale bar, 100 μ m.
 (C) IHC images of F4/80-positive cells in orthotopic xenografts generated from the human RCC cell lines 786-O and Caki2. Scale bar, 100 μ m.
 (D) RT-qPCR analysis of bulk RNA extracted from metastatic lungs after tail vein injection of IL34-OE ($n = 3$ –4 mice) or Ctrl ($n = 5$ mice) Renca cells. Median, min to max. Mann-Whitney U test, * $p < 0.05$.
 (E) IHC (left) and quantification (right) of F4/80-positive cells in lung metastases ($n = 3$ mice per group). Scale bar, 100 μ m; zoom, 50 μ m. Mean $\pm$ SEM. Unpaired Student's t tests, * $p < 0.05$.

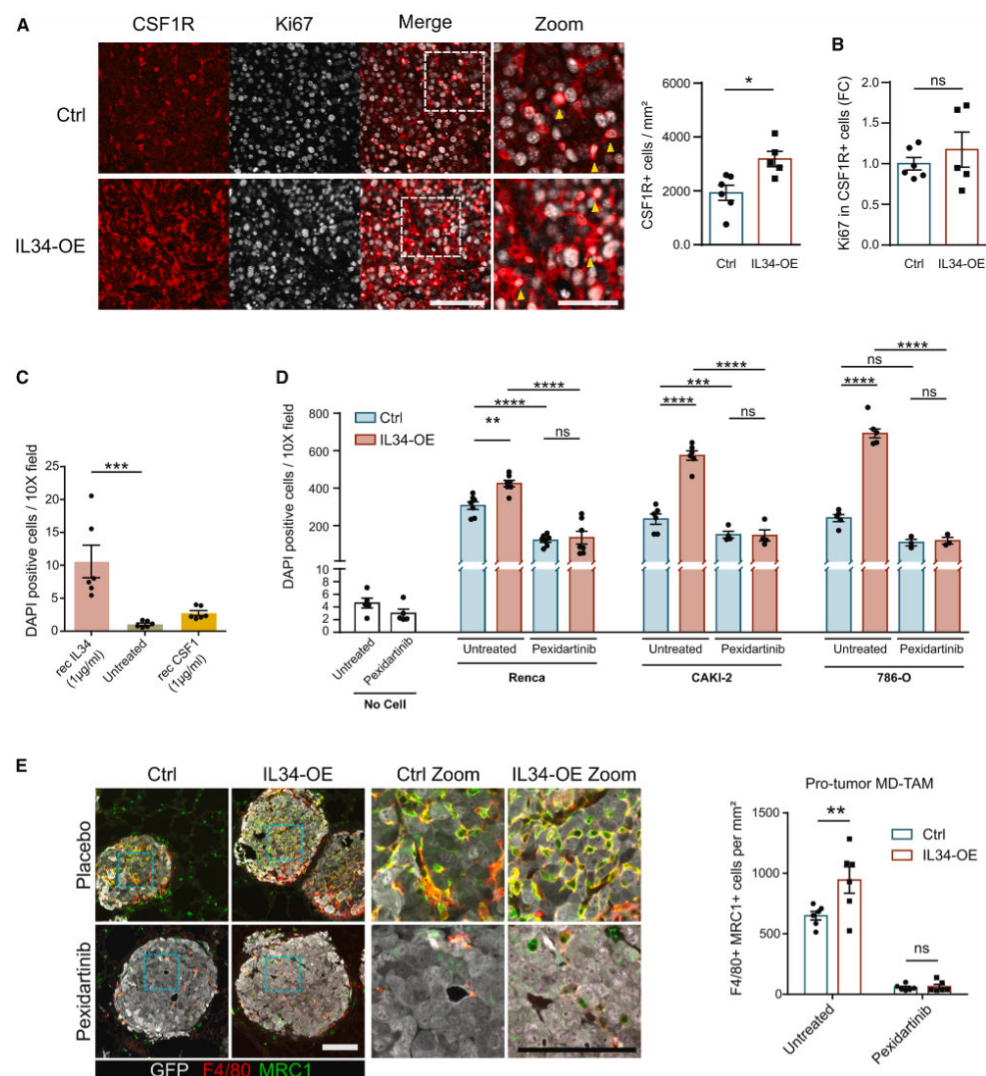


Figure 4. IL34-CSF1R axis is involved in MD-TAMs migration

(A) Immunofluorescence analysis of proliferative MD-TAMs (i.e., Ki67 expression in CSF1R+ cells) in primary tumors generated from IL34-OE ($n = 5$ mice) or Ctrl ($n = 6$ mice) Renca cells. The graph on the right shows the quantification of total CSF1R+ cells. Scale bar, 100 μm ; zoom, 50 μm . Mean $\pm$ SEM. Unpaired Student's t tests, * $p < 0.05$.

(B) Quantification of proliferative MD-TAMs shown in (A). Mean $\pm$ SEM. Unpaired Student's t tests. ns, non significant. FC, fold change.

(C) Transwell migration assay of BMDM ($n = 6$ mice per group) treated with either recombinant mouse IL34 or CSF1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 24 hours). One dot represents a single-cell line of BMDM extracted from one mouse. Mean $\pm$ SEM. Kruskal-Wallis test, *** $p < 0.001$.

(legend continued on next page)



analyses underscore the translational relevance of our findings and indicate a potential role for IL34 in the interplay between immunosuppressive TAMs and cytotoxic T cells in RCC patients. In line with these findings, Hama et al. reported an immunosuppressive protumor role for IL34 in a murine model of melanoma.⁴⁰ Here, the IL34-enriched TME was characterized by the accumulation of immunosuppressive MD-TAMs, a reduction in cytotoxic CD8⁺ T cell infiltration, and increased vessel permeability in mouse renal tumors and metastases. In addition, augmented vascular leakage was associated with an increase in vessel-associated CSF1R-positive cells, which are likely to represent perivascular MD-TAMs. In line with the known protumor activities of perivascular TAMs in facilitating angiogenesis and vascular permeability,^{44,45} we demonstrated that inhibiting the IL34-CSF1R axis with pexidartinib impeded the augmented vascular leakage observed in untreated tumors with an IL34-enriched TME. The role of IL34 in controlling tumor vascular architecture through immune cells was also reported by Kajihara et al. in a mouse model of breast cancer. In particular, they showed that IL34 could alter the response to chemotherapy by negatively regulating the proangiogenic activity of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSC) in the TME of 4T1 subcutaneous tumors.⁴⁶ These findings seemed to be independent of CSF1R, suggesting the involvement of another IL34 receptor. Two main reasons may explain the difference in their findings compared with our results. First, due to the pleiotropic roles of IL34, which depend on the cellular and molecular context of the TME, it is not surprising that IL34 can have different functions in different types of tumor. Second, they used subcutaneous tumors whose TME usually differs from the one of orthotopic tumors.^{47,48} Taken together, our results reveal the involvement of the IL34-CSF1R axis in the RCC tumor vasculature and immunity through the regulation of MD-TAMs biology and suggest that blockade of the IL34-CSF1R axis could be used to improve RCC therapy.

Although several studies reported the role of IL34 in cancer, we are still missing therapeutic strategies that target IL34-driven mechanisms to implement in the clinics. For this reason, the improved therapeutic effects observed with pexidartinib are interesting from a practical perspective. Since this CSF1R inhibitor is FDA approved,⁴⁹ it can be already tested for the treatment of the metastatic forms of RCC in combination with standard-of-care therapies. Although pexidartinib alone impeded the accumulation of immunosuppressive MD-TAMs in lung metastases, in IL34-OE pexidartinib-treated mice we observed a nonsignificant decrease in infiltrating CD8⁺ T cells, similar to those in the Ctrl group. This finding indicated that other mechanisms of immunosuppression remained in place, explaining the inability of pexidartinib, as a single agent, to generate a more immunostimulant TME. For example, Voissière et al. reported that in advanced cancers, pexidartinib affects the differentiation of anti-tumor dendritic cells, potentially limiting the effects of anti-PD-L1

therapy.⁵⁰ Additionally, Kumar et al. demonstrated that CSF1R blockade can enhance tumor immunosuppression by recruiting MDSC.⁵¹ On the other side, we showed that the combination of pexidartinib with sunitinib or an anti-PD1 antibody could exert a synergistic effect in reducing metastatic growth of RCC. Although both types of combination significantly reduced the levels of immunosuppression in the metastatic TME, we observed a reduction in tumor vasculature leakage only in mice treated with pexidartinib and sunitinib. In addition, IL34-OE mice were more responsive to pexidartinib plus sunitinib than their placebo counterparts, highlighting the role of the IL34-CSF1R axis in the immune-vascular crosstalk mediated by increased MD-TAMs recruitment. Taken together, our findings show the importance of evaluating the clinical benefit of pexidartinib in RCC in combination with current therapies.

Several clinical trials tested the beneficial use of CSF1R inhibitors in combination with immunotherapy, targeted therapy, or chemotherapy in different types of cancer. However, these studies led to controversial findings.⁵² Intra- and inter-tumor heterogeneity or the lack of biomarkers that could predict the rate of response to CSF1R inhibitors are potential reasons for such discrepancies in the outcomes observed in clinical trials. The use of pexidartinib in RCC was only tested in a phase Ib study,⁵³ but we are still lacking evidence of its potential in treating this type of cancer. Our data suggest the implementation of pexidartinib with current RCC therapy, especially for those patients who express high levels of IL34.

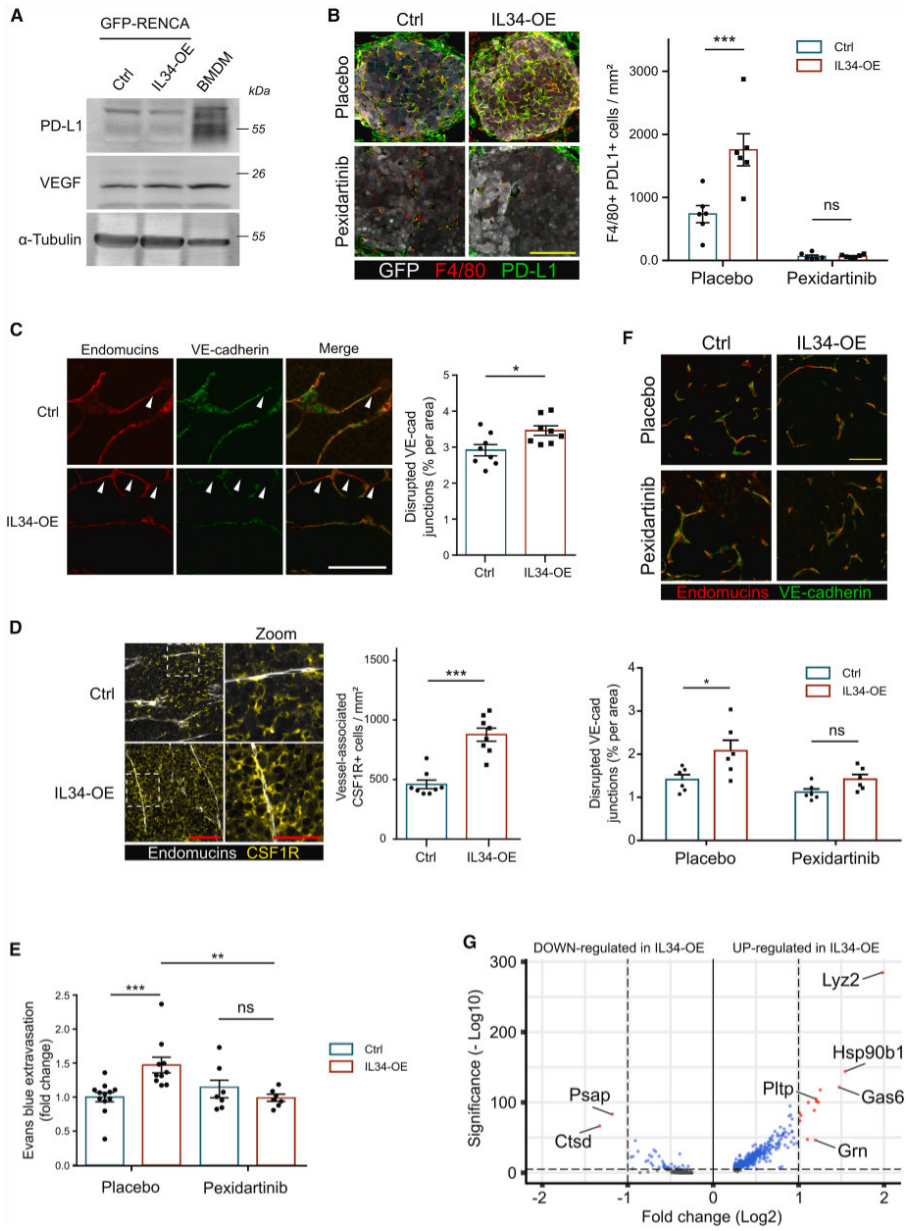
Limitations of the study

Renca cells do not reflect the pathological features observed in human RCC. In fact, the majority of RCC patients present inactive mutations or deletions of VHL, whereas Renca cells have intact expression of this gene.^{2,54} However, the Renca model permitted the investigation of the protumor mechanisms of immunosuppression and vessel permeability using an intact TME. Furthermore, similar to tumors of RCC patients, TAMs represented the most abundant myeloid cell population of the TME in our mouse models, allowing us to investigate the role of IL34 in the regulation of this cell population. The effect of IL34 on MD-TAMs recruitment was also validated in the human cell lines 786-O and Caki2 (VHL-mutated and VHL-wild-type, respectively). Notably, in the last decade, the Renca syngeneic mouse model has been widely used as the main preclinical model for RCC research, generating a wealth of data that eventually contributed to significantly improving RCC therapy.^{55–59}

Another limitation is the use of a CSF1R inhibitor to block IL34 protumor activities. Using an anti-IL34 antibody could have been a better strategy for ruling out potential interference of CSF1. However, our work would have lost its potential clinical impact: whereas anti-IL34 antibodies have never been tested in humans, pexidartinib is FDA approved and already available to test in patients. Also, in our experimental settings, pexidartinib was likely

(D) Transwell migration assay of BMDM after 24 h of coculture with Renca ($n = 7$ mice), 786-O ($n = 3$ –5 mice) or Caki2 ($n = 4$ –6 mice) cells overexpressing mouse IL34 or an empty vector as a control under untreated or pexidartinib-treated (2.5 μ M, 24 hours) conditions. One dot represents a single-cell line of BMDM extracted from one mouse. Mean $\pm$ SEM. two-way ANOVA, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

(E) Histological analysis (left) and quantification (right) of protumor MD-TAMs by counting MRC1+ cells among F4/80+ cells ($n = 6$ mice per group). Scale bar, 100 μ m. Mean $\pm$ SEM. two-way ANOVA, ** $p < 0.01$.



legend on next page)



to block the IL34-driven alterations of the immune-vascular crosstalk, as CSF1 levels were unchanged in IL34-OE cancer cells and not associated with aggressiveness and progression of Renca tumors and metastases. Finally, IL34 showed a greater ability than CSF1 to induce BMDM migration *in vitro*.

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and any requests should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Prof. Andreas Bikfalvi (andreas.bikfalvi@u-bordeaux.fr).

Materials availability

This study did not generate new unique reagents.

Data and code availability

- Gene expression and survival data from patients in the TCGA-KIRC database were acquired from xenabrowser.net and cbioportal.org. The raw sequencing reads from the snRNA-seq analysis have been deposited in EMBL's European Bioinformatics Institute database (accession number: E-MTAB-14432).
- No new or custom code has been used to analyze the data.
- Additional information (e.g., experimental details) can be obtained from the [lead contact](#) upon request.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Siric-BRIO (postdoctoral fellowship to A.E.), Fondation ARC 2019 (ref. PJA 20191209471), Plan Cancer INSERM 2017 (ref. C18005GS), and Conseil Régional d'Aquitaine 2020 and by recurrent funding from Inserm and the University of Bordeaux to A.B. The authors thank Xavier Gauthereau (TBMCore, Bordeaux) and Frédéric Martins (GeT-Santé, Toulouse) for their help with snRNA-seq library preparation and sequencing. Resources and services used for snRNA-seq analysis were provided by the VSC (Flemish Supercomputer Center), funded by the Research Foundation Flanders (FWO) and the Flemish Government.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.B. conceived the study. A.E. designed the experiments. A.E., W.S., Y.P., M.-A.D., J.M., C.M.S., and T.M. performed experiments. A.E., W.S., T.C., B.B., L.C., D.A., and D.L. were involved in data analysis. J.-C.B. collected clinical samples. A.E. and A.B. wrote the manuscript, and the final version of the manuscript was reviewed and approved by all authors.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare that they have no conflicts of interest.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- **KEY RESOURCES TABLE**
- **EXPERIMENTAL MODEL AND STUDY PARTICIPANT DETAILS**
 - Cell culture
 - Animal models
 - Human participants
- **METHOD DETAILS**
 - Generation of stable cell lines
 - Cell proliferation assay
 - Animal experiments
 - Immunohistochemistry and tissue microarrays
 - Vessel permeability miles assay
 - BMDM isolation and transwell migration assay
 - RNA extraction and real-time qPCR (RT-PCR)
 - Protein extraction, Western blot analysis and ELISA
 - Flow cytometry of circulating monocytes
 - snRNA-sequencing
- **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**
 - Data analysis of the TCGA-KIRC cohort
 - Statistical analyses

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.isci.2025.112752>.

Received: November 19, 2024

Revised: March 25, 2025

Accepted: May 22, 2025

Published: May 26, 2025

REFERENCES

1. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I., and Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 74, 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.
2. Moch, H., Cubilla, A.L., Humphrey, P.A., Reuter, V.E., and Ulbright, T.M. (2016). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur. Urol.* 70, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.029>.
3. Padala, S.A., Barsouk, A., Thandra, K.C., Saginala, K., Mohammed, A., Vakiti, A., Rawla, P., and Barsouk, A. (2020). Epidemiology of Renal Cell

Figure 5. Impact of the IL34-CSF1R axis in the immune-vascular crosstalk of RCC

(A) Western blot analysis showing the levels of PD-L1 and VEGF expression in GFP-Renca cells and BMDM.
 (B) Histological analysis (left) and quantification (right) of immunosuppressive PD-L1+ F4/80+ MD-TAMs in lung metastases ($n = 6$ mice per group). Scale bar, 100 μ m. Mean $\pm$ SEM. two-way ANOVA, *** $p < 0.001$.
 (C) Primary tumor analysis revealed leaky vessels that were positive for endomucin and expressed low VE-cadherin, as indicated by white arrows ($n = 8$ mice per group). Scale bar, 100 μ m. Mean $\pm$ SEM. Mann-Whitney U test, * $p < 0.05$.
 (D) Histological images of CSF1R+ cells associated with vessels (endomucin staining) in Renca-generated primary tumors (left) and quantification (right). Scale bar, 100 μ m; zoom, 50 μ m. Mean $\pm$ SEM ($n = 8$ mice per group). Mann-Whitney U test, *** $p < 0.001$.
 (E) Quantification of extravasated Evans blue in Renca-generated primary tumors treated with pexidartinib (40 mg/kg) or placebo. Up to 12 mice per group from two independent experiments were analyzed. Data are expressed as the fold change compared with placebo control samples with tumor weight normalization. Mean $\pm$ SEM. two-way ANOVA, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.
 (F) Histological images of leaky vessels (top) and quantification (bottom) of lung metastases from mice treated with pexidartinib (40 mg/kg) or placebo ($n = 6$ per group). Scale bar, 50 μ m. Mean $\pm$ SEM. two-way ANOVA, * $p < 0.05$.
 (G) Volcano plot of the DEGs identified via MD-TAM. The x axis represents the log2-fold change in gene expression between the IL34-OE and Ctrl groups, indicating upregulation (right) and downregulation (left) in IL34-OE MD-TAM. The y axis represents the $-\log_{10}$ of the adjusted p value. The horizontal dashed line indicates the threshold for statistical significance (i.e., adjusted p value < 0.05).

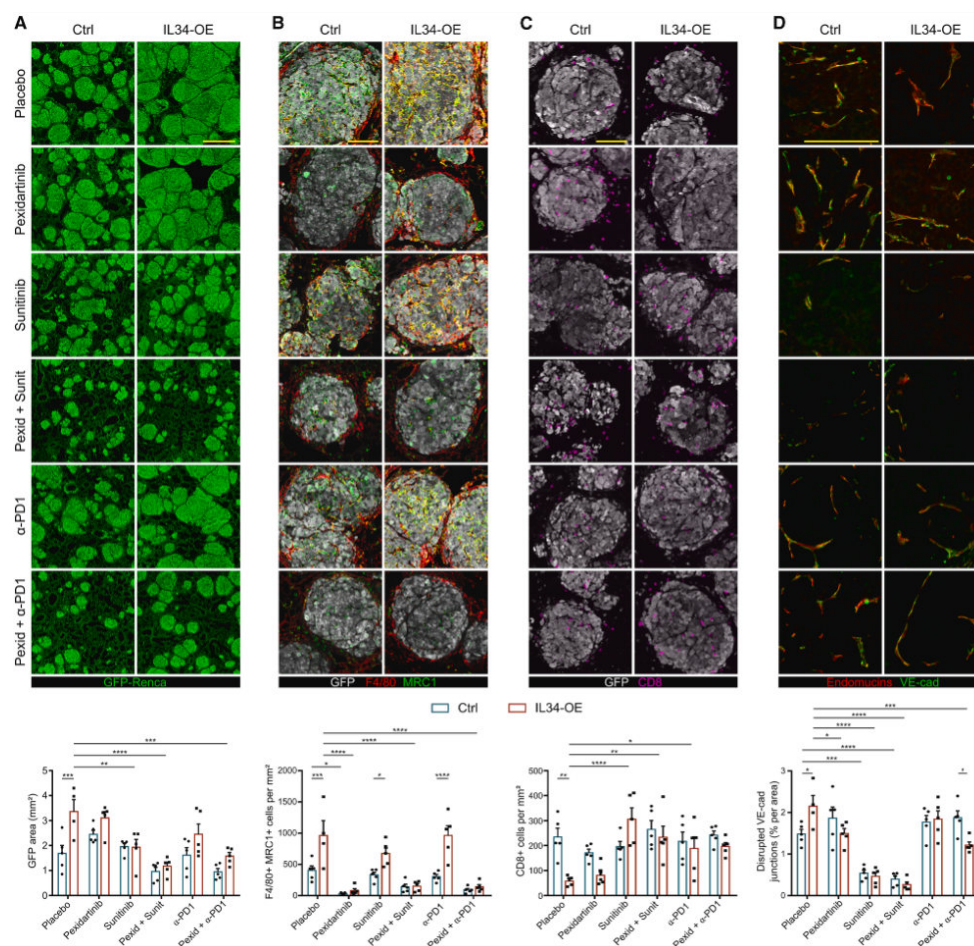


Figure 6. Metastatic growth in mice treated with pexidartinib alone or with standard RCC therapy

(A–D) Histological images (top) and quantification (bottom) of the GFP area (A; scale bar, 500 μ m), protumor MD-TAMs recruitment (B; scale bar, 100 μ m); infiltrating cytotoxic CD8⁺ T cells (C; scale bar, 100 μ m), and leaky vasculature (D; scale bar, 100 μ m) in the metastatic lungs of mice treated with pexidartinib either alone or in combination with sunitinib or an anti-PD1 antibody; 4–5 mice per group were analyzed. Mean $\pm$ SEM. two-way ANOVA, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

- Carcinoma. World J. Oncol. 11, 79–87. <https://doi.org/10.14740/wjon1279>.
- Bias, L., Monji, K., Mutaguchi, J., Kobayashi, S., Goto, S., Matsumoto, T., Shiota, M., Inokuchi, J., and Eto, M. (2024). Current status and future perspective of immunotherapy for renal cell carcinoma. Int. J. Clin. Oncol. 29, 1105–1114. <https://doi.org/10.1007/s10147-023-02446-3>.
- Powles, T., Albiges, L., Bex, A., Comperat, E., Grünwald, V., Kanesvaran, R., Kitamura, H., McKay, R., Porta, C., Procopio, G., et al. (2024). Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. 35, 692–706. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2024.05.537>.
- Saliby, R.M., Saad, E., Kashima, S., Schoenfeld, D.A., and Braun, D.A. (2024). Update on Biomarkers in Renal Cell Carcinoma. Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book 44, e430734. https://doi.org/10.1200/EDBK_430734.
- Cooley, L.S., Rudewicz, J., Souleyreau, W., Emanuelli, A., Alvarez-Arenas, A., Clarke, K., Falciani, F., Dufies, M., Lambrechts, D., Modave, E., et al. (2021). Experimental and computational modeling for signature and

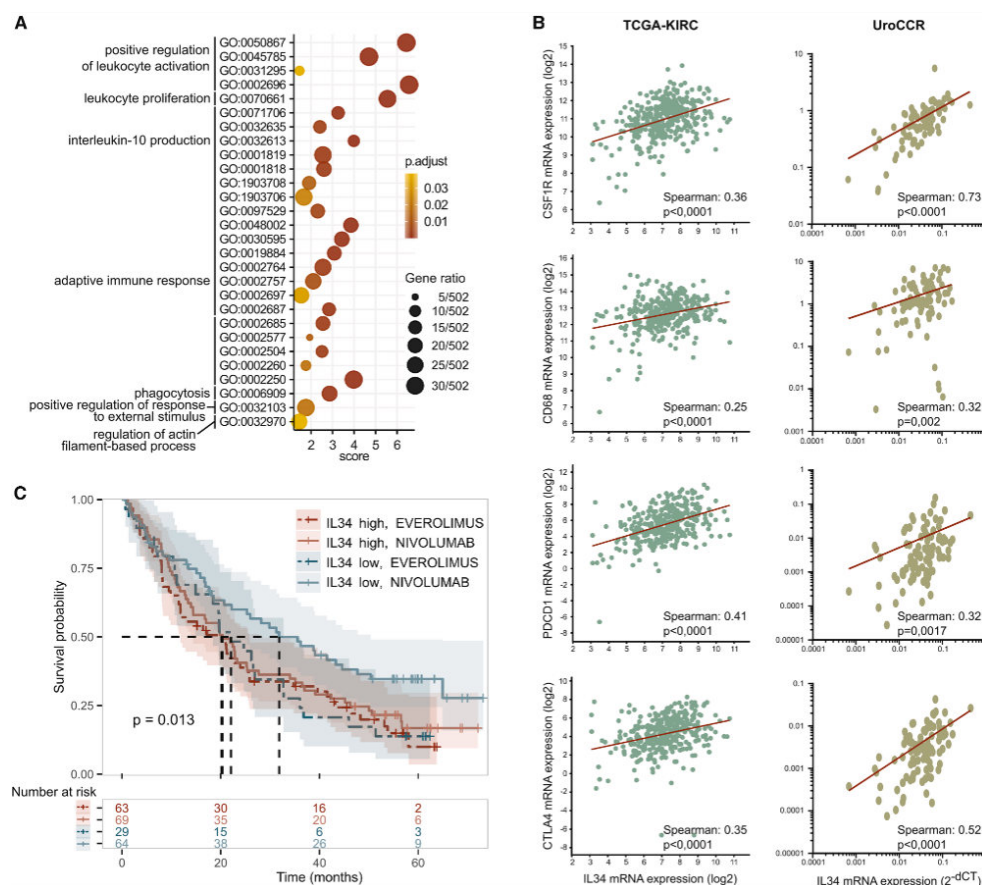


Figure 7. In RCC patients, high IL4 expression correlates with features of immunosuppression and a reduced response to immunotherapy
(A) Gene Ontology term enrichment analysis of genes whose expression correlated with IL34 expression in KIRC-TCGA patients.
(B) Spearman correlation analysis of IL34 expression with the MD-TAM markers *CSF1R* and *CD68* or the exhausted T cell markers *PDCD1* and *CTLA4* in the KIRC-TCGA (left) and UroCCR (right) databases.
(C) Kaplan-Meier survival analysis of patients stratified on the basis of IL34 expression (high vs. low) who received treatment (everolimus vs. nivolumab, CheckMate CM-025 cohort). Number of patients per group and p values are indicated in the figure.

- biomarker discovery of renal cell carcinoma progression. *Mol. Cancer* 20, 136. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01416-5>.
8. Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 669–692. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>.
9. Franzè, E., Stolfi, C., Troncone, E., Scarozza, P., and Monteleone, G. (2020). Role of Interleukin-34 in Cancer. *Cancers* 12. <https://doi.org/10.3390/cancers12010252>.
10. Baghdadi, M., Umeyama, Y., Hama, N., Kobayashi, T., Han, N., Wada, H., and Seino, K. (2018). Interleukin-34, a Comprehensive Review at (John Wiley and Sons Inc.). <https://doi.org/10.1002/JLB.MR1117-457R>.
11. Xie, X., Zhang, W., Xiao, M., Wei, T., Qiu, Y., Qiu, J., Wang, H., Qiu, Z., Zhang, S., Pan, Y., et al. (2023). TREM2 acts as a receptor for IL-34 to suppress acute myeloid leukemia in mice. *Blood* 141, 3184–3198. <https://doi.org/10.1182/blood.2022018619>.
12. Baghdadi, M., Wada, H., Nakanishi, S., Abe, H., Han, N., Wira, E.P., Endo, D., Watari, H., Sakuragi, N., Hida, Y., et al. (2016). Chemotherapy-induced IL34 enhances immunosuppression by tumor-associated macrophages and mediates survival of chemoresistant lung cancer cells. *Cancer Res.* 76, 6030–6042. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1170>.

13. Franzè, E., Dinallo, V., Rizzo, A., Di Giovangiulio, M., Bevivino, G., Stoffi, C., Caprioli, F., Colantoni, A., Ortenzi, A., Di Grazia, A., et al. (2018). Interleukin-34 sustains pro-tumorigenic signals in colon cancer tissue. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23289>.
14. Nandi, S., Cioce, M., Yeung, Y.G., Nieves, E., Tesfa, L., Lin, H., Hsu, A.W., Halenbeck, R., Cheng, H.Y., Gokhan, S., et al. (2013). Receptor-type protein-tyrosine phosphatase ζ is a functional receptor for interleukin-34. *J. Biol. Chem.* 288, 21972–21986. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.442731>.
15. Zhou, S.-L., Hu, Z.-Q., Zhou, Z.-J., Dai, Z., Wang, Z., Cao, Y., Fan, J., Huang, X.-W., and Zhou, J. (2016). miR-28-5p-IL-34-macrophage feedback loop modulates hepatocellular carcinoma metastasis. *Hepatology* 63, 1560–1575. <https://doi.org/10.1002/hep.28445>.
16. Baghdadi, M., Endo, H., Takano, A., Ishikawa, K., Kameda, Y., Wada, H., Miyagi, Y., Yokose, T., Ito, H., Nakayama, H., et al. (2018). High co-expression of IL-34 and M-CSF correlates with tumor progression and poor survival in lung cancers. *Sci. Rep.* 8, 418. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18796-8>.
17. Zilionis, R., Engblom, C., Pfirschke, C., Savova, V., Zemmour, D., Saaticoglu, H.D., Krishnan, I., Maroni, G., Meyerovitz, C.V., Kerwin, C.M., et al. (2019). Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity* 50, 1317–1334.e10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.009>.
18. De Palma, M., and Hanahan, D. (2024). Milestones in tumor vascularization and its therapeutic targeting. *Nat. Cancer* 5, 827–843. <https://doi.org/10.1038/s43018-024-00780-7>.
19. Harney, A.S., Arwert, E.N., Entenberg, D., Wang, Y., Guo, P., Qian, B.-Z., Oktay, M.H., Pollard, J.W., Jones, J.G., and Condeelis, J.S. (2015). Real-Time Imaging Reveals Local, Transient Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation Stimulated by TIE2hi Macrophage-Derived VEGFA. *Cancer Discov.* 5, 932–943. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0012>.
20. Andries, L., Kancheva, D., Masin, L., Scheyltjens, I., Van Hove, H., De Vlaeminck, K., Bergmans, S., Claes, M., De Groef, L., Moons, L., et al. (2023). Immune stimulation recruits a subset of pro-regenerative macrophages to the retina that promotes axonal regrowth of injured neurons. *Acta Neuropathol. Commun* 11, 85. <https://doi.org/10.1186/s40478-023-01580-3>.
21. Huang, X., Zhang, W., Yang, N., Zhang, Y., Qin, T., Ruan, H., Zhang, Y., Tian, C., Mo, X., Tang, W., et al. (2024). Identification of HSP90B1 in pan-cancer hallmarks to aid development of a potential therapeutic target. *Mol. Cancer* 23, 19. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01920-w>.
22. Wu, G., Ma, Z., Cheng, Y., Hu, W., Deng, C., Jiang, S., Li, T., Chen, F., and Yang, Y. (2018). Targeting Gas6/TAM in cancer cells and tumor microenvironment. *Mol. Cancer* 17, 20. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0769-1>.
23. Steitz, A.M., Steffes, A., Finkernagel, F., Unger, A., Sommerfeld, L., Jansen, J.M., Wagner, U., Graumann, J., Müller, R., and Reinartz, S. (2020). Tumor-associated macrophages promote ovarian cancer cell migration by secreting transforming growth factor beta induced (TGFB) and tenascin C. *Cell Death Dis.* 11, 249. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2438-8>.
24. Shi, W. (2023). PB2375: PLTP Regulates BCR Signaling And Tumor Microenvironment in diffuse large b-cell lymphoma through reprogramming of lipid metabolism environment. <https://doi.org/10.1097/01.HS9.0000976216.03649.6b>.
25. Zhang, S., Peng, W., Wang, H., Xiang, X., Ye, L., Wei, X., Wang, Z., Xue, Q., Chen, L., Su, Y., et al. (2023). C1q(+) tumor-associated macrophages contribute to immunosuppression through fatty acid metabolic reprogramming in malignant pleural effusion. *J. Immunother. Cancer* 11. <https://doi.org/10.1136/jitc-2023-007441>.
26. Quaranta, V., Rainer, C., Nielsen, S.R., Raymant, M.L., Ahmed, M.S., Engle, D.D., Taylor, A., Murray, T., Campbell, F., Palmer, D.H., et al. (2018). Macrophage-Derived Granulin Drives Resistance to Immune Checkpoint Inhibition in Metastatic Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* 78, 4253–4269. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3876>.
27. Kong, H.Y., and Byun, J. (2013). Emerging roles of human prostatic Acid phosphatase. *Biomol. Ther. (Seoul)*. 21, 10–20. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.095>.
28. Gan, P., Xia, Q., Hang, G., Zhou, Y., Qian, X., Wang, X., and Ding, L. (2019). Knockdown of cathepsin D protects dopaminergic neurons against neuroinflammation-mediated neurotoxicity through inhibition of NF- κ B signaling pathway in Parkinson's disease model. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 46, 337–349. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13052>.
29. Chevrier, S., Levine, J.H., Zanotelli, V.R.T., Silina, K., Schulz, D., Bacac, M., Ries, C.H., Alles, L., Jewett, M.A.S., Moch, H., et al. (2017). An Immune Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell* 169, 736–749.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.016>.
30. Motzer, R.J., Escudier, B., McDermott, D.F., George, S., Hammers, H.J., Srinivas, S., Tykodi, S.S., Sosman, J.A., Procopio, G., Plimack, E.R., et al. (2015). Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 373, 1803–1813. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1510665/SUPPL_FILE/NEJMoa1510665_DISCLOSURES.PDF.
31. Escudier, B., and Thompson, J.A. (2009). Mechanism of action of everolimus in renal cell carcinoma. *Med. Oncol.* 261, 32–39. <https://doi.org/10.1007/S12032-008-9158-8>.
32. Astore, S., Baciarello, G., Cerbone, L., and Calabrò, F. (2023). Primary and acquired resistance to first-line therapy for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Drug Resist.* 6, 517–546. <https://doi.org/10.20517/cdr.2023.33>.
33. Poudel, M., Kim, G., Bhattarai, P.Y., Kim, J.-Y., and Choi, H.S. (2021). Interleukin-34-CSF1R Signaling Axis Promotes Epithelial Cell Transformation and Breast Tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22052711>.
34. Jiang, Y., Chen, J., Yen, K., and Xu, J. (2019). Ectopically Expressed IL-34 Can Efficiently Induce Macrophage Migration to the Liver in Zebrafish. *Zebrafish* 16, 165–170. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1685>.
35. Wu, S., Xue, R., Hassan, S., Nguyen, T.M.L., Wang, T., Pan, H., Xu, J., Liu, Q., Zhang, W., and Wen, Z. (2018). IL34-Csf1r Pathway Regulates the Migration and Colonization of Microglial Precursors. *Dev. Cell* 46, 552–563.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.08.005>.
36. Ségalin, A.L., Mohamadi, A., Dizier, B., Lokajczyk, A., Brion, R., Lanel, R., Amiaud, J., Charrier, C., Boisson-Vidal, C., and Heymann, D. (2015). Interleukin-34 promotes tumor progression and metastatic process in osteosarcoma through induction of angiogenesis and macrophage recruitment. *Int. J. Cancer* 137, 73–85. <https://doi.org/10.1002/ijc.29376>.
37. DeNardo, D.G., Brennan, D.J., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S.L., Madden, S.F., Gallagher, W.M., Wadhwani, N., Keil, S.D., Junaid, S.A., et al. (2011). Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.* 1, 54–67. <https://doi.org/10.1158/2159-8274.CD-10-0028>.
38. Endo, H., Hama, N., Baghdadi, M., Ishikawa, K., Otsuka, R., Wada, H., Asano, H., Endo, D., Konno, Y., Kato, T., et al. (2020). Interleukin-34 expression in ovarian cancer: a possible correlation with disease progression. *Int. Immunol.* 32, 175–186. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXZ074>.
39. Nakajima, S., Mimura, K., Saito, K., Thar Min, A.K., Endo, E., Yamada, L., Kase, K., Yamauchi, N., Matsumoto, T., Nakano, H., et al. (2021). Neoadjuvant Chemotherapy Induces IL34 Signaling and Promotes Chemoresistance via Tumor-Associated Macrophage Polarization in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Mol. Cancer Res.* 19, 1085–1095. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-0917>.
40. Hama, N., Kobayashi, T., Han, N., Kitagawa, F., Kajihara, N., Otsuka, R., Wada, H., Lee, H.-K., Rhee, H., Hasegawa, Y., et al. (2020). Interleukin-34 Limits the Therapeutic Effects of Immune Checkpoint Blockade. *iScience* 23, 101584. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101584>.
41. Jayasingam, S.D., Citartan, M., Thang, T.H., Mat Zin, A.A., Ang, K.C., and Ch'ng, E.S. (2019). Evaluating the Polarization of Tumor-Associated



- Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Front. Oncol.* 9, 1512. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01512>.
42. Muñoz-García, J., Cochonneau, D., Télétchéa, S., Moranton, E., Lanoe, D., Brion, R., Lézot, F., Heymann, M.-F., and Heymann, D. (2021). The twin cytokines interleukin-34 and CSF-1: masterful conductors of macrophage homeostasis. *Theranostics* 11, 1568–1593. <https://doi.org/10.7150/thno.50683>.
 43. Mantovani, A., Allavena, P., Marchesi, F., and Garlanda, C. (2022). Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 21, 799–820. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00520-5>.
 44. Bahri, M., Anstee, J.E., Opzoomer, J.W., and Arnold, J.N. (2023). Perivascular tumor-associated macrophages and their role in cancer progression. *Essays Biochem.* 67, 919–928. <https://doi.org/10.1042/EB0220242>.
 45. Lewis, C.E., Harney, A.S., and Pollard, J.W. (2016). The Multifaceted Role of Perivascular Macrophages in Tumors. *Cancer Cell* 30, 365. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.07.009>.
 46. Kajihara, N., Kobayashi, T., Otsuka, R., Nio-Kobayashi, J., Oshino, T., Takahashi, M., Imanishi, S., Hashimoto, A., Wada, H., and Seino, K. (2022). Tumor-derived interleukin-34 creates an immunosuppressive and chemoresistant tumor microenvironment by modulating myeloid-derived suppressor cells in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 72, 851. <https://doi.org/10.1007/S00262-022-03293-3>.
 47. Zhang, Y., Zhang, G.L., Sun, X., Cao, K.X., Ma, C., Nan, N., Yang, G.W., Yu, M.W., and Wang, X.M. (2018). Establishment of a murine breast tumor model by subcutaneous or orthotopic implantation. *Oncol. Lett.* 15, 6233–6240. <https://doi.org/10.3892/OL.2018.8113>.
 48. Stribbling, S.M., Beach, C., and Ryan, A.J. (2024). Orthotopic and metastatic tumour models in preclinical cancer research. *Pharmacol. Ther.* 257, 108631. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2024.108631>.
 49. Lin, F., Jacqueline Kwong, W., Pan, I., Ye, X., Dai, D., and Tap, W. (2024). Real-World Patient Experience of Pexidartinib for Tenosynovial Giant-Cell Tumor. *Oncologist* 29, e535–e543. <https://doi.org/10.1093/oncolo/oyad282>.
 50. Voissière, A., Gomez-Roca, C., Chabaud, S., Rodriguez, C., Nkodia, A., Berthet, J., Montane, L., Bidaux, A.-S., Treilleux, I., Eberst, L., et al. (2024). The CSF-1R inhibitor pexidartinib affects FLT3-dependent DC differentiation and may antagonize durvalumab effect in patients with advanced cancers. *Sci. Transl. Med.* 16, eadd1834. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.add1834>.
 51. Kumar, V., Donthireddy, L., Marvel, D., Condamine, T., Wang, F., Lavilla-Alonso, S., Hashimoto, A., Vonteddu, P., Behera, R., Goins, M.A., et al. (2017). Cancer-Associated Fibroblasts Neutralize the Anti-tumor Effect of CSF1 Receptor Blockade by Inducing PMN-MDSC Infiltration of Tumors. *Cancer Cell* 32, 654–668.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.10.005>.
 52. Wen, J., Wang, S., Guo, R., and Liu, D. (2023). CSF1R inhibitors are emerging immunotherapeutic drugs for cancer treatment. *Eur. J. Med. Chem.* 245, 114884. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2022.114884>.
 53. Wesolowski, R., Sharma, N., Reebel, L., Rodal, M.B., Peck, A., West, B.L., Marimuthu, A., Severson, P., Karlin, D.A., Dowlati, A., et al. (2019). Phase Ib study of the combination of pexidartinib (PLX3397), a CSF-1R inhibitor, and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 11. <https://doi.org/10.1177/1758835919854238/>.
 54. Sobczuk, P., Brodziak, A., Khan, M.I., Chhabra, S., Fiedorowicz, M., Wehniak-Kaminska, M., Synoradzki, K., Bartnik, E., Cudnoch-Jędrzejewska, A., and Czarnecka, A.M. (2020). Choosing The Right Animal Model for Renal Cancer Research. *Transl. Oncol.* 13, 100745. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100745>.
 55. Watanabe, H., Matsushita, Y., Tamura, K., Motoyama, D., Sugiyama, T., Otsuka, A., and Miyake, H. (2023). Assessments of therapeutic effects according to timings for combined therapy with axitinib and immune checkpoint inhibitor in a mouse renal cell carcinoma model. *Sci. Rep.* 13, 11361. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37857-9>.
 56. Peng, Y.-L., Xiong, L.-B., Zhou, Z.-H., Ning, K., Li, Z., Wu, Z.-S., Deng, M.-H., Wei, W.-S., Wang, N., Zou, X.-P., et al. (2022). Single-cell transcriptomics reveals a low CD8(+) T cell infiltrating state mediated by fibroblasts in recurrent renal cell carcinoma. *J. Immunother. Cancer* 10. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-004206>.
 57. Li, X., Xu, P., Wang, C., Xu, N., Xu, A., Xu, Y., Sadahira, T., Araki, M., Wada, K., Matsuura, E., et al. (2017). Synergistic effects of the immune checkpoint inhibitor CTLA-4 combined with the growth inhibitor lycorine in a mouse model of renal cell carcinoma. *Oncotarget* 8, 21177–21186. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15505>.
 58. Hara, T., Miyake, H., Hinata, N., and Fujisawa, M. (2019). Inhibition of Tumor Growth and Sensitization to Sunitinib by RNA Interference Targeting Programmed Death-ligand 1 in Mouse Renal Cell Carcinoma RenCa Model. *Anticancer Res.* 39, 4737–4742. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.13656>.
 59. Dubrot, J., Lane-Reticker, S.K., Kessler, E.A., Ayer, A., Mishra, G., Wolfe, C.H., Zimmer, M.D., Du, P.P., Mahapatra, A., Ockerman, K.M., et al. (2021). In vivo screens using a selective CRISPR antigen removal lentiviral vector system reveal immune dependencies in renal cell carcinoma. *Immunity (Camb., Mass.)* 54, 571–585.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.01.001>.
 60. Geraldo, L.H., Xu, Y., Jacob, L., Pibouin-Fragner, L., Rao, R., Maissa, N., Verreault, M., Lemaire, N., Knosp, C., Lesaffre, C., et al. (2021). SLIT2/ROBO signaling in tumor-associated microglia and macrophages drives glioblastoma immunosuppression and vascular dysmorphia. *J. Clin. Invest.* 131. <https://doi.org/10.1172/JCI141083>.
 61. Liu, Z., Gu, Y., Shin, A., Zhang, S., and Ginhoux, F. (2020). Analysis of Myeloid Cells in Mouse Tissues with Flow Cytometry. *STAR Protoc.* 1, 100029. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100029>.
 62. Nardone, S., De Luca, R., Zito, A., Klymko, N., Nicoloutsopoulos, D., Am-salem, O., Brannigan, C., Resch, J.M., Jacobs, C.L., Pant, D., et al. (2024). A spatially-resolved transcriptional atlas of the murine dorsal pons at single-cell resolution. *Nat. Commun.* 15, 1966. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45907-7>.
 63. Zheng, G.X.Y., Terry, J.M., Belgrader, P., Ryvkin, P., Bent, Z.W., Wilson, R., Ziraldo, S.B., Wheeler, T.D., McDermott, G.P., Zhu, J., et al. (2017). Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat. Commun.* 8, 14049. <https://doi.org/10.1038/ncomms14049>.
 64. Fleming, S.J., Chaffin, M.D., Arduini, A., Akkad, A.-D., Banks, E., Marioni, J.C., Philippakis, A.A., Ellnor, P.T., and Babadi, M. (2023). Unsupervised removal of systematic background noise from droplet-based single-cell experiments using CellBender. *Nat. Methods* 20, 1323–1335. <https://doi.org/10.1038/s41592-023-01943-7>.
 65. Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W. M., 3rd, Hao, Y., Stoeckius, M., Smibert, P., and Satija, R. (2019). Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* 177, 1888–1902.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.031>.



STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Goat anti-mouse CSF1	bio-technie	AF416; RRID:AB_355351
Rat anti-F4/80	Invitrogen	14-4801-85; RRID:AB_467559
Mouse anti-F4/80	Santa Cruz	sc-377009; RRID:AB_2927461
Goat anti-MRC1/CD206	bio-technie	AF2535; RRID:AB_2063012
Rabbit anti-GFP	MBL	598; RRID:AB_591816
Rabbit anti-CSF1R	Cell Signaling	3152; RRID:AB_2085233
Rabbit anti-mouse IL34	antibodies-online	ABIN1175348; RRID:AB_3695706
Mouse anti-human IL34	Abcam	ab101443; RRID:AB_10711208
Rat anti-Ly6G	BD Pharmigen	551459; RRID:AB_394206
Rat anti-Ki67	Invitrogen	14-5698-82; RRID:AB_10854564
Goat anti-Endomucins	bio-technie	AF4666; RRID:AB_2100035
Rat anti-VEcadherin	BD Bioscience	555289; RRID:AB_395707
Mouse anti-PD-L1/CD274	Proteintech	66248-1-Ig; RRID:AB_2756526
Rabbit anti-CD8	Abcam	ab217344; RRID:AB_2890649
Rabbit anti-PD-L1/CD274	RD system	MAB90781; RRID:AB_2921258
Sheep anti-mouse IL34	bio-technie	AF5195; RRID:AB_2124393
Mouse anti- α -Tubulin	Sigma-Aldrich	T6199; RRID:AB_477583
Mouse anti- β -Actin	Santa Cruz	sc-69879; RRID:AB_1119529
Mouse anti-VEGF	Invitrogen	MA5-13182; RRID:AB_10981661
Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488	Jackson ImmunoResearch	711-545-152; RRID:AB_2313584
Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 647	Jackson ImmunoResearch	711-605-152; RRID:AB_2492288
Donkey anti-rat TRITC	Jackson ImmunoResearch	712-025-153; RRID:AB_2340636
Donkey anti-rat Alexa Fluor 647	Jackson ImmunoResearch	712-605-153; RRID:AB_2340694
Donkey anti-goat TRITC	Jackson ImmunoResearch	705-025-147; RRID:AB_2340389
Donkey anti-goat Alexa Fluor 647	Jackson ImmunoResearch	705-605-147; RRID:AB_2340437
Donkey anti-mouse Alexa Fluor 647	Jackson ImmunoResearch	715-605-151; RRID:AB_2340863
PE anti-CD45, clone 30-F11	BD Bioscience	553081; RRID:AB_394611
Alexa Fluor 647 anti-SiglecF, clone E50-2440	BD Bioscience	562680; RRID:AB_2687570
PE-Cy7 anti-FceR1, clone MAR-1	Invitrogen	25-5898-82; RRID:AB_2573493
PerCP-eFlour710 anti-CD172a, clone P84	eBiosciences	46-1721-80; RRID:AB_10805866
BV785 anti-CD11b, clone M1/70	BioLegend	101243; RRID:AB_2561373
Pacific Blue anti-Ly6G, clone 1A8	BioLegend	127611; RRID:AB_1877212
APC-Cy7anti-Ly6C, clone HK1.4	BioLegend	128025; RRID:AB_10643867
BV605 anti-CD115, clone AFS98	BioLegend	135517; RRID:AB_2562760
Bacterial and virus strains		
Lentivirus pRRLsin-MND-eGFP-WPRE	This paper	N/A
Lentivirus pCMV-puro-IL34	This paper	N/A
Biological samples		
UroCCR samples	University Hospital, Bordeaux	NCT03293563
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
Pexidartinib	MedChemExpress	HY-16749/CS-4256
Sunitinib	MedChemExpress	HY-10255A/CS-1670

(Continued on next page)



<i>continued</i>		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Critical commercial assays		
Chromium Next GEM Single Cell 3' GEM	10X Genomics	Library & Gel Bead Kit v3.1
Mouse IL-34 Quantikine ELISA Kit	RD System	M3400
Deposited data		
snRNA-seq	EMBL's European Bioinformatics Institute database	E-MTAB-14432; RRID:SCR_004727
Experimental models: Cell lines		
786-O	ATCC	ATCC CRL-1932; RRID:CVCL_1051
Caki2	ATCC	ATCC HTB-47; RRID:CVCL_0235
Renca	ATCC	ATCC CRL-2947; RRID:CVCL_2174
Experimental models: Organisms/strains		
BALB/c mice	Charles River Laboratories	
Oligonucleotides		
Primers for qPCR via SYBR green are listed in Table S4	This paper	N/A
Csf1r TaqMan Assay	ThermoFisher Scientific	Mm01266652_m1
Il34 TaqMan Assay	ThermoFisher Scientific	Mm01243248_m1
Csf1 TaqMan Assay	ThermoFisher Scientific	Mm00432686_m1
Forward primer with attB site for IL34 cDNA amplification 5'-GGGG-ACA-AGT-TTG-TACAAA- AAA-GCA-GGC-TTC-ATG-CCC-TGG-GGA-CTC-GCC-TGG-CTA-3'	This paper	N/A
Reverse primer with attB site for IL34 cDNA amplification 5'-GGGG-AC-CAC-TTT-GTA-CAA-GAA-AGC-TGG-GTC-TCA-GGG-CAA-CGA-GCCATG-GCT-TGA-3'	This paper	N/A
Recombinant DNA		
pLenti CMV/TO Puro DEST	Addgene	17293; RRID:Addgene_17293
pVSV-G	Addgene	8454; RRID:Addgene_8454
psPAX2	Addgene	12260; RRID:Addgene_12260
Software and algorithms		
RStudio		RRID:SCR_000432
GraphPad Prism		RRID:SCR_002798

EXPERIMENTAL MODEL AND STUDY PARTICIPANT DETAILS

Cell culture

The human cell lines 786-O and Caki2 were purchased from ATCC and cultured in RPMI 1640. Mouse renal carcinoma Renca cells were purchased from ATCC and cultured in DMEM. The media were supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco; Thermo Fisher Scientific) and 1% (v/v) penicillin–streptomycin (Sigma–Aldrich), and the cells were cultured at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO₂.

Animal models

Female BALB/c mice of 8 to 12 weeks (Charles River Laboratories) were housed in the animal facility of Bordeaux University (Animalerie Mutualisée, Université de Bordeaux, France). All studies involving animals were approved by the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (authorization number 31294-2021042114529886 v3).

Human participants

Uro R cohort

Patient samples from the UroCCR cohort were used with associated clinical data (clinicaltrials.gov, NCT03293563). Patients' information are summarized in [Table 1](#). All patients gave written informed consent. The UroCCR database (French Research Network for



Kidney Cancer) is IRB-approved (Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en Matière de Recherche dans le domaine de la Santé) and obtained the CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés) authorization number DR-2013-206.

METHOD DETAILS

Generation of stable cell lines

Renal cancer cell lines were infected with a lentiviral vector (pRRLsin-MND-eGFP-WPRE, obtained from the vectorology platform of the University of Bordeaux Vect'UB) expressing the eGFP for imaging purposes. GFP-positive cells were then sorted with a FACSAria sorter (BD Biosciences). The mouse IL34 lentiviral vector was obtained by extracting total RNA from Renca cells and reverse-transcribing it into cDNA via a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, 4368814). Mouse IL34 cDNA was then amplified via PCR via specific primers containing the attB site: fwd: 5'-GGGG-ACA-AGT-TTG-TACAAA- AAA-GCA-GGC-TTC-ATG-CCC-TGG-GGA-CTC-GCC-TGG-CTA-3'; rev: 5'-GGGG-AC-CAC-TTT-GTA-CAA-GAA-AGC-TGG-GTC-TCA-GGG-CAA-CGA-GCCATG-GCT-TGA-3'. The attB-PCR product was subsequently cloned and inserted into pDONR221 (Thermo Fisher, 12536017) via BP gateway cloning and subsequently transferred into pLenti CMV/TO Puro DEST (Addgene 17293) via LR gateway cloning to obtain the pLenti CMV/TO-mIL34-Puro lentiviral vector. Viral particles were produced by calcium phosphate cotransfection of HEK293T cells with the packaging plasmids pSV-G (Addgene, 8454) and psPAX2 (Addgene, 12260) and a transfer plasmid (e.g., eGFP or mIL34 plasmid). Renca cells were infected with lentiviruses and selected for 7 days in complete DMEM supplemented with 1 µg/mL puromycin. All the constructs were sequence verified.

Cell proliferation assay

For the proliferation assay, 2×10^5 Renca or 1×10^5 786-O cells were seeded in 6-well plates, and the medium was changed every day. At each time point, the cells were gently washed with PBS, fixed with 4% FA for 10 min at RT, and stained with 0.5% crystal violet for an additional 10 min at RT. The cells were then washed several times with tap water and dried completely. Once all the time points were collected, the cells were destained with 1% SDS under agitation. The intensity of the dissolved crystal violet was read at 595 nm via a spectrophotometer.

Animal experiments

Syngeneic renal tumors or metastases were established via subcapsular implantation or tail vein injection, respectively. For subcapsular implantation, 1×10^5 Renca cells were injected under the left kidney capsule, whereas for intravenous injection, 5×10^5 Renca cells were injected into the caudal vein. Two to three weeks after implantation/injection, the generated primary tumors or lung metastases were either fixed in 4% formaldehyde for histological analysis or snap frozen in liquid nitrogen for bulk RNA or protein extraction. For *in vivo* treatments, the mice were randomized into different groups and treated four days after Renca cell injection. Pexidartinib or sunitinib (HY-16749/CS-4256 or HY-10255A/CS-1670, MedChemExpress) was dissolved in 5% DMSO - 95% corn oil and administered once daily by gavage (40 mg/kg per mouse) for two cycles, where one cycle consisted of 5 days of treatment. Anti-PD1 antibody (100 µg/mouse, BE0146, BioXCell) was administered by intraperitoneal injection twice per week for a total of two weeks. At least 2 h after the last treatment, the mice were culled for further analysis.

Immunohistochemistry and tissue microarrays

Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues were cut via a microtome, and 5 µm sections were stained for histological analyses. The slides were deparaffinized in toluene and rehydrated in a descending scale of ethanol baths. After antigen retrieval, the sections were blocked with 3% BSA for 30 min at room temperature or overnight at 4°C. Then, the sections were incubated with primary antibodies (summarized in Table S3) for 2 h at RT, washed in PBS and incubated for 1 h with a fluorescent secondary antibody and DAPI according to the manufacturer's instructions. Finally, the slides were washed with PBS and mounted with ProLong™ Gold antifade reagent (Invitrogen). Histological images were analyzed via ImageJ, and three different areas were analyzed for each mouse.

Human tissue microarrays were obtained from the French Kidney Cancer Research Network UroCCR (Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux - Hôpital Pellegrin), and IL34 protein levels were analyzed via IHC. The expression of IL34 was scored by a board-certified pathologist. Up to three different tumor areas were analyzed for each patient, and the histological score was calculated as the percentage of labeled cells (0–100%) multiplied by the staining intensity (0–3).

Vessel permeability miles assay

Vessel permeability was assessed via the Miles assay as previously described.⁶⁰ Briefly, 18 days after implantation, tumor-bearing mice were anesthetized and injected intravenously with 200 µL of 1% Evan's blue solution (Sigma). Fifteen to twenty minutes after injection, the mice were sacrificed, and the circulating Evan's blue was removed via transcardiac perfusion with PBS. Primary tumors and contralateral kidneys were collected, weighed, and incubated in formamide for 24 h at 56°C under agitation. The absorbance of the extracted dye was quantified with a spectrophotometer at 620 nm and normalized to the tumor weight.



BMDM isolation and transwell migration assay

Bone marrow cells were collected from the tibia and femurs of BALB/c mice and centrifuged for 10 min at $300 \times g$ at room temperature. The cells were subsequently resuspended in complete DMEM containing 50 ng/mL mouse M-CSF (416-ML-050/CF, Bio-technique). The media was replaced every 2–3 days to remove unwanted cells, and after 8 days, the BMDMs were used for subsequent analyses. For the Transwell migration assay, 1.5×10^5 renal cancer cells were seeded in complete DMEM at the bottom of each well of a 24-well plate. The next day, the media was replaced with 650 μ L of fresh media. After 24 h, 1×10^5 isolated BMDMs were added to 3 μ m inserts and cocultured with cancer cells for an additional 24 h. Finally, migrated BMDMs were fixed in 4% formaldehyde and stained with DAPI (1:2000). After the removal of nonmigrated cells via a cotton swap, the DAPI-positive cells were imaged via a Nikon videomicroscope (9 fields/insert, 10X magnification) and counted via Fiji.

RNA extraction and real-time qPCR RT-PCR)

Total RNA was extracted via TRI Reagent (TR118-200, Euromedex) according to the manufacturer's protocols. Then, 1–2 μ g of total RNA was reverse-transcribed into cDNA via a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, 4368814). Finally, the qPCR products were prepared via either EurobioProbe or EurobioGreen master mix (AEMMX03H or GAEMMX02H; Eurobio Scientific), and the resulting cDNA was amplified via the AriaMx Real-time PCR System (Agilent Technologies). The list of primers used is summarized in [Table S4](#).

Protein extraction, Western blot analysis and ELISA

The cells were lysed via either RIPA buffer (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate) for Western blot (WB) analysis or TH buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 140 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton-X) for ELISA. Lysis buffers were supplemented with proteases and phosphatase inhibitors (Roche), and the protein concentration was determined via a BCA assay. For WB analysis, blotted PVDF membranes were incubated with Revert 700 total protein stain (cat. 926–11011, LI-COR) following the manufacturer's instructions or with primary antibodies overnight at 4°C. Finally, the membranes were incubated with IRDye secondary antibodies diluted in Odyssey Blocking Buffer (927–40000, LI-COR) for 1 h at room temperature and visualized via an Odyssey Imaging System (LI-COR). The list of primary antibodies used is summarized in [Table S3](#). For ELISA quantification of secreted IL34, either 500 μ g of total protein or 100 μ L of mouse plasma was analyzed with a Mouse IL-34 Quantikine ELISA Kit (M3400, RD System).

Flow cytometry of circulating monocytes

Circulating monocytes from peripheral blood were analyzed as previously described with a few modifications.⁵¹ At the time of mouse sacrifice, 100 μ L whole blood samples were collected in a tube containing 10 μ L 0.5 M EDTA. Then, 50 μ L of the sample was added to 1 mL of red cell lysis buffer (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0.1 mM EDTA) and incubated at RT for 10 min. The cells were then washed once and resuspended in 50 μ L of 2% FBS–PBS, after which 5 μ L of antibody cocktail ([Table S3](#)) was added. After 15 minutes of incubation at 4°C, the cells were washed, resuspended in 300 μ L of 2% FBS–PBS and analyzed via a BD LSRFortessa flow cytometer.

snRNA-sequencing

Fresh samples were quickly frozen in liquid nitrogen, stored at -80°C , and processed the same day for cDNA library generation. Nuclei were isolated as previously described with minor changes.⁶² Briefly, frozen samples were homogenized in ice-cold lysis buffer (10 mM TrisHCl pH 8, 250 mM sucrose, 25 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0.1% Triton X-100, 0.2 U/ μ L RNasin Plus RNase Inhibitor), strained through a 70 μ m filter and collected in an Eppendorf tube. After centrifugation, the nuclei were resuspended in 1X RNase-free PBS containing 0.1% BSA and RNasin Plus RNase Inhibitor by gently pipetting 5 times via a regular-bore pipette tip. After an additional step of centrifugation, the nuclei were passed through a 20 μ m strainer, stained with DAPI, counted on a hematocytometer, and finally diluted to 1,000 nuclei/ μ L. Subsequently, 17,000 nuclei/sample were processed on the OneCell platform (TBMCore, University of Bordeaux) for gel bead-in-emulsion (GEM) and library generation via the Chromium Next GEM Single Cell 3' GEM, Library & Gel Bead Kit v3.1 (10X Genomics). The libraries were sequenced via an Illumina NovaSeq 6000 (GeT-PlaGe facility, Toulouse). The raw sequencing reads of the 8 libraries were aligned to the mm10 (2020-A) reference genome, and gene-count matrices were generated with 10x Genomics Cell Ranger v3.⁶³ The ambient counts were removed from the matrices via CellBender,⁶⁴ and the libraries were subsequently merged and further processed via Seurat (Seurat V3,⁶⁵). Cells with >400 UMIs and between 200 and 6000 genes were retained. These 39,681 cells were normalized, regression was performed for the number of UMIs per cell, and the 2000 most variable genes were selected for principal component analysis on 18 principal components. Clustering was performed with the Leiden algorithm at a resolution of 0.2, and the data were visualized in a uniform manifold approximation and projection (UMAP). This resulted in 14 clusters that were annotated via canonical marker genes in 5 major cell types. The immune compartment consisting of 7,207 cells was further subclustered and annotated via the same approach with 30 principal components at a resolution of 1. Differential expression was calculated with the Wilcoxon signed-rank test implemented in Seurat.



QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Data analysis of the TCGA-KIRC cohort

Gene expression and survival data from patients in the TCGA-KIRC cohort ($n = 510$) were analyzed via RStudio. Survival analysis was performed by separating patients into 2 groups on the basis of IL34 expression. The optimal cutoff point was determined via the `surv_cutpoint` function, and Kaplan–Meier survival plots were generated via the `survival` and `survminer` packages. Gene Ontology (GO) analyses of biological process (BP) terms were performed on the 542 IL34-correlated genes. The 28 obtained GO terms were clustered into 7 clusters via the `clusterProfiler` and `rrvgo` packages. Spearman correlation coefficients ($p < 0.05$, $|R| > 0.4$) were utilized to identify genes coexpressed with IL34.

Statistical analyses

All the data presented herein were obtained from three or more biological replicates and are presented as the mean $\pm$ SEM, unless otherwise indicated, and were analyzed via RStudio version 4.2 (<https://www.rproject.org/>) or GraphPad Prism. Statistical tests are indicated in the figure legends. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

9.2 Autres articles, livres conceptuels et interventions en lien avec le cancer et la philosophie

Bikfalvi A. Science, vérité et croyance, *Médecine&Science*

<https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/pdf/2018/12/msc180160.pdf>

Rondeau E, Larmonier N, Pradeu T, Bikfalvi A. Characterizing causality in cancer. *Elife*. 2019 Nov 29;8:e53755. doi: 10.7554/eLife.53755. PMID: 31782731; PMCID: PMC6884405

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6884405/pdf/elife-53755.pdf>

Laplane L, Duluc D, Larmonier N, Pradeu T, Bikfalvi A. 2018. The multiple layers of the tumor environment. *Trends in Cancer* 4:802–809.

<https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.10.002>

Bikfalvi, A. History and conceptual developments in vascular biology and angiogenesis research: a personal view. *Angiogenesis* **20**, 463–478 (2017).

<https://doi.org/10.1007/s10456-017-9569-2>

Bikfalvi, A. Une brève histoire du vaisseau sanguin et lymphatique 2016 .

<https://laboutique.edpsciences.fr/produit/930/9782759818631/une-breve-histoire-de-vaisseau-sanguin-et-lymphatique>

Bikfalvi. A. Univ Bordeaux. (2016, 21 juin). A brief history of blood and lymphatic vessels. [Vidéo]. Canal-U. <https://doi.org/10.60527/hy5k-4a27>. <https://www.canal-tv.chaines/univ-bordeaux/a-brief-history-of-blood-and-lymphatic-vessels>

Bikfalvi A. A brief history of blood and lymphatic vessels. Ed Springer Verlag 2017, <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-74376-9>

9.3 Codes et scripts

9.3.1 Codes DAG Gliomes (Figure 18)

```
dag {
  bb="0,0,1,1"
  "Adaptive immunity" [exposure,pos="0.623,0.781"]
  "Expansion of tumor mass" [pos="0.538,0.559"]
  "Glycolytic state of tumor cells" [exposure,pos="0.733,0.701"]
  "Innate immunity" [exposure,pos="0.465,0.787"]
  "Molecular profile of tumor cells" [exposure,pos="0.346,0.701"]
  "Neural input" [exposure,pos="0.719,0.399"]
  "Oxydative state" [exposure,pos="0.528,0.260"]
  "Patient survival" [outcome,pos="0.722,0.561"]
  "Tumor-derived angiogenesis factors" [pos="0.096,0.553"]
  "Vessel cooption" [exposure,pos="0.290,0.389"]
  Angiogenesis [pos="0.290,0.558"]
  Hypoxia [exposure,pos="0.100,0.395"]
  Invasion [pos="0.528,0.392"]
  Necrosis [pos="0.103,0.259"]
  "Adaptive immunity" -> "Expansion of tumor mass"
```

```

"Expansion of tumor mass" -> "Patient survival"
"Glycolytic state of tumor cells" -> "Expansion of tumor mass"
"Innate immunity" -> "Expansion of tumor mass"
"Molecular profile of tumor cells" -> "Expansion of tumor mass"
"Molecular profile of tumor cells" -> Angiogenesis
"Molecular profile of tumor cells" -> Invasion
"Neural input" -> Invasion
"Oxydative state" -> Invasion
"Tumor-derived angiogenesis factors" -> Angiogenesis
"Vessel cooption" -> Angiogenesis
"Vessel cooption" -> Invasion
Angiogenesis -> "Expansion of tumor mass"
Hypoxia -> "Tumor-derived angiogenesis factors"
Invasion -> "Expansion of tumor mass"
Necrosis -> Hypoxia
}

```

9.3.2 Codes DAG TSP1 (Figure 22)

Model code :

```

dag {
bb="0,0,1,1"
"GLIOMA-NEURON SYNAPSE" [latent,pos="0.348,0.242"]
"IMMUNE TOLERANCE" [pos="0.338,0.696"]
"MATRIX INTERACTION" [latent,pos="0.672,0.246"]
"PATIENT SURVIVAL" [outcome,pos="0.550,0.888"]
"TUMOR DEVELOPMENT" [pos="0.548,0.694"]
"VEGF/FGF INHIBITION" [latent,pos="0.604,0.559"]
ANGIOGENESIS [pos="0.778,0.691"]
CD36 [pos="0.672,0.441"]
CD47 [pos="0.454,0.385"]
HYPOXIA [exposure,pos="0.724,0.051"]
INVASION [pos="0.389,0.533"]
TGFB [exposure,pos="0.283,0.054"]
TSP1 [pos="0.512,0.248"]
"GLIOMA-NEURON SYNAPSE" -> INVASION
"IMMUNE TOLERANCE" -> "TUMOR DEVELOPMENT"
"MATRIX INTERACTION" -> INVASION
"TUMOR DEVELOPMENT" -> "PATIENT SURVIVAL"
"VEGF/FGF INHIBITION" -> ANGIOGENESIS
ANGIOGENESIS -> "TUMOR DEVELOPMENT"
CD36 -> ANGIOGENESIS
CD47 -> INVASION
HYPOXIA -> ANGIOGENESIS
HYPOXIA -> TSP1
INVASION -> "TUMOR DEVELOPMENT"
TGFB -> "IMMUNE TOLERANCE"
TGFB -> TSP1
TSP1 -> "GLIOMA-NEURON SYNAPSE"
TSP1 -> "MATRIX INTERACTION"
TSP1 -> "VEGF/FGF INHIBITION"
TSP1 -> CD36
TSP1 -> CD47
}

```

9.3.3 Analyse de régression du « Collider » $TGF\beta > TSP1 \leftarrow Hypoxie$, $TSP1$ -Survie utilisant la cohorte Glass (page 141)

A, l'analyse de régression sans fermeture des « portes arrière » (« *backdoors* »), B, l'analyse de régression après fermeture des « *backdoors* ».

A

```
result=noTSPmodel.fit()
print(result.summary())
```

Optimization terminated successfully.
Current function value: 0.640076
Iterations 5

Logit Regression Results

```
=====
```

Dep. Variable:	OS2	No. Observations:	139
Model:	Logit	Df Residuals:	136
Method:	MLE	Df Model:	2
Date:	Wed, 11 Sep 2024	Pseudo R-squ.:	0.06105
Time:	13:48:26	Log-Likelihood:	-88.971
converged:	True	LL-Null:	-94.755
Covariance Type:	nonrobust	LLR p-value:	0.003075

```
=====
```

	coef	std err	z	P> z	[0.025	0.975]
Intercept	2.2622	0.863	2.623	0.009	0.572	3.953
THBS1	0.0013	0.001	1.239	0.215	-0.001	0.003
age	-0.0496	0.016	-3.114	0.002	-0.081	-0.018

```
=====
```

B

```
else:
    TGFBIModel = smf.logit(formula = regString, data=dfToUse)
    #TGFBIModel = smf.logit(formula = '%s ~ %s + THBS1 + age'%(outcome, geneToStudy), data=dfToUse)
    #newModel = smf.ols(formula = 'survival_days ~ CD44_zscore + TSP_zscore + age_at_diagnosis', data=newDF)
    result2=TGFBIModel.fit()
    print(result2.summary())
```

Optimization terminated successfully.
Current function value: 0.622836
Iterations 5

Logit Regression Results

```
=====
```

Dep. Variable:	OS2	No. Observations:	139
Model:	Logit	Df Residuals:	134
Method:	MLE	Df Model:	4
Date:	Wed, 11 Sep 2024	Pseudo R-squ.:	0.08634
Time:	15:00:32	Log-Likelihood:	-86.574
converged:	True	LL-Null:	-94.755
Covariance Type:	nonrobust	LLR p-value:	0.002570

```
=====
```

	coef	std err	z	P> z	[0.025	0.975]
Intercept	3.1993	0.989	3.235	0.001	1.261	5.138
THBS1	0.0034	0.002	2.172	0.030	0.000	0.006
TGFBI	-0.0126	0.009	-1.443	0.149	-0.030	0.005
age	-0.0545	0.016	-3.332	0.001	-0.087	-0.022
HIF1A	-0.0020	0.001	-1.551	0.121	-0.004	0.001

```
=====
```

```
[133]: df[numpy.logical_and(df['idh'] != 'mutant', df['idh'] != 'wt')].shape
```

```
[133]: (177, 19)
```

```
[120]: transcripttpn=pd.read_csv('C:\\Users\\joe_s\\OneDrive\\G\\GLASS\\synapse\\transcript_tpn_matrix_all_samples.tsv', de
```

9.3.4 Script pour modélisation (Figure 32)

Pull down to show history

```
In [1]:
import numpy as np
from scipy.integrate import solve_ivp
import matplotlib.pyplot as plt
```

Idée générale du modèle:

- nombre fixe de cellules
- cellules saines (A) se font progressivement transformer B_soft (diffusion)
- cellules soft se transforment en compact ; processus réversible

L'importance est dans le rapport taux de diffusion / compaction

```
A -> B_soft      [diffusion_rate]
B_soft -> B_compact
B_compact -> B_soft
```

```
In [3]:
def f(t, y, rates):
    k = y*rates
    d_soft = k[0]
    d_comp = k[1] - k[2]
    return [-d_soft, d_soft - d_comp, d_comp]
```

```
In [73]:
def piecewise_solve(init, pattern, plot=True):
    t = np.array([0.])
    y = np.array([init]).T
    for m, d in pattern:
        t_eval = np.linspace(t[-1], t[-1]+d, 500 // len(pattern))
        sol = solve_ivp(f, (t[-1], t[-1]+d), y[:, -1], args=(mode[m],),
                        t_eval=t_eval)
        t = np.concat([t, sol.t])
        y = np.concat([y, sol.y], axis=1)
```

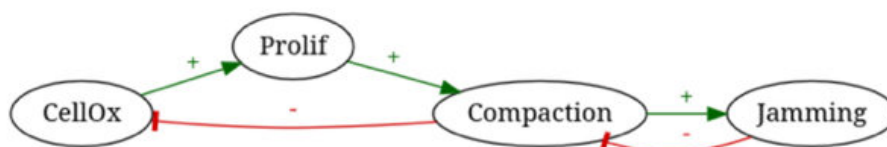
```
if plot:
    plt.plot(t, y.T)
    plt.legend(name)
else:
    return (t, y)
```

```
In [74]:
name = ['healthy', 'soft', 'compact']
init = np.array([100., 0., 0.])
mode = {
    1: np.array([2, 1, 0]),
    2: np.array([2, 0.1, 0.5]),
    3: np.array([0.5, 0.1, 0.5]),
}
```

9.3.5 Script pour modélisation (Figure 33)

```
from scipy.integrate import solve_ivp
import matplotlib.pyplot as plt
```

- cellules oxydatives
- => migration / invasion / diffusion + prolifération
- => compaction (changement métabolique, microglie),
- => croissance de la tumeur
- => (jamming/break down matrice) perte de densité à la périphérie (protéases : MMPs ; UPA)
- => facteurs de diffusions augmentent
- => cellules oxydatives



src

```
def f(t, y):
    CellOx, Prolif, Compaction, Jamming, Tumor = tuple(y)
    n = 3
    dCellOx = (0.1/(1+2*Compaction)) / (0.1+CellOx**2) - ( CellOx * ( Compaction**n / (2
    dProlif = CellOx*1.4 - Prolif
    dCompaction = Compaction * (Prolif/7 - 1.5*Jamming)
    #Prolif*(Prolif / (Prolif ** 2 +1)) / (0.5+Compaction**2) \
    #- Compaction*10*(Jamming**nJ / (2**nJ + Jamming**nJ))
    dJamming = Jamming * (Compaction**2 - 1.1)
    dTumour = Compaction/10
    return [dCellOx, dProlif, dCompaction, dJamming, dTumour]

names = ["CellOx", "Prolif", "Compaction", "Jamming", "Tumour size"]
t = 120
init = np.array([0,0,1e-5,1e-5,0])
sol = solve_ivp(f, (0, t), init, t_eval=np.linspace(0, t, 500))
plt.figure(figsize=plt.figaspect(0.5))
plt.plot(sol.t, sol.y.T[:, :4])
plt.legend(names);
```

9.3.6 Codes du DAG pour IL34 (Figure 44)

```

dag {
bb="0,0,1,1"
"Angiogenèse" [pos="0.724,0.534"]
"Métastase" [pos="0.588,0.643"]
"Survie des patients" [outcome,pos="0.597,0.805"]
CSFR1 [pos="0.377,0.348"]
IL34 [exposure,pos="0.368,0.185"]
Macrophages [pos="0.578,0.354"]
MphM2 [pos="0.473,0.546"]
"Angiogenèse" -> "Métastase"
"Métastase" -> "Survie des patients"
CSFR1 -> Macrophages
IL34 -> CSFR1
Macrophages -> "Angiogenèse"
Macrophages -> MphM2
MphM2 -> "Métastase"
}
  
```

9.4 Résumés détaillés de la thèse

Résumé en français détaillé

Cette thèse offre une analyse approfondie et interdisciplinaire de la notion de causalité dans le contexte de la biologie du cancer, en particulier en lien avec le microenvironnement tumoral (TME). Elle combine philosophie, modélisation mathématique et données expérimentales pour mieux comprendre les mécanismes complexes à l'œuvre dans le développement et la progression tumorale, en proposant des outils conceptuels et méthodologiques innovants pour la recherche biomédicale et clinique.

Introduction à la causalité en cancérologie

La causalité, longtemps controversée, est revisitée ici sous un double angle métaphysique et méthodologique, soulignant son rôle crucial pour modéliser les interactions complexes entre cellules tumorales et leur microenvironnement. L'étude vise à combler le fossé entre philosophie et biomédecine, en proposant notamment l'usage de diagrammes causaux pour formaliser ces relations.

Évolution des théories du cancer et complexité causale

L'histoire des théories du cancer révèle une alternance entre modèles centrés sur la cellule tumorale (mutation somatique) et ceux privilégiant le microenvironnement tumoral, incluant angiogenèse, matrice extracellulaire et immunité. La reconnaissance de la plasticité phénotypique et de l'hétérogénéité intra- et inter-tumorale a accru la complexité causale, nécessitant une approche intégrative et interdisciplinaire.

Les « Hallmarks » du cancer : synthèse et limites

Les travaux de Hanahan et Weinberg ont synthétisé les caractéristiques fondamentales du cancer en « Hallmarks », enrichis au fil du temps par des aspects métaboliques, immunitaires, épigénétiques et microbiens. Cependant, ces cadres restent souvent descriptifs et fragmentés, sans articulation claire des liens causaux ni intégration spatio-temporelle. La thèse propose une modélisation multi-échelle et l'emploi de modèles causaux formels pour dépasser ces limites.

Théories causales majeures : SMT vs TOFT

Deux cadres s'opposent : la théorie somatique mutationnelle (SMT), qui considère la mutation génétique comme cause première, et la théorie des champs d'organisation tissulaire (TOFT), qui attribue la cause initiale à la perturbation de l'architecture tissulaire. La réalité biologique requiert leur intégration, tenant compte des facteurs génétiques, cellulaires et micro-environnementaux. Une modélisation probabiliste formalisée illustre la variabilité causale selon le type tumoral et son microenvironnement.

Approche de la criticité auto-organisée (SOC)

Le concept de criticité auto-organisée est appliqué pour modéliser la transition d'un comportement cellulaire chaotique à une organisation collective coordonnée, via des réseaux et grilles représentant les interactions cellulaires. Malgré son intérêt heuristique, ce modèle reste difficile à quantifier expérimentalement.

Théories modernes de la causalité : revue et application

La thèse présente un panorama des théories modernes de la causalité, distinguant approches métaphysiques (régularité, contrefactuelle, singularité) et méthodologiques (interventionniste, probabiliste, inférence abductive, modèles graphiques). Chaque cadre est discuté quant à son applicabilité à la recherche sur le cancer, soulignant la complémentarité et les limites, notamment pour la complexité moléculaire et l'hétérogénéité des cas.

Concepts clés pour la causalité en cancer

Des propriétés essentielles sont mises en avant : pluralisme causal, granularité, hiérarchie, temporalité, stabilité, convergence et complémentarité causales. La distinction entre causes et conditions facilitatrices est cruciale, notamment pour interpréter les « Hallmarks ». Ces notions guident l'analyse causale dans le microenvironnement tumoral.

Analyse causale appliquée à deux prototypes tumoraux

Gliomes diffus (Prototype I)

Les gliomes diffus, divisés selon la classification moléculaire OMS 2021 en gliomes IDH-mutés et IDH sauvages (glioblastomes), présentent des profils biologiques et pronostiques distincts. L'étude utilise des graphiques acycliques dirigés (DAGs) et modèles par équations structurelles (SEM) pour formaliser les interactions complexes entre angiogenèse, invasion, immunité, métabolisme et profil moléculaire. Trois scénarios illustrent différentes dynamiques tumorales, mettant en lumière la notion de « fromage causal » où plusieurs facteurs nécessaires agissent conjointement selon des conditions INUS.

L'analyse du rôle de la thrombospondine-1 (TSP1) révèle son implication dans l'invasion tumorale via la voie TGF β /SMAD3 et l'interaction TSP1/CD47, validée expérimentalement. Un modèle causal formalisé intègre hypoxie, invasion, angiogenèse et tolérance immunitaire, avec coefficients modulables selon les scénarios prédominants.

Les gliomes IDH mutés, avec une progression plus lente et une angiogenèse faible, font l'objet d'une intégration multimodale (transcriptomique, protéomique, radiomique) pour identifier des signatures prédictives de récurrence. Plusieurs modèles causaux sont proposés pour expliquer la progression tumorale, illustrant la complexité des voies moléculaires impliquées.

Une modélisation réductionniste différencie les dynamiques des gliomes IDH WT, caractérisés par des cycles d'invasion et de compaction, des gliomes IDH mutés avec une phase dormante prolongée, modélisée par des processus stochastiques à deux états influencés par des facteurs internes et externes.

Carcinome rénal à cellules claires (Prototype II)

Le carcinome rénal, très métastatique, est dominé causalement par l'inactivation du gène VHL, qui stabilise les facteurs HIF1/2 et active des modules moléculaires liés à l'angiogenèse, au métabolisme, au stroma et à l'immunité. Ces modules forment des sous-réseaux causaux complexes et interdépendants, influencés par le microenvironnement tumoral.

Deux modèles probabilistes sont proposés : un modèle cumulatif d'effets indépendants et un modèle hiérarchique intégrant les dépendances conditionnelles entre modules, reflétant la complexité causale du RCC. L'interleukine-34 (IL34) est identifiée comme un facteur clé favorisant la migration des macrophages associés à la tumeur (MD-TAM) via le récepteur CSF1R, induisant immunosuppression et vascularisation dysfonctionnelle. Le blocage pharmacologique de cet axe améliore la réponse aux traitements standards. Un modèle causal formalisé par SEM explicite ces interactions et leur impact sur la survie.

Discussion méthodologique et implications cliniques

La thèse souligne la difficulté d'identifier des causes uniques dans des réseaux causaux multi-échelles et multi-facteurs. La modélisation causale via DAGs, SEM et approches bayésiennes permet d'évaluer la plausibilité et la dominance relative des mécanismes, bien que la validation expérimentale soit limitée par la complexité biologique *in vivo*. Les avancées technologiques, telles que les organoïdes multicellulaires, offrent des perspectives prometteuses.

Le raisonnement interventionniste woodwardien est particulièrement adapté à la recherche biomédicale pour tester effets directs et indirects. L'intégration systématique d'analyses causales dans les publications scientifiques est recommandée pour clarifier les relations et orienter la recherche. La thèse met également en lumière l'influence des facteurs sociétaux et industriels sur l'orientation de la recherche, illustrée par le déplacement du paradigme angiogénique vers l'immunitaire.

Sur le plan clinique, l'intégration des réseaux causaux au chevet du patient pourrait améliorer la médecine personnalisée, en facilitant la visualisation des effets thérapeutiques sur le TME et en renforçant le raisonnement contrefactuel dans les essais cliniques.

Conclusion

La causalité en cancérologie, notamment dans le microenvironnement tumoral, est un domaine complexe et sous-exploré. La coexistence de multiples causes nécessaires mais non suffisantes, la variabilité tumorale, et les influences externes rendent difficile la construction d'un modèle unifié. Cette thèse propose une démarche holistique combinant philosophie, modélisation et données expérimentales, ouvrant une voie originale pour mieux comprendre les interactions causales et orienter la recherche fondamentale et clinique en oncologie.

Extended English Summary

This thesis offers an in-depth and interdisciplinary analysis of the notion of causality in the context of cancer biology, particularly regarding the tumor microenvironment (TME). It combines philosophy, mathematical modeling, and experimental data to better understand the complex mechanisms at work in tumor development and progression, proposing innovative conceptual and methodological tools for biomedical and clinical research.

Introduction to Causality in Oncology

Causality, long a subject of debate, is revisited here from both metaphysical and methodological perspectives, highlighting its crucial role in modeling the complex interactions between tumor cells and their microenvironment. The study aims to bridge the gap between philosophy and biomedicine, notably by proposing the use of causal diagrams to formalize these relationships.

Evolution of Cancer Theories and Causal Complexity

The history of cancer theories reveals an alternating focus between cell-centered models (somatic mutation) and those giving priority to the tumor microenvironment, including angiogenesis, extracellular matrix, and immunity. Recognition of phenotypic plasticity and intra- and inter-tumoral heterogeneity has increased causal complexity, requiring an integrative and interdisciplinary approach.

The "Hallmarks" of Cancer : Synthesis and Limitations

The work of Hanahan and Weinberg synthesized the fundamental features of cancer into "Hallmarks", later enriched by metabolic, immune, epigenetic, and microbial aspects. However, these frameworks remain largely descriptive and fragmented, lacking clear articulation of causal links or spatio-temporal integration. The thesis proposes multi-scale modeling and the use of formal causal models to move beyond these limits.

Main Causal Theories: SMT vs. TOFT

Two main frameworks are contrasted: the Somatic Mutation Theory (SMT), which sees genetic mutation as the primary cause, and the Tissue Organization Field Theory (TOFT), which attributes the initial cause to disturbance of tissue architecture. Biological reality requires their integration, considering genetic, cellular, and microenvironmental factors. A formal probabilistic model illustrates causal variability according to tumor type and its environment.

Approach of Self-Organized Criticality (SOC)

The concept of self-organized criticality is applied to model the transition from chaotic cellular behavior to coordinated collective organization through networks and grids representing cellular interactions. While heuristically interesting, this model remains difficult to quantify experimentally.

Modern Theories of Causality: Review and Application

The thesis presents an overview of modern causality theories, distinguishing metaphysical approaches (regularity, counterfactual, singularist) from methodological ones (interventionist, probabilistic, abductive inference, graphical models). Each framework is discussed with regard to its applicability to cancer research, noting complementarity and limitations, especially for molecular complexity and case heterogeneity.

Key Concepts for Causality in Cancer

Essential properties are emphasized: causal pluralism, granularity, hierarchy, temporality, stability, convergence, and causal complementarity. The distinction between causes and facilitating conditions is crucial, especially for interpreting the "Hallmarks". These notions guide causal analysis in the tumor microenvironment.

Applied Causal Analysis to Two Tumor Prototypes

Diffuse Gliomas (Prototype I)

Diffuse gliomas, divided according to the 2021 WHO molecular classification into IDH-mutant and IDH-wildtype gliomas (glioblastomas), display distinct biological and prognostic profiles. The study uses

directed acyclic graphs (DAGs) and structural equation models (SEM) to formalize the complex interactions between angiogenesis, invasion, immunity, metabolism, and molecular profile. Three scenarios illustrate different tumor dynamics, highlighting the concept of the "causal pie," where several necessary factors act together according to INUS conditions.

The analysis of thrombospondin-1 (TSP1) highlights its role in tumor invasion via the TGF β /SMAD3 pathway and TSP1/CD47 interaction, validated experimentally. A formal causal model integrates hypoxia, invasion, angiogenesis, and immune tolerance, with modifiable coefficients depending on predominant scenarios.

IDH-mutant gliomas, with slower progression and weaker angiogenesis, are the subject of multimodal integration (transcriptomics, proteomics, radiomics) to identify predictive signatures of recurrence. Several causal models are proposed to explain tumor progression, illustrating the complexity of the molecular pathways involved.

A reductionist model distinguishes the dynamics of IDH-wildtype gliomas, characterized by cycles of invasion and compaction, from IDH-mutant gliomas with a prolonged dormant phase, modeled by two-state stochastic processes influenced by internal and external factors.

Clear Cell Renal Carcinoma (Prototype II)

Renal carcinoma, highly metastatic, is causally dominated by inactivation of the VHL gene, stabilizing HIF1/2 factors and activating molecular modules linked to angiogenesis, metabolism, stroma, and immunity. These modules form complex and interdependent causal sub-networks, influenced by the tumor microenvironment.

Two probabilistic models are proposed: a cumulative model of independent effects and a hierarchical model integrating conditional dependencies between modules, reflecting the causal complexity of RCC. Interleukin-34 (IL34) is identified as a key factor promoting the migration of tumor-associated macrophages (MD-TAM) via the CSF1R receptor, inducing immunosuppression and dysfunctional vascularization. Pharmacological blockade of this axis improves response to standard treatments. A formal causal model, structured by SEM, details these interactions and their impact on survival.

Methodological Discussion and Clinical Implications

The thesis highlights the difficulty of identifying unique causes in multi-scale, multi-factorial causal networks. Causal modeling via DAGs, SEM, and Bayesian approaches allows evaluation of plausibility and relative dominance of mechanisms, though experimental validation is limited by *in vivo* biological complexity. Technological advances, such as multicellular organoids, offer promising perspectives.

The Woodwardian interventionist approach is particularly suited to biomedical research for testing direct and indirect effects. Systematic integration of causal analyses in scientific publications is recommended to clarify relationships and guide research. The thesis also highlights the influence of societal and industrial factors on research direction, illustrated by the shift from angiogenic to immune paradigms.

Clinically, integrating causal networks at the patient bedside could improve personalized medicine by facilitating visualization of therapeutic effects on the TME and strengthening counterfactual reasoning in clinical trials.

Conclusion

Causality in oncology, particularly in the tumor microenvironment, is a complex and underexplored field. The coexistence of multiple necessary but insufficient causes, tumor variability, and external influences make it difficult to build a unified model. This thesis proposes a holistic approach combining philosophy, modeling, and experimental data, opening an original path for better understanding causal interactions and guiding fundamental and clinical oncology research.

9.5 Index thématique de la thèse

A. Concepts fondamentaux

- Causalité : Approche philosophique et modélisation des relations causales en oncologie ; distinction de différentes propriétés de la causalité pouvant être utile pour la biomédecine : domination causale, réductionnisme, exclusion causale, causes nécessaires, causes suffisantes, condition INUS, réductionnisme causal, effets indirects etc.
- Microenvironnement tumoral (TME) : Rôle du stroma, de l'immunité, et des interactions cellule-cellule dans la progression tumorale.
- Réseaux multi-échelles : Organisation et interactions entre modules moléculaires, cellulaires et tissulaires ; intégration des facteurs internes et externes.

B. Modèles et approches

- DAG (« *Directed Acyclic Graphs* ») : Représentation graphique des dépendances causales.
- Modèles bayésiens : Analyse des mécanismes dominants et de la plausibilité causale dans des réseaux complexes.
- Modèles probabilistes : Modélisation cumulative et hiérarchique des effets moléculaires et phénotypique dans le gliome et le carcinome rénal.
- Modèles réductionnistes : Réduction à deux variables (diffusion, compaction). Différenciation des dynamiques tumorales selon le statut mutationnel (IDH, VHL).
- SCEM (« *Situation-specific causal model* ») : SCEM tient compte du facteur temps et peut s'appliquer à la causalité du cas unique.
- SEM (« *Structural Equation Modeling* ») : Modélisation formelle des interactions et évaluation de leur impact sur la survie.

C. Facteurs moléculaires

- CSF1R (« *Colony Stimulating Factor 1 Receptor* ») : Récepteur clé dans l'axe immuno-suppresseur et la vascularisation. Exprimé dans les cellules immunitaires notamment monocytes et macrophages.
- DLL4 (« *delta like canonical Notch ligand 4* ») : Régulateur avec Notch de l'angiogenèse (facteur important pour la formation des bourgeons vasculaires).
- FGF (*Fibroblast growth factor*) : Facteur morphogénique principal des tissus. Induit aussi la formation de nouveaux vaisseaux.
- HIF1/2 (« *Hypoxia-Inducible Factors* ») : Stabilisation des modules moléculaires.
- IDH (*Isocitrate Dehydrogenase*) : Mutation et impact sur le comportement tumoral.
- IL34 (Interleukine-34) : Promotion de la migration des macrophages associés aux tumeurs (MD-TAM).
- Notch1 (« *Neurogenic locus notch homolog protein1* ») : Régulateur avec DLL4 de l'angiogenèse
- VEGF (« *Vascular endothelial growth factor* ») : Inducteur de la formation de nouveaux vaisseaux.
- VHL (Von Hippel-Lindau) : Inactivation et conséquences sur l'angiogenèse tumorale. (Facteur important pour la formation des bourgeons vasculaires).

D. Méthodologies expérimentales

- Analyse de l'expression : Consultation des bases de données d'expression de gènes et protéines (transcriptome, protéome).
- Organoïdes multicellulaires : Nouvelles technologies pour la validation expérimentale des modèles causaux.

- Tests *in vitro* sur culture cellulaire : Réductionniste. Limites pour une compréhension holistiques de la causalité.
- Validation *in vivo* : Limites de l'expérimentation biologique et défis de la traduction des résultats.

E. Approches philosophiques

- Causalité de singularité : Théorie philosophique qui justifie l'approche mécanistique (moléculaire, physicaliste)
- Causalité dépendante du temps : SCEM de Cartwright et causalité de Granger.
- Causalité du cas unique (Cartwright) : Difficultés de justification à partir du raisonnement contrefactuel.
- Interventionnisme woodwardien : Test des effets directs et indirects dans la recherche biomédicale.
- « Mark transmission » : Théorie développée par Wesley Salmon qui suppose que les processus causaux peuvent transmettre une « marque » dans l'espace et le temps à la suite de l'interaction causale.
- Raisonnement contrefactuel : Utilisation pour l'interprétation de la causalité dans le domaine biomédical.
- RWT, Thèse de Russo-Williamson : Distinction entre deux aspects de la causalité : « *difference making* » et « production ». Ceci est particulièrement important pour des questions de causalité dans le domaine biomédicale.

F. Implications cliniques

- Essais cliniques : Amélioration du raisonnement contrefactuel et de la visualisation des effets du TME.
- Intégration des réseaux causaux : Application pratique potentielle au chevet du patient et impact sur la prise de décision.
- Médecine personnalisée : Intégration des réseaux causaux pour la stratification des patients et l'optimisation thérapeutique.

G. Facteurs sociétaux et industriels

- Influence sur la recherche : Poids des choix industriels et sociétaux dans l'orientation des études et la publication des résultats.
- Paradigmes angiogéniques vs immunitaires : Évolution des axes de recherche en fonction des avancées scientifiques et des politiques de financement.