



**HAL**  
open science

# Mécanismes de résistance à la chimiothérapie dans les gliomes de haut grade de l'enfant : implications des systèmes de réparation de l'ADN et de l'hypoxie intra-tumorale

Aurélia Nguyen

► **To cite this version:**

Aurélia Nguyen. Mécanismes de résistance à la chimiothérapie dans les gliomes de haut grade de l'enfant : implications des systèmes de réparation de l'ADN et de l'hypoxie intra-tumorale. Cancer. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ086 . tel-01239221

**HAL Id: tel-01239221**

**<https://theses.hal.science/tel-01239221>**

Submitted on 7 Dec 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ÉCOLE DOCTORALE 414**

**Unité de recherche : EA 3430**

Progression tumorale et microenvironnement  
Approches translationnelles et épidémiologie

# THÈSE

présentée par

**Aurélia Nguyen**

Pour obtenir le **grade de Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Soutenue le 22 septembre 2014

## **Mécanismes de résistance à la chimiothérapie dans les gliomes de haut grade de l'enfant : Implications des systèmes de réparation de l'ADN et de l'hypoxie intra-tumorale**

**Docteur Sophie Pinel**  
**Professeur Jacques Grill**  
**Docteur Pascale Varlet**  
**Professeur Vincent Laugel**  
**Professeur Natacha Entz-Werlé**

Président du Jury, MCU, Université H. Poincaré, Nancy  
Rapporteur, MD, PHD, Institut Gustave Roussy  
Rapporteur, MD, PHD, Clinique Sainte-Anne  
Examineur, PU-PH, Université de Strasbourg  
Directeur de thèse, PU-PH, Université de Strasbourg

*A la mémoire de monsieur le professeur Pierre Kehrl*

*Sans lequel ce travail n'aurait pu voir le jour*

# Remerciements

*Je remercie vivement les membres du jury, le Professeur Jacques Grill, le Docteur Pascale Varlet, le Professeur Vincent Laugel, le Docteur Sophie Pinel pour avoir accepté d'être membres de mon jury de doctorat et de consacrer une partie de leur temps pour la lecture et l'appréciation de ce travail.*

*Je remercie le Professeur Natacha Entz-Werlé pour m'avoir encadrée et soutenue pendant ma thèse et fait découvrir le monde passionnant de la recherche en oncologie pédiatrique.*

*Je remercie mon maître le Professeur Patrick Lutz, pour m'avoir permis de poursuivre cette folle aventure scientifique.*

*Je remercie très sincèrement le Docteur Marie-Pierre Gaub, le Professeur Michèle Beau-Faller, le Docteur Dominique Guenot et le Docteur Erwan Pencreach, pour la transmission de leur savoir scientifique (qui est grand !!!) et surtout pour la gentillesse et la grande humanité avec laquelle ils m'ont soutenue. Merci Erwan, tu as été pour moi une véritable source d'inspiration scientifique ! Merci Michèle, ma chère co-bureau, qui m'a beaucoup écoutée (!) et soutenue. Merci Dominique et Marie-Pierre, vous aurez été là jusqu'au bout pour me soutenir et prendre les bonnes décisions !*

*Merci Michèle Legrain pour ta disponibilité, tes conseils et ton intelligence. C'était super de travailler avec toi sur la méthylation !*

*Merci à Anne Schneider, Anne-Claire Voegeli et à Eric Guérin ainsi qu'à toute l'équipe de Biologie Moléculaire auprès de laquelle j'ai trouvé une aide précieuse. Une pensée particulière aux techniciennes de biologie moléculaire : Isabelle Keller, Geneviève Hetzel et Véronique Kusaibi qui ont beaucoup contribué à ce travail.*

*Merci à tous les membres de l'EA3430 : Damien Reita (merci pour tes conseils de geek et ton amitié !), Pierre Coliat (merci pour tes conseils scientifiques avisés), Marie Litzler, Audrey Groh et Cyril Bour, vous êtes une super équipe !!*

*Merci à « ma » Christelle Lasthaus, véritable amie et compagne de toujours. Merci de m'avoir fait partager tes compétences, tu es une petite magicienne de la recherche !*

*Merci à Viviane Lobstein, « ma » technicienne préférée, dont l'investissement personnel et les grandes compétences ont été déterminantes pour la réalisation de cette thèse.*

*Je remercie également l'ensemble des personnes de l'unité INSERM qui m'ont permis de travailler dans de bonnes conditions ainsi que l'ensemble de l'équipe d'anatomie pathologique et du CRB, particulièrement sympathique et compétente.*

*Merci à François-Marie Moussalieh, sa grande disponibilité et ses compétences en métabolomique.*

*Merci à Alexander-Sacha Timofeev, madame Albarello et l'ensemble de l'équipe de neurochirurgie hyper-motivée, qui nous permet de poursuivre nos recherches.*

*Je n'oublie pas bien sûr mes chers parents et leur soutien indéfectible et mes amies (Nono, Marie-Pierre, Ariane, celles de la nuit des temps Val, Camille, Isa, Anne, Katou), toujours à l'écoute, qui m'ont entourée de leur affection et de leur gentillesse.*



# Table des matières

Remerciements.....	3
Table des matières.....	6
Liste des tableaux.....	9
Liste des figures.....	10
Abréviations / Acronymes.....	13
<b>Introduction.....</b>	<b>16</b>
<b>I Les gliomes malins de l'enfant et de l'adulte .....</b>	<b>17</b>
I.A Système nerveux central normal : Rappels anatomiques et histologiques.....	17
I.A.1 Anatomie du système nerveux central (SNC).....	17
I.A.2 Rappels histologiques .....	23
I.A.3 Développement du système nerveux central.....	27
I.B Classification histologique et épidémiologie .....	31
I.B.1 La classification OMS .....	31
I.B.2 Epidémiologie et pronostic.....	35
I.B.3 Les particularités des tumeurs gliales malignes pédiatriques.....	35
I.C Classification moléculaire .....	40
I.C.1 Altérations génétiques .....	40
I.C.2 Altérations épigénétiques .....	50
I.C.3 Stratification moléculaire des glioblastomes.....	56
I.C.4 Stratification moléculaire des gliomes anaplasiques de l'adulte.....	62
I.C.5 La gliomagenèse et la théorie des cellules souches.....	64
I.D Modèles précliniques .....	66
I.D.1 Modèles cellulaires .....	66
I.D.2 Nouveaux modèles in vitro « in vivo-like ».....	72
I.D.3 Modèles in vivo : les xénogreffes .....	73
I.E Traitements des gliomes de haut grade pédiatriques.....	76
I.E.1 Les traitements de première ligne.....	76
I.E.2 Thérapies ciblées .....	81
<b>II Les mécanismes de chimio-résistance dans les gliomes pédiatriques .....</b>	<b>84</b>
II.A Modulation de la réponse aux agents alkylants par les systèmes de réparation de l'ADN.....	84
II.A.1 Vue générale sur les mécanismes de réparation des lésions faites à l'ADN .....	84

II.A.2	Mécanismes d'action des agents alkylants .....	87
II.A.3	MGMT (O6 MéthylGuanine-DNA Méthyl-Transférase).....	92
II.A.4	Le système MMR (MisMatch repair) .....	98
II.A.5	Statut de MGMT, du système MMR et de TP53 dans les gliomes malins pédiatriques .....	100
II.A.6	Le système de réparation par excision des bases ou BER .....	101
II.A.7	Le système de réparation par recombinaison homologue et le principe de létalité synthétique .....	103
II.B	Hypoxie Intra-tumorale, Facteurs HIFs et Résistance aux Traitements .....	106
II.B.1	L'hypoxie, une caractéristique du microenvironnement tumoral des GBM.....	106
II.B.2	Hypoxie et résistance aux traitements.....	137
III	Objectifs.....	156
	<b>Résultats</b> .....	157
IV	Exploration des mécanismes de réparation de l'ADN .....	159
IV.A	Hypothèse :.....	159
IV.B	Matériels et Méthodes: .....	160
IV.C	Résultats .....	161
IV.D	Conclusion et perspectives:.....	163
V	Développement de modèles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	166
V.A	Rationnel.....	166
V.B	Objectifs.....	166
V.C	Méthodologie .....	167
V.C.1	Les plateformes d'oncobiologie et de recherche préclinique à Strasbourg .....	167
V.C.2	Les collaborations .....	167
V.C.3	La cohorte de patients pédiatriques .....	169
V.C.4	La stratégie.....	169
V.D	Résultats .....	171
V.D.1	Patients inclus .....	171
V.D.2	Lignées cellulaires développées .....	172
V.D.3	Modèles de xénogreffes.....	176
V.E	Perspectives.....	177
VI	Exploration et ciblage de l'axe mTOR-HIF-1 $\alpha$ dans les gliomes malins pédiatriques.....	179
VI.A	Rationel .....	179



VI.B Résultats .....	181
VI.C Conclusion et perspectives .....	183
<b>Conclusion</b> .....	<b>184</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>188</b>
Résumé .....	230
Résumé en anglais.....	230

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Classification OMS 2007 des gliomes et des tumeurs neuro-gliales.....	32
<b>Tableau 2</b> : Classification OMS des astrocytomes diffus.....	33
<b>Tableau 3</b> : Classification OMS des oligodendrogliomes et gliomes mixtes.....	34
<b>Tableau 4</b> : Altérations génomiques récurrentes dans les glioblastomes de l'adulte comparées à celles des gliomes malins pédiatriques .....	48
<b>Tableau 5</b> : Principales thérapies ciblées testées en monothérapie chez l'enfant et l'adulte .....	82
<b>Tableau 6</b> : Caractéristiques cliniques des patients et des lignées cellulaires et/ou xénotreffes dérivées directement des tumeurs initiales de ces patients. ....	171

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Vue latérale du cerveau .....	18
<b>Figure 2</b> : Coupe sagittale médiane du cerveau .....	18
<b>Figure 3</b> : Structure de la moelle épinière.....	21
<b>Figure 4</b> : Protection du système nerveux central .....	21
<b>Figure 5</b> : Aspects histologiques des cellules du tissu nerveux.....	25
<b>Figure 6</b> : Barrière hémato-encéphalique .....	26
<b>Figure 7</b> : Développement du système nerveux central .....	27
<b>Figure 8</b> : Neurogenèse dans le cerveau adulte.....	30
<b>Figure 9</b> : Caractéristiques histologiques et radiologiques des gliomes malins de l'adulte .....	34
<b>Figure 10</b> : Incidence relative des tumeurs cérébrales de l'enfant et de l'adolescent .....	36
<b>Figure 11</b> : Incidence moyenne par âge des gliomes .....	37
<b>Figure 12</b> : Entités anatomo-cliniques des gliomes .....	39
<b>Figure 13</b> : Principales voies altérées dans le glioblastome adulte .....	42
<b>Figure 14</b> : Les mécanismes assurant la maintenance des télomères dans les gliomes .....	54
<b>Figure 15</b> : Relations entre génome et épigénome dans le glioblastome.....	56
<b>Figure 16</b> : Résumé des 6 sous-groupes de glioblastomes avec leurs caractéristiques moléculaires corrélées à l'âge (Sturm et al., 2014 ; Brennan et al., 2013) .....	58
<b>Figure 17</b> : Répartition des anomalies moléculaires en fonction de la localisation intracérébrale et de l'impact pronostique .....	59
<b>Figure 18</b> : Activation de la voie PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MEK/ERK dans les glioblastomes de l'adulte (groupe mésenchymal versus pro-neural) .....	61
<b>Figure 19</b> : Proposition d'une nouvelle classification des gliomes anaplasiques de l'adulte .....	63
<b>Figure 20</b> : Caractérisation moléculaire de la lignée KNS42 .....	68
<b>Figure 21</b> : Caractérisation moléculaire de la lignée SF188 .....	69
<b>Figure 22</b> : Caractérisation moléculaire de la lignée UW479.....	70

<b>Figure 23</b> : Taux de réponse objective aux chimiothérapies conventionnelles des gliomes malins.....	80
<b>Figure 24</b> : Options thérapeutiques selon le statut IDH1, MGMT et 1p19q .....	81
<b>Figure 25</b> : Les différentes lésions induites par les agents génotoxiques sur l'ADN et les systèmes de réparation impliqués dans leur réparation. ....	87
<b>Figure 26</b> : Sites de substitution nucléophile préférentiels des agents méthylants et chloroéthylants sur les bases de l'ADN. ....	91
<b>Figure 27</b> : Schéma résumant les mécanismes de réparation après action du témozolomide. ....	92
<b>Figure 28</b> : Techniques basées sur la PCR spécifique de méthylation .....	96
<b>Figure 29</b> : Pyroséquençage.....	96
<b>Figure 30</b> : Système de réparation par recombinaison homologue (HR) .....	105
<b>Figure 31</b> : Exemple de vascularisation tumorale anormale de tumeurs humaines xénogreffées chez la souris NOD/SCID .....	109
<b>Figure 32</b> : Structure des facteurs HIFs (Hypoxia Inducible Factors).....	111
<b>Figure 33</b> : Dégradation de HIF-1 $\alpha$ par la voie du pVHL-protéasome .....	114
<b>Figure 34</b> : Rôle des voies de signalisation oncogénique PI3K/AKT/mTOR et RAS/MAPK dans la régulation traductionnelle de HIF-1 $\alpha$ .....	116
<b>Figure 35</b> : Rôle des HIFs dans la stabilisation du complexe MYC-MAX .....	119
<b>Figure 36</b> : Régulation de mTOR par l'hypoxie.....	123
<b>Figure 37</b> : Effet Warburg médié par HIF-1 .....	124
<b>Figure 38</b> : Rôle de HIF-1 dans la régulation de l'angiogenèse et de la vasculogenèse .....	127
<b>Figure 39</b> : Rôle de HIF-1 dans la dissémination métastatique des tumeurs solides .....	128
<b>Figure 40</b> : Les structures secondaires de Scherer et le rôle de l'axe CXCL12/CXCR4 .....	134
<b>Figure 41</b> : Fenêtre de normalisation vasculaire.....	146
<b>Figure 42</b> : Progression chez un patient traité par bevacizumab.....	147
<b>Figure 43</b> : Les 6 mécanismes impliqués dans la vascularisation tumorale et la résistance aux anti-VEGF(R) .....	148
<b>Figure 44</b> : Rôle de la TOP1 pendant la transcription.....	151
<b>Figure 45</b> : Voie de signalisation mTOR .....	152

<b>Figure 46</b> : Boucle de feedback control négatif sur mTORC2 et IRS1 .....	155
<b>Figure 47</b> : Programme de médecine personnalisée à Strasbourg, appliqué aux tumeurs cérébrales pédiatriques .....	168
<b>Figure 48</b> : Immunomarquage réalisé sur les deux lignées TC46 et TC35 .....	173
<b>Figure 49</b> : Immunomarquage réalisé sur TC35.....	173
<b>Figure 50</b> : Caractérisation de TC35 .....	174
<b>Figure 51</b> : Aspects morphologiques de TC68 .....	175
<b>Figure 52</b> : Prolifération de TC68 à 21% d'oxygène.....	176

## Abréviations / Acronymes

**AKT** : v-akt murine thymoma viral oncogene homolog  
**ALT** : Alternative lengthening telomere maintenance  
**AMPK** : AMP-activated protein kinase  
**ANGPT1/2** : angiopoietin 1/2  
**AOD** : anaplastic oligodendroglioma (oligodendrogliome anaplasique)  
**APE1** : apurinic/aprimidinic endonuclease 1  
**ATRX** : alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked  
**BER** : Base excision repair  
**BNIP3** : BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3  
**BRCA1/2** : breast cancer 1/2, early onset  
**CA9** : carbonic anhydrase IX  
**CCND2** : cyclin D2  
**CDK4** : cyclin-dependent kinase 4  
**CDKN2A** : cyclin-dependent kinase inhibitor 2A  
**CSN** : cellule souche neurale  
**CXCL12** (=SDF1) : chemokine (C-X-C motif) ligand 12  
**CXCR4** : chemokine (C-X-C motif) receptor 4  
**DAXX** : death-domain associated protein  
**DDIT4** (=REDD1) : DNA-damage-inducible transcript 4  
**DIPG** : Diffuse Intra-Pontic Glioma (gliome diffus du pont)  
**DNA polb** : polymerase (DNA directed), beta  
**DSB** : double strand break (cassure double brin)  
**EGF(R)** : Epidermal growth factor (receptor)  
**EIF4E** : eukaryotic translation initiation factor 4E  
**EPAS1** : endothelial PAS domain protein 1  
**ERK** : *Extracellular signal-regulated kinases*  
**EZH2** : enhancer of zeste homolog 2  
**FGF(R)** : Fibroblast growth factor (receptor)  
**G-CIMP** : Glioma-CpG Island Methylator Phenotype  
**GBM** : glioblastome  
**GFAP** : Glial fibrillary acidic protein (protéine acide fibrillaire gliale)

**HIF1A** : hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)

**HR** : homologous recombination (recombinaison homologue)

**IDH1** : isocitrate dehydrogenase 1

**IGF1R** : insulin-like growth factor 1 receptor

**LCR** : liquide céphalo-rachidien

**MAPK** : mitogen-activated protein kinase

**MDM2** : MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase

**MEK** : Mitogen/Extracellular signal-regulated Kinase.

**MET** : met proto-oncogene

**MGMT** : O6-methylguanine-DNA-methyltransférase

**MLH1** : mutL homolog 1

**MMR** : Mismatch Repair

**MNK** : MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase)-Interacting Kinase

**MPG** : N-methylpurine-DNA glycosylase

**MSH2/6** : mutS homolog 2/6

**mTORC1/2** : mammalian Target of Rapamycin complex

**MYC** : v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

**MYCN** : v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog

**NHEJ** : non-homologous end joining

**NER** : Nucleotide excision repair

**NFKB** : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells

**NF1** : neurofibromin 1

**NOD/SCID** : Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**OPC** : oligodendroglial progenitor cell (progéniteur oligodendroglial)

**PARG** : poly (ADP-ribose) glycohydrolase

**PARP** : poly (ADP-ribose) polymerase

**PDGFRA** : Platelet-derived growth d-factor receptor alpha

**PIK3CA** : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha

**PMG** : pediatric malignant glioma (gliome malin pédiatrique)

**PMS2** : Postmeiotic Segregation Increased 2

**PTEN** : phosphatase and tensin homolog  
**RAF1** : v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1  
**RAPTOR** : regulatory associated protein of MTOR, complex 1  
**RAS** : rat sarcoma viral oncogene homolog  
**RB** : retinoblastoma gene  
**RICTOR** : RPTOR independent companion of MTOR, complex 2  
**ROS** : réactifs dérivés de l'oxygène  
**RTK** : récepteur à activité tyrosine kinase  
**S6K1** : ribosomal protein S6 kinase, 70kDa  
**S6RP** : S6 ribosomal protein  
**SLC2A1** : Solute Carrier Family 2 (Facilitated Glucose Transporter), Member 1 (gène du transporteur du glucose GLUT1)  
**SETD2** : SET domain containing 2  
**SGZ** : zone sous-granulaire  
**SNC** : système nerveux central  
**SSB** : single strand break (cassure simple brin)  
**SVZ** : zone sous-ventriculaire  
**TERT** : telomerase reverse transcriptase  
**TMZ** : temozolomide  
**TSC1/2** : tuberous sclerosis 1/2  
**VEGF(R)** : vascular endothelial growth factor (receptor)  
**XRCC1** : X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1  
**4EBP1** : eIF4E-binding protein 1



# Introduction

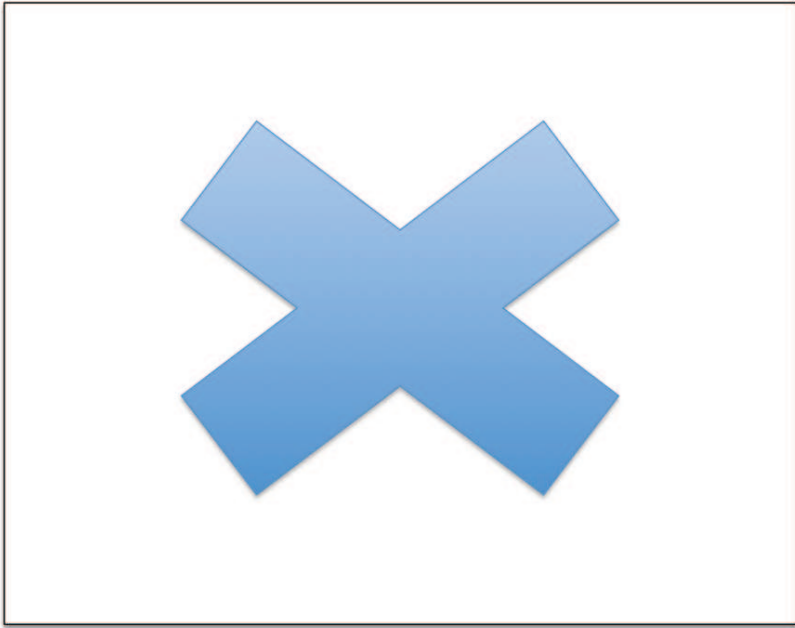
# I Les gliomes malins de l'enfant et de l'adulte

Les tumeurs du système nerveux central représentent 25% des tumeurs de l'enfant de moins de 15 ans et sont donc les tumeurs solides les plus fréquentes en pédiatrie. Elles représentent également 10% des tumeurs de l'adolescent et du jeune adulte de moins de 25 ans et seulement 1 à 2% des tumeurs de l'adulte (Arora et al., 2009). Ces tumeurs représentent la première cause de mortalité par cancer chez le patient de moins de 15 ans (Birch et al., 2002; Geraci et al., 2007). Parmi ce groupe hétérogène de tumeurs sur le plan histologique, un sous-type représenté par les gliomes de haut grade (grade III et IV de l'OMS) est de pronostic particulièrement sombre avec une médiane de survie de 12 mois pour la plupart des patients (Louis et al., 2007). Les gliomes de haut grade pédiatriques même s'ils ressemblent morphologiquement à ceux de l'adulte sur le plan histologique, diffèrent de ces derniers sur le plan clinique comme sur le plan biologique. Ainsi, l'oncogenèse et les mécanismes de résistance aux traitements de ces gliomes pédiatriques de haut grade sont différents de ceux des adultes.

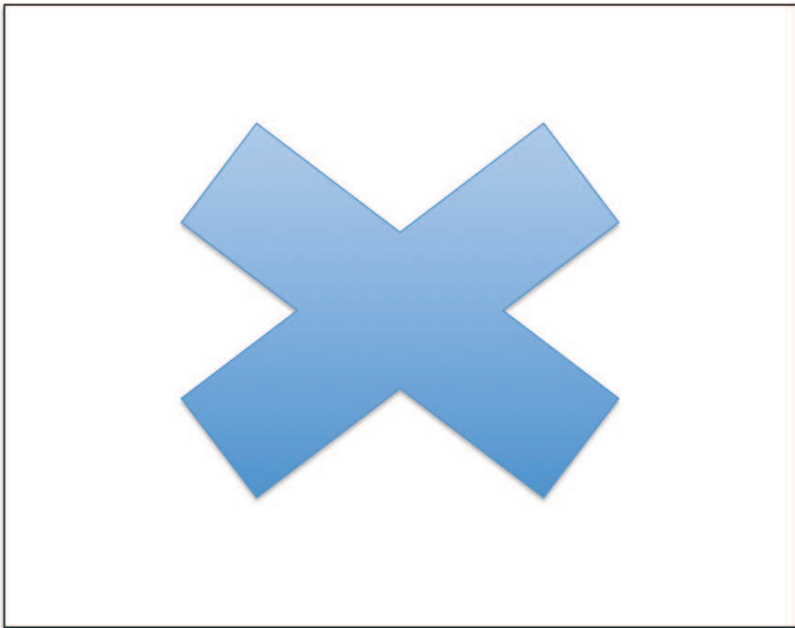
## I.A Système nerveux central normal : Rappels anatomiques et histologiques

### I.A.1 Anatomie du système nerveux central (SNC)

Le système nerveux des vertébrés se compose d'un **système nerveux central (encéphale et moelle épinière)**, d'un système nerveux périphérique (ensemble des nerfs de la tête, du tronc et des membres) et d'un système nerveux végétatif ou autonome (assurant l'innervation des viscères, vaisseaux et glandes). Le système nerveux central (SNC) permet l'intégration et le traitement des informations sensorielles véhiculées par les nerfs périphériques et végétatifs, le mouvement volontaire et la perception consciente.



**Figure 1** : Vue latérale du cerveau



**Figure 2** : Coupe sagittale médiane du cerveau

## I.A.1.1 Les régions de l'encéphale

L'encéphale ou cerveau peut être régionalisé en opposant les structures dites médianes aux structures hémisphériques ou les structures sus versus sous-tentorielles définies par rapport à la tente du cervelet (D'après Anatomie et Physiologie humaine de Marieb, 1993).

### I.A.1.1.1 Structures hémisphériques versus médianes:

L'encéphale se compose :

#### i) d'une structure bilatérale :

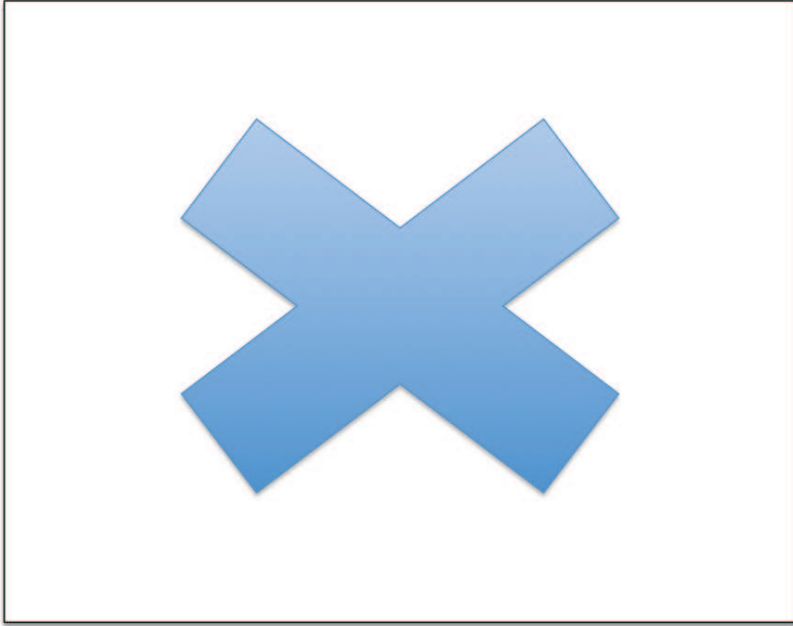
- le télencéphale, constitué par les deux **hémisphères cérébraux**, qui recouvrent le diencéphale et le sommet du tronc cérébral. La surface des hémisphères ou **cortex** est parcourue par des circonvolutions et des sillons. Les sillons séparent chaque hémisphère en 5 lobes (frontal, pariétal, occipital, temporal et insulaire). Le cortex se compose de substance grise et peut être subdivisé en **aires fonctionnelles** (sensitives, motrices ou associatives) qui permettent les principales fonctions cognitives supérieures. Sous le cortex, la substance blanche constituée de fibres axonales myélinisées, s'organise en faisceaux permettant une communication du cortex avec les autres aires corticales ou avec les centres sous-corticaux (ex : le corps calleux qui relie les deux hémisphères). Enfin, au cœur de la substance blanche de chaque hémisphère, on peut trouver un groupe de noyaux de substance grise sous-corticale, appelés **noyaux gris centraux** : le noyau caudé, le putamen et le pallidum, qui interviennent dans la régulation motrice.

#### ii) de structures dites médianes comprenant :

- le **diencéphale** situé entre les deux hémisphères, comprend le thalamus, l'hypothalamus et l'épithalamus. **Le thalamus** est formé de deux masses jumelles de substance grise regroupée en de nombreux noyaux symétriques aux fonctions spécifiques et joue un rôle essentiel dans la sensibilité, la motricité mais aussi la mémoire. **L'hypothalamus** couronne le tronc cérébral. Il représente le principal centre de régulation des fonctions physiologiques et

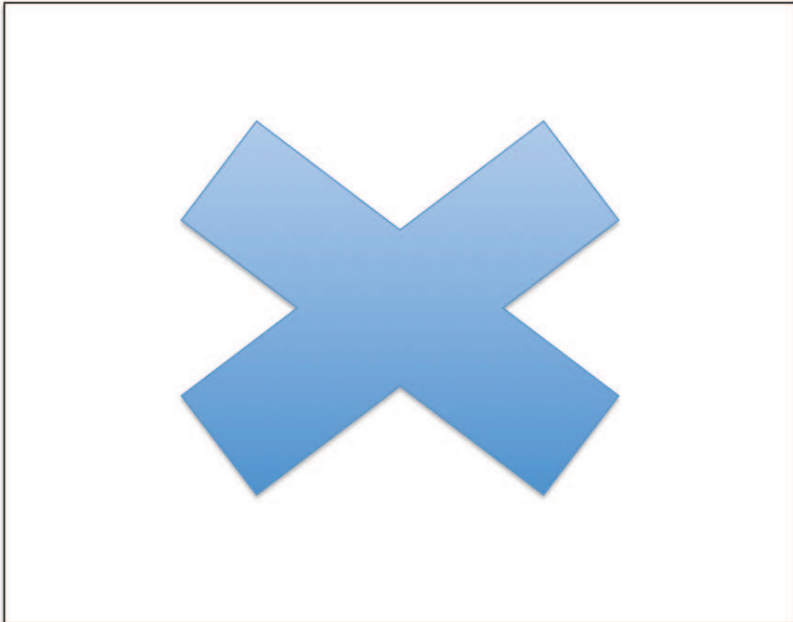
est essentiel au maintien de l'homéostasie de l'organisme. L'**epithalamus** contient la glande pinéale qui secrète la mélatonine.

- le **tronc cérébral** (situé sous le diencephale et prolongé par la moelle épinière). Celui-ci peut être subdivisé en trois parties : le bulbe rachidien dans le prolongement direct de la moelle épinière, le pont (ou protubérance) et le mésencéphale directement sous les structures diencephaliques. Le tronc cérébral est constitué de substance grise entourée de faisceaux de substance blanche. Il comprend la majorité des noyaux des nerfs crâniens et d'importants centres vitaux qui régulent les comportements automatiques nécessaires à la survie (vigilance, fréquence cardiaque, respiration, vasomotricité etc...) Le tronc cérébral est par ailleurs traversé par les principales voies sensitivo-motrices de l'organisme.
- le **cervelet** est composé de deux hémisphères cérébelleux latéraux et symétriques réunis par une structure médiane, le vermis. Le cervelet traite les informations sensorielles reçues de l'aire motrice, de divers noyaux du tronc cérébral, des récepteurs sensoriels proprioceptifs et des centres visuels et de l'équilibre, pour les retransmettre aux centres moteurs corticaux et sous-corticaux de manière à maintenir l'équilibre et la posture et à produire des mouvements coordonnés (Voir Figure 1 et 2).



**Figure 3 :** Structure de la moelle épinière

A : Visualisation de la moelle épinière sans le rachis B : Visualisation au sein du rachis. Comme le tronc cérébral, la **moelle épinière** est constituée d'une substance grise centrale entourée par des faisceaux de substance blanche. Elle est parcourue par les faisceaux sensitifs ascendants et les moteurs descendants reliant les centres supérieurs à leurs effecteurs ou récepteurs sensoriels périphériques. Elle est protégée par le rachis qui est constitué d'éléments vertébraux étagés. La moelle épinière donne naissance à des **nerfs périphériques**, les nerfs rachidiens, qui émergent à chaque segmentation de vertèbre



**Figure 4 :** Protection du système nerveux central

A : Système ventriculaire dans lequel circule le LCR ; B : 3 feuillets des méninges - le LCR circule dans l'espace sous-arachnoïdien - la glia limitans est une barrière formée par les pieds astrocytaires du tissu nerveux sous-jacent (cf : histologie)

### I.A.1.2 Structures sus et sous tentorielles

L'encéphale et la moelle épinière sont entourés et protégés par des structures osseuses : respectivement par la boîte crânienne et le rachis (ou colonne vertébrale). Situées sous les structures osseuses, **les méninges** cérébrales ou rachidiennes constituent l'enveloppe externe du SNC. Les méninges sont composées de 3 feuillets : la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère.

**La dure-mère** qui tapisse directement la face interne du crâne ou du rachis et constitue en même temps le périoste. Au niveau cérébral, elle donne naissance à des septums qui pénètrent loin dans la cavité crânienne comme la faux du cerveau inter-hémisphérique et la tente du cervelet. **La tente du cervelet** sépare la fosse postérieure occupée par le tronc cérébral et le cervelet, de l'étage dit sus-tentorial occupé par les hémisphères et le diencephale. Sa partie antérieure ménage un orifice qui permet la pénétration du tronc cérébral. La dure-mère renferme les grands sinus veineux du cerveau.

**L'arachnoïde**, sous la dure-mère, est séparée de cette dernière par une fente capillaire représentant l'espace sous-dural. L'arachnoïde délimite l'espace sous-arachnoïdien qui contient le liquide céphalo-rachidien (LCR).

**La pie-mère** recouvre directement le tissu nerveux et représente la membrane « porte-vaisseaux », à partir de laquelle sont projetés les vaisseaux (artères et veines) dans la profondeur du tissu nerveux.

Le SNC est de plus protégé par le LCR, qui a un rôle d'amortisseur mécanique aqueux mais aussi trophique et assure le transport et la circulation des neuro-hormones. Le SNC est donc entouré de toute part par le LCR qui circule entre un compartiment interne représenté par le système ventriculaire et le canal médullaire, et un compartiment externe délimité par les méninges. **Le système ventriculaire** est constitué de cavités situées au centre de l'encéphale, dans lesquelles circule le LCR. Dans la moelle épinière, cette cavité centrale est réduite à une simple lumière (le **canal médullaire**). A la hauteur du bulbe et du pont se trouve le IV<sup>e</sup> ventricule. Une portion très rétrécie dans la région mésencéphalique (aqueduc de Sylvius) réunit ce dernier au III<sup>e</sup> ventricule situé dans le diencephale. Les 2 trous de Monroe situés dans les parois latérales du III<sup>e</sup> ventricule au niveau du thalamus, donnent accès aux ventricules latéraux, qui représentent les I et II<sup>e</sup> ventricules creusés dans les hémisphères cérébraux (Voir Figure 2 et 4).

## **I.A.2 Rappels histologiques**

Le tissu nerveux se compose de cellules nerveuses (neurones), de cellules gliales (cellules de soutien et d'enveloppement) et de vaisseaux (D 'après l'Atlas d'histologie fonctionnelle de Weather, (Young, 2008)). Voir Figure 5.

### **I.A.2.1 Les neurones**

Les neurones sont des cellules hautement spécialisées et interconnectées, qui recueillent l'information qu'elles transforment afin de générer une réponse adaptée. Les neurones, hautement différenciés, ne se divisent plus et donc ne se renouvèlent pas en cas de mort cellulaire. Le neurone comprends un volumineux corps cellulaire (ou péricaryon) à partir duquel se développent deux types d'expansions : un axone unique et une ou plusieurs dendrites. Les dendrites sont le lieu de réception de l'influx nerveux. L'axone est un prolongement cylindrique, d'une longueur pouvant atteindre 1 mètre, se terminant par un bouton terminal qui fait synapse sur d'autres neurones et ainsi transmet l'influx nerveux. Les axones avec leur gaine de myéline sont communément appelés fibres nerveuses et représentent la substance blanche organisée en faisceaux. En général, les corps cellulaires des neurones sont situés dans le SNC et constituent la substance grise. Les neurones peuvent présenter diverses morphologies et s'organiser en différentes structures selon leur localisation corticale ou nucléaire.

### **I.A.2.2 La névroglie**

La névroglie est le tissu de soutien du système nerveux. Dans le SNC, elle comprend quatre types cellulaires principaux : les oligodendrocytes, les astrocytes, les cellules de la microglie et les cellules épendymaires. Le tissu nerveux central est dépourvu de tissu conjonctif collagène, ce dernier étant confiné au voisinage immédiat des vaisseaux et des méninges. La névroglie représente environ la moitié de la masse totale du SNC et occupe l'espace entre les neurones. Celle-ci entretient des relations fonctionnelles étroites avec les neurones en leur fournissant un support à la fois métabolique et structural.

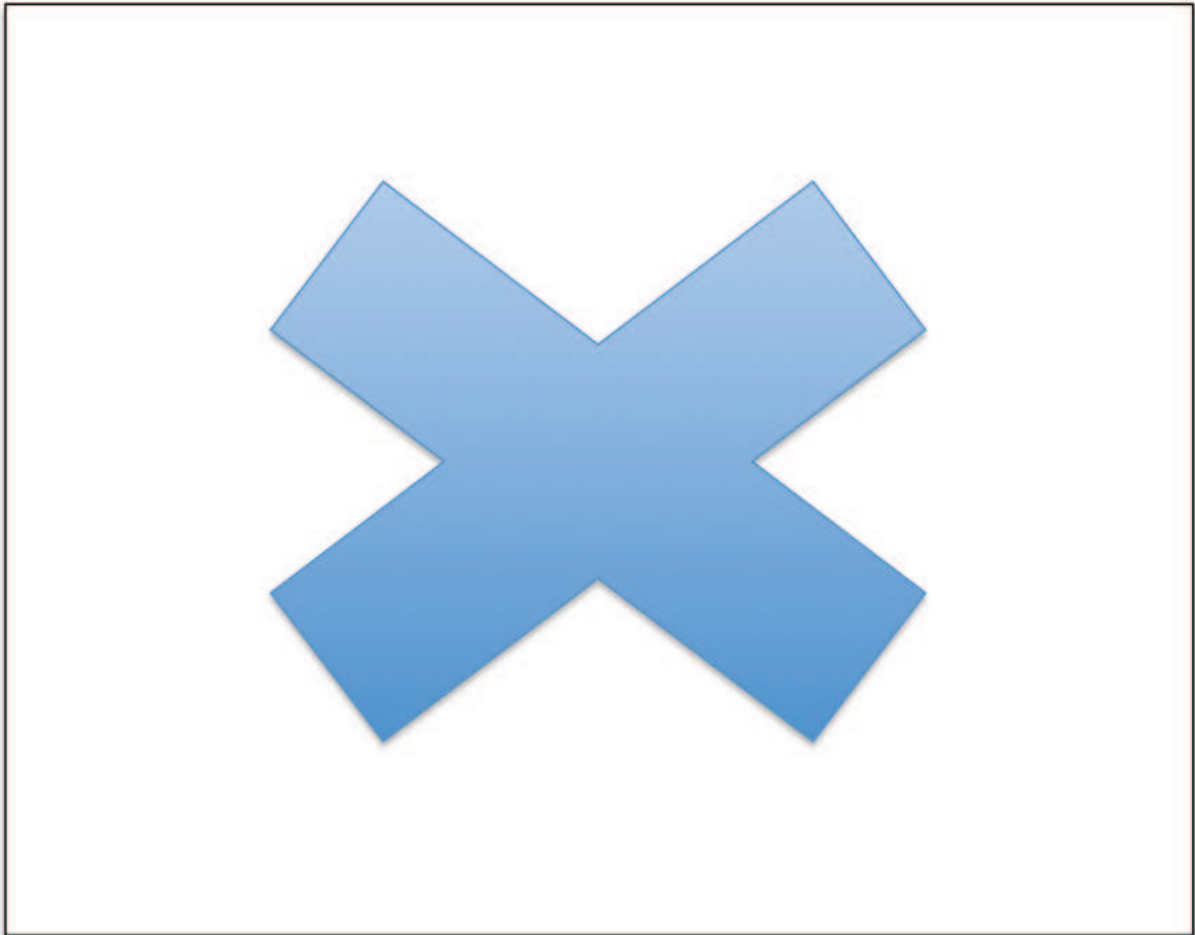


**Les oligodendrocytes** sont responsables de l'élaboration des gaines de myéline au niveau du SNC (alors que les cellules de Schwann sont leurs équivalents fonctionnels au niveau des nerfs périphériques). Les oligodendrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses de la substance blanche et sont également abondantes dans la substance grise. Les oligodendrocytes sont des cellules de taille relativement grande à chromatine dispersée et possèdent de courts prolongements. Un oligodendrocyte peut être responsable de la myélinisation de plus de 50 axones différents tandis qu'un axone peut être myélinisé par plusieurs oligodendrocytes. La gaine de myéline permet l'augmentation de la vitesse de conduction du potentiel d'action le long de l'axone et assure également un rôle trophique pour le neurone. La gaine de myéline, riche en lipides, apparaît blanche dans les tissus frais donnant ainsi son nom à la substance blanche.

**Les astrocytes** sont les cellules gliales les plus nombreuses de la substance grise et sont également présents dans la substance blanche. Ce sont des cellules très ramifiées, étoilées, qui occupent la majeure partie de l'espace inter-neuronal. Ils représentent un support mécanique tout en régulant les échanges de métabolites entre les neurones et le système vasculaire. De nombreux prolongements astrocytaires se terminent au contact des régions non synaptiques des neurones tandis que d'autres se terminent par des expansions sur les membranes basales des capillaires et représentent un des éléments de la barrière hémato-encéphalique. Des prolongements similaires s'observent entre le SNC et la pie-mère constituant la barrière du revêtement astrocytaire marginal. Les astrocytes contiennent des faisceaux de filaments intermédiaires constitués d'une protéine caractéristique : la protéine gliale fibrillaire acide (ou GFAP).

**Les cellules de la microglie** dérivent de cellules d'origine mésenchymateuse ayant migré vers le SNC à un stade tardif du développement fœtal. Celles-ci sont difficiles à observer sur des préparations standard de microscopie optique. Lors d'une lésion tissulaire, ces cellules se transforment en cellules phagocytaires et font donc partie du système de défense monocyte-macrophage du SNC.

**Les cellules épendymaires** forment un épithélium spécialisé revêtant les cavités ventriculaires et le canal médullaire. Contrairement aux autres épithéliums, celui-ci ne repose pas sur une membrane basale mais sur une couche constituée de prolongements astrocytaires. Il s'agit d'un épithélium cilié comportant également des microvillosités.



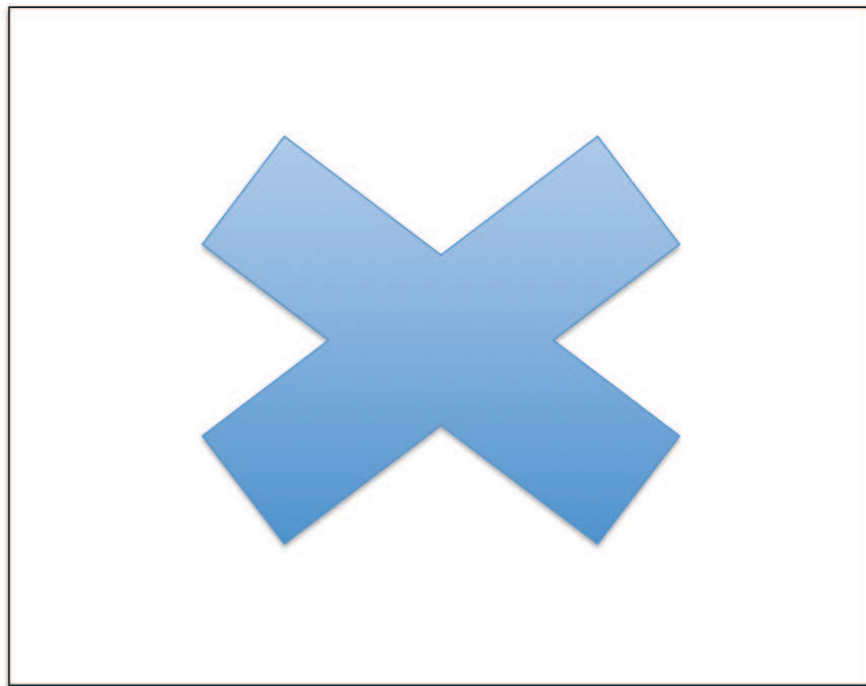
**Figure 5 :** Aspects histologiques des cellules du tissu nerveux

A : Différentes morphologies possibles du neurone ; B : Neurone pyramidal du cortex entouré par des oligodendrocytes satellites (à noter le halo périnucléaire caractéristique de l'oligodendrocyte) ; C : Epithélium épendymaire cilié ; D : Astrocyte GFAP + ; E : Microglie ; F : Substance grise (flèches bleues, les neurones pyramidaux, flèches jaunes les oligodendrocytes, flèches oranges les astrocytes) ; G : Substance blanche (flèches jaunes les oligodendrocytes, flèches oranges les astrocytes). (D'après l'Atlas d'histologie fonctionnelle de Weather, Young, 2008).

### **I.A.2.3 La barrière hémato-encéphalique**

Les capillaires du SNC ont une architecture classique comportant des cellules endothéliales aplaties reposant sur une membrane basale. Ces cellules endothéliales sont reliées par des jonctions intercellulaires serrées (ou zona

occludens). Les péricytes sont les cellules musculaires lisses associées aux endothéliums. A l'extérieur, l'endothélium est complètement revêtu par les pieds péricyotiques des astrocytes. Les capillaires du SNC sont imperméables à certains constituants plasmatiques, en particulier les grosses molécules formant ainsi une barrière sang-cerveau. Cette barrière est renforcée par la présence de transporteurs d'efflux (ou ABC transporteurs) capables d'évacuer de nombreuses molécules potentiellement délétères pour le cerveau et situés au niveau de la membrane apicale de l'endothélium, qui contient de plus à sa surface, différentes enzymes capables de détruire les métabolites neuro-toxiques et les substances humorales neuro-actives. Le maintien de cette barrière protectrice semble dépendre des pieds péricyotiques des astrocytes (Obermeier et al., 2013).

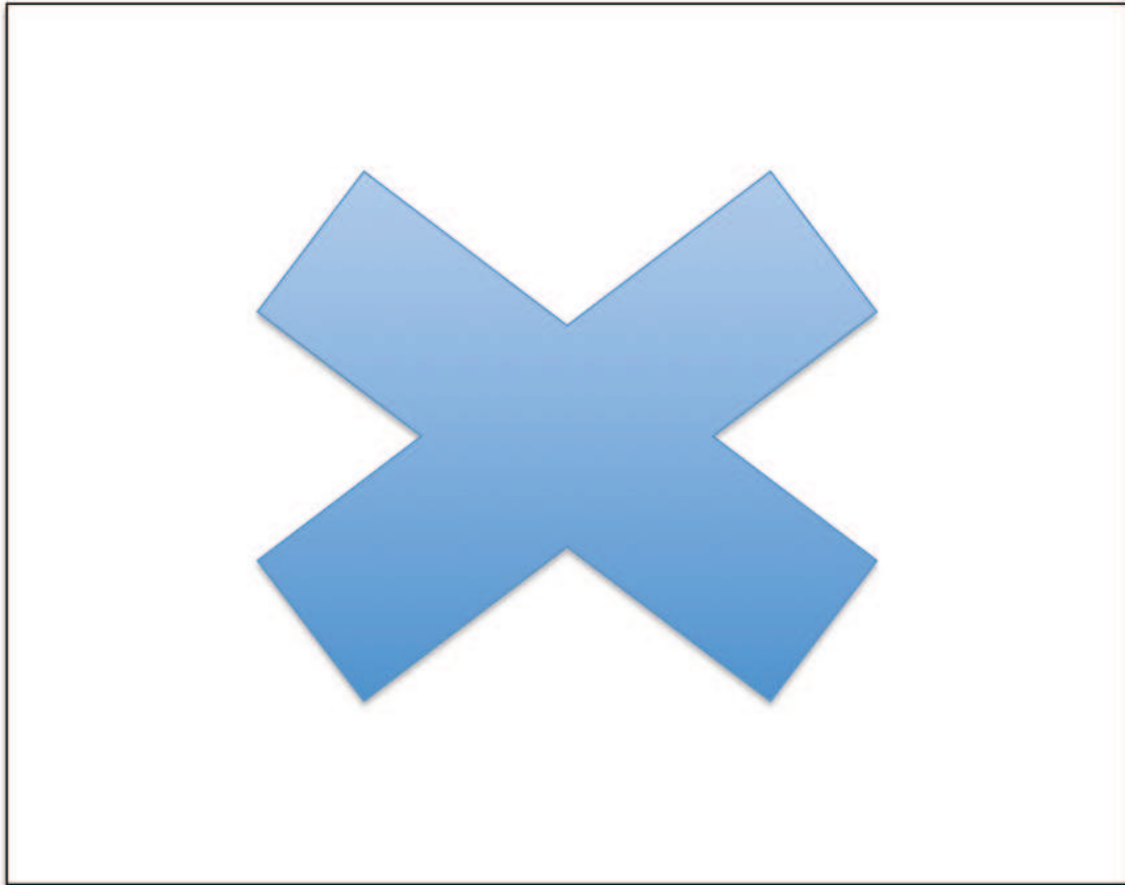


**Figure 6 :** Barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique est constituée de cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées et entourées par les pieds péricyotiques des astrocytes. (Obermeier et al., 2013)

## I.A.3 Développement du système nerveux central

### I.A.3.1 Embryologie du SNC



**Figure 7 :** Développement du système nerveux central

Forebrain : cerveau antérieur ; Midbrain : cerveau moyen ; Hindbrain : cerveau postérieur ; Medulla oblongata : bulbe rachidien ; Spinal cord : moelle épinière ; Pons : pont ; brainstem : tronc cérébral ; cerebrum : cerveau ; cerebellum : cervelet ; white matter : substance blanche ; basal nuclei : noyaux gris centraux.

Sur le plan embryologique, le SNC se développe à partir de l'ectoderme qui s'épaissit pour former la plaque neurale qui se transforme en gouttière neurale puis en tube neural, achevé à la quatrième semaine de grossesse. Rapidement ce dernier va se différencier en encéphale dans sa partie antérieure et en moelle épinière dans sa partie postérieure. Son extrémité antérieure croît plus rapidement que sa partie postérieure et forme des constriction qui délimitent 5 vésicules identifiables dès la cinquième semaine de grossesse : le prosencéphale (cerveau antérieur) sous-divisé

en télencéphale et en diencéphale, le mésencéphale (cerveau moyen) et le rhombencéphale (cerveau postérieur) sous-divisé en métencéphale et en myelencéphale. Deux renflements émergent rapidement du télencéphale pour donner naissance aux deux hémisphères cérébraux. Le métencéphale se transformera en cervelet et pont, et le myelencéphale en bulbe rachidien. A mesure que le cerveau, et en particulier le télencéphale, croît dans l'espace limité de la boîte crânienne, les hémisphères recouvrent le diencéphale et le tronc cérébral tandis que les circonvolutions et les sillons apparaissent à la surface du cortex (D'après Embryologie médicale,(Langman and Sadler, 1995)). Voir Figure 7.

### **I.A.3.2 Histogenèse**

Les neurones et les cellules gliales dérivent de l'ectoderme au cours d'un processus appelé neurogenèse, tandis que les vaisseaux et les méninges dérivent du mésoderme. La neurogenèse comporte des étapes de prolifération, de migration et de différenciation et s'étend de la vie embryonnaire jusqu'à l'âge adulte. La neurogenèse détermine les grandes étapes du développement psycho-moteur de l'enfant et continue d'opérer, de façon plus limitée à l'âge adulte (Stiles and Jernigan, 2010).

#### **Neurogenèse prénatale**

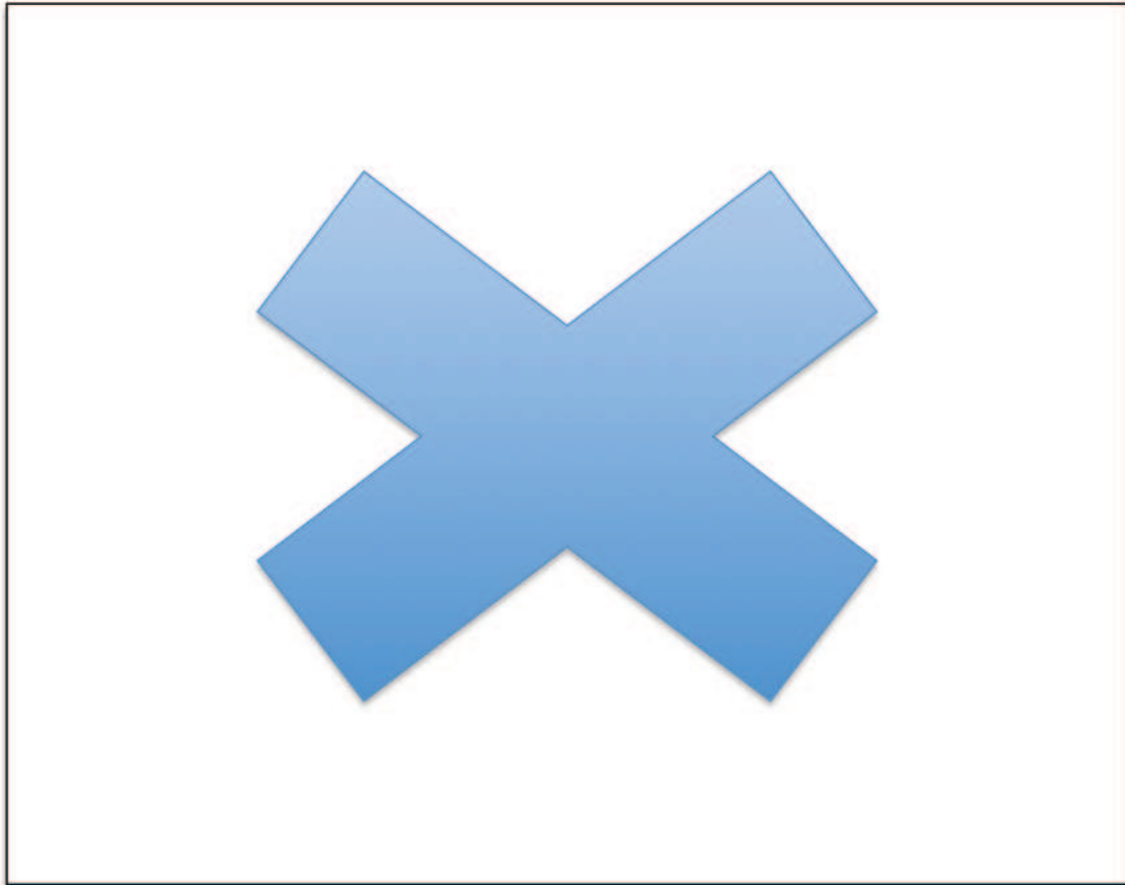
Le cerveau humain contient des milliards de neurones dont la majorité a été élaborée pendant la vie fœtale. Le processus de la neurogenèse débute par l'expansion du pool des cellules souches neurales embryonnaires qui se divisent selon un mode symétrique puis asymétrique pour donner naissance aux progéniteurs neuronaux. La majorité de ces progéniteurs sont produits au niveau des zones sous-ventriculaires et migrent à partir de là, de façon radiale pour former le neocortex. Les neurones migrent le long de guides radiaux formés de cellules gliales qui s'étendent des ventricules à la surface piale et qu'on appelle glia radiata. Une deuxième région ventrale, au niveau des ganglions de la base, produit des neuroblastes qui migrent sur une plus longue distance, de façon tangentielle au manteau cortical pour donner naissance aux interneurones inhibiteurs. La migration de ces neuroblastes permet

par la suite l'élaboration du néocortex en une structure complexe de 6 couches de neurones différenciés (Florio and Huttner, 2014).

### **Neurogenèse postnatale**

Un flux de migration neuroblastique post-natal a été identifié : le flux migratoire médial selon lequel les neuroblastes migrent vers le cortex pré-frontal, et qui prend fin à l'âge de 18 mois (Sanai et al., 2007). Il est possible que d'autres étapes de prolifération et de migration neuroblastique interviennent à l'âge pédiatrique comme le suggère la découverte récente de cellules de phénotype souche qui semblent migrer vers le tronc cérébral au cours d'une fenêtre spatio-temporelle précise à l'âge de 5 ans (Monje et al., 2011).

Alors que la production et la migration des neurones a lieu principalement pendant la vie prénatale et post-natale précoce, la prolifération, la migration et la différenciation des progéniteurs gliaux continue pendant la vie post-natale. Les progéniteurs gliaux et notamment oligodendrogliaux persistent tout au long de la vie, sont distribués dans tout le cerveau et peuvent migrer, proliférer et se différencier en réponse à un stress lésionnel (Cayre et al., 2009). Une fois différenciés, les oligodendrocytes sont responsables de la myélinisation axonale. Incomplète à la naissance, celle-ci devient intense les six premiers mois et prend fin à l'adolescence. Un intense remodelage a lieu pendant toute la phase de développement de l'individu.



**Figure 8 : Neurogenèse dans le cerveau adulte**

(D'après Vescovi et al., 2006) A : localisation de la zone sous-ventriculaire (SVZ) B : localisation de la zone sous-granulaire (SGZ) au niveau du gyrus dentelé C : auto-renouvellement et différenciation des CSNs D : précurseurs neuronaux avec leur marquage spécifique ; E : Composition de la niche sous-ventriculaire

GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; GFAP, glial fibrillary acid protein; HSA, heat-stable antigen; MAP2, microtubule-associated protein 2; NCAM1, neural cell adhesion molecule 1; PSA, polysialic acid; RMS, rostral migratory stream.

La neurogenèse chez l'adulte est un processus limité que l'on pense être à l'origine d'un remodelage des neurones et de la glie et de la réponse aux lésions faites au cerveau (Fuentelba et al., 2012). Les cellules souches neurales de l'adulte sont distribuées dans certaines zones bien précises du cerveau adulte, superposables aux localisations des cellules souches embryonnaires: la zone sous-granulaire (SGZ) au niveau du gyrus dentelé de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire (SVZ) au niveau des ventricules latéraux, (Figure 8 A et B).

Les cellules souches interagissent au sein d'une niche microenvironnementale composée de cellules gliales, endothéliales, épendymaires, immunitaires et de la microglie et intègrent les différents signaux provenant de ces cellules, du flux

sanguin et du LCR. Ces niches sont sous la dépendance d'un équilibre finement régulé entre stimuli de différenciation ou de maintien dans un état indifférencié appelé « stemness » par les anglo-saxons (Gilbertson and Rich, 2007; Persano et al., 2013).

Dans la SVZ, les cellules souches neurales (CSN) dites de type B, bordent la face externe de l'épithélium épendymaire. Celles-ci dérivent de la glie radiale d'origine neuro-ectodermique, responsable de l'organisation stratifiée du cortex. Les CSN de type B sont capables d'auto-renouvellement et de divisions asymétriques qui donnent naissance aux cellules neuronales et gliales. Pour la production des neurones, elles donnent naissance plus exactement à des progéniteurs intermédiaires : les cellules de type C qui elles-mêmes génèrent les cellules de type A ou neuroblastes. Les neuroblastes migrent par la suite selon un trajet appelé « flux migratoire rostral » dans le cortex frontal pour enfin coloniser les bulbes olfactifs et donner les neurones péri-glomérulaires (Voir Figure 8 C-E). Les CSN de type B, peuvent aussi générer des astrocytes corticaux et des précurseurs oligodendrogliaux (ou OPC) qui se différencient en oligodendrocytes, sous l'influence d'autres signaux de différenciation. Dans la SGZ, un processus comparable est observé à partir des astrocytes radiaux qui font office de cellules souches dites de type 1 qui donneront naissance aux cellules granulaires de l'hippocampe (Modrek et al., 2014; Vescovi et al., 2006).

## **I.B Classification histologique et épidémiologie**

### **I.B.1 La classification OMS**

Les gliomes sont une variété de tumeurs du système nerveux central dont les caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques évoquent une origine astrocytaire (astrocytomes), oligodendrogliale (oligodendrogliomes) ou mixte (oligoastrocytomes). Ils représentent les tumeurs du système nerveux central les plus fréquentes. Les épendymomes font également partie nosologiquement des gliomes. Cependant, leurs caractéristiques histologiques et biologiques ainsi que leur prise en charge diffèrent, si bien qu'ils ne font pas partie habituellement de cette entité gliale maligne et ne seront pas détaillés dans ce travail.



Depuis sa première publication en 1979, la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) des tumeurs du système nerveux central inclut un système d'échelle de malignité ou « grading » (du grade I le plus bénin au grade IV le plus malin) ayant pour but de prédire le comportement biologique de ces tumeurs (cf. annexe 1) (Louis et al., 2007). Ce grading, utile en clinique, permet d'orienter le choix thérapeutique et notamment l'utilisation adjuvante de la radiothérapie et de la chimiothérapie dans le cadre des **gliomes dits de haut grade** (grade III et IV).

<b>1. Gliomes astrocytaires</b>	
Astrocytome pilocytique	Grade I
Variant : astrocytome pilomyxoïde	Grade II
Astrocytome à cellules géantes sous épendymaire	Grade I
Xanthoastrocytome pléomorphe	Grade II
Astrocytome diffus (fibrillaire, protoplasmique, gémistocytique)	Grade II
Astrocytome anaplasique	Grade III
Glioblastome	
Variant : glioblastome à cellules géantes	Grade IV
Gliosarcome	
Gliomatose cérébrale	Grade III
<b>2. Gliomes oligodendrogliaux</b>	
Oligodendrogliome	Grade II
Oligodendrogliome anaplasique	Grade III
<b>3. Gliomes mixtes</b>	
Oligoastrocytome	Grade II
Oligoastrocytome anaplasique	Grade III
Si nécrose	Grade IV
<b>4. Tumeurs glioneuronales</b> (elles sont classées dans le groupe « tumeurs neuronales et glioneuronales »)	
Gangliogliome	Grade I
Gangliogliome anaplasique	Grade III
Astrocytome/gangliogliome desmoplasique infantile	Grade I
Tumeur neuroépithéliale dysembryoplasique	Grade I
Tumeur glioneuronale papillaire	Grade I
Tumeur glioneuronale à rosettes du IV <sup>e</sup> ventricule	Grade I

**Tableau 1** : Classification OMS 2007 des gliomes et des tumeurs neuro-gliales (Figarella-Branger et al., 2013)

Le grading de l'OMS repose sur l'analyse de plusieurs critères histopronostiques : la densité cellulaire, l'activité mitotique, le degré d'anaplasie (ou dédifférenciation cellulaire), les atypies nucléaires (anomalies de la structure des noyaux et des mitoses), la prolifération micro-vasculaire et la nécrose. L'évaluation de l'activité mitotique repose notamment sur l'immuno-marquage du Ki-67/MIB-1. L'immuno-marquage de la protéine gliofibrillaire acide ou GFAP caractéristique de la lignée astrocytaire, et du facteur de transcription OLIG2, caractéristique de la lignée oligodendrogliale, sont utilisés en routine pour typer les gliomes mais ne sont toutefois pas pathognomoniques d'un sous-type histologique (Colin et al., 2007). Les gliomes sont enfin classés selon leur caractère focal ou diffus/infiltrant.

Les gliomes de grade I (astrocytomes pilocytiques et astrocytomes à cellules géantes sous-épendymaires) sont des tumeurs circonscrites contrairement aux gliomes de grade II, III et IV qui sont des tumeurs diffuses. Le xanthoastrocytome pléiomorphe est un astrocytome souvent circonscrit auquel on attribue cependant un grade II voire III quand il existe une anaplasie. Les astrocytomes et les oligodendrogliomes de grade II sont des tumeurs infiltrantes bien différenciées, qui présentent des atypies cytologiques plus ou moins marquées. Malgré leur faible taux de prolifération, ceux-ci ont tendance à récidiver.

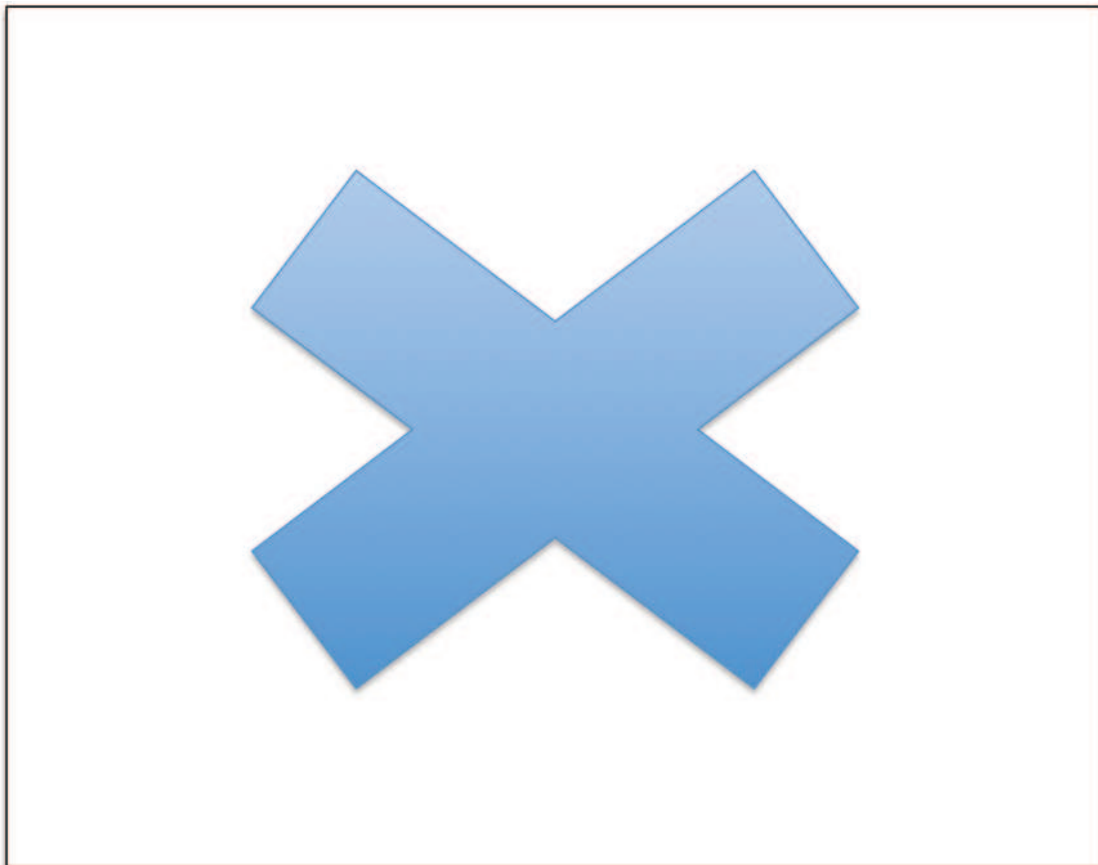
Les astrocytomes présentant une forte activité mitotique et un degré d'anaplasie, sont considérés comme des grades III (astrocytomes anaplasiques) et ceux qui présentent de surcroît une prolifération microvasculaire et/ou de la nécrose sont considérés comme des grades IV ou glioblastomes. Les oligodendrogliomes anaplasiques de grade III présentent également une forte activité mitotique et des caractéristiques d'anaplasie mais peuvent aussi présenter parfois une prolifération microvasculaire et/ou de la nécrose. Comme on l'a vu, la détermination du sous-type histologique du gliome est basée sur le phénotype cellulaire prédominant. Les oligoastrocytomes sont des tumeurs mixtes. Il n'existe cependant pas de consensus clair sur la proportion minimale nécessaire de chacun des deux contingents cellulaires pour établir un diagnostic de gliome mixte. La présence de nécrose dans ces tumeurs les font se classer parmi les gliomes de grade IV (Hegi et al., 2012).

Astrocytomes	Différenciation	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifération vasculaire
Astrocytomes diffus de grade II - fibrillaires - gémistocytiques - protoplasmiques (rares)	Haut degré de différenciation	Modérée	Occasionnelles	Absente ou 1 mitose	Absente	Absente
Astrocytomes anaplasiques de grade III	Anaplasie focale ou dispersée	Augmentée diffusément ou focalement	Présentes	Présente	Absente	Absente
Glioblastomes de grade IV	Faible	Élevée	Marquées	Marquée	Présente	Présente

**Tableau 2** : Classification OMS des astrocytomes diffus

Oligodendrogliomes et gliomes	Différenciation	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifération vasculaire
Oligodendrogliomes de grade II	Bien différencié	Modérée	Possiblement marquées	Absente ou occasionnelle	Absente ou peu conséquente	Non proéminente
Oligo-astrocytomes de grade II	Bien différencié	Faible ou modérée	?	Absente ou faible	Absente	Absente
Oligodendrogliomes anaplasiques de grade III	Anaplasie focale ou diffuse	Éventuellement augmentée	Éventuellement marquées	Éventuellement forte	Possible	Possible
Oligo-astrocytomes anaplasiques de grade III	?	Éventuellement forte	Éventuellement présentes	Éventuellement forte	Possible	Possible

**Tableau 3** : Classification OMS des oligodendrogliomes et gliomes mixtes



**Figure 9** : Caractéristiques histologiques et radiologiques des gliomes malins de l'adulte

A et B: Glioblastome, caractérisé par un pléomorphisme nucléaire, une forte densité cellulaire et une nécrose pseudopalisadique (astérisque). (A, hématoxyline et éosine) prolifération vasculaire endothéliale (astérisque) et mitoses (flèches) (B, hématoxyline et éosine).

C et D Oligodendrogliome anaplasique, avec le halo péri-nucléaire typique ("fried egg") (C, hématoxyline and éosine) et un marquage diffus Olig2+ (D).

E et F: Astrocytome anaplasique. Marquage Ki67 (E), amplification d'EGFR par hybridation in situ colorimétrique (F). G : Imagerie d'un astrocytome anaplasique H, Imagerie d'un glioblastome (noter la nécrose centrale)

## **I.B.2 Epidémiologie et pronostic**

L'incidence annuelle des gliomes de haut grade de l'adulte est d'environ 5 cas/100 000 habitants. Les glioblastomes représentent 60 à 70% des gliomes malins de l'adulte, les astrocytomes anaplasiques 10 à 15% et les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes anaplasiques environ 10%. Le restant est composé d'histologies plus rares chez l'adulte comme les épendymomes anaplasiques et les gangliogliomes anaplasiques. L'âge médian des patients au diagnostic est de 64 ans pour les glioblastomes de novo et 45 ans pour les gliomes anaplasiques (Wen and Kesari, 2008).

Le grading OMS est un critère pronostique important, à combiner avec les autres critères pronostiques cliniques connus (âge, indice de performance, qualité de l'exérèse chirurgicale, localisation tumorale) mais aussi biologiques (détaillés dans les prochains paragraphes) (Louis et al., 2007). De façon globale, les gliomes de grade III et IV de l'adulte sont de mauvais pronostic avec une survie médiane respective d'environ 3 ans et 1 an.

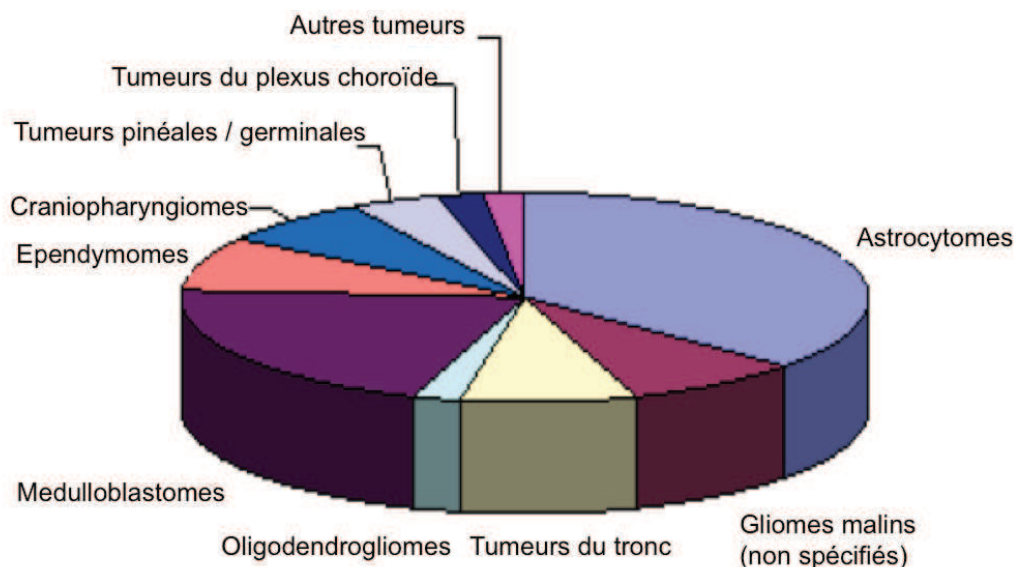
## **I.B.3 Les particularités des tumeurs gliales malignes pédiatriques**

Les tumeurs gliales et neurogliales malignes pédiatriques même si elles ressemblent morphologiquement à celles de l'adulte sur le plan histologique, diffèrent de ces dernières sur le plan épidémiologique, topographique, biologique et clinique.

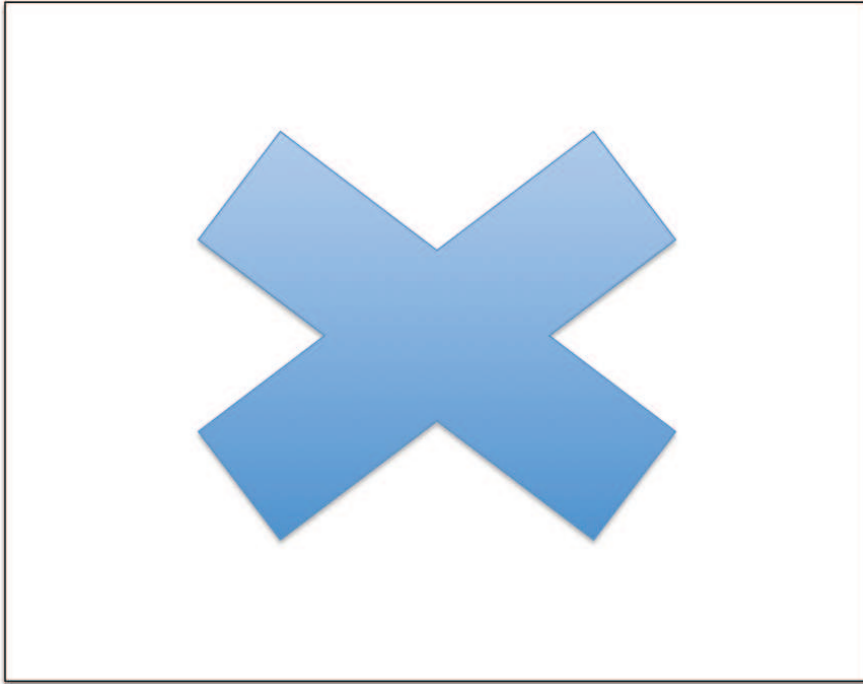
### **I.B.3.1 Epidémiologie des gliomes malins pédiatriques**

Les gliomes peuvent survenir à tout âge. Ils représentent 50 à 60% des tumeurs du système nerveux central de l'enfant de moins de 15 ans et 40 à 50% des tumeurs de l'adolescent de moins de 20 ans (Bauchet et al., 2009; Desandes et al., 2013, 2014; Ostrom et al., 2013) (Figure 10). L'incidence des différents sous-types histologiques varie selon l'âge des patients. Ainsi, les gliomes de bas grade sont plus fréquents chez l'enfant (exemple des astrocytomes pilocytiques pédiatriques) alors que les gliomes de haut grade et notamment les glioblastomes sont beaucoup plus fréquents chez l'adulte. Les gliomes de bas versus haut grade sont ainsi inversement représentés selon l'âge (Figure 11): 25% vs 5-8% des tumeurs du SNC de l'enfant de moins de 15 ans, contre 8% et 25% des tumeurs de l'adulte. Chez les

adolescents et jeunes adultes de 15 à 24 ans, les proportions des gliomes de bas versus haut grade sont comparables (environ 10%). L'incidence des gliomes de haut grade augmente ainsi de façon constante avec l'âge des patients (Arora et al., 2009; Ostrom et al., 2013). Au total, les gliomes de haut grade représentent 15 à 20% des gliomes pédiatriques (Bauchet et al., 2009; Qaddoumi et al., 2009). Les répartitions des différents grades de gliomes peuvent également varier entre les différentes tranches d'âge pédiatriques. En particulier, les gliomes survenant chez l'enfant de moins de 5 ans ont des caractéristiques histologiques et des pronostics encore différents par rapport aux enfants plus âgés (Dufour et al., 2006; Qaddoumi et al., 2009).



**Figure 10** : Incidence relative des tumeurs cérébrales de l'enfant et de l'adolescent (Chiffres de 2000 à 2011 au Canada) où 20% environ des tumeurs cérébrales correspondent aux gliomes malins ou aux gliomes du tronc cérébral.



**Figure 11** : Incidence moyenne par âge des gliomes malins (en bleu) et de bas grade (en rouge) (Ostrom et al., 2013)

### **I.B.3.2 Localisations et Entités anatomo-cliniques**

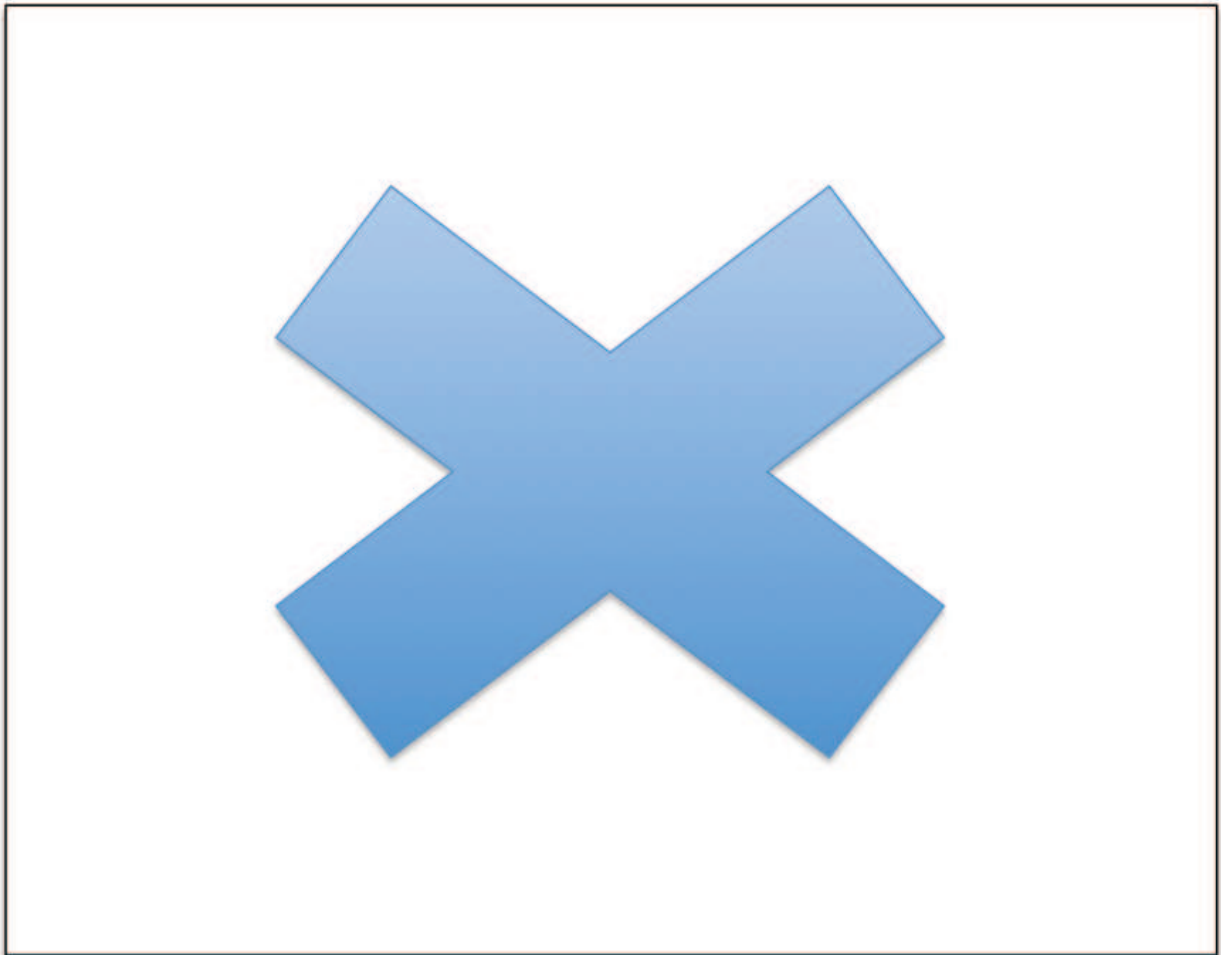
Les localisations infra-tentorielles sont particulièrement fréquentes chez l'enfant (40-50% des tumeurs du SNC de l'enfant) et leur proportion décroît de façon significative avec l'âge à l'opposé des localisations supra-tentorielles (Arora et al., 2009). En particulier, dans les formes de haut grade, les gliomes de la ligne médiane comprenant les gliomes thalamiques (5 à 10% des tumeurs du SNC de l'enfant) et les gliomes du tronc cérébral (10 à 15% des tumeurs du SNC de l'enfant) sont des entités clinico-biologiques distinctes et propres à l'âge pédiatrique (Figarella-Branger et al., 2013; Kramm et al., 2011; Puget et al., 2007; Wolff et al., 2008). Les gliomes du tronc cérébral ne représentent que 1% des tumeurs du SNC de l'adulte. Plus de 80% d'entre eux sont des gliomes diffus infiltrant le pont, connus sous l'acronyme anglo-saxon DIPG (diffuse intra-pontic glioma) et sont considérés comme malins quel que soit leur grade (Rineer et al., 2010).

Si l'on intègre toutes ces données d'un point de vue anatomo-clinique, en prenant en compte les particularités neuro-radiologiques et topographiques

caractérisant les gliomes malins pédiatriques, ceux-ci peuvent être classés selon 3 entités distinctes (Figarella-Branger et al., 2013). Voir Figure 12.

- 1) **Les gliomes diffus du tronc cérébral** (environ 20% des gliomes malins), essentiellement localisés au niveau de la protubérance (DIPG) surviennent typiquement entre 6 et 8 ans, sont inopérables et d'un pronostic particulièrement sombre. Ils sont associés à une augmentation diffuse du volume du tronc cérébral avec peu ou pas de prise de contraste à l'imagerie. Ces gliomes diffus peuvent être de phénotype astrocytaire ou oligodendrogial. Leur grading est difficile à réaliser en raison du problème de la représentativité des biopsies qui, du fait de cette localisation délicate sur le plan neurologique, sont la plupart du temps de petite taille. Ces gliomes sont considérés comme malins quel que soit leur grade (grade II à IV). Leur survie médiane est habituellement de 9 mois.
- 2) **Les gliomes thalamiques infiltrant de haut grade** (environ 40% des gliomes malins de l'enfant) sont de résection difficile et présentent les mêmes aspects radiologiques que les gliomes du tronc. Ils surviennent avec un âge médian de 11-12 ans et ont un pronostic intermédiaire entre gliomes du tronc et supratentoriaux. Ils peuvent être de phénotype oligodendrogial ou astrocytaire, de grade III ou IV (Fernandez et al., 2006; Kramm et al., 2011; Puget et al., 2007; Wolff et al., 2008). Leur survie médiane est de 12 mois.
- 3) **Les gliomes hémisphériques infiltrant de haut grade** (environ 40% des gliomes malins de l'enfant). Ces tumeurs surviennent également avec un âge médian de 11-12 ans et ont un pronostic moins mauvais, la survie médiane s'allonge de quelques mois. En termes de classification OMS, ces tumeurs correspondent le plus souvent à des glioblastomes. Cependant, la présentation typique du glioblastome de l'adulte avec prise de contraste, nécrose et œdème péri-lésionnel à l'imagerie, est peu fréquente chez l'enfant. Les localisations les plus corticales correspondraient le plus souvent à un xanthoastrocytome pléomorphe anaplasique ou à un glioblastome à cellules géantes selon le grading de l'OMS. Beaucoup de ces diagnostics de glioblastomes hémisphériques de l'enfant correspondraient en réalité à des tumeurs glioneurales malignes (Meyronet et al., 2014; Puget et al., 2011;

Varlet et al., 2004). Cette nouvelle entité histopathologique est caractérisée par une incidence plus fréquente chez l'enfant, une localisation hémisphérique préférentielle, des caractéristiques neuro-radiologiques particulières (aspect kystique en grappe de raisin avec attachement méningé), pas de récurrence in situ après exérèse complète, mais une tendance métastatique avec extension lepto-méningée. Ces tumeurs sont associées à un meilleur pronostic que les glioblastomes qui partagent avec les tumeurs du tronc cérébral le pronostic le plus sombre.



**Figure 12** : Entités anatomo-cliniques des gliomes

A : de l'adulte ; B : de l'enfant

DNT : tumeur dysembryoplasique neuro-épithéliale GG : gangliogliome ; PXA : xantho astrocytome pléomorphe ; AP : astrocytome pilocytique (Figarella-Branger et al., 2013)



De façon intéressante, cette classification anatomo-clinique recouvre des propriétés biologiques et moléculaires spécifiques, variant selon l'âge et la localisation des tumeurs (Khuong-Quang et al., 2012; Sturm et al., 2012; Weller et al., 2013).

## **I.C Classification moléculaire**

Basée sur des critères morphologiques le plus souvent subjectifs, l'utilisation de la classification OMS est limitée par une grande variabilité inter-observateur, traduite par des taux de discordance parfois importants entre pathologistes dans le rendu des diagnostics (Louis et al., 2007). Dans les essais cliniques récents, les revues centralisées par plusieurs pathologistes indépendants ont permis une reclassification pour environ 20 à 30% des gliomes (van den Bent, 2010). La caractérisation moléculaire récente des gliomes a permis de décrire leurs principales anomalies récurrentes. Bien qu'encore une fois incomplètement spécifiques d'un sous-type histologique, celles-ci contribuent, avec les critères histologiques et clinico-radiologiques de la tumeur, à constituer le faisceau d'arguments permettant de poser un diagnostic. Certaines de ces anomalies ont de plus une valeur pronostique et/ou prédictive de réponse à certaines chimiothérapies. Dans les gliomes malins pédiatriques, leur analyse moléculaire a souvent été réalisée sans distinction du sous-type histologique en raison de la taille généralement réduite des cohortes.

### **I.C.1 Altérations génétiques**

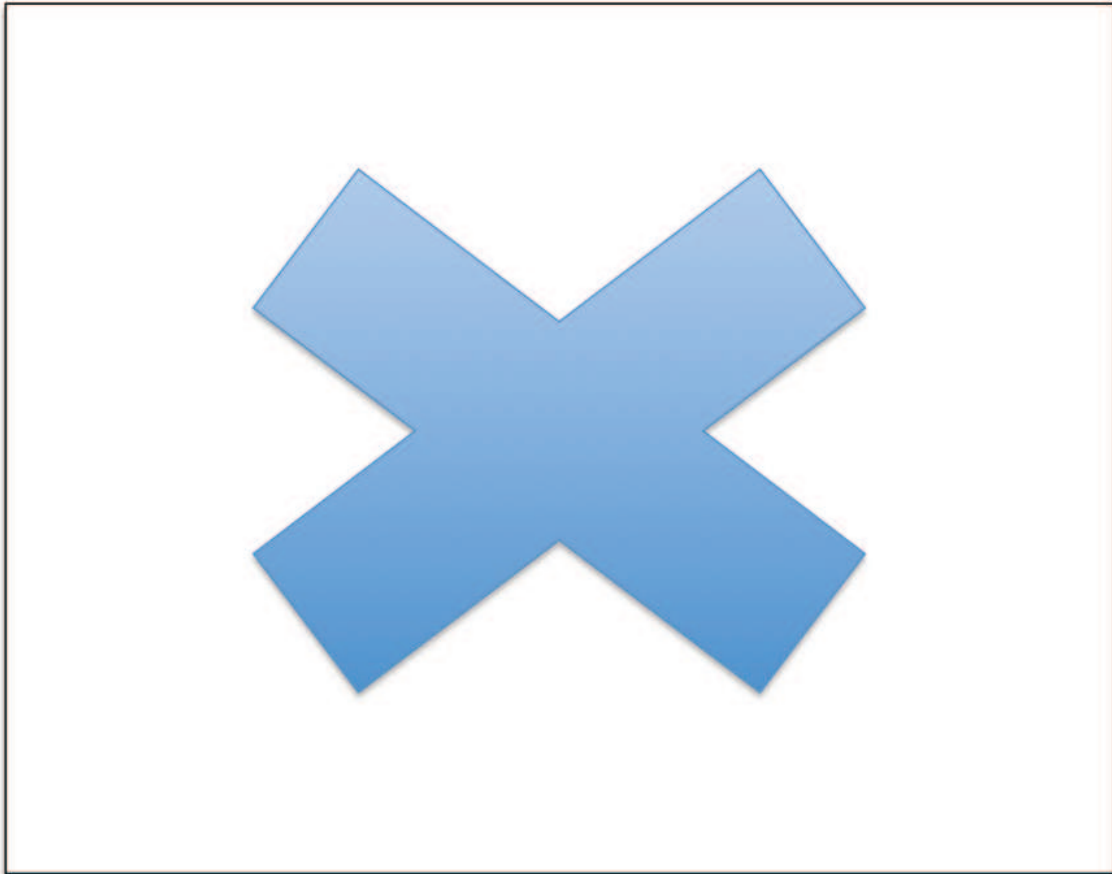
Ces dernières années, les technologies basées sur l'utilisation de micropuces biologiques (ou microarrays) pour l'étude pangénomique des tumeurs, a permis une caractérisation en sous-groupes moléculaires plus homogènes, grâce à l'analyse intégrée du génome en terme d'anomalies quantitatives du nombre de copie des gènes et de perte d'hétérozygotie (CGHarray), de mutations (SNParray et exome), d'expression (transcriptome) ou d'altérations épigénétiques (méthylome).

### **I.C.1.1 Voies de signalisation altérées dans le glioblastome**

Les grands projets de caractérisation pangénomique tels que celui du TCGA (« The Cancer Genome Atlas ») ont permis depuis 2008, d'identifier les principales voies cellulaires altérées dans le glioblastome adulte (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Ces anomalies entraînent classiquement des pertes de fonctions et/ou d'expression sur les gènes suppresseurs de tumeurs et des gains de fonctions et/ou d'expression sur les oncogènes. Elles consistent essentiellement en :

- des mutations ponctuelles activatrices ou inactivatrices
- des anomalies focales du nombre de copies des gènes (gains, amplifications, pertes d'hétérozygotie, délétions homozygotes ou hémizygotés).
- des réarrangements structuraux inter ou intra-chromosomiques (intergéniques) ou intragéniques
- des anomalies chromosomiques avec des pertes ou gains de portions entières de chromosomes

Trois voies de signalisation principales sont altérées dans plus de 80% des glioblastomes par l'un ou l'autre de ces mécanismes d'altérations. Ces altérations activent les voies cellulaires de transduction des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) impliquant RAS et la phosphoinositide 3-kinase (Pi(3)K) ou entraînent une dérégulation du cycle cellulaire ou de la voie P53 (Voir Figure 13). Ces altérations sont généralement exclusives, si bien qu'une seule altération est généralement suffisante à la dérégulation de la voie concernée. Les principales anomalies des acteurs de chacune de ces voies seront détaillées brièvement dans les prochains paragraphes.



**Figure 13** : Principales voies altérées dans le glioblastome adulte  
(Brennan et al., 2013, TCGA)

#### **I.C.1.1.1 La voie oncogénique des RTK/RAS/PI(3)K**

De façon générale, les voies de signalisation débutent par la liaison d'un ligand (facteur de croissance ou cytokine) à son récepteur spécifique. Cet événement conduit à une transduction du signal et à l'activation de diverses cascades de signalisation telles que les voies Ras/Raf/MEK/ERK et PI3K/PTEN/AKT/mTOR. La plupart des signaux prolifératifs sont transduits par des récepteurs à activité tyrosine kinase membranaires. Ainsi ces deux voies transmettent des signaux provenant de nombreux récepteurs à tyrosine kinase. Ces voies contrôlent au final l'expression de multiples gènes cibles régulant la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Ces voies sont médiées par une série de kinases ou GTPases en général codées par des oncogènes et finement régulées par des protéines inhibitrices, en général codées par des gènes suppresseurs de tumeurs. Les altérations génomiques de ces voies sont fréquentes dans les cancers

et consistent en une sur-activation d'un acteur de la voie ou à la suppression d'une protéine régulatrice conduisant à une signalisation oncogénique aberrante et incontrôlée.

### **Les RTKs (Récepteurs à activité tyrosine kinase)**

De façon globale, plus de 60% des glioblastomes de l'adulte présentent une altération génomique d'au moins un RTK, principalement l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) et le PDGFRA (Platelet Derived Growth Factor alpha). **L'EGFR** est le récepteur transmembranaire du facteur de croissance épidermal EGF et possède donc dans sa partie cytosolique un domaine à activité tyrosine kinase activé lors de la fixation de son ligand, permettant la dimérisation du récepteur et la transduction intracellulaire du signal. L'*EGFR* localisé sur le chromosome 7 est la cible fréquente (au total 57% des cas selon le TCGA) d'altérations génomiques multiples contribuant à l'augmentation de l'activité d'EGFR à travers des amplifications très fréquentes (40% à 50%), le plus souvent associées à des mutations activatrices ponctuelles (20%) ou des réarrangements intra ou inter-géniques (comme la fréquente délétion intragénique  $\Delta$ e2-7 dite EGFRvIII ou des fusions inter-géniques nouvellement identifiées) (Brennan et al., 2013). Dix à 30% des glioblastomes présentent une altération du **PDGFRA** avec des amplifications (11-26%) qui peuvent être associées à des mutations (3-4%) et/ou des réarrangements intragéniques (7-18%) comme la délétion des exons 8 et 9 (PDGFRA <sup>$\Delta$ 8-9</sup>) (Ozawa et al., 2010). La plupart des altérations de PDGFRA sont par ailleurs concomitantes à une altération d'EGFR. Des fusions de *FGFR1* avec le gène *TACC1* conduisant à l'activation constitutive de la kinase ont été observées dans 3% des glioblastomes, ainsi que des amplifications de *MET* dans 2%. Une co-amplification de ces RTKs dans une même tumeur est fréquente et suit en général un pattern mosaïque soulignant l'hétérogénéité des glioblastomes dans lesquels des sous-clones peuvent présenter des activations de RTK distincts ou bien coexister avec un sous-clone exempt d'altération (Sturm et al., 2014).

Chez l'enfant, les altérations génomiques d'*EGFR* sont moins fréquentes avec des taux rapportés de 11% pour les amplifications, 17% pour les délétions EGFRvIII

et 4% pour les mutations ponctuelles. Les altérations de PDGFRA semblent par contre plus fréquentes avec des taux d'amplification de 8 à 39% selon les études et particulièrement enrichies dans les DIPGs pour lesquels cette voie représenterait un événement clé de l'oncogenèse. La délétion intragénique  $\Delta 8-9$  est plus rare (4%), alors que de nouvelles mutations ponctuelles (4-10%) de PDGFRA ont été mises en évidence dans les gliomes malins pédiatriques et les DIPGs (Paugh et al., 2013; Puget et al., 2012a).

### **La voie PI3K/PTEN/AKT/mTOR**

La voie PI3K/PTEN/AKT/mTOR est essentielle à la survie et la croissance cellulaire et est altérée dans de nombreux cancers. Très schématiquement, l'activation du domaine tyrosine kinase des RTKs recrute et active à la membrane cellulaire, la phosphatidyl inositol-3 (PI3) kinase qui active à son tour la kinase AKT. La kinase AKT phosphoryle de très nombreux substrats/cibles comme les facteurs de transcription CREB et FOXO, les acteurs du cycle cellulaire E2F et p21, les facteurs pro-apoptotiques BAD et BIM et interagit avec d'autres voies sur des cibles communes comme la voie NF- $\kappa$ B via I-kappaK, la voie p53 via MDM2, ou la voie Wnt/beta-catenine via GSK-3 $\beta$  (McCubrey et al., 2012). Enfin AKT régule l'activité de la kinase mTOR (mammalian target of rapamycine) via la phosphorylation inhibitrice de TSC2 (ou tuberin). TSC1 et TSC2 sont deux gènes suppresseurs de tumeurs et forment un complexe qui maintient la protéine Rheb dans un état inactivé. L'inhibition de TSC2 par AKT entraîne l'activation de Rheb qui à son tour active mTOR. mTOR est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme l'inhibition de l'autophagie, la régulation de l'initiation de la traduction et permet l'intégration des signaux cellulaires mitogènes par rapport au statut énergétique et nutritionnel de la cellule. Cette voie sera détaillée ultérieurement.

**Les PI3Ks** de classe IA sont responsables de la transduction des signaux provenant des RTKs en réponse à un facteur de croissance. Les PI3Ks phosphorylent des phospholipides membranaires et génèrent des second messagers lipidiques. En particulier elles assurent la conversion du phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3), second

messenger qui initie la cascade de signalisation. **La PI3K** est une protéine hétérodimérique constituée d'une sous-unité régulatrice de 85 kDa et d'une sous-unité catalytique de 110-kDa. Il existe

-5 variants pour la sous-unité régulatrice :p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$  codés par **PIK3R1** et p85 $\beta$  et p55 $\gamma$  codés par PIK3R2 et PIK3R3 respectivement

-3 variants pour la sous-unité catalytique p110 $\alpha$ ,  $\beta$ , ou  $\delta$  codés par **PIK3CA**, **PIK3CB** et **PIK3CD**.

Les mutations oncogéniques ciblant la PI3K sont retrouvées dans 7 à 20% (**PIK3CA**) et 6 à 11% (PIK3R1) des glioblastomes avec des taux similaires chez l'enfant (8-20% et 10-12% respectivement). L'équipe de Grill et al., a rapporté en 2012, une prévalence de ces mutations d'environ 10% dans les DIPGs (Grill et al., 2012).

La régulation négative de cette voie est principalement assurée par l'action inhibitrice de **PTEN** sur l'activité de la PI3K. **PTEN** est un gène suppresseur de tumeur codant une phosphatase responsable de la dégradation de PIP3 et modulant ainsi l'activité de la PI3K. **PTEN** peut être altéré via des mutations inactivatrices identifiées dans 20 à 30% des glioblastomes, des délétions focales dans 8 à 10% des cas et/ ou être délété lors de pertes du chromosome 10. Chez l'enfant, ces événements sont plus rarement observés (1-12% pour les mutations et 0-1% pour les délétions) (Sturm et al., 2014).

### **La voie RAS/RAF/MEK/ERK**

La voie RAS/RAF et sa cascade de kinases MEK et ERK sont également importantes pour la prolifération et la survie mais aussi l'adhésion et la motilité cellulaire ainsi que l'induction de signaux pro-angiogéniques (McCubrey et al., 2007). L'activation du domaine tyrosine kinase des RTKs entraîne l'activation de la GTPase RAS, ancrée à la face interne de la membrane cytoplasmique qui à son tour permet l'activation de la sérine/thréonine kinase RAF. La famille des gènes **RAS** et **RAF** comprennent chacune trois membres : **HRAS**, **NRAS**, **KRAS2** et **BRAF**, **RAF1**,

*ARAF*, respectivement. RAF phosphoryle et active la MAP (Mitogen Activated protein) kinase kinase-1 (MEK1) qui active à son tour les MAP kinases-2/1 (ERK1/2). Ces dernières ont de très nombreux substrats comme la kinase p90<sup>RSK1</sup> impliquée dans la régulation de la traduction ou les facteurs de transcription ELK-1, FOS, MYC, STAT1/3 etc...

Les mutations de RAS et de BRAF (en particulier la mutation V600E) sont rarement observées dans les glioblastomes de l'adulte (<2%). L'activité de RAS est régulée négativement par NF1 qui est un gène suppresseur de tumeur et dont les mutations germinales sont la cause de l'affection génétique appelée neurofibromatose. *NF1* est délété dans 1% et muté dans 10% des glioblastomes de l'adulte et semblerait plus fréquemment muté dans les gliomes malins de l'enfant (24%). Chez l'enfant la mutation de BRAF V600E serait également plus fréquente dans les gliomes malins sus-tentoriels avec des taux de allant de 10 à 25% selon les études (Sturm et al., 2014).

### **I.C.1.1.2 Dérégulation du cycle cellulaire et de la voie p53**

Deux voies principales régulent le cycle cellulaire : la voie p16<sup>INK4A</sup>-CDK4-RB et la voie p14<sup>ARF</sup>-MDM2-p53.

Le locus *CDKN2A* (9p21) génère deux transcrits de fonction différente : p16<sup>INK4</sup> codant pour la protéine inhibitrice du complexe CD4/cyclineD1 et p14<sup>ARF</sup> inhibant MDM2, lui-même régulant négativement la stabilisation de p53. La phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (RB) par CDK4 permet la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S tandis que p53 régule les transitions G1-S et G2-M (Weinberg, 1995). La voie p16<sup>INK4A</sup>-CDK4-RB peut résulter soit d'une perte de *CDKN2A* (le plus souvent par délétion homozygote ou méthylation), d'une mutation/délétion de RB ou encore d'une amplification de CDK4. Ces altérations conduisent toutes à une perte du point de contrôle G1/S du cycle cellulaire et sont mutuellement exclusives au sein d'une même tumeur. Les délétions homozygotes de *CDKN2A* sont fréquentes dans les glioblastomes de l'adulte (53%

des cas) et plus rares chez l'enfant (5 des cas). Les différentes altérations sont résumées dans le tableau n°4.

Le gène p53, situé en 17p13.1, code un facteur de transcription qui permet l'intégration du stress cellulaire et la régulation du programme de mort cellulaire (Levine, 1997). En réponse à différents stress cellulaires, p53 induit l'expression de gènes cibles essentiels au maintien de l'intégrité du génome : par exemple la régulation du cycle cellulaire (action sur les gènes essentiels du cycle cellulaire p21, 14-3- $\sigma$  et GADD45) (Jin et al., 2002), la régulation de l'apoptose ou du métabolisme cellulaire (Bensaad and Vousden, 2007).

L'altération de la voie p14<sup>ARF</sup>-MDM2-p53 dans les gliomes peut résulter soit d'une altération du gène *TP53* (le plus souvent par mutation), soit d'une amplification de *MDM2* (12q14.3-q15) ou enfin d'une délétion homozygote de *CDKN2A*. La protéine p53 joue ainsi un rôle de « gardien du génome » et sa mutation autorise la survenue d'une instabilité génomique. Dans les glioblastomes, les délétions de *TP53* sont rares (1%) tandis que des mutations sont retrouvées chez environ 30% des patients adultes et 30-40% des patients pédiatriques (Sturm et al., 2014). Les mutations de *TP53* conduisent en général à la formation d'une protéine anormale qui s'accumule dans le noyau et devient donc détectable par immunohistochimie. Même si l'expression protéique de p53 n'est pas corrélée de façon absolue à la présence d'une mutation, l'immunohistochimie représente une alternative simple aux techniques de séquençage. Un point de cassure récurrent sur le chromosome 12 (12q14-15) a récemment été identifié dans 5% des glioblastomes avec pour conséquence, une co-amplification de CDK4 et de MDM2 (Zheng and Verhaak, 2013).



Target genes	Alteration type	Frequency (%) In adult GBMs	Frequency (%) In pediatric HGGs
EGFR	Focal amplification	43	1-11
	Point mutation	18-26	4
	Intragenic deletion ( $\Delta$ e2-7 ; EGFRvIII)	10-64	17
PDGFRA	Focal amplification	11-26	8-39
	Point mutation	3-4	4-9
	Intragenic deletion	7-18	4
PTEN	Focal deletion	8-10	0-1
	Mutation	23-31	1-12
NF1	Focal deletion	1	0-1
	Mutation	9-10	24
RB1	Focal deletion	3-4	0-3
	Mutation	7-9	10
CDKN2A et CDKN2B	Focal deletion	62	10-19
TERT	Promoter mutation	55-83	3-11
TP53	Mutation	20-29	34-37
CDK4	Focal amplification	13-18	3-4
FGFR1 ou FGFR3	Fusion	3-8	?
IDH1	Mutation	5-12	0-16
PIK3CA	Mutation	7-21	8-20
PIK3R1	Mutation	6-11	10-12
H3F3A G34R ou G34V	Mutation	0-3	12-14
H3F3A K27M	Mutation	0-1	23-43
HIST1H3B/C K27M	Mutation	0	12-31
ATRX	Mutation	6	14-29
SETD2	Mutation	1-2	15
ACVR1	Mutation	0	20-22
MYCN	Focal amplification	3	3-5
MYC	Focal amplification	2	3-4
BRAF V600E	Mutation	2	10-25

**Tableau 4 :** Altérations génomiques récurrentes dans les glioblastomes de l'adulte comparées à celles des gliomes malins pédiatriques (D'après Sturm et al, 2014)

### I.C.1.2 Anomalies chromosomiques observées dans les gliomes

L'anomalie chromosomique de loin la plus fréquente dans les glioblastomes consiste en la **perte du chromosome 10 et le gain du chromosome 7** (responsable d'une polysomie à différencier d'une amplification d'EGFR). Cette anomalie 7+/10- est retrouvée dans 80 à 85% des glioblastomes de l'adulte. La perte du chromosome 10 peut être soit totale (monosomie du 10) soit intéresser le 10p ou le 10q ou encore certaines régions comme le 10p14-p15, le 10q23-24 et le 10q25pter et impliquer (ou non) *PTEN* (10q23.3) et / ou *MGMT* (10q26).

Les autres anomalies chromosomiques fréquentes chez l'adulte intéressent les gains des chromosomes 19 et 20 (35-40%), les pertes du 9p (38%), 22q (33%), 13q (33%), 14q (27%) et 6q (22%). Chez l'enfant, les anomalies structurales génomiques sont généralement moins fréquentes avec l'existence d'une fraction de gliomes pédiatriques (15%) ne présentant aucune anomalie. Parmi les anomalies chromosomiques observées chez l'enfant, le gain du chromosome 1q est la plus fréquente (20%) alors que l'anomalie 7+/10- est rare (Sturm et al., 2014).

**Les délétions du 1 p et / ou du 19q** sont des altérations fréquemment observées dans les gliomes. La perte combinée du 1p19q (codélétion), due à une translocation déséquilibrée  $t(1;19)(q10;p10)$ , est caractéristique des oligodendrogliomes. Une perte partielle distale du 1p avec une perte ou non du 19q est retrouvée dans les glioblastomes à composante oligodendrogliale et dans ce cas est associée aux altérations classiques du glioblastome, comme l'amplification de l'*EGFR*, une délétion de *CDKN2A* ou une mutation de *PTEN* (Wiestler et al., 2014).

## I.C.2 Altérations épigénétiques

### I.C.2.1 L'hyperméthylation du promoteur de MGMT :

La méthylation aberrante de l'ADN est une caractéristique épigénétique fréquemment rencontrée dans les cancers dans lesquels une hypométhylation globale de l'ADN coexiste le plus souvent avec une hyperméthylation des îlots CpG de nombreux promoteurs de gènes (Jones and Baylin, 2007). Les îlots CpG sont des régions riches en dinucléotides CpG, localisés dans la région 5' de plus de 50% des gènes humains, et plus spécifiquement dans les régions promotrices de ces gènes. L'hyper-méthylation en position 5 des cytosines de ces îlots est associée à une répression transcriptionnelle du gène associé (Schuebel et al., 2007). La méthylation des îlots CpG apparaît aujourd'hui comme un mécanisme alternatif aux mutations permettant l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur par méthylation est une cause majeure d'instabilité génomique. Ainsi la coopération de mécanismes génétiques et épigénétiques est à l'origine de l'initiation de la cancérogénèse.

Parmi les gènes fréquemment inactivés par hyperméthylation dans les gliomes, on retrouve *TP53*, *CDKN2A*, *RB1*, *PTEN* mais surtout *MGMT*. L'enzyme O6-methylguanine-DNA-methyltransferase codée par ce gène est responsable de l'excision des résidus alkyls en position O6 des guanines générées après un traitement par les agents alkylants méthylants comme le témozolomide ou les nitrosourés (Esteller and Herman, 2004). L'hyperméthylation du promoteur de MGMT concerne 40 à 50% des gliomes malins de l'adulte et représente en outre un marqueur prédictif de meilleure réponse au témozolomide en association avec la radiothérapie (Stupp et al., 2009). Cette partie sera approfondie dans un chapitre ultérieur sur les mécanismes de réparation de l'ADN et leur implication dans la réponse à la chimiothérapie.

### **I.C.2.2 Le phénotype G-CIMP et les mutations de IDH1 ou IDH2**

Le phénotype hypermutateur dit CIMP pour « CpG island methylator phenotype » est défini par la présence de l'hyperméthylation simultanée et extensive d'un grand nombre de promoteurs de gènes et a été décrit pour la première fois dans le cancer colorectal (Weisenberger et al., 2006). De façon comparable mais impliquant d'autres gènes cibles, un phénotype CIMP glial ou G-CIMP a récemment été mis en évidence (Noushmehr et al., 2010).

Les mutations du gène de l'isocitrate déshydrogénase *IDH1* (ou *IDH2*) ont récemment été impliquées dans la causalité directe de ce phénotype (Turcan et al., 2012). Les mutations de *IDH1* n'ont été détectées qu'à un seul site « hotspot », celui de l'arginine en position 132, et consistent dans la très grande majorité des cas, en une substitution R132H (Arginine vers Histidine) (Parsons et al., 2008). La conséquence de cette mutation est le gain d'une activité néomorphique pour cette enzyme du cycle de Krebs qui produit dans ce cas, en place du métabolite habituellement généré l' $\alpha$ -ketoglutarate, un « onco-métabolite » R-énantiomère du 2-hydroxyglutarate ((R)-2-HG). Le (R)-2-HG aurait la propriété d'inhiber de nombreuses dioxygénases comme les enzymes de déméthylation de l'ADN de la famille TET ou à domaine « Jumanji » et ainsi conduire à l'hyper-méthylation de nombreux promoteurs (Dang et al., 2009). Les mutations de *IDH1* (et de façon moins fréquente de *IDH2*) sont particulièrement fréquentes dans les gliomes de grade II et III (>80%) mais ne concernent que 5 à 12% des glioblastomes. Dans les glioblastomes, les mutations de *IDH1* sont caractéristiques des glioblastomes secondaires (70% dans ce cas contre <5% dans les GBM de novo) et résultent donc de la transformation d'un gliome de grade II ou III (Yan et al., 2009, Ohgaki et al., 2013). La corrélation entre G-CIMP et les mutations de *IDH1* n'est cependant pas absolue, suggérant l'existence d'autres mécanismes capables de générer un phénotype G-CIMP.

### **I.C.2.3 Les mutations des histones**

Les mutations de *H3F3A* ont été détectées pour la première fois par séquençage haut débit dans des gliomes malins pédiatriques et sont les premières mutations récurrentes portant sur des histones, à avoir été identifiées dans l'oncogenèse humaine. *H3F3A* code l'histone H3.3 qui est un variant d'histone

capable de remplacer l'histone conventionnelle H3 dans les nucléosomes de nombreux gènes. Elle représente la forme prédominante de l'histone H3 dans les cellules non prolifératives, est incorporée dans la chromatine indépendamment de la réplication et semblerait être spécifique des régions transcriptionnellement actives. Les mutations hétérozygotes ponctuelles de H3F3A sont traduites soit par la substitution en position 27 d'une lysine en méthionine (K27M), soit par la substitution en position 34 d'une glycine en arginine (G34R) ou bien en Valine (G34V). Des substitutions K27M ont également été identifiées sur l'histone canonique H3.1 via des mutations sur les gènes *HIST1H3B* et *HIST1H3C* (Khuong-Quang et al., 2012; Schwartzenuber et al., 2012; Sturm et al., 2012; Wu et al., 2012).

Ces mutations ciblent la queue N-terminale des histones et interfèrent avec certaines modifications post-traductionnelles des lysines. Les mutations K27M interfèrent avec la triméthylation de la lysine 27 (H3K27me3) via l'inhibition de sa liaison avec la méthyltransférase EZH2 qui est la sous-unité catalytique du complexe PCR2 (Polycomb repressive complex 2). PCR2 réprime l'expression de multiples gènes via la triméthylation des histones H3K27me3 qui un marqueur d'état hétérochromatique. La mutation K27M est associée à une hypométhylation globale de l'ADN et des niveaux réduits de triméthylation H3K27me3 au niveau des sites où le variant H3.3 est incorporé. Au niveau de ces sites, les lysines des histones H3.3 sont au contraire acétylées entraînant l'activation ou la dé-répression de nombreux gènes cibles. De la même façon, la mutation G34 interfère avec la triméthylation de la lysine voisine située en position 36 (H3K36me3), cible de la méthyltransférase SETD2. Des mutations de SETD2 ont également été décrites dans les gliomes malins pédiatriques et sont dans ce cas exclusives des mutations G34 de l'histone H3.3 (Fontebasso et al., 2013).

Interférant avec des marques épigénétiques différentes, les mutations K27M et G34R/V sont associées à des profils d'expression et de méthylation distincts. Parmi les gènes activés ou dé-réprimés par les mutations G34, *MYCN* est une des cibles les plus enrichies en triméthylation H3K36 comme l'a montré une étude réalisée sur le modèle cellulaire pédiatrique KNS42 porteur d'une mutation G34V et présentant une forte expression de *MYCN* (Bjerke et al., 2013). (Voir plus loin pour la description des modèles cellulaires). Les sites de triméthylation H3K36 joueraient

également un rôle en tant que plateforme de recrutement des protéines du système de réparation post-répliatif des mésappariements de l'ADN ou MMR (Mismatch repair) (Li et al., 2013). Les mutations G34 seraient donc associées à une déficience de ce système et donc pourvoyeuses d'instabilité génétique (cf. chapitre sur le MMR).

De façon intéressante, les mutations des histones H3.3 surviennent quasi exclusivement dans les gliomes malins de l'enfant et du jeune adulte de moins de 30 ans et sont mutuellement exclusives. Elles concernent environ 40% des gliomes sustentoriels (G34) et 80% des DIPGs (K27) et sont également exclusives des mutations de *IDH1*. Elles correspondent à des entités clinico-anatomiques spécifiques à l'âge pédiatrique et à certaines localisations qui seront détaillées plus loin (Khuong-Quang et al., 2012).

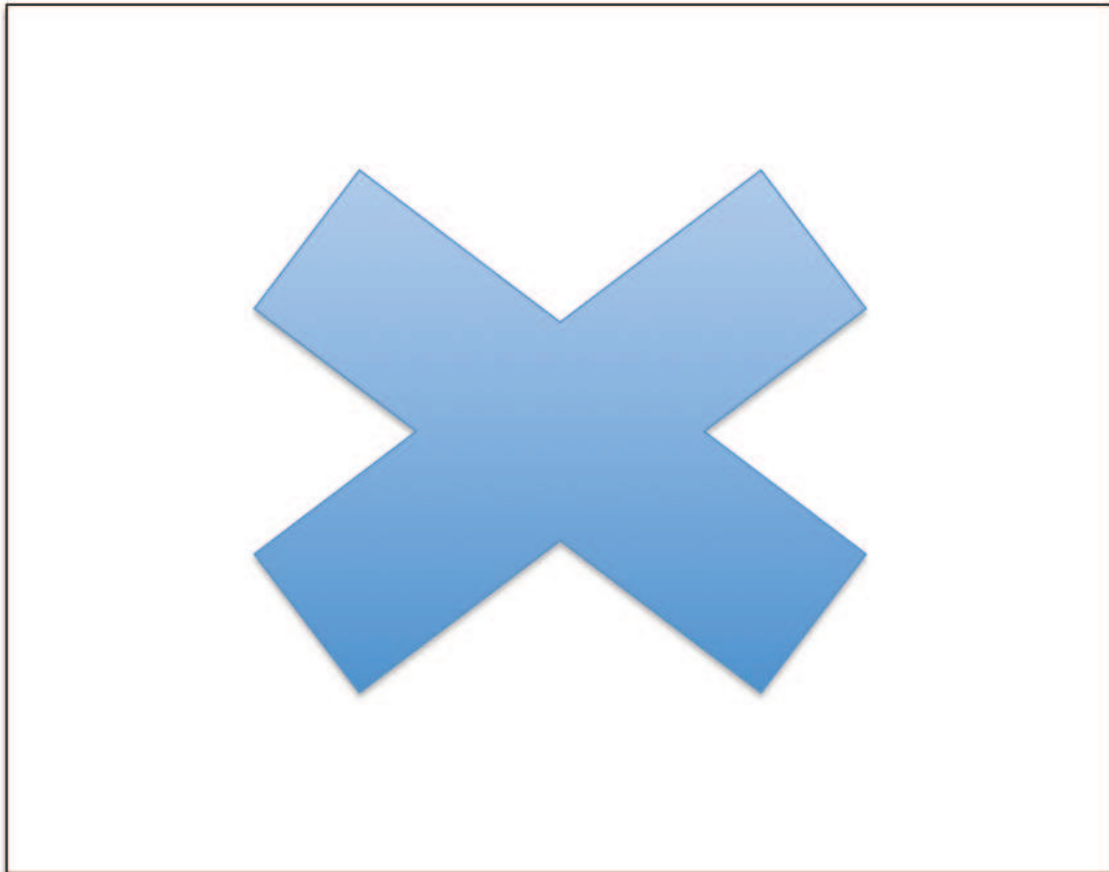
#### **I.C.2.4 Le phénotype d'allongement des télomères**

En l'absence d'une activité télomérase aberrante, les télomères raccourcissent au fur et à mesure des divisions cellulaires et conduisent à la sénescence de la cellule. Le développement des cancers est associé à un système actif de maintenance et d'allongement des télomères contribuant à l'immortalité de la cellule cancéreuse. L'hyper-activation de la télomérase est le mécanisme de maintenance des télomères le plus connu dans les cancers. Dans les gliomes, des mutations C228T et C250T du promoteur de la télomérase reverse transcriptase (***TERT***), sont particulièrement fréquentes et corrélées aux amplifications d'EGFR (Killela et al., 2013, 2014). Ces mutations sont associées à une surexpression transcriptionnelle du gène de la *TERT*.

Un autre système de maintenance indépendant de la télomérase, le système d'allongement alternatif des télomères (ou ALT pour Alternative Lengthening of Telomeres) a récemment été mis en évidence dans les gliomes et associé à des mutations du gène ***ATRX*** (Lovejoy et al., 2012). *ATRX* intervient dans un complexe de remodelage de la chromatine indépendant de la réplication impliquant également *DAXX* (*ATRX/DAXX* complexe). L'ALT repose sur le système de recombinaison homologue pour assurer le processus de maintenance. Le rôle du complexe des

protéines chaperonnes ATRX/DAXX serait celui notamment de déposer au niveau des télomères le variant des histones H3.3.

Chez l'adulte, les mutations d'ATRX sont fortement corrélées aux mutations de *TP53* et d'*IDH1* et donc caractéristiques des gliomes de bas grade et des glioblastomes secondaires à ces gliomes de bas grade. De façon intéressante, ces mutations sont exclusives des mutations de la TERT suggérant que la maintenance des télomères est un prérequis de la gliomagenèse par l'un ou l'autre de ces mécanismes. A l'âge pédiatrique, ces mutations, également associées aux mutations de *TP53*, sont corrélées cette fois aux mutations G34 de *H3F3A*. Un phénotype d'ALT est également associé aux mutations K27 de *H3F3A* dans les DIPGs, avec ou sans mutations d'ATRX (Buczkowicz et al., 2014).



**Figure 14 :** Les mécanismes assurant la maintenance des télomères dans les gliomes

(D'après Sturm et al.,2014).

### **I.C.2.5 Epigénome du glioblastome : vue d'ensemble**

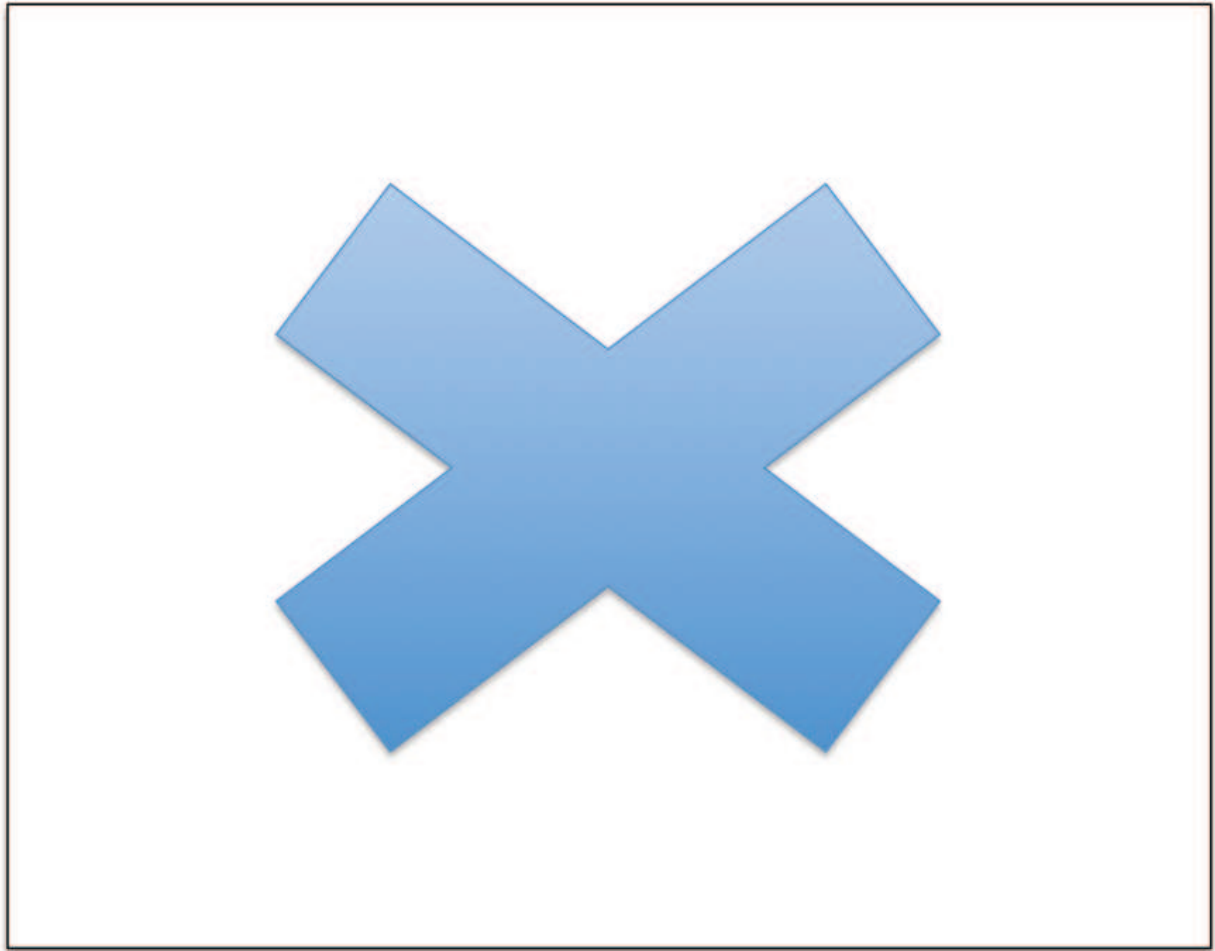
On distingue donc plusieurs grands mécanismes d'altérations épigénétiques dans les glioblastomes, générées par des mutations spécifiques qui sont: les mutations des histones spécifiques de l'enfant et les mutations d'*IDH1* ou de *SETD2* (Sturm et al., 2014). De façon intéressante, 46% des glioblastomes de l'adulte présentent au moins une mutation portant sur un gène intervenant dans la modification de la chromatine :

-Soit dans la méthylation : *IDH1*, *SETD2* mais aussi *KDM6A*, *MLL2,3,4*, *EZH2* et *HDAC2*

-Soit dans le remodelage chromatinien : *ATRX*, *CREBBP*, *CHD5,6,7,8,9* et *SMARCA2*

L'implication de l'isoforme *PKM2* (enzyme impliquée dans la glycolyse et le phénomène de Warburg) dans la régulation épigénétique a été récemment mise en évidence et corrélée aux surexpressions d'*EGFR* et de *PDGFRA* (Jiang et al., 2014; Venneti and Thompson, 2013; Yang et al., 2012). Ainsi la gliomagenèse semble être sous la dépendance de divers mécanismes de régulation épigénétique dont les interactions avec les altérations génomiques restent à définir. (Voir Figure 15).





**Figure 15** : Relations entre génome et épigénome dans le glioblastome (D'après Sturm et al, 2014)

### **I.C.3 Stratification moléculaire des glioblastomes**

Les premières études transcriptomiques menées dans les glioblastomes avaient permis de les stratifier en quatre sous-groupes d'expression distincts : proneural, mésenchymal, classique et neural. Chaque sous-groupe était enrichi d'anomalies génétiques caractéristiques (Verhaak et al., 2010). Des profils similaires ont été décrits chez l'enfant (Bax et al., 2010; Paugh et al., 2010; Wong et al., 2006).

Les études du méthylome et de l'exome de ces tumeurs sont venues compléter et affiner cette stratification en proposant une analyse intégrée de ces altérations génomiques, transcriptomiques et épigénomiques. De façon intéressante cette analyse menée sur des glioblastomes pédiatriques et adultes a mis en évidence l'existence de sous-groupes moléculaires spécifiquement corrélés à l'âge pédiatrique et la topographie de la tumeur et présentant des patterns de méthylation associés à des mutations spécifiques.

Trois sous-groupes ont pu ainsi être définis à partir de leurs caractéristiques épigénétiques et mutationnelles (Figures 3 et 4) (Sturm et al., 2012). Ces 3 sous-groupes sont relativement dépourvus des anomalies structurales génomiques classiquement décrites :

- 1) le premier est fortement corrélé aux mutations d'**IDH1** associées au phénotype G-CIMP. Ce sous-groupe est enrichi de mutations de *TP53* et d'*ATRX*, et présente un pattern d'expression pro-neural. Il présente globalement moins d'anomalies structurales de l'ADN que les autres GBMs de l'adulte. Il est associé aux GBM hémisphériques secondaires du **jeune adulte**, de localisation surtout temporale et frontale et présente un meilleur pronostic.
- 2) le deuxième est caractérisé par les mutations **G34** de **H3F3A**, associées à des mutations quasi constantes de *TP53* et d'*ATRX/DAXX* et à un pattern d'expression de type proneural. Ce sous-groupe est spécifique des GBM hémisphériques survenant à **l'adolescence**. Ces tumeurs auraient un pronostic intermédiaire. Ce sous-groupe est par ailleurs marqué par la sous-expression de *OLIG2* par hyperméthylation de son promoteur.
- 3) Le troisième est caractérisé par les mutations **K27** de **H3F3A**, également associées à des mutations de *TP53* (60% des cas) et *ATRX/DAXX* (30% des cas), des altérations de *PDGFRA* (30-40%) et un pattern d'expression mixte. Ce sous-groupe est spécifique des gliomes de la ligne médiane (tronc cérébral et thalamus) **de l'enfant** et les mutations K27 sont retrouvées dans 70-80% de ces gliomes. (Schwartzentruber et al., 2012;

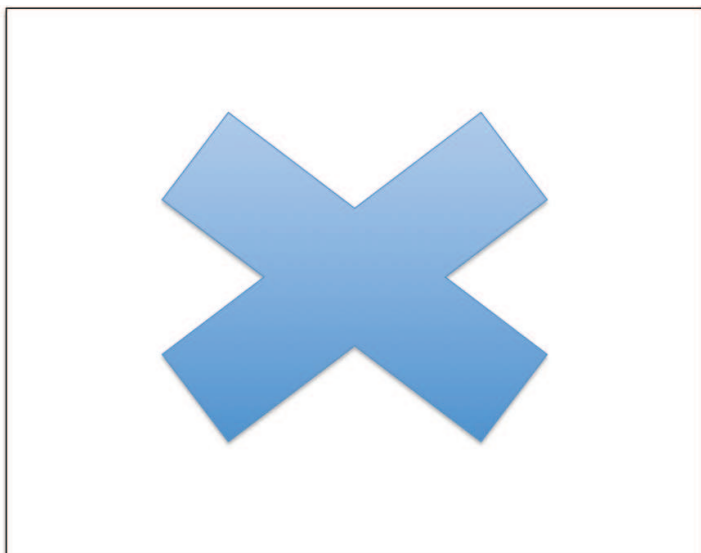
Wu et al., 2012, 2014) Ce sous-groupe est associé à un pronostic particulièrement sombre. A noter que les mutations K27 de *HIST1H3B* ou *HIST1H3C* sont également caractéristiques de ce sous-groupe (11-30%) et semblent être associées à des mutations activatrices nouvellement décrites d'ACVR1 (ou ALK2) (Buczkwicz et al., 2014; Taylor et al., 2014).

Les 3 autres profils décrits comme « non G-CIMP » et « non histone » recouvrent les profils d'expression transcriptomiques et les anomalies génomiques classiquement décrits dans les glioblastomes hémisphériques.

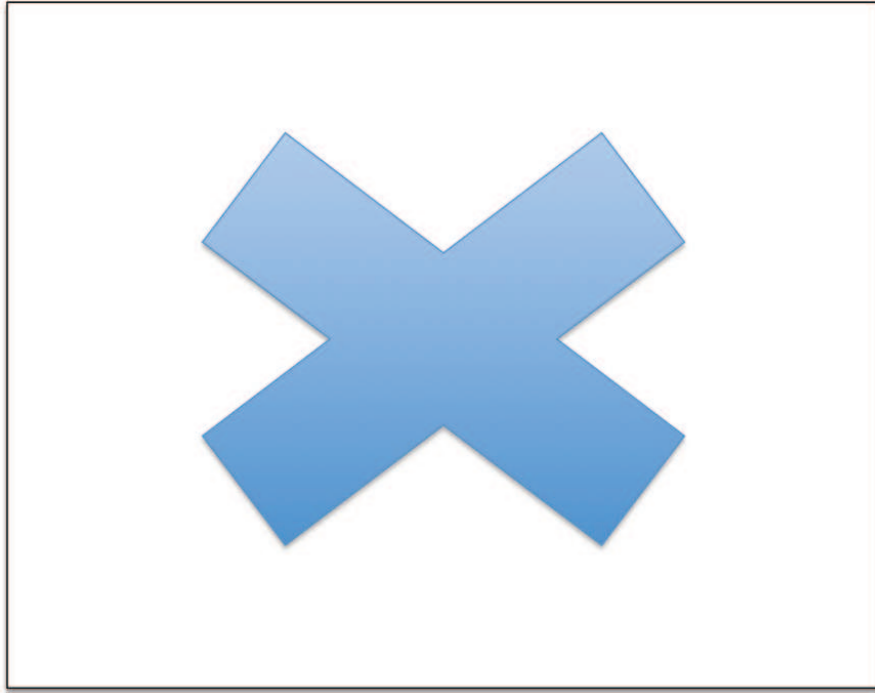
**-Le sous-groupe des RTK-I** est un sous-groupe d'expression pro-neurale (40% de ce sous-groupe) enrichi en altérations de PDGFRA. Il concerne des patients d'âge **pédiatrique comme adulte**.

**-Le sous-groupe des RTK-II** correspond au sous-groupe d'expression classique enrichi en altérations d'EGFR, aux délétions homozygotes de CDKN2A/B et aux anomalies chromosomiques 7+/10-. Ce sous-groupe est spécifique à l'adulte et correspond à des patients plus âgés.

**-Le sous-groupe d'expression dit mésenchymal** : est enrichi en mutations de NF1 et comporte diverses altérations de RTK. Une faible proportion de tumeurs de l'enfant, surtout des DIPGs, peut être classée dans ce sous-groupe.



**Figure 16** : Résumé des 6 sous-groupes de glioblastomes avec leurs caractéristiques moléculaires corrélées à l'âge (Sturm et al., 2014 ; Brennan et al., 2013)



**Figure 17 :** Répartition des anomalies moléculaires en fonction de la localisation intracérébrale et de l'impact pronostique (D'après Sturm et al., 2012)

Ainsi, en fonction du sous-groupe, la médiane de survie sans progression peut varier de 9 à 16 mois. A noter que l'ensemble de ces caractéristiques moléculaires concernent essentiellement les tumeurs gliales de haut grade de l'enfant de plus de 5 ans, sachant qu'avant cet âge, l'histologie, l'évolution et le pronostic de ces tumeurs sont extrêmement différents et seront considérés dans d'autres études (Dufour et al., 2006).

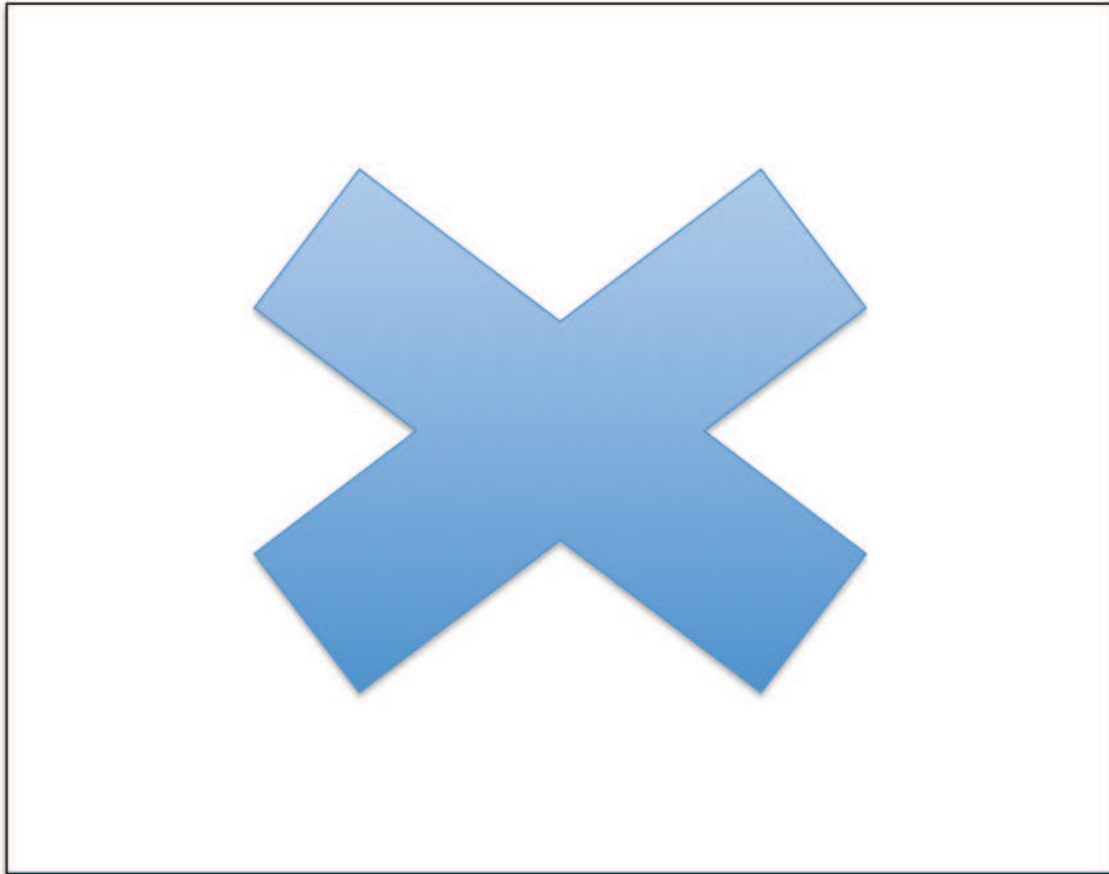
Des analyses moléculaires plus poussées ont été réalisées dans le sous-groupe des DIPGs à partir de collections tumorales obtenues selon différentes approches, compte-tenu de la difficulté technique mais aussi éthique à réaliser des biopsies chez ces patients. Ainsi certaines équipes ont étudié des prélèvements issus d'autopsies (Paugh et al., 2011), tandis que d'autres ont préféré perfectionner les techniques de biopsies stéréotaxiques permettant d'obtenir des échantillons tumoraux au diagnostic, avant tout traitement (Puget et al., 2012a). Ces études ont permis de mettre en évidence des cibles d'intérêt telles que les mutations des histones H3.1 et H3.1, des amplifications et des mutations spécifiques de PDGFRA avec des co-amplifications fréquentes de MET

(Paugh et al., 2011; Puget et al., 2012a) et enfin des mutations relativement fréquentes de *PIK3CA* (Grill et al., 2012). Trois profils transcriptomiques ont pu être distingués, enrichis chacun d'anomalies génomiques caractéristiques :

- a) un sous-groupe proneural fortement associé aux amplifications/mutations de *PDGFRA*, de phénotype plutôt oligodendroglial et sur-exprimant *OLIG2* (Paugh et al., 2011; Puget et al., 2012a)
- b) un sous-groupe mésenchymateux, sur-exprimant les facteurs de transcription associés à la transition épithélio-mésenchymateuse, au phénotype de cellule souche ainsi que les facteurs pro-angiogéniques et autres cibles de *HIF-1 $\alpha$*  induites par l'hypoxie intra-tumorale (Paugh et al., 2011; Puget et al., 2012a)
- c) un sous-groupe prolifératif, uniquement mis en évidence dans les échantillons post-mortem et pouvant donc représenter un phénotype de résistance, acquis après traitement par radiothérapie (Paugh et al., 2011)

### **Activation des voies de signalisation oncogéniques dans les glioblastomes**

De façon intéressante, le TCGA a corrélé les activations des voies oncogéniques fréquemment altérées dans les glioblastomes aux différents sous-groupes moléculaires ainsi stratifiés, en procédant à une analyse protéomique ciblée (Brennan et al., 2013).



**Figure 18** : Activation de la voie PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MEK/ERK dans les glioblastomes de l'adulte (groupe mésenchymal versus pro-neural)

(D'après Brennan et al., 2013, TCGA)

Le sous-groupe des RTK-I dit classique, présente une surexpression intense et attendue de l'EGFR, une surexpression modérée de NOTCH 1 et 3 et une sous-expression de certains facteurs pro-apoptotiques (BID, BAK etc...), ainsi que de la voie RAS-MAPK (notamment de p90RSK).

Le sous-groupe mésenchymal, présente des niveaux d'expression élevés de marqueurs endothéliaux comme CD31 et VEGFR-2, et de l'inflammation comme COX-2, une surexpression modérée de la voie RAS-MAPK (Phospho-RAF, Phospho-ERK, Phospho-MEK) et une sous-expression de la tubérine (produit de *TSC2*). En rapport avec cette activation, S6RP, cible de mTOR est suractivée (pS235-S6RP) par rapport au groupe mésenchymal.

Le sous-groupe proneural montre une activation marquée d'AKT et de 4E-BP1 (cible de mTOR) comparé au sous-groupe mésenchymal. Les tumeurs G-

CIMP+ sont caractérisées par la sous-expression de COX-2, d'IGFBP2 et de l'annexine 1.

Les glioblastomes présentant des amplifications de RTK ont de façon globale une plus faible activation des voies oncogéniques d'aval. Les pertes de PTEN sont associées aux niveaux de surexpression d'AKT les plus forts tandis que les mutations de la PI3K ont des faibles niveaux d'activation d'AKT. Enfin les mutations de NF1 sont associées à une forte activation de la voie RAS-MAPK.

Dans les gliomes de haut grade pédiatriques, il n'existe pour l'instant pas d'étude protéomique intégrée publiée, mais il a déjà été montré que les voies PI3K/AKT et RAS/MAPK sont activées dans la majorité des cas (avec des surexpressions de p-AKT et/ou p-ERK dans plus de 80% des cas). De façon intéressante, il semblerait exister comme dans les glioblastomes de l'adulte, une prédominance de l'une ou l'autre de ces voies dans la plupart des tumeurs. Ceci a été principalement décrit dans la publication de Wu et al. en 2014, qui confirmait les conclusions de Antonelli et al. de 2012 en montrant l'impact négatif sur la survie d'une surexpression prédominante d'AKT (Antonelli et al., 2012; Faury et al., 2007; Thorarinsdottir et al., 2008; Wu et al., 2014).

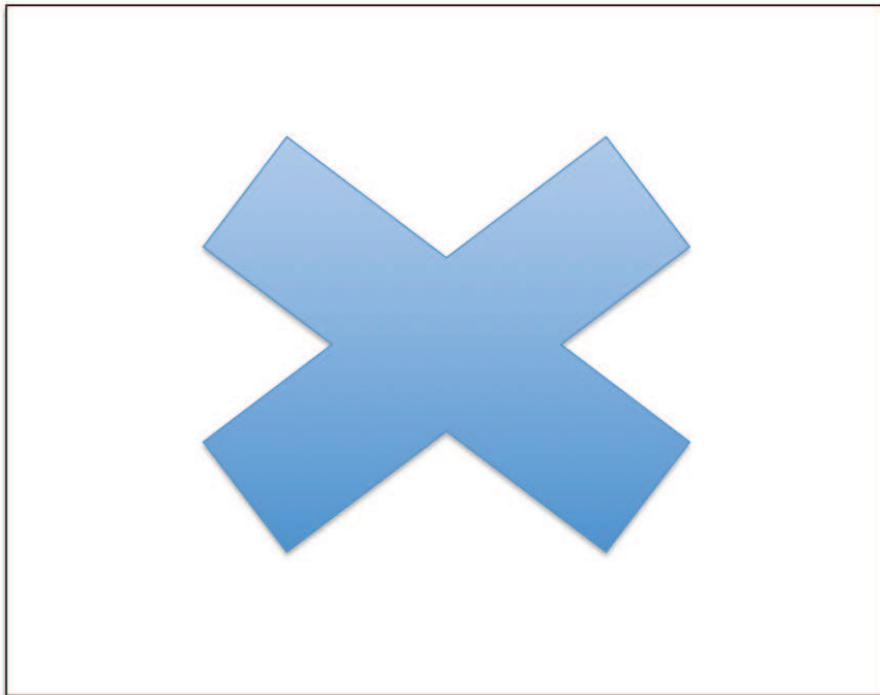
#### **I.C.4 Stratification moléculaire des gliomes anaplasiques de l'adulte**

A l'heure actuelle, trois marqueurs permettent de stratifier les gliomes diffus de grade II et III : la codélétion 1p19q et les mutations de *TP53* et d'*IDH1*. La mutation d'*IDH1* est identifiée dans plus de 80% des gliomes de grade II et III (Figarella-Branger et al., 2013).

La codélétion 1p19q est plus spécifique et retrouvée dans 50 à 70% des oligodendrogliomes. Les oligodendrogliomes de grade III combinent habituellement la codélétion 1p19q avec une délétion possible de *CDKN2A* dans 30% des cas mais les mutations de *PTEN* et la mosomie du 10 y sont rares. Les oligodendrogliomes anaplasiques sans codélétion 1p19q peuvent toutefois présenter des pertes du 10 et des gains du 7. L'amplification d'*EGFR*, de *PDGFRA*, de *CDK4* et de *MDM2* est rapportée dans moins de 10% des cas d'oligodendrogliomes (Jeuken et al., 2004).

Les mutations de TP53 semblent exclusives de la codélétion 1p19q et caractéristiques des astrocytomes diffus. Les gliomes mixtes peuvent présenter soit une codélétion de 1p19q s'ils siègent en dehors du lobe temporal, soit des mutations de TP53 s'ils sont temporaux ou diencephaliques (Eoli et al., 2006). Cependant, certains de ces gliomes ne présentent aucune de ces deux anomalies.

Le phénotype G-CIMP et la méthylation du promoteur de MGMT sont fortement corrélés aux mutations de IDH1. La mutation de IDH1 semble représenter un facteur de bon pronostic intrinsèque quel que soit le traitement mais est fortement associée à la méthylation de MGMT et la codélétion 1p19q qui quant à elles, ont montré une valeur prédictive de meilleure réponse aux agents alkylants. Les mutations de la TERT sont également fréquentes et corrélées au pronostic (Killela et al., 2014). L'intérêt d'une stratification des gliomes selon ces marqueurs est actuellement en cours d'évaluation dans des essais cliniques et des propositions de nouvelles classifications à intégrer dans celle de l'OMS émergent (Wiestler et al., 2014) (voir Figure 19).



**Figure 19** : Proposition d'une nouvelle classification des gliomes anaplasiques de l'adulte (D'après Wiestler et al, 2014), CNV : Copy Number Variation



## **I.C.5 La gliomagenèse et la théorie des cellules souches**

### **I.C.5.1 La théorie des cellules souches :**

L'hypothèse classique de la cancérogenèse repose sur un modèle dit stochastique, selon lequel chacune des cellules de la masse tumorale possède le même potentiel d'auto-renouvellement illimité et ainsi la même tumorigénicité. L'hétérogénéité tumorale dans ce modèle s'explique par l'acquisition de nouvelles altérations génétiques ou épigénétiques sélectionnées sous la pression de l'environnement tumoral (Dalerba et al., 2007). A l'inverse le modèle alternatif dit hiérarchique fait l'hypothèse que seul un pool limité de cellules tumorales dites souches possède cette capacité d'auto-renouvellement illimité et de tumorigénicité (Visvader and Lindeman, 2008). Les cellules souches tumorales, comme les cellules souches normales, sont capables de se différencier en de multiples sous-types cellulaires qui constituent ainsi la masse proliférative de la tumeur au sommet hiérarchique duquel se situent les cellules souches. Il a été cependant démontré que des cellules tumorales différenciées pouvaient être reprogrammées en cellules souches et former ainsi des sphères, suggérant que cet état souche pouvait être plastique (Dufour et al., 2009; Garvalov and Acker, 2011).

La présence de cellules à propriété souche dans les tumeurs cérébrales humaines a été mise en évidence pour la première fois par Ignatova et al qui ont isolé des précurseurs clonogéniques formant des neurosphères à partir de prélèvements chirurgicaux de glioblastomes et de médulloblastomes (Ignatova et al., 2002). Leur propriété tumorigénique a ensuite été validée chez la souris immunodéficente (Singh et al., 2003, 2004). Des cellules souches ont été également isolées à partir d'un grand nombre de tumeurs cérébrales pédiatriques (Thirant et al., 2011). Ces cellules à propriété souche expriment des marqueurs à la fois astrogliaux et neuronaux à leur surface ainsi que des marqueurs de cellule souche neurale utilisés pour leur identification tels que CD133, la nestine, SOX2, BMI1, Musashi, OCT4, CD44, CD15 ou les ABC transporteurs. Ces marqueurs permettent de cibler une population enrichie en cellules initiatrices de tumeurs même si aucun n'est spécifique per se et qu'une combinaison de marqueurs est préférable pour leur identification (Venere et al., 2011; Westphal and Lamszus, 2011). Une dérégulation

des mécanismes de contrôle de l'auto-renouvellement de ces cellules est probablement à l'origine de l'oncogenèse des gliomes (Vescovi et al., 2006).

### **I.C.5.2 Théories de la gliomagenèse**

La découverte des cellules de phénotype souche dans les glioblastomes et de la présence d'une neurogenèse qui persiste à l'âge adulte a fait émerger l'idée que les cellules souches neurales pouvaient être à l'origine de la formation des gliomes. De nombreux modèles murins soutiennent cette hypothèse (Liu and Zong, 2012; Modrek et al., 2014). Les CSNs mais aussi les progéniteurs oligodendrogliaux (OPCs) peuvent donner naissance à des gliomes après manipulation génétique (Sturm et al., 2014). De façon surprenante des neurones ou des astrocytes matures transformés après invalidation génétique de *NF1* et *TP53* sont aussi capables de générer une tumeur *in vivo* (Friedmann-Morvinski et al., 2012). Ces observations peuvent expliquer la grande hétérogénéité et plasticité morphologique des gliomes mais empêchent la formulation d'une théorie unique sur la gliomagenèse. La théorie actuelle présume d'une origine de type CSN pour les glioblastomes de novo, tandis que les glioblastomes secondaires et les gliomes de plus bas grade dont ils sont issus seraient issus des OPCs (Lai et al., 2011). Les OPCs semblent aussi représenter la cellule d'origine des glioblastomes mutés sur *NF1* et *TP53* (Liu and Zong, 2012).

Enfin, l'existence d'entités anatomo-cliniques propres à l'âge pédiatrique suggère une origine développementale spécifique aux gliomes pédiatriques. Récemment des cellules possédant un phénotype de CSN ont été identifiées dans les structures pontiques de cerveaux humains et murins à l'âge du pic d'incidence des DIPGs, suggérant que la survenue de ces tumeurs correspondait à une réactivation de la neurogenèse dans cette fenêtre spatio-temporelle précise du développement humain (Monje et al., 2011). De façon intéressante, les signatures transcriptomiques associées aux glioblastomes porteurs de mutations des histones K27 ou G34 sont superposables à celles de cellules provenant de régions anatomiques distinctes et à des stades développementaux spécifiques (Kang et al., 2011). Cependant les modèles murins *Trp53*-null H3 K27M mutés n'ont pas généré

de gliomes, ce qui signifie que le contexte développemental et / ou l'acquisition de mutations supplémentaires sont nécessaires à la formation des gliomes pédiatriques de la ligne médiane (Lewis and Allis, 2013).

## **I.D Modèles précliniques**

Les lignées dérivées de tumeurs de patients maintenues en culture ou en xénogreffe restent, malgré les limitations inhérentes à chacun de ces modèles, des outils incontournables de prédiction préclinique de l'efficacité d'un nouvel agent thérapeutique (Sharma et al., 2010). Ainsi, afin de pouvoir identifier et valider de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des gliomes malins pédiatriques, le développement d'un large panel de modèles précliniques *in vitro* et *in vivo* capables de représenter la diversité et la spécificité de leurs caractéristiques moléculaires est fondamental (Neale et al., 2008). Jusqu'à présent peu nombreux en pédiatrie, ces modèles font actuellement l'objet d'un important effort collaboratif international autour de leur développement et de leur échange (Jones et al., 2012; Taylor et al., 2014).

### **I.D.1 Modèles cellulaires**

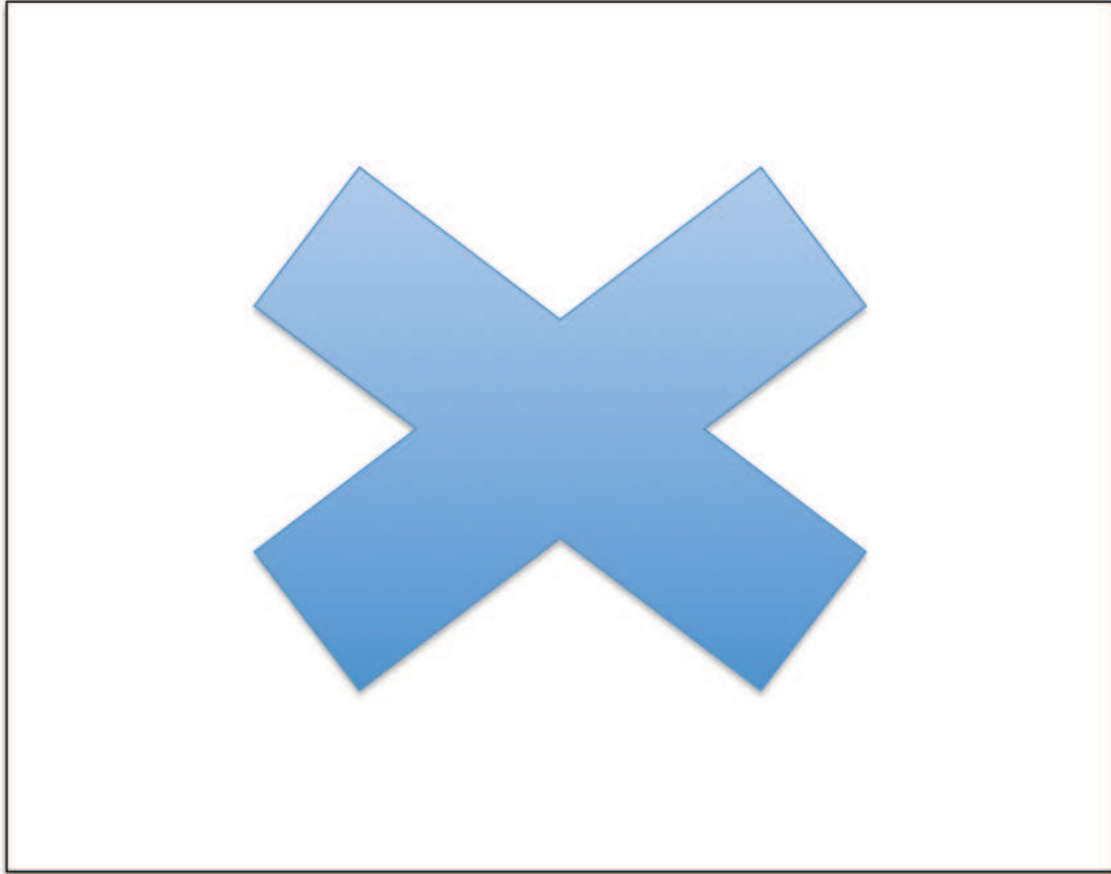
Les lignées cellulaires immortalisées dérivées de tissu tumoral de patients restent le modèle *in vitro* le plus utilisé actuellement en recherche pré-clinique. Rassemblées au sein de banques comme celle des plateformes du NCI60 ou du CMT1000, celles-ci ont permis le développement de larges programmes de testing et de screening de drogues *in vitro* haut débit. En plus de la découverte de nouveaux agents thérapeutiques, la caractérisation pangénomique de ces lignées en parallèle du testing a permis de corrélérer le génotype à la réponse aux thérapeutiques testées (Barretina et al., 2012). Il a été établi que ces lignées, malgré certaines distinctions, conservent la majeure partie des caractéristiques génomiques des tumeurs dont elles sont issues ainsi qu'un profil similaire de réponse aux traitements (Neve et al., 2006; Sos et al., 2009). Cette similarité donne ainsi une signification clinique à ces

corrélations génotype-réponse observées *in vitro*. Si tant est que l'ensemble de ces lignées puisse représenter la diversité et l'hétérogénéité des tumeurs humaines, cette approche peut donc aboutir à l'identification de biomarqueurs prédictifs de réponse et ainsi participer à une stratification des patients en de multiples sous-groupes basés sur ces biomarqueurs et susceptibles de répondre à des thérapies précises. Cette stratification des patients a montré son importance depuis l'avènement des thérapies dites « ciblées », dont l'efficacité est souvent restreinte à un sous-groupe de patients présentant une anomalie génomique relativement peu fréquente. Etant donnée la complexité croissante de cette stratification, le nombre de lignées cellulaires à même de représenter cette diversité génomique s'accroît tandis que l'analyse de leur profil nécessite des technologies haut débit particulièrement performantes (Sharma et al., 2010).

En pédiatrie, il existe très peu de lignées immortalisées de gliomes malins aisément disponibles. Une volonté de coopération européenne et internationale est en cours pour la mise au point de lignées dérivées de gliomes localisés dans le tronc cérébral, le thalamus et les hémisphères. De plus, très peu d'entre elles ont fait l'objet d'une caractérisation exhaustive (Jones et al., 2012). En particulier, 3 lignées ont été caractérisées et utilisées dans de nombreuses études précliniques ainsi que dans ce travail de thèse (Bax et al., 2009; Bielen et al., 2011; Gaspar et al., 2010). Celles-ci possèdent les caractéristiques cliniques et moléculaires suivantes :

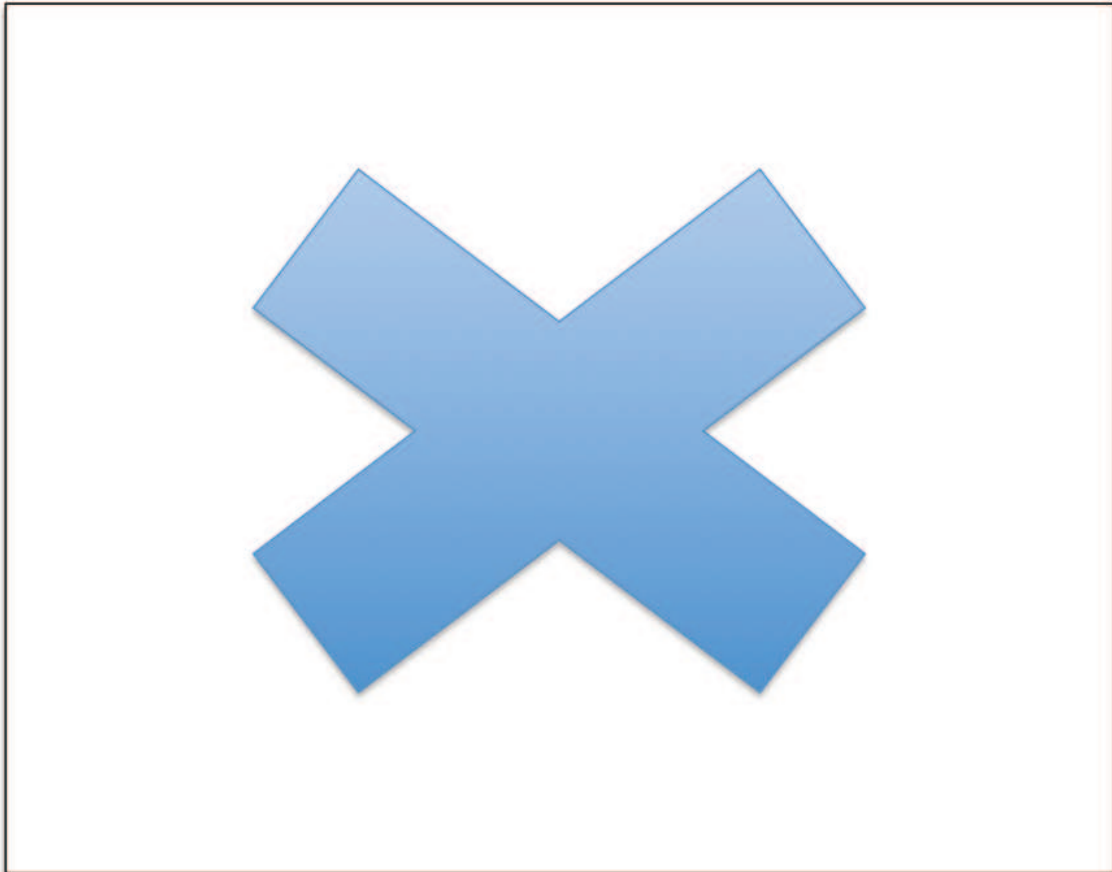
- **KNS42** (Figure 20): dérivée en 1987 du **glioblastome** hémisphérique (fronto-pariétal) d'un adolescent japonais de 16 ans, cette lignée est la seule à être commercialisée (Takeshita et al., 1987). Celle-ci présente un génome triploïde et hautement réarrangé avec notamment un gain du nombre de copies de **PIK3CA** (3q26). Une mutation au niveau du gène de l'histone H3.3 (**H3F3A G34V**) a été identifiée dans cette lignée. Cette mutation est associée à une hypométhylation globale et une signature d'expression génique spécifique avec en particulier une surexpression de **MYCN** (Bjerke et al., 2013). Par ailleurs elle a été rapportée comme sur-exprimant **IGF1R** et **EGFR** (Bielen et al., 2011; Inaba et al., 2011). Elle est également porteuse d'une mutation de **TP53** ainsi qu'une hyperméthylation du promoteur de **MGMT**. La Figure 8 décrit la caractérisation génomique et l'expression des gènes dans cette

lignée. Cette analyse a été effectuée par l'équipe de Chris Jones et Alan MacKay (ICR, Londres).



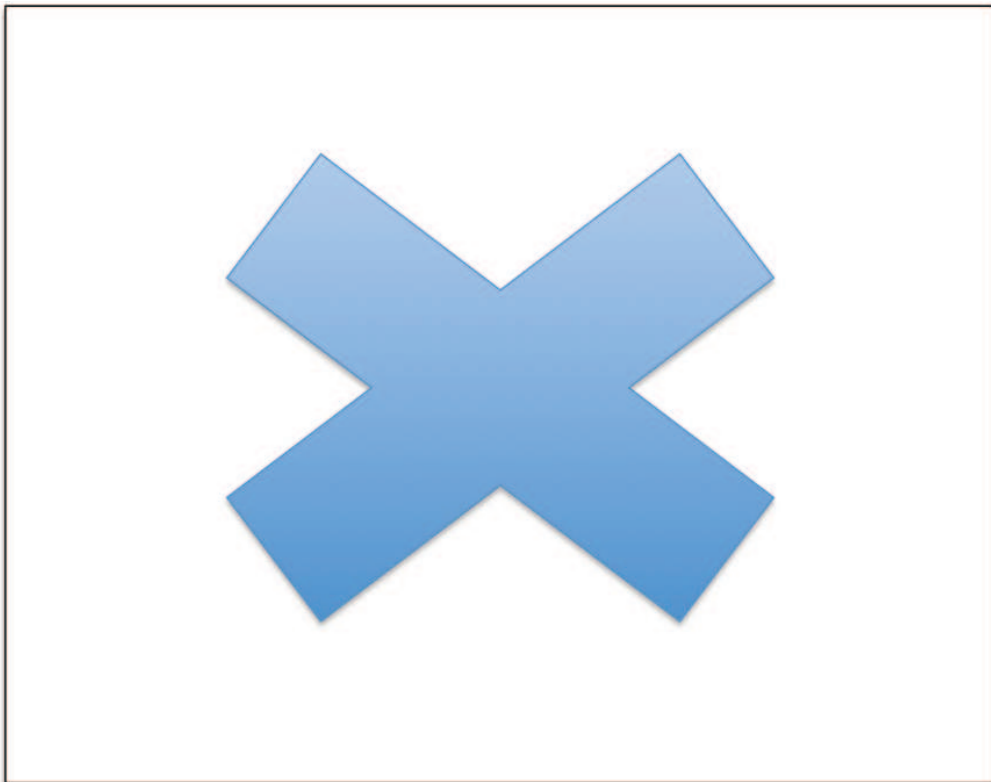
**Figure 20:** Caractérisation moléculaire de la lignée KNS42  
(D'après Chris Jones et Alan MacKay, données personnelles non publiées)

- **SF188** (Figure 21): dérivée en 1980 du **glioblastome** hémisphérique (frontal) d'un garçon de 8 ans et qui présente des amplifications de plusieurs oncogènes tels que **MYC** (8q24), **CDK4** (12q14) et **CCND1** (11q13) ainsi qu'une délétion focale de **NF1** (17q11.2) (Bax et al., 2009; Trent et al., 1986). Elle est également porteuse d'une mutation de **TP53** mais pas des histones.



**Figure 21** : Caractérisation moléculaire de la lignée SF188  
(D'après Chris Jones et Alan MacKay, données personnelles non publiées)

- **UW479** (Figure 22): dérivée d'un **astrocytome anaplasique** obtenu chez une enfant de 13 ans et qui comporte principalement une délétion homozygote de **CDKN2A/B** (9p12) ainsi qu'une hyperméthylation extensive de nombreux promoteurs de gènes (**phénotype hyperméthylateur**) tels que *APC*, *CASP8*, *CD44*, *CDH13*, *CHFR*, *ESR1*, *GSTP1*, *IGSF4*, *PAX5A*, *PAX6*, *RARB* et **MGMT**. Elle est également porteuse d'une mutation de **TP53** mais pas des histones.



**Figure 22** : Caractérisation moléculaire de la lignée UW479

(D'après Chris Jones et Alan MacKay, données personnelles non publiées)

### **I.D.1.1 Limites des modèles cellulaires maintenus *in vitro***

Même si l'analyse haut débit des lignées cellulaires a été et est très importante pour la découverte de nouvelles thérapies et la compréhension des mécanismes moléculaires sous-tendant la réponse à ces thérapies, la transposabilité clinique de ces modèles reste limitée en raison des nombreux artéfacts liés aux conditions de culture *in vitro*.

De façon évidente, les lignées cellulaires adhérentes sont cultivées de façon artificielle, dans un environnement non physiologique. Celles-ci sont en effet cultivées en 2 dimensions sur du plastique, en l'absence de toute interaction avec les cellules inflammatoires et de soutien du microenvironnement, dans du sérum fœtal d'origine bovine et dans des conditions d'oxygénation (21% O<sub>2</sub>) non physiologiques puisque les niveaux mesurés dans une tumeur varient plutôt entre 1 et 5% d'O<sub>2</sub> (voir chapitre suivant sur l'hypoxie intra-tumorale). Leur utilisation est donc difficilement applicable à l'évaluation de l'efficacité des thérapies anti-angiogéniques ou ciblant l'hypoxie intra-tumorale par exemple (Sharma et al., 2010).

Par ailleurs, il existe des biais de représentativité des lignées par rapport à la tumeur d'origine d'une part et à la diversité moléculaire des cancers d'autre part. En effet, même si ces lignées conservent la majeure partie des anomalies génomiques de la tumeur d'origine, il existe néanmoins certaines distinctions comme l'illustre très bien la surreprésentation des mutations de *TP53* observée dans les lignées cellulaires (Drexler et al., 2000). L'une des hypothèses formulées serait que les conditions de culture riches en glucose favoriseraient la sélection de clones tumoraux mutés car mieux adaptés aux contraintes de culture grâce à un métabolisme glycolytique prépondérant. Le phénotype glycolytique est d'ailleurs le phénotype métabolique le plus fréquemment décrit dans les lignées cellulaires. De fait, ces lignées cellulaires ne représentent qu'imparfaitement l'hétérogénéité de la tumeur initiale car elles résultent de la sélection des cellules les mieux adaptées aux contraintes de culture *in vitro*. A noter également que certaines lignées à croissance lente ne permettent pas l'évaluation standardisée de l'effet anti-prolifératif d'un agent thérapeutique (réalisée habituellement sur 72h) et sont donc souvent exclues des études précliniques. Enfin, les lignées établies n'ont pas forcément la capacité à générer une tumeur quand elles sont injectées chez la souris immuno-déficiente. Ceci peut signifier que ces lignées ne contiennent pas toutes la même proportion de cellules dites « initiatrices de tumeur » et donc que certaines de ces lignées ne sont pas capables de mimer les phénotypes de résistance liés à ces cellules (Sharma et al., 2010).

Les lignées établies depuis longtemps (comme par exemple KNS42 et SF188 établies dans les années 80 !) sont susceptibles d'avoir dérivées au fur et à mesure



de leurs multiples passages et circulations entre de nombreux laboratoires. Leur caractérisation préalable est donc fondamentale. Ces modèles restent cependant un outil de compréhension mécanistique important dont il faut toutefois connaître les limites et champs d'application.

## **I.D.2 Nouveaux modèles *in vitro* « *in vivo-like* »**

Plusieurs stratégies ont été développées afin de mieux approcher la physiologie de la tumeur *in vivo* en termes de croissance et d'interaction avec le microenvironnement, à travers de nouveaux modèles *in vitro*.

-Les cultures de **neurosphères** permettent l'isolement de cellules possédant des caractéristiques de cellules souches (cellules souches-like), à partir de tumeurs de patients. Ces neurosphères sont des cellules non-adhérentes regroupées en sphéroïdes et cultivées dans du milieu exempt de sérum foetal bovin mais enrichi en FGF et EGF (Singh et al., 2003, 2004). Les neurosphères auraient plus de similitudes génomiques et transcriptomiques avec la tumeur d'origine que les lignées adhérentes standard, similitudes qui seraient conservées à travers de multiples passages (De Witt Hamer et al., 2008, référencé à Witt). Les neurosphères mimeraient au mieux les phénotypes de résistance associés aux cellules souches-like dans les tumeurs. Cette stratégie est en plein développement dans les tumeurs cérébrales pédiatriques mais leurs particularités génétiques sont encore peu connues (Monje et al., 2011; Thirant et al., 2011). Il reste pourtant difficile d'utiliser les neurosphères dans des applications de testing de drogues haut débit étant donné leur croissance lente et la variabilité expérimentale liée à leur hétérogénéité cellulaire et aux challenges techniques du comptage automatisé sur des structures 3D.

-Les systèmes de culture en **3 dimensions** (3D) ont pour but, en recréant une structure tumorale 3D, de mieux reproduire la croissance de la tumeur et ses interactions avec le microenvironnement observées *in vivo*. Parmi ces systèmes, les cultures en sphéroïdes (en milieu standard) et les explants organotypiques sont les plus connus. De nombreux challenges techniques sont associés à ces méthodes et nécessitent encore de nombreuses mises au point pour pouvoir les utiliser à grande échelle, de façon automatisée (Yamada and Cukierman, 2007).

-Les systèmes de culture **en hypoxie** dans des incubateurs spécifiques peuvent recréer les conditions intra-tumorales d'oxygénation qui peuvent varier de 1 à 5%, et ainsi permettre une meilleure évaluation de l'efficacité d'une drogue en hypoxie et d'évaluer les stratégies ciblant les voies de l'hypoxie (Levin et al., 2012; Pencreach et al., 2009).

### **I.D.3 Modèles in vivo : les xénogreffes**

Les modèles animaux sont incontournables pour l'évaluation préclinique, pharmacocinétique et toxique d'une nouvelle thérapie avant son utilisation chez l'homme. Ils permettent également d'évaluer de façon plus physiologique, l'efficacité et les mécanismes pharmacodynamiques de cette nouvelle thérapie. Les modèles murins de xénogreffes sont actuellement les plus utilisés. Les lignées de xénogreffes dérivées de tumeurs de patients à partir de souris immuno-déficientes (athymiques ou NOD/SCID) semblent plus fidèles, sur le plan génomique, à la tumeur d'origine que les lignées cellulaires *in vitro*, même après plusieurs générations (Guenot et al., 2006; Morton and Houghton, 2007). Ces xénogreffes obtenues après transplantation directe de la tumeur du patient en sous-cutané sur les flancs de la souris ou au mieux de façon orthotopique dans l'organe d'origine de la tumeur, sont capables de reproduire les caractéristiques histologiques ainsi que la micro-vascularisation et la nécrose observées dans la tumeur d'origine.

La controverse quant à la capacité de ces modèles à prédire l'efficacité clinique d'une thérapie a été largement effacée grâce aux progrès réalisés sur la connaissance du métabolisme murin et des correspondances pharmacocinétiques homme-souris. Ainsi, les corrélations entre génotype de la tumeur et sa réponse au traitement, ont pu être réalisées à partir de schémas thérapeutiques cliniquement transposables à l'homme (Morton and Houghton, 2007). De plus, l'amélioration des explorations par imagerie adaptées au petit animal devrait permettre une meilleure évaluation de la réponse au traitement que celle du seul volume tumoral, point crucial pour évaluer l'efficacité des traitements anti-angiogéniques par exemple. Ces modèles sont donc précieux pour la recherche de biomarqueurs prédictifs de

réponse aux agents thérapeutiques et pour la stratification des patients basée sur ces biomarqueurs (Sharma et al., 2010).

Cependant, toutes les tumeurs ne poussent pas en xénogreffes et la plupart des xénogreffes ne parviennent pas à reproduire le caractère métastatique (ou diffus pour les gliomes) de la tumeur d'origine. Il existe donc aussi un biais, même s'il est moins prononcé que pour les lignées *in vitro*, dans la capacité de ces modèles animaux à représenter l'hétérogénéité tumorale. Ceci peut être expliqué encore une fois par une dérive génétique par rapport à la tumeur d'origine en faveur des cellules les mieux adaptées à un microenvironnement non physiologique, et l'inadéquation de ce microenvironnement au développement de phénotypes invasifs. Le microenvironnement immuno-déprimé et bien sûr murin reste éloigné du microenvironnement humain. Le stroma de la xénogreffe comporte une proportion variable de cellules murines et doit bien sûr influencer l'invasion tumorale. Par ailleurs, la logistique sous-jacente à de tels projets animaux lourde et coûteuse ne permet pas d'envisager de screening haut débit tel qu'il a été réalisé dans les lignées cellulaires *in vitro* (Sharma et al., 2010).

Plusieurs stratégies ont été développées pour améliorer ces modèles animaux. Les implantations orthotopiques améliorent à la fois la prise de la greffe et la reproduction des caractères métastatiques ou invasifs de la tumeur. Dans les glioblastomes de l'adulte, la culture préalable de biopsies en sphéroïdes avant injection orthotopique dans des rats immuno-déficients, a permis d'augmenter le rendement de la prise de la xénogreffe ainsi qu'une meilleure reproduction du caractère diffus et nécrotique du glioblastome que celle obtenue avec des lignées cellulaires standards (Keunen et al., 2011; Wang et al., 2009). Le développement de souris NOD/SCID/IL2R<sub>γ</sub> null (NSG) a permis l'obtention de meilleures xénogreffes pour les tumeurs difficiles. Les souris humanisées possédant un système immunitaire humain ou bien un microenvironnement spécifique humain et les souris génétiquement modifiées (GEMMs) possédant des altérations oncogéniques précises sont encore d'autres modèles prometteurs (Chow and Baker, 2012).

En neuro-oncologie pédiatrique, de nombreux modèles de xénogreffes de tumeurs cérébrales ont été développés et ont permis une évaluation précoce de l'efficacité de chimiothérapies comme l'irinotecan et le topotecan (Vassal et al., 1996,

1997). Cependant, les modèles de gliomes malins et de DIPG restent peu nombreux et difficiles d'accès. Les 6 modèles de gliomes malins en xénogreffes sous-cutanées développés par le « Paediatric Preclinical Testing Panel » sous l'égide du NCI ont été les plus utilisés pour des études précliniques (Houghton et al., 2007; Neale et al., 2008; Smith and Anderson, 2004). Les lignées dites « commerciales » décrites dans le paragraphe ci-dessus ont pu être mises en xénogreffe orthotopique et sous-cutanée avec des difficultés spécifiques à chacune et un temps de pousse relativement long (Bax et al., 2009).

### **I.D.3.1 Vers une médecine personnalisée ?**

Ces approches précliniques *in vitro* ou *in vivo* convergent vers la possibilité idéale d'une médecine personnalisée où chaque patient posséderait son avatar « lignée cellulaire » et « xénogreffe » dérivés à partir de sa tumeur (Malaney et al., 2014). Dans ce modèle idéal, l'avatar souris humanisé posséderait le système immunitaire du patient et le traitement des souris permettrait de guider directement la thérapie de première ligne et d'anticiper les mécanismes de résistance aux drogues utilisées. Enfin, le screening haut débit réalisé à partir de sa lignée permettrait de trouver de nouveaux agents thérapeutiques. Il est évident que pour l'instant, cette médecine personnalisée, en raison de limitations techniques et logistiques, essentiellement liées à une mise en place très longue dans le temps et très fastidieuse et coûteuse en pratique, peut difficilement guider la thérapie pour le bénéfice individuel du patient. Certaines études précliniques couplées à des essais cliniques ont relevé le défi à travers des « Co-clinical trials » où des modèles de xénogreffes étaient dérivés des tumeurs des patients inclus dans l'essai. Ces études ont permis d'identifier des biomarqueurs et des techniques d'imagerie fonctionnelle d'intérêt qui pourront ensuite être validés dans d'autres essais cliniques (Nardella et al., 2011). Cette stratégie permet donc d'accélérer la recherche sur les biomarqueurs prédictifs de réponse et de développer des outils d'imagerie permettant le monitoring de cette réponse grâce à la multiplication des modèles directement dérivés des patients.

## **I.E Traitements des gliomes de haut grade pédiatriques**

Malgré une prise en charge thérapeutique multidisciplinaire basée sur la chirurgie, la radiothérapie et les agents alkylant, la survie des patients porteurs d'un gliome malin reste sombre quel que soit l'âge. De façon globale, la plupart des patients décèdent dans les trois ans suivant le diagnostic. Une meilleure connaissance de la biologie des tumeurs gliales pédiatriques a permis de mettre en évidence des différences importantes pouvant éventuellement sous-tendre des différences de réponses aux traitements. Cependant, jusqu'à présent, leur traitement repose encore sur des traitements conventionnels calqués sur la prise en charge de l'adulte. De nombreux essais cliniques, testant de nouvelles thérapies ciblées seules ou en combinaison avec les chimiothérapies classiques tentent de répondre à ces spécificités pédiatriques.

### **I.E.1 Les traitements de première ligne**

#### **I.E.1.1 Chirurgie**

Dans les tumeurs sus-tentorielles thalamiques ou hémisphériques, la prise en charge thérapeutique débute par une chirurgie permettant la confirmation du diagnostic ainsi qu'une résection tumorale la plus complète possible tout en préservant les fonctions cognitives et la qualité de vie des patients. Passées les controverses des précédentes décennies, l'importance de l'étendue de la résection est actuellement un élément pronostique bien établi, corrélé à la survie globale chez l'adulte comme chez l'enfant (Qaddoumi et al., 2009; Rutka and Kuo, 2004). En raison du caractère diffus des gliomes, il reste toutefois difficile d'appréhender la qualité de la résection en termes carcinologiques classiques. La mesure systématique sur une IRM post-opératoire du volume résiduel de la prise de contraste tumorale permet d'évaluer le caractère total (absence de tissu résiduel) ou non de la résection. Ainsi, avec ces nouveaux critères, l'intérêt d'une résection dite totale est clairement démontré dans les gliomes malins avec un allongement de la

survie globale allant de quelques mois pour les glioblastomes à 12 mois pour les gliomes anaplasiques (Sanai and Berger, 2008).

Dans les gliomes diffus du tronc cérébral, une résection complète n'est pas envisageable, en raison des fonctions vitales de cet organe et du caractère diffusé du gliome dans l'ensemble du tissu pontique. Le tableau clinique (symptomatologie et âge de survenue) associé à des caractéristiques évocatrices à l'IRM (lésion infiltrée dans généralement plus de 50% du pont, hypointense en T1 et hyperintense en T2) suffisent en règle générale à établir le diagnostic de gliome diffus du tronc. De plus, comme le grade (II, III ou IV) ou le sous-type histologique ne semblent pas impacter l'évolution de toute façon rapidement fatale de ces tumeurs, la pratique de biopsies exploratoires a longtemps été considérée comme trop invasive et éthiquement non recevable en l'absence de bénéfice direct pour la prise en charge du patient en routine et réservée au cadre strict des essais cliniques (Albright et al., 1993). Ainsi, afin de pouvoir étudier et caractériser ces tumeurs, plusieurs groupes ont constitué des banques de tissus et même dérivé des modèles cellulaires à partir d'autopsies (Broniscer et al., 2010; Caretti et al., 2013; Monje et al., 2011). D'autres ont pu démontrer la sécurité (pas de mortalité et faible morbidité) des biopsies stéréotaxiques réalisées au diagnostic par voie trans-cérébelleuse (Puget et al., 2012b). Leur intérêt pronostique a également été démontré au sein d'essais cliniques (Geoerger et al., 2011) ou de grands programmes de caractérisation génomique (Cage et al., 2013; Puget et al., 2012a).

### **I.E.1.2 La radiothérapie**

La radiothérapie est la première thérapie à avoir permis une augmentation, bien que modeste, de la survie globale dans les gliomes malins. Elle est délivrée de façon conventionnelle avec des doses totales de 54 à 60 Gy sur 6 semaines en fractions de 1.8 à 2 Gy. Elle est administrée rapidement après la résection chirurgicale dans les gliomes malins sus-tentoriels ou bien d'emblée, ou après la biopsie chirurgicale dans les gliomes diffus du tronc. Le plus souvent, la radiothérapie seule ne permet qu'un contrôle transitoire de la croissance tumorale. Dans les gliomes diffus du tronc cérébral, elle reste le seul traitement de référence

en l'absence de bénéfice supplémentaire obtenu avec toutes les autres thérapies testées jusqu'à présent (Chassot et al., 2012).

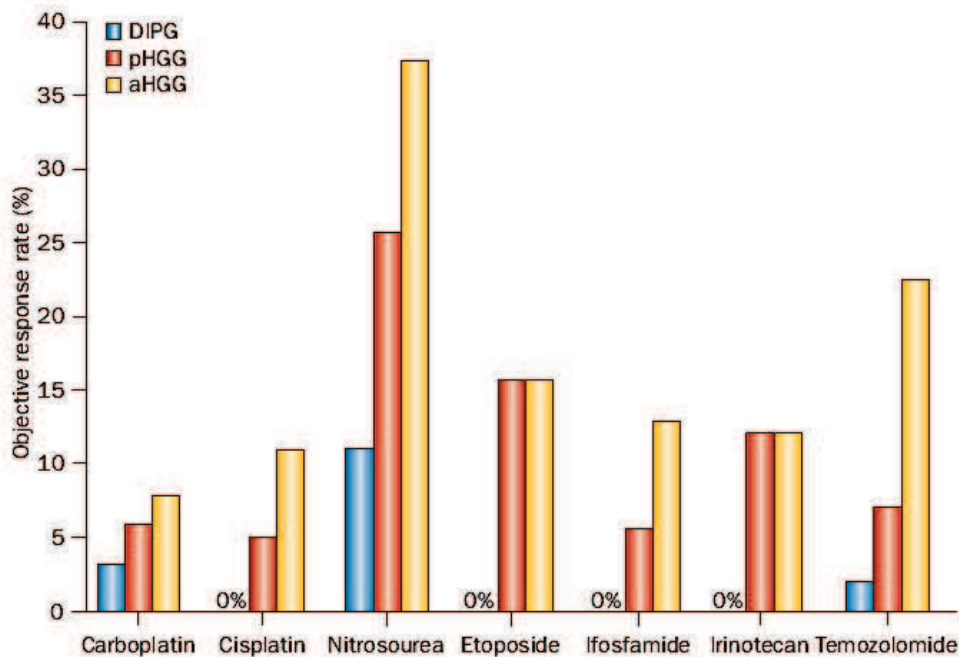
D'autres modalités de délivrance de la radiothérapie ont été testées pour augmenter son efficacité ou en améliorer la tolérance. Les schémas d'administration hyperfractionnée (augmentation de la dose totale délivrée), tout comme les pré-irradiations avant résection ou l'utilisation de radio-sensibilisants n'ont pas permis d'améliorer la survie dans les gliomes malins de l'adulte et de l'enfant. Dans un cadre palliatif, des schémas hypofractionnés sur 3 ou 4 semaines ont permis chez des patients de très mauvais pronostic tels que les patients âgés ou les patients pédiatriques atteints de gliome du tronc, d'obtenir des résultats comparables tout en allégeant le poids du traitement (Jansen et al., 2012; Janssens et al., 2013).

### **I.E.1.3 La chimiothérapie**

Le bénéfice de l'adjonction d'une chimiothérapie à la radiothérapie dans les gliomes malins de l'adulte a été démontré 20 ans auparavant dans une méta-analyse de 16 essais regroupant plus de 3000 patients (Fine et al., 1993). De nombreuses chimiothérapies ont été étudiées individuellement ou en association avec la radiothérapie dans les gliomes malins de l'adulte et de l'enfant (Pollack et al., 1999; Stupp et al., 2006) Des taux de réponses objectives (ensemble des réponses tumorales partielles et complètes) relativement comparables aux adultes ont été objectivés en réponse à la plupart des chimiothérapies conventionnelles testées en monothérapie dans les gliomes malins pédiatriques sus-tentoriels, à l'opposé des gliomes diffus du tronc cérébral pour lesquels une très modeste (voire aucune) réponse a pu être objectivée (Figure 23). En effet, dans les tumeurs du tronc cérébral, la chimiothérapie n'a fait preuve d'aucun bénéfice quel que soit le schéma thérapeutique ou les drogues utilisées (Chassot et al., 2012; Frappaz et al., 2008; Jalali et al., 2010; Warren et al., 2012; Zaky et al., 2013). On observe cependant une moindre réponse aux agents alkylants (nitrosourés et témozolomide) en monothérapie dans les gliomes malins sus-tentoriels de l'enfant comparée à celle observée chez l'adulte.

La chimiothérapie de référence administrée dans les glioblastomes de l'adulte est le temozolomide (agent alkylant méthylant) qui a permis d'obtenir une augmentation de la survie en association avec la radiothérapie (survie globale à 3 ans de 16% avec le temozolomide vs 4,4% avec la radiothérapie seule,  $p < 0,0001$ ) (Stupp et al., 2009). Le temozolomide est administré de façon concomitante avec la radiothérapie puis de façon adjuvante en cycles itératifs de 28 jours. Une seule étude, non randomisée, a été effectuée chez l'enfant dans des gliomes de haut grade de tout type et a montré à 3 ans une survie globale de 22% et une survie sans progression de 11% mais cette survie sans progression n'était que de 7% pour les glioblastomes. Ainsi, même si le témozolomide montre une certaine efficacité dans les gliomes sus-tentoriels pédiatriques, celle-ci semble moindre par rapport aux résultats obtenus chez l'adulte (Brandes et al., 2010). Le témozolomide reste cependant, pour l'instant, la drogue de référence en pédiatrie (Packer, 2012; Verschuur et al., 2004). Ce traitement a été combiné à d'autres drogues ou à des inhibiteurs de MGMT (l'O6-MéthylGuanine-MéthylTransférase) (Grill et al., 2013; Warren et al., 2012) mais pour l'instant aucune supériorité n'a été démontrée par rapport au temozolomide seul dont les mécanismes de résistance intra-tumoraux peuvent être divers et seront détaillés dans le paragraphe sur les résistances aux traitements.





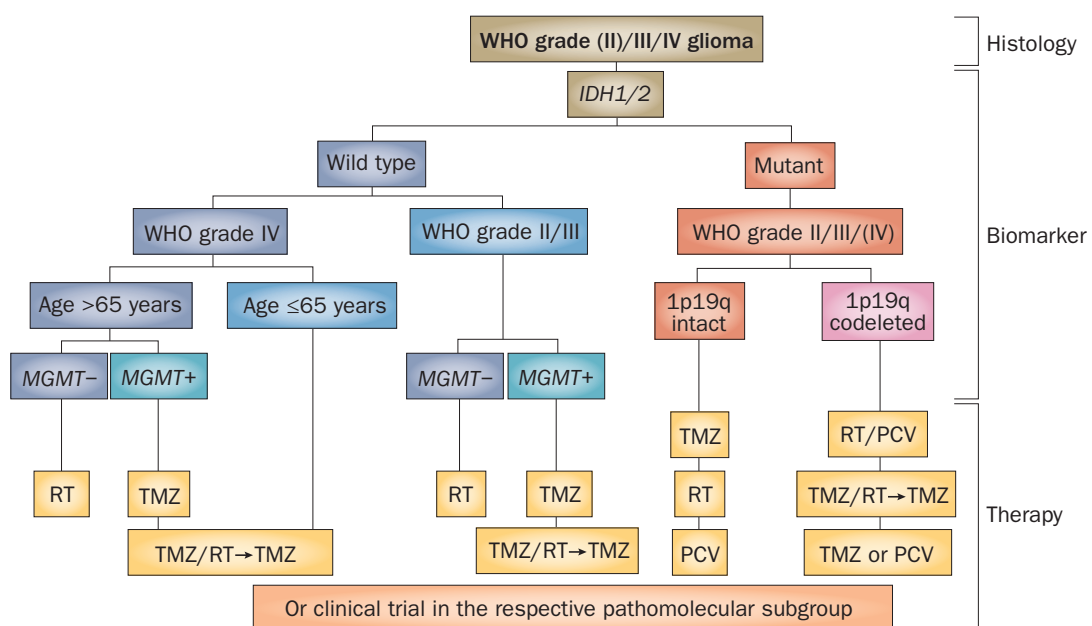
**Figure 23 :** Taux de réponse objective aux chimiothérapies conventionnelles des gliomes malins

Taux de réponse objective = % des réponses partielles + complètes. Les gliomes malins sont représentés en orange pour l'adulte, en rouge pour les localisations sustentorielles de l'enfant et en bleu pour les localisations diffuses du tronc cérébral de l'enfant (D'après Jones and Hargrave et al., 2013).

Les patients pédiatriques de moins de 5 ans, ont cependant bénéficié de protocoles alternatifs visant à épargner à cette tranche d'âge les effets particulièrement nocifs d'une radiothérapie administrée sur un cerveau en cours de développement. De manière surprenante les enfants de moins de 3 ans présentent une meilleure survie et peuvent répondre de façon soutenue à des protocoles de chimiothérapie sans radiothérapie (Dufour et al., 2006). Actuellement de nombreux efforts collaboratifs européens et internationaux visent à caractériser sur le plan moléculaire ces tumeurs et à homogénéiser leur traitement.

Dans les gliomes anaplasiques de l'adulte, le traitement repose sur la radiothérapie. L'adjonction d'une combinaison de chimiothérapies appelée « PCV » et contenant 2 nitrosourés (procarbazine et lomustine) et un poison du fuseau (la vincristine) a été testée dans deux essais cliniques dont les résultats à long terme ont montré le bénéfice d'une chimio-radiothérapie par PCV en particulier dans les tumeurs porteuses d'une codélétion 1p19q. De nouvelles recommandations

proposent un arbre décisionnel dont la stratification est basée sur les statuts de MGMT, IDH1, la codélétion de 1p19q et l'âge du patient (Figure 24). Des essais cliniques sont actuellement en cours pour préciser l'intérêt de différentes modalités de traitement (chimiothérapie seule, radiothérapie seule ou chimio-radiothérapie) ou du choix de la chimiothérapie la plus efficace et/ou tolérée, (témozolomide ou PCV ?) selon ces sous-groupes histo-moléculaires (Weller and Wick, 2014; Weller et al., 2014; Wick et al., 2014).

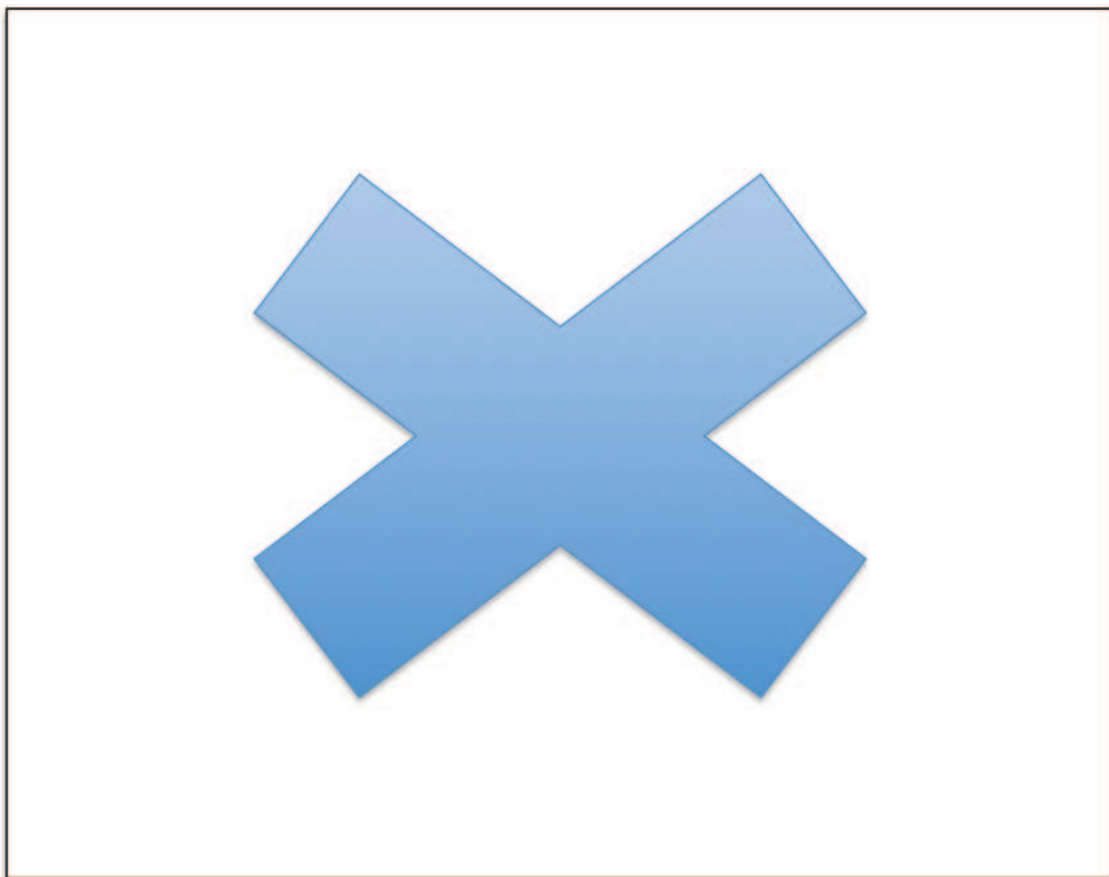


**Figure 24** : Options thérapeutiques selon le statut IDH1, MGMT et 1p19q  
 RT : radiothérapie ; TMZ : temozolomide, PCV : procarbazine + lomustine + vincristine. (D'après Weller and Wick, 2014).

## I.E.2 Thérapies ciblées

De façon prévisible, étant donné l'hétérogénéité de ces tumeurs mais surtout la redondance et l'interconnexion des différentes voies de signalisation de l'oncogénèse, les nombreuses thérapies dites « ciblées » testées au sein d'essais cliniques de phase I et II dans les gliomes malins de l'adulte et de l'enfant, se sont

révélées peu efficaces, du moins en monothérapie (Tableau 5). Dans ces résultats, on observe cependant une très grande variabilité inter-étude dans ces résultats qui peut s'expliquer par la grande difficulté à déterminer d'une part le bon critère de réponse pour l'analyse de l'efficacité et d'autre part le bon marqueur prédictif en amont de l'inclusion, permettant de stratifier les patients les plus à même de bénéficier de ces thérapies. (Georger et al., 2011, 2012).



**Tableau 5** : Principales thérapies ciblées testées en monothérapie chez l'enfant et l'adulte

(D'après Jones and Hargrave et al., 2013)

Un très grand espoir avait été fondé sur l'utilisation de thérapies anti-angiogéniques, en premier lieu le bevacizumab (anticorps monoclonal ciblant le vascular endothelial growth factor ou VEGF), dans les glioblastomes de l'adulte. La première étude exploratoire en monothérapie du bevacizumab avait montré une réponse objective satisfaisante de l'ordre de 20-25% et surtout une augmentation de la qualité de vie des patients jusqu'à la progression. Cependant les deux essais de phase II/III (RTOG 0825 et AVAglio) testant l'association du bevacizumab à la radiochimiothérapie standard n'ont pas montré de bénéfice en termes de survie globale et des résultats contradictoires en termes de survie sans progression et de qualité de vie. L'étude RTOG a même mis en évidence un déclin possible des fonctions cognitives et de la qualité de vie du patient avant progression. De façon intéressante cette dernière étude propose une signature angiogénique prédictive de survie globale (Weller and Wick, 2014). Un protocole de phase II randomisé en cours teste actuellement la même approche dans les gliomes malins pédiatriques sus-tentoriels (protocole HERBY). Encore une fois ces études soulignent la difficulté d'analyse et d'interprétation de la réponse tumorale dans les essais cliniques testant ces nouvelles thérapies ciblées.

## **II Les mécanismes de chimio-résistance dans les gliomes pédiatriques**

### **II.A Modulation de la réponse aux agents alkylants par les systèmes de réparation de l'ADN**

#### **II.A.1 Vue générale sur les mécanismes de réparation des lésions faites à l'ADN**

Les agents exogènes génotoxiques, qu'ils soient environnementaux (carcinogènes, radiations) ou médicamenteux (chimiothérapie, radiothérapie) induisent de **nombreuses lésions au niveau de l'ADN**, comme les modifications des bases, les ponts intra ou inter-caténaux et les cassures d'un seul ou des deux brins (SSB pour single strand break ou DSB pour double strand break). Des mécanismes endogènes peuvent également être à l'origine de DSBs comme la production de ROS (dérivés actifs de l'oxygène) produits lors des processus métaboliques cellulaires ou les mésappariements des bases de l'ADN suite aux erreurs liées à la fiabilité imparfaite de la réplication de l'ADN ou encore les modifications chimiques spontanées des bases de l'ADN (ex : désamination spontanée des adénines, guanines et cytosines). Ces différentes lésions sont réparées par plusieurs systèmes multi-enzymatiques de réparation de l'ADN, qui peuvent agir de façon indépendante ou bien concertée (Hosoya and Miyagawa, 2014).

L'ensemble de ces lésions, si elles ne sont pas réparées, conduit à la formation de DSBs au cycle de réplication suivant. L'absence de réparation de ces DSBs conduit à la mort cellulaire par apoptose, tandis qu'une réparation insuffisante

ou inappropriée est associée à la survie de cellules porteuses d'altérations génomiques pouvant contribuer à l'instabilité génomique des cancers.

Afin de conserver l'intégrité de leurs génomes, les cellules ont ainsi développé des systèmes de reconnaissance et de signalisation des dommages faits à l'ADN qui permettent ensuite le recrutement des systèmes de réparation (DDR pour DNA Damage Response). **Le système de reconnaissance des DSBs** repose sur le complexe MRN. Ce complexe, comportant les protéines MRE11-RAD50 et NBS1, reconnaît et se lie aux DSBs puis recrute et active la kinase ATM (ataxia telangiectasia mutated) via une autophosphorylation (Matsuoka et al., 2007). ATM phosphoryle et active ainsi de nombreuses cibles comme :

- la kinase CHK2 qui induit un arrêt du cycle cellulaire pendant les phases S et G2 via son action sur CDC25A

- BRCA1 qui induit un arrêt du cycle cellulaire pendant la phase S et la réparation des DSBs

- p53 qui induit soit un arrêt du cycle cellulaire pendant la phase G1, soit l'apoptose

**Les SSBs ou les collapsus des fourches de réplication** induits par les modifications ou les mésappariements des bases ou les ponts intra ou inter-caténaux de l'ADN, sont reconnues par la kinase ATR (ataxia telangiectasia and rad3-related) qui phosphoryle et active CHK1, qui par son action sur la phosphatase CDC25A, régule les points de contrôle des phases S et G2.

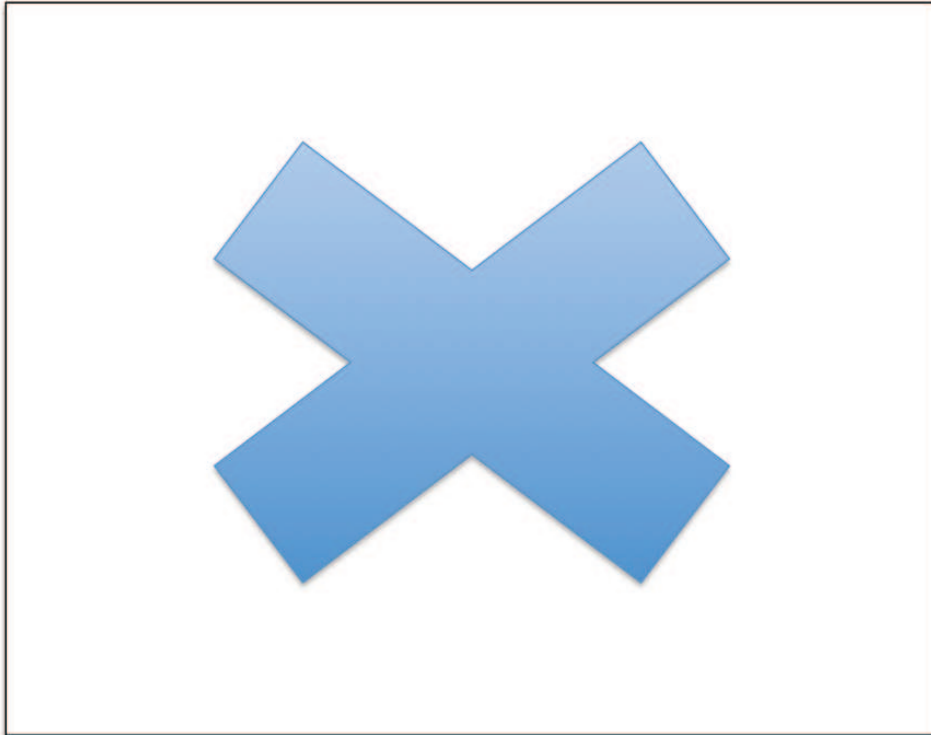
Les DSBs sont essentiellement réparées par le **système de recombinaison homologue** (ou système HR) et le **système de jonction non homologue des extrémités** (NHEJ pour non homologous end joining). Le NHEJ est un système de réparation « voué à l'erreur » contrairement au système HR, puisqu'il repose sur la jonction directe des brins qui ont été cassés, accompagnée généralement de la perte d'un ou plusieurs nucléotides au niveau du site de jonction. Le NHEJ comporte le complexe Ku70/Ku80, la sous-unité catalytique de la DNA-PK (DNA-PKcs), la nucléase Artémis, XLF, XRCC4 and l'ADN-ligase IV. Le système HR utilise comme modèle la chromatide sœur de la molécule d'ADN lésée pour copier et restaurer le point de cassure de façon fidèle. Le système HR se compose entre autres du complexe MRN, de la RPA (replication protein A), de BRCA1, BRCA2, PALB2 et RAD51. Ces deux systèmes coexistent chez l'homme et sont finement régulés. Un

système alternatif du NHEJ permet la jonction de deux extrémités provenant de sections chromosomiques différentes à l'origine de translocations et se compose notamment de PARP-1, XRCC1, et l'ADN-ligase III $\alpha$ .

Les SSBs et certaines modifications des bases (déamination, oxydation ou alkylation des bases) sont réparées directement par le système d'excision des bases ou **BER (Base excision Repair)** qui se compose de la MPG, PARP1, APE1, XRCC1, la DNA Pol $\beta$ , et l'ADN ligase III. Certaines modifications des bases survenant sur l'oxygène en position 6 de la guanine sont réparées directement par l'enzyme O6-methylguanine-DNA méthyltransférase (**MGMT**). Les mésappariements des bases survenus lors de la réplication sont réparés par le **système de réparation post-répliatif appelé MMR** pour Mismatch Repair et qui comprend quatre enzymes principales : MSH2, MSH6 et MLH1, PMS2.

Les ponts intra-caténares comme les dimères de pyrimidine induits par les radiations ultra-violettes sont réparés par le système de réparation par excision des nucléotides (Nucleotide Excision Repair) qui comprend notamment l'enzyme ERCC1. Les ponts inter-caténares sont réparés par la coopération complexe du **NER**, du HR et de la synthèse trans-lésion orchestrée par la voie de l'anémie de Fanconi ou FA (pour Fanconi anemia). Ces derniers systèmes (NER, voie FA et synthèse trans-lésion) ne seront pas détaillés dans ce travail de thèse.

Dans les cancers, ces différents systèmes de signalisation et de réparation des lésions de l'ADN sont fréquemment inactivés et contribuent ainsi à leur instabilité génomique et à leur progression. Ils peuvent être cependant aussi activés dans de nombreuses tumeurs et être ainsi à l'origine d'une résistance aux traitements anti-cancéreux dont l'efficacité repose dans la majorité des cas sur leur capacité à générer des lésions sur l'ADN. Jusqu'à présent, seuls MGMT et BRCA1/2 ont été utilisés comme bio-marqueurs pour la stratification d'essais cliniques, tandis que l'altération et les implications fonctionnelles des dérégulations des autres systèmes de réparation sont encore peu connues (Hosoya and Miyagawa, 2014).



**Figure 25** : Les différentes lésions induites par les agents génotoxiques sur l'ADN et les systèmes de réparation impliqués dans leur réparation.

(D'après Hosoya et al., 2014); ICL : pont inter-caténaire ; stalled replication fork : collapsus de la fourche de réplication

## **II.A.2 Mécanismes d'action des agents alkylants**

### **II.A.2.1 Agents méthylants et chloroéthylants**

Les agents alkylants sont des agents organiques capables de transférer un groupement hydrocarboné dit alkyl (noté R-CH<sub>2</sub>) sur les sites nucléophiles de nombreuses molécules comme les acides nucléiques grâce à une réaction de substitution nucléophile. Leur cytotoxicité repose essentiellement sur leur capacité à se lier de façon covalente aux bases de l'ADN, inhibant la réplication et générant des cassures d'un seul ou des deux brins de l'ADN (cassures ADN simple et double brin). Les cibles atomiques préférentielles des agents alkylants au niveau des bases de l'ADN sont les oxygènes en position 6 des guanines (O6G), les azotes en position 7 des guanines (N7G), les azotes en position 3 des cytosines (N3C) et les azotes en position 1 des adénines (N1A).



**Les chimiothérapies alkylantes** dont les effets sont connus depuis l'utilisation des moutardes azotées au cours de la première guerre mondiale, est une classe de médicaments constituée de plusieurs sous-groupes d'agents anti-cancéreux largement utilisés en pratique clinique (moutardes azotées, nitrosourées, triazènes, aziridines, époxydes, alkylsulfonates ...). Les nitrosourées comme la carmustine (BCNU, BiCNU®) et la lomustine (CCNU, CeeNU®) et les triazènes comme la procarbazine (PCB, PCZ, N-Methyl hydrazine, Natulan® ou Matulane®), et le temozolomide (TMZ, SCHS2.365, NSC 362856, Temodal® ou Temodar®) constituent la base de la chimiothérapie utilisée dans le traitement des gliomes en raison de leur forte liposolubilité, leur permettant de passer la barrière hémato-encéphalique. Les triazènes sont des agents méthylants monofonctionnels possédant un seul site électrophile capable de transférer un groupement méthyl (R-CH<sub>3</sub>) sur les bases de l'ADN, tandis que la carmustine et la lomustine sont des agents chloroéthylants bifonctionnels possédant 2 sites électrophiles capables de transférer un groupement chloroéthyl (R-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Cl) sur les bases de l'ADN et en outre, de créer des ponts intra- ou inter-caténaux au niveau de l'ADN (Drabløs et al., 2004).

Les agents alkylants peuvent également être retrouvés dans l'**environnement** sous la forme de composés N-nitrosés d'origine industrielle (préparations alimentaires) ou provenant de la combustion incomplète du tabac. Parmi ces composés, le DMN (N-nitrosodi-méthylamine) est retrouvé dans l'alimentation, le NNN (N'-nitrosornicotine) et le NNK (4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone) sont des carcinogènes retrouvés dans la fumée de tabac. Ces composés sont mutagènes et carcinogènes en raison des lésions qu'ils induisent sur l'ADN (Christmann et al., 2011).

Ainsi plusieurs **mécanismes de réparation de l'ADN** existent dans l'organisme pour réparer ces lésions et lutter contre les effets carcinogènes des agents alkylants environnementaux. S'ils sont protecteurs pour la cellule, ces mécanismes de réparation de l'ADN peuvent aussi constituer une résistance contre les effets cytotoxiques des agents alkylants dont l'efficacité repose justement sur les effets génotoxiques induits sur l'ADN.

### **II.A.2.2 Cytotoxicité et mutagénicité des lésions O6 méthylguanine**

Parmi les nombreuses alkylations induites sur les bases de l'ADN par le TMZ, les lésions survenant en position O6 des guanines, alors qu'elles sont minoritaires (environ 5% des lésions totales), sont particulièrement cytotoxiques et mutagènes. Les lésions O6 méthylguanine sont mutagènes car elles sont susceptibles de se mésappairer avec une base thymine lors de la réplication (dans environ 30% des cas). Les lésions O6MG sont donc à la fois mutagènes car génératrices de mutations transitionnelles (G-C vers A-T) et cytotoxiques. On leur attribue d'ailleurs un rôle majoritaire dans la cytotoxicité des agents méthylants, cytotoxicité s'effectuant principalement par apoptose (Kaina et al., 2007). Les lésions O6 méthylguanine sont réparées spécifiquement par la MGMT (O6-méthylguanine-DNA méthyltransferase), qui, quand elle est exprimée, permet aux cellules tumorales de lutter contre les effets cytotoxiques des agents méthylants et chloroéthylants et contribue à leur résistance intrinsèque. Les inhibiteurs pharmacologiques de MGMT (comme la O6 benzylguanine) ont permis de restaurer une sensibilité au TMZ dans de nombreux modèles cellulaires y compris les glioblastomes (Kurpad et al., 1997). L'efficacité du TMZ dépend donc d'une faible expression de MGMT.

Or l'apoptose induite par les lésions O6 méthylguanine ne survient qu'après leur transformation en cassures ADN double brin (DSB). Cette transformation dépend cette fois-ci de l'efficacité du système mismatch repair qui permet la reconnaissance des mésappariements O6 méthylguanine-thymine. Cette reconnaissance ne pouvant conduire à la réparation de l'O6-méthylguanine sur le brin mère en l'absence de MGMT, les cycles futiles et inefficaces de réparation du MMR créent une cassure ADN simple brin (SSB) qui se transforme en DSB lors du cycle de réplication suivant. Ce sont les DSBs formées qui signalisent ensuite la mort cellulaire (Kaina et al., 2007). Enfin, ces DSBs, peuvent encore être réparées par le système HR, dernier système de sauvetage avant l'apoptose.

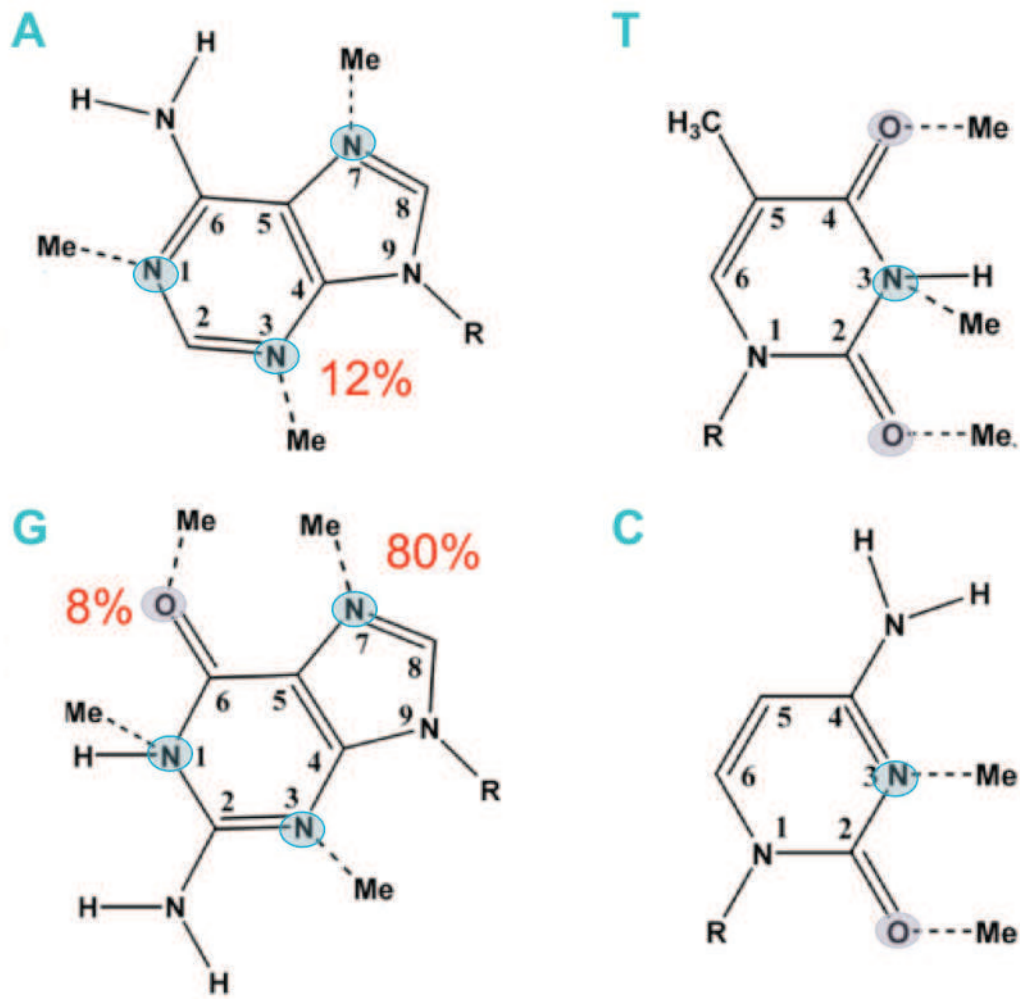
En résumé, la cytotoxicité du TMZ, principalement liée aux propriétés pro-apoptotiques des lésions O6MG, dépend d'une faible capacité de réparation de MGMT combinée à la présence d'une réplication cellulaire extensive, d'un système MMR efficace, et d'effecteurs pro-apoptotiques intacts (ex : p53) (Hermisson et al.,

2006; Roos et al., 2007, 2009). L'ensemble de ces différents systèmes de réparation ainsi que le statut de *TP53*, peuvent ainsi moduler la réponse au TMZ.

### **II.A.2.3 Effets du TMZ dans les cellules gliomateuses**

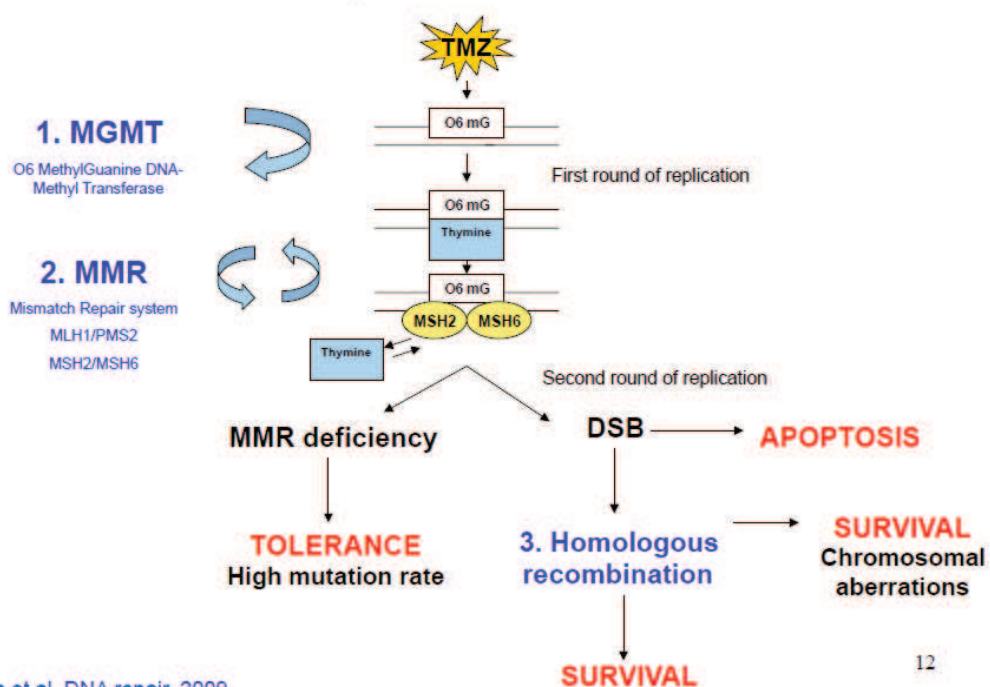
Dans les cellules gliomateuses adhérentes, le TMZ peut conduire à une apoptose dans les cellules déficientes en MGMT et possédant un gène *TP53* non muté. Une apoptose peut également être obtenue dans des cellules mutées sur *TP53* après un traitement prolongé (>96h). Cependant, dans tous les cas, 30 à 40% des cellules semblent résister au TMZ (Hermisson et al., 2006; Roos et al., 2007). Dans les cellules gliomateuses *TP53* non muté, le TMZ peut également entraîner un arrêt en phase G2-M prolongé (observé à 48h de traitement) suivi de senescence après 10 jours de traitement, alors que l'arrêt ne sera que temporaire avec une reprise de la prolifération dans les lignées *TP53* mutées (Hirose et al., 2001a, 2001b). Une augmentation de l'autophagie a également été associée à la réponse au TMZ mais semblerait représenter plutôt une voie de survie cellulaire et de résistance à l'apoptose (Kanzawa et al., 2004; Katayama et al., 2007; Knizhnik et al., 2013).

Dans les neurosphères de glioblastomes, le TMZ est capable d'entraîner une déplétion complète (avec des doses 100 fois supérieures toutefois quand MGMT est exprimé). 50% de ces cellules présentent une sensibilité au TMZ, qui semble dépendre de l'expression de MGMT, comme chez les patients (Beier et al., 2008, 2011; Li et al., 2009).



**Figure 26 :** Sites de substitution nucléophile préférentiels des agents méthylants et chloroéthylants sur les bases de l'ADN. (D'après Kaina, 2007). Ces lésions sont réparées soit par MGMT, soit par le système BER. La plupart des lésions induites comme les lésions N7 methylguanine qui sont les plus fréquentes (80% de l'ensemble des lésions) sont réparées par le système BER (Base Excision Repair) alors que MGMT répare les lésions O6 methylguanine qui ne représentent que 8% des lésions.

## Repair of O<sup>6</sup> mG



**Figure 27 :** Schéma résumant les mécanismes de réparation après action du témozolomide.

### II.A.3 MGMT (O<sup>6</sup> MéthylGuanine-DNA Méthyl-Transférase)

#### II.A.3.1 Fonction

MGMT (O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase) est une enzyme hautement conservée à travers les espèces, exprimée de façon ubiquitaire dans tous les tissus et responsable de l'excision spécifique et directe des groupements méthyl transférés par le TMZ sur l'oxygène en position O<sup>6</sup> des guanines. Elle permet donc de reverser en une seule étape les effets les plus délétères des agents alkylant et du TMZ et ceci pendant toutes les phases du cycle cellulaire. Il s'agit d'une enzyme suicide qui est inactivée et dégradée par le protéasome après avoir catalysé sa réaction de déméthylation. MGMT est également responsable de l'excision des autres groupements transférés en position O<sup>6</sup> des guanines par d'autres agents alkylants comme les groupements chloroéthyl induits par les nitrosourées et les groupements plus complexes induits par les carcinogènes de la fumée de tabac (Kaina et al., 2007).

## II.A.3.2 Régulation

### II.A.3.2.1 Régulation épigénétique

Le gène *MGMT* est localisé en 10q26 et se compose de 5 exons. Un îlot CpG composé de 762 pb (pb : -552 à +289) et comportant 98 dinucléotides CpG, est localisé en 5' du gène *MGMT* et recouvre une grande partie de son promoteur et de son premier exon.

Une perte d'expression de *MGMT* est fréquemment retrouvée dans de nombreux cancers. Dans la majorité des cas, cette perte d'expression est associée à l'inactivation transcriptionnelle par hyperméthylation aberrante des cytosines de l'îlot CpG du promoteur de *MGMT*. La fréquence de l'inactivation épigénétique de *MGMT* varie selon le type tumoral étudié. Deux régions hyperméthylées de l'îlot sont plus fréquemment associées à une extinction protéique de *MGMT* dans les cancers et par là même, ciblées par la plupart des amorces PCR créées pour étudier la méthylation de l'îlot (Martinez et al., 2007). Le tissu sain est en théorie exempt de cette hyperméthylation mais peut en contenir de faibles niveaux (Christmann et al., 2011).

La perte d'expression de *MGMT* semble représenter une nouvelle voie mutagène impliquée dans la cancérogenèse. En effet, dans les tumeurs coliques et cérébrales, la méthylation du promoteur de *MGMT* est fortement associée à un phénotype hypermutateur particulier caractérisé par la présence de mutations transitionnelles (G:C vers A:T) fréquentes ciblant des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs comme *K RAS* et *TP53* (Esteller and Herman, 2004; Wirtz et al., 2010; Yin et al., 2003). Les travaux récents du TCGA ont confirmé la présence d'une fréquence plus élevée de mutations ponctuelles de *TP53* et *PTEN* parmi les glioblastomes porteurs d'une hyperméthylation du promoteur de *MGMT* (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Par ailleurs, la présence d'une méthylation de *MGMT* détectée au sein du tissu sain directement péri-tumoral des cancers coliques, suggère une implication précoce de *MGMT* dans la cancérogenèse (Ramírez et al., 2008). Dans les gliomes, l'hyperméthylation du promoteur de *MGMT* est très fréquente dans les gliomes de bas grade, supportant ainsi également un rôle dans les étapes précoces de la gliomagenèse. Si la sous-expression de *MGMT* renforce l'instabilité génétique des tumeurs, sa surexpression au contraire jouerait un rôle important dans l'acquisition d'un phénotype de résistance au traitement alkylant.

Il a été montré pour certaines tumeurs, une expression plus importante de *MGMT* par rapport à leur équivalent sain ou par rapport aux tumeurs primaires dans les rechutes (Christmann et al., 2011).

L'hyperméthylation du promoteur de *MGMT* est fortement associée aux mutations de *IDH1/2* dans les gliomes anaplasiques et survient dans ce cas dans le contexte d'un phénotype G-CIMP (voir chapitre dédié). Dans les glioblastomes *de novo* cependant, l'hyperméthylation du promoteur de *MGMT* est dans la majorité des cas indépendante de ces mutations qui sont beaucoup plus rares dans ce contexte et donc dépend d'un autre mécanisme de dérégulation épigénétique (Wick et al., 2014).

*MGMT* peut être régulée par d'autres mécanismes épigénétiques. Les modifications des cytosines incluses dans le corps du gène de *MGMT* sont importantes pour l'expression de *MGMT*. Ainsi un traitement par la décitabine a permis de sensibiliser des cellules de glioblastome au TMZ, en particulier celles ne possédant pas d'hyperméthylation du promoteur de *MGMT* (Moen et al., 2014). Certaines modifications des histones peuvent également moduler l'expression de *MGMT* : la méthylation de H3K9 et la liaison de MeCP2 sur le promoteur sont associées à l'hyperméthylation des îlots CpG et à une baisse d'expression de *MGMT*; l'acétylation de H3K9 et de H4K20 et la méthylation de H3K4 sont associées à une surexpression de *MGMT* et ont été corrélées à une résistance secondaire au TMZ (Kitange et al., 2012; Nakagawachi et al., 2003; Zhao et al., 2005).

### **II.A.3.2.2 Autres mécanismes de régulation**

L'expression cellulaire basale de *MGMT* est extrêmement variable d'un tissu à l'autre mais aussi d'un individu à l'autre. Les niveaux d'expression de *MGMT* dans le tissu cérébral sont plutôt faibles. Cette variabilité de l'expression de *MGMT* peut s'expliquer par une forte inductibilité enzymatique de *MGMT* mais les mécanismes de cette régulation restent peu connus. *MGMT* serait inductible par les radiations ionisantes, les agents alkylants et les glucocorticoïdes. À l'opposé, la sur-expression de p53, le tabac et les cytokines pro-inflammatoires comme l'Interféron  $\beta$  diminueraient son expression (Kaina et al., 2007; Verbeek et al., 2008).

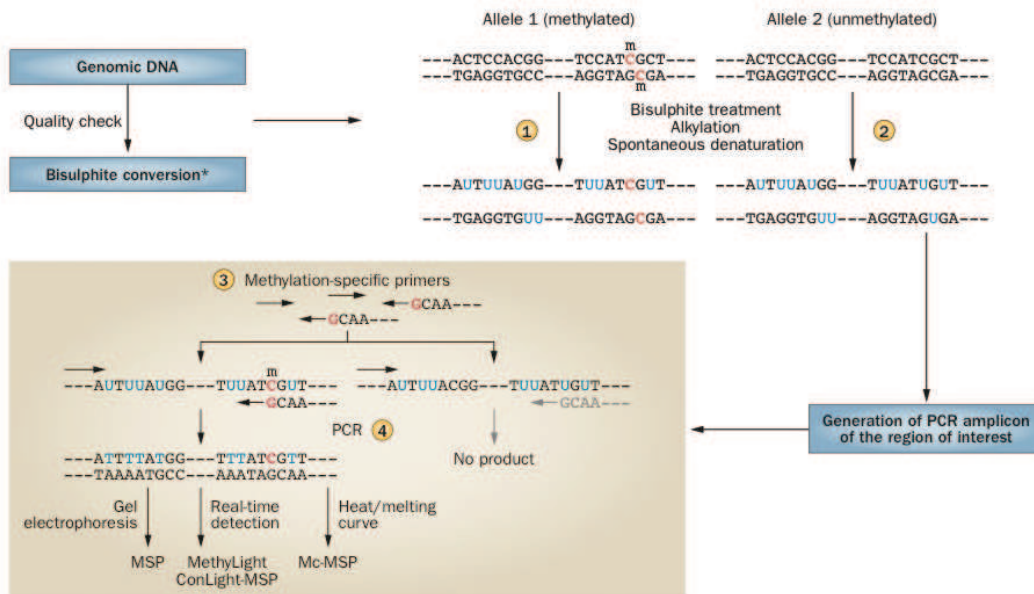
De nombreux facteurs de transcription régulent l'expression de MGMT : positivement comme SP1 (Costello et al., 1994), NF-KB (Lavon et al., 2007), CBP-p300 (Bhakat and Mitra, 2000) et AP-1 (Boldogh et al., 1998), ou négativement comme p53 (Harris et al., 1996).

L'hypoxie et l'inflammation ont été récemment corrélées à l'augmentation de l'expression de MGMT comme l'ont montré Pistollato et ses collaborateurs en comparant les phénotypes de cellules de glioblastome issues de régions intratumorales distinctes le long d'un gradient d'hypoxie. Dans leur étude, MGMT est fortement exprimée et vraisemblablement de façon HIF-dépendante, dans les cellules dites souches de la zone centrale hypoxique des glioblastomes (Pistollato et al., 2010). Un traitement différenciant à base de BMP2 a permis dans ces cellules de diminuer l'expression de HIF-1 $\alpha$  et de MGMT (Persano et al., 2012). Enfin, NDRG1, qui est un gène inductible par les corticoïdes et une cible d'AKT/mTORC2 peut être induit par l'hypoxie et ainsi stabiliser MGMT (Weiler et al., 2014). Un autre niveau de régulation peut s'effectuer par le biais de miRNAs (Wick et al., 2014).

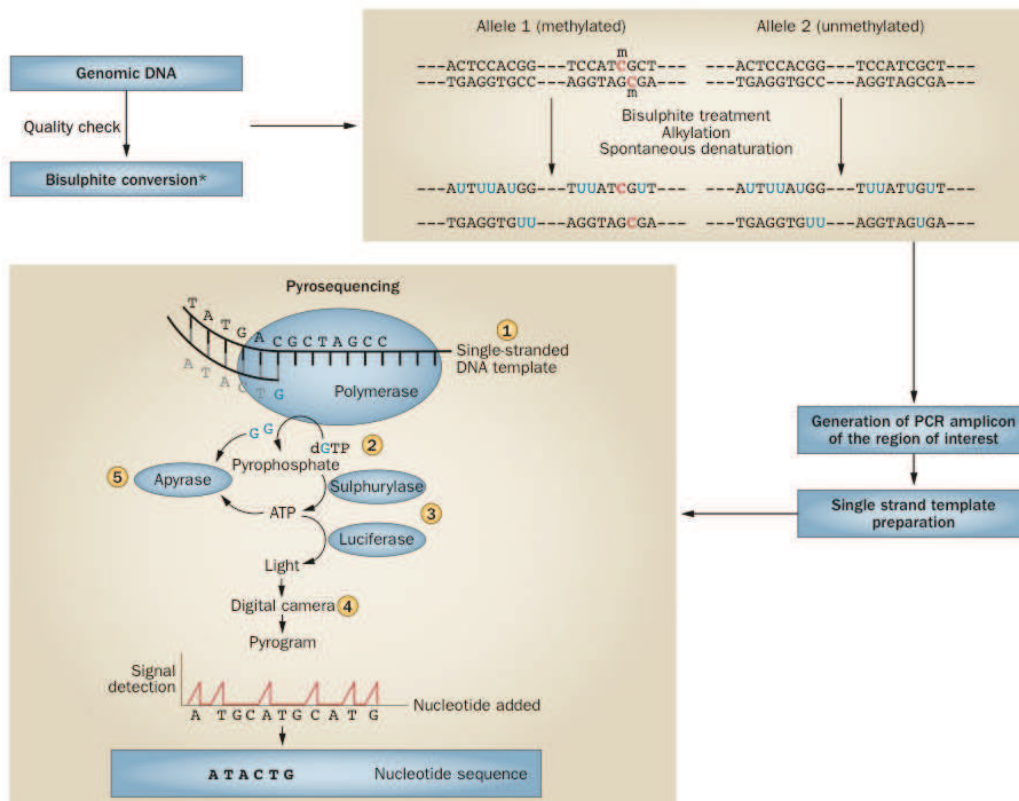
### **II.A.3.3 Valeurs prédictive / pronostique et écueils techniques liés à la détermination du statut de MGMT**

Seule l'hyperméthylation du promoteur de *MGMT* a été corrélée à la survie des patients au contraire de l'expression protéique ou mRNA. Sur le plan clinique, l'hyperméthylation de *MGMT* est un facteur prédictif de bonne réponse au TMZ comme cela a été montré dans les glioblastomes de l'adulte pour lesquels le TMZ associé à la radiothérapie constitue actuellement un des principaux traitements depuis le papier princeps de Stupp (Stupp et al., 2009). Elle est associée à une valeur pronostique dans les gliomes anaplasiques, et prédictive, uniquement dans les gliomes anaplasiques ne présentant pas de mutations de *IDH1/2* (Wick et al., 2013). Chez les patients âgés atteints de glioblastome, son statut a une valeur décisionnelle sur le traitement à envisager en première ligne puisque, selon les nouvelles recommandations issues des essais NOA-08 et du consortium nordique, les patients ne présentant pas de méthylation de MGMT ne reçoivent que de la radiothérapie et les autres que du TMZ (Wick et al., 2012).





**Figure 28** : Techniques basées sur la PCR spécifique de méthylation (D'après Weller et al., 2004, source Wikipedia))



**Figure 29** : Pyroséquençage (D'après Weller et al., 2014, source Wikipedia))

L'importance de l'évaluation du statut de MGMT est désormais clairement établie en clinique et le sera encore plus quand de nouvelles alternatives thérapeutiques pourront être proposées pour les patients ne présentant pas cette méthylation, ce qui n'est pour le moment, pas encore le cas.

La standardisation des techniques permettant d'évaluer de façon fiable le statut de MGMT fait l'objet, encore à l'heure actuelle, de nombreuses controverses. Pour être utilisables en routine, ces techniques doivent être simples, peu coûteuses, sensibles et reproductibles. Elles doivent pouvoir être réalisables à partir d'un matériel restreint, issu de tumeurs conservées en paraffine ou congelées. La grande majorité de ces méthodes repose sur la transformation chimique préalable de l'ADN, grâce à un traitement par bisulfite qui permet la conversion des cytosines non méthylées en uracile alors que les cytosines méthylées restent inchangées. Ce traitement chimique permet ensuite la discrimination des séquences méthylées versus non méthylées :

- après amplification par PCR et analyse qualitative (il s'agit alors de la MSP ou PCR spécifique de méthylation classique) ou quantitative (ex : MethyLight)

- ou après pyroséquençage qui peut déterminer le pourcentage de méthylation pour chaque site CpG individuel interrogé et ainsi prendre en compte l'hétérogénéité de méthylation au sein du promoteur

Les techniques d'analyse PCR quantitative ont permis d'améliorer la reproductibilité de la technique mais dépendent d'un traitement pré-analytique basé sur la microdissection et l'enrichissement du prélèvement en cellules tumorales pour arriver à soustraire un maximum de cellules saines, ce qui n'est pas toujours possible. Le problème du seuil de positivité est enfin un point majeur d'achoppement pour déterminer la valeur prédictive et décisionnelle propre à l'utilisation d'une technique quantitative.

Esteller et al. avaient déterminé dès 2000, deux régions du promoteur dont l'hyperméthylation était corrélée à une répression transcriptionnelle et qui sont interrogées par la MSP classique. Or les autres techniques proposées en routine peuvent interroger des régions très différentes (ex : MethyLight<sup>®</sup>, PyroSeq<sup>®</sup>). Il a été

par ailleurs été démontré que les patterns de méthylation au sein du promoteur pouvaient être hétérogènes. A l'heure actuelle, les sites CpGs les mieux corrélés à la survie des patients ne sont pas encore clairement établis (Esteller et al., 2000; Wick et al., 2014).

Enfin, certains patients présentant une méthylation du promoteur de MGMT seront résistants d'emblée au TMZ, comme cela a été démontré également dans KNS42, lignée de glioblastome pédiatrique résistante au TMZ mais présentant une méthylation de MGMT. Cette résistance peut être liée à la présence d'autres mécanismes de résistance non évalués ou bien au problème purement technique du seuil de positivité qui ne peut pas être estimé avec la MSP classique qualitative, utilisée le plus souvent jusqu'à présent. A l'opposé, certains patients (rares) sans méthylation répondront au TMZ, posant de la même façon le problème de la sensibilité technique et du contrôle de sa qualité comme la possibilité d'autres mécanismes intrinsèques à la tumeur et pouvant moduler cette réponse.

#### **II.A.4 Le système MMR (MisMatch repair)**

Le système MMR (MisMatch Repair) permet la réparation des mésappariements accumulés au cours de la réplication. Comme on l'a vu, son efficacité est nécessaire à la transformation des mésappariements O6MG-thymine en SSBs, elles-mêmes ensuite transformées en DSBs. De plus, MMR aurait également un rôle direct dans la signalisation des lésions ADN et l'induction de l'apoptose (Kaina et al., 2007). Ainsi les cellules ayant un déficit du système MMR sont résistantes au TMZ, quel que soit le statut de MGMT et sont associées à un phénotype hypermutateur en l'absence de MGMT (Kaina et al., 1997).

Le système MMR est composé de quatre enzymes principales à l'origine de deux complexes composés respectivement de MSH2 et MSH6 et de MLH1 et PMS2. Le système MMR est impliqué dans la pathogenèse du syndrome de Lynch ou HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer), syndrome familial de prédisposition au cancer du colon qui consiste en des mutations germinales

hétérozygotes inactivatrices de l'un des gènes codant les enzymes du MMR, les plus fréquemment mutés étant *hMLH1* et *hMSH2* (Liu et al., 1996). Une perte de fonction ou déficience du système MMR est aussi observée dans de nombreux cancers sporadiques (15% des cancers coliques, gastriques et endométriaux et une minorité d'autres cancers) et dans ce cas principalement associée à l'hyperméthylation du promoteur de *MLH1* (Li, 2008).

Les cellules ayant un déficit en MMR ont un phénotype dit « mutateur » associé à une accumulation excessive de mutations lié à l'incapacité du MMR à réparer les mésappariements post-réplicatifs. Ce défaut de réparation est associé à grand nombre de délétions ou insertions au niveau des microsatellites situés tout au long des séquences codantes et non codantes de l'ADN, avec une susceptibilité particulière des gènes possédant des séquences répétées de *polyA* ou de dinucléotides de type *CA* dans leur séquence régulatrice ou codante. Les tumeurs porteuses d'une déficience du MMR sont caractérisées par une instabilité des microsatellites (phénotype MSI pour microsatellite instability ou RER pour *Replication Error*). La détection du phénotype MSI a été standardisée dans le cadre du dépistage du syndrome de Lynch en cas de cancer colique et repose sur l'allélotypage de cinq marqueurs mononucléotidiques quasi monomorphiques selon les critères dits de Bethesda (NR27, NR21, NR24, BAT25, BAT26) (Matloff et al., 2013). Ce mécanisme représente une grand voie de cancérogenèse en particulier colique en contribuant à l'activation de nombreux oncogènes ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Chung and Rustgi, 1995).

La déficience du système MMR est rare dans les glioblastomes nouvellement diagnostiqués, naïfs de tout traitement. Il existe cependant une forte augmentation de la fréquence des mutations du gène *hMSH6*, dans les rechutes de glioblastomes porteurs d'une hyperméthylation de *MGMT* après traitement par TMZ (Cahill et al., 2007; Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Ainsi le phénotype hypermutateur induit par la perte de *MGMT*, favoriserait l'émergence d'un phénotype de résistance au TMZ avec l'acquisition secondaire d'une déficience du système MMR.

## II.A.5 Statut de MGMT, du système MMR et de TP53 dans les gliomes malins pédiatriques

La plupart des travaux concernant MGMT, sa régulation et sa fonction ont été effectués soit *in vitro*, soit sur des cohortes de patients adultes. Cependant, les agents alkylants comme le TMZ sont largement utilisés dans les schémas thérapeutiques des gliomes de haut grade de l'enfant et de l'adolescent. Des études spécifiquement pédiatriques ont rapportés des taux de méthylation du promoteur de *MGMT* dans les gliomes malins pédiatriques pouvant varier de 20 à 50%. Globalement, il semble que la méthylation du promoteur de *MGMT* y soit moins fréquente que chez l'adulte et qu'au contraire, l'expression voire la sur-expression de MGMT contribue à la résistance de ces tumeurs aux agents alkylants (Buttarelli et al., 2010; Fassan et al., 2011; Lee et al., 2011; Pollack et al., 2010; Schlosser et al., 2010; Srivastava et al., 2010).

En pédiatrie, les études les plus récentes ayant utilisé les critères de Bethesda pour l'évaluation du phénotype MSI ont confirmé une prévalence plus élevée de celui-ci dans les gliomes malins pédiatriques comparés aux adultes (19,7% versus 6,8%,  $p=0,02$  soit 14/71 cas pédiatriques versus 5/73 cas adultes). Le phénotype MSI était associé à une perte d'expression de MLH1 dans la majorité des cas pédiatriques et un cas correspondait à un syndrome de Turcot avec une inactivation germinale et bi-allélique de *hMSH6* (Viana-Pereira et al., 2011).

Les mutations de *TP53* sont fréquentes dans les gliomes de haut grade et sont susceptibles de contribuer avec la déficience du système MMR à la résistance au TMZ par le biais d'une altération de la signalisation de l'apoptose (Roos et al., 2007).

Une proportion non négligeable de gliomes malins pédiatriques possèderaient donc une résistance intrinsèque au TMZ en raison d'une non-méthylation du promoteur de *MGMT* et/ou d'une déficience du système MMR. L'administration du TMZ pourrait de plus accélérer la progression tumorale en cas de déficience du système MMR et d'hyperméthylation concomitante du promoteur de *MGMT*. Dans ces études pédiatriques, la détermination simultanée de ces trois facteurs n'a pas été réalisée, ne permettant pas de confirmer cette hypothèse.

## II.A.6 Le système de réparation par excision des bases ou BER

Le TMZ génère un grand nombre de lésions différentes sur les bases de l'ADN. Parmi celles-ci, 70% consistent en un transfert d'un groupement méthyl sur les N7 des guanines, 10% sur les N3 des adénines et seulement 5% sur les O6 des guanines. Ainsi le système BER, en réparant les lésions N7 et N3 répare la grande majorité des lésions induites par le TMZ sur l'ADN (Kaina et al., 2007).

La première étape de reconnaissance et d'excision des bases modifiées par le système BER est médiée par une glycosylase spécialisée appelée MPG (N-méthylpurine DNA glycosylase). Celle-ci laisse donc apparaître un site abasique ensuite hydrolysé par l'APE1 (AP endonuclease 1) qui génère une cassure simple brin de l'ADN (SSB) avec deux extrémités 3'OH et 5'dRP. Cette SSB est ensuite reconnue par un complexe formé par les PARP 1 et 2 (Poly (ADP-ribose) polymérase) et la PARG (poly (ADP-ribose) glycohydrolase), qui permet le recrutement de XRCC1 (protéine scaffold) et de la DNA Pol $\beta$  (ADN polymérase  $\beta$ ) (Dantzer et al., 2006). Cette dernière hydrolyse le groupement 5'dRP et insère à cette extrémité un nucléotide qui est ensuite fixé à l'autre extrémité 3'OH par l'ADN ligase III $\alpha$  avec l'aide de XRCC1 (Almeida and Sobol, 2007; Robertson et al., 2009).

La PARP catalyse le transfert d'un ADP-ribose à partir du NAD<sup>+</sup>, sur une protéine cible. En plus de ses fonctions dans la réparation de l'ADN, la PARP a également de multiples fonctions dans la régulation de l'inflammation et de la mort cellulaire, puisqu'une sur-activation de la PARP peut entraîner la mort cellulaire par déplétion du NAD<sup>+</sup> (Dantzer et al., 2006; Schreiber et al., 2006). La PARG permet la dégradation de la PARP1 *in vivo* et assure la survie cellulaire après réparation, en empêchant une accumulation trop importante de poly-ADP riboses et donc l'induction de la mort cellulaire (Hassa et al., 2006).

### II.A.6.1 Altérations du BER dans les cancers

Les altérations du système BER dans les cancers conduit de la même façon à un phénotype hypermutateur. Ces altérations consistent en des dérégulations de l'expression des gènes et/ou des protéines ou bien des polymorphismes altérant la fonction des enzymes. L'expression d'**APE1** est très variable selon le type de cancer avec une surexpression allant de 20 à 100% des cancers du sein, poumon et

ovaires. L'expression nucléaire d'APE1 a été associée à une résistance à la chimiothérapie et à un mauvais pronostic dans les cancers de la tête et du cou et du col de l'utérus et dans les cancers bronchiques non à petites cellules. Ces données suggèrent donc qu'une augmentation de l'activité d'APE1 pourrait être un facteur de radio et chimio-résistance. De nombreux polymorphismes ont été identifiés au niveau du gène d'APE1 avec des impacts pronostiques et prédictifs qui restent incomplètement déterminés (Abbotts and Madhusudan, 2010). **La PARP** est surexprimée dans environ 50% des cancers du sein, du poumon et du côlon (Hosoya and Miyagawa, 2014; Masutani and Fujimori, 2013). La PARP1 est surexprimée dans les gliomes de haut grade de l'enfant par rapport aux gliomes de bas grade, dans les épendymomes et dans les médulloblastomes (particulièrement à grandes cellules) et associée à un mauvais pronostic (Barton et al., 2009; Pizem et al., 2011; van Vuurden et al., 2011). Des polymorphismes ont également été décrits sur le gène de la PARP1 et 2 dont la valeur prédictive est contradictoire selon les études et le type de cancer (Masutani and Fujimori, 2013). **La MPG** est surexprimée dans les gliomes par rapport au tissu cérébral normal et son expression augmente avec le grade du gliome et semble représenter un facteur de mauvais pronostic indépendamment du grade (Kim et al., 2003; Liu et al., 2012). **La DNA Pol $\beta$**  est quant à elle fréquemment surexprimée dans de nombreux cancers avec des variants décrits dans environ 30% des tumeurs (Albertella et al., 2005a, 2005b; Chan et al., 2006). Globalement, les expressions de MPG, PARP, APE1 et de la DNA Pol $\beta$  sont hautement variables d'une tumeur à l'autre (Tang et al., 2011).

#### **II.A.6.2 Ciblage du BER et sensibilisation au TMZ**

L'inhibition pharmacologique du système BER a permis d'augmenter la sensibilité au TMZ dans de nombreux modèles précliniques, et ceci indépendamment du statut de MGMT (Adhikari et al., 2008; Kinsella, 2009). Ces inhibiteurs peuvent cibler APE1 (Liu and Gerson, 2004; Rosa et al., 1991; Yan et al., 2007), PARP-1 (Dungey et al., 2009; Fisher et al., 2007; Ratnam and Low, 2007), la PARG (Tentori and Graziani, 2005) et la Pol $\beta$  (Jaiswal et al., 2009; Mizushina, 2009; Trivedi et al., 2005, 2008). En particulier, les inhibiteurs de la PARP ont permis la sensibilisation de cellules de gliomes au TMZ (Tentori et al., 2002) et de modèles de xénogreffes porteuses d'une déficience du système MMR (Cheng et al., 2005). De

façon intéressante la surexpression de MPG permet aussi la sensibilisation des cellules cancéreuses au TMZ (Fishel and Kelley, 2007; Trivedi et al., 2008) en augmentant l'excision des lésions N7méthylguanines induites par le TMZ et de ce fait le nombre de SSBs secondaires qui dépasse alors les capacités de réparation de la DNA Pol $\beta$ , enzyme limitante du système BER (Rinne et al., 2005). De la même façon, la surexpression de MPG permet la sensibilisation des cellules cancéreuses à plusieurs molécules anti-BER, dirigées contre APE1, la PARP ou la PARG, alors qu'une augmentation de l'expression de la DNA Pol $\beta$  antagonise cet effet (Tang et al., 2011).

Ainsi l'équilibre entre les différents acteurs de cette voie est un élément important à considérer pour prédire la réponse à de telles molécules. Cette inhibition a en outre l'avantage de cibler des mécanismes indépendants de MGMT et du système MMR et est ainsi particulièrement attractive. De nombreux essais cliniques ont testé ou sont en cours de tester de nouvelles molécules ciblant les enzymes du système BER dans un grand nombre de cancers différents (Hosoya and Miyagawa, 2014). En pédiatrie, Van Vuurden et ses collaborateurs ont montré qu'un traitement par anti-PARP (Olaparib) pouvait radiosensibiliser un certain nombre de lignées de gliomes malins pédiatriques (van Vuurden et al., 2011).

## **II.A.7 Le système de réparation par recombinaison homologue et le principe de létalité synthétique**

Le système HR n'est fonctionnel que pendant les phases G2 et S, puisqu'il utilise pour la réparation des DSBs, la chromatide homologue de la molécule d'ADN lésée comme modèle à copier pour le remplacement des DSBs. La réparation par HR débute par la liaison du complexe MRN sur le site de la DSB à réparer puis le recrutement et l'activation d'une résection MRE11-médiée puis le recrutement de RAD51 et la recombinaison homologue proprement dite. Les protéines BRCA1, BRCA2 ainsi que d'autres composants du HR tels que H2AX, PALB2, RPA et RAD52 interviennent dans la charge de RAD51 au niveau de la cassure ADN.

L'ensemble des lésions de l'ADN, si elles ne sont pas réparées sont transformées en DSBs lors du cycle de réplication suivant, comme on l'a vu dans le chapitre précédent. Ainsi la réparation de toutes ces lésions peut être rattrapée au



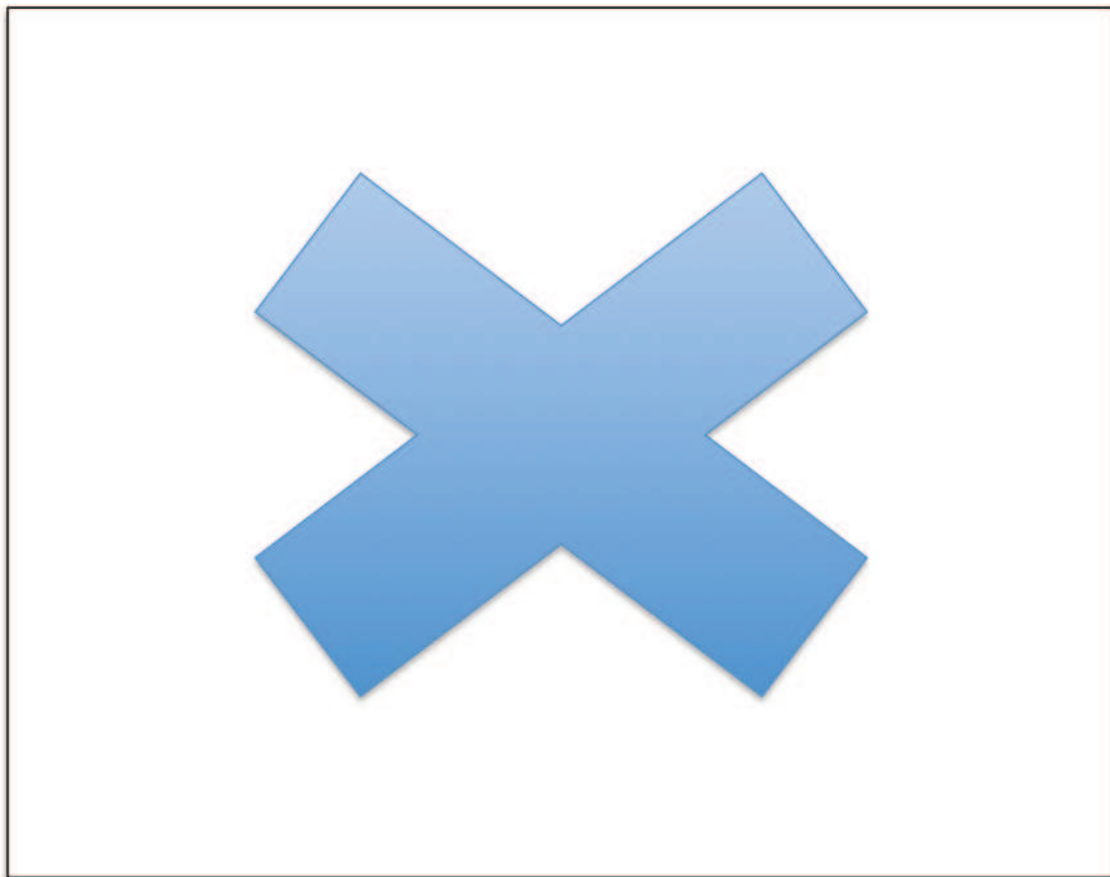
stade de DSBs par le système HR qui représente ainsi un grand système de by-pass et donc de résistance finale. Avec les inhibiteurs de la PARP, a été observée une létalité dite synthétique qui correspond à une augmentation de l'efficacité des anti-PARP en présence d'une atteinte concomitante du système HR, avec une utilisation aberrante secondaire du NHEJ qui favorise l'accumulation d'erreurs non viables et ainsi une toxicité sélective des anti-PARP envers les cellules HR déficientes (Lupo and Trusolino, 2014).

La déficience du HR est définie par le terme de « BRCAness » car elle a été observée pour la première fois à travers des mutations germinales de BRCA1 et BRCA2. Ces mutations inactivatrices de BRCA1 ou BRCA2 sont identifiées dans moins de 10% des cancers du sein et de l'ovaire et peuvent correspondre à des mutations germinales dans le cadre de syndromes familiaux de prédisposition au cancer (Turner et al., 2004). La déficience d'autres composants du HR ou de la signalisation des DSBs a également été associée par la suite à une sensibilisation au TMZ, comme les sous-expressions du complexe MRN, de PALB2, de RAD51, RAD54, DSS1, RPA1, ATR, ATM, CHK1, CHK2, FANCD2, FANCA et FANCC. Notamment ATM, MRE11 et RAD51 sont fréquemment altérés dans les cancers sporadiques par le biais de mécanismes génétiques ou épigénétiques (Dedes et al., 2011). D'autres molécules semblent interférer avec la fonction HR telle que Aurora A dont l'amplification et la surexpression inhibe RAD51 ou la délétion de PTEN qui entraîne une déplétion de RAD51 et ainsi une déficience du HR (Hunt et al., 2012; Michels et al., 2014). Une sous-expression de BRCA1 ou de BRCA2 est retrouvée dans environ 30% et 15% respectivement des cancers sporadiques du sein, de l'ovaire, du côlon et du poumon, tandis qu'une surexpression de BRCA1 concerne environ 20% des cancers bronchiques. Dans les cancers sporadiques, l'hyperméthylation du promoteur de BRCA1 est responsable de cette sous-expression, tandis que l'amplification de *EMSY* semble déstabiliser BRCA2. L'hyperméthylation des promoteurs de certains composants de la voie de l'anémie de Fanconi (FANCD2, FANCA, FANCC) est aussi responsable d'un phénotype de déficience du HR (Dedes et al., 2011).

La déficience du système HR peut être déterminée à partir de tissu frais en culture via la capacité des cellules à former des foci de RAD51 ou de H2AX après exposition aux agents génotoxiques. Cette méthode n'est cependant pas applicable

en routine. Une façon de détecter indirectement les cellules HR déficientes est le niveau des polymères de PAR qui est particulièrement élevé en cas de déficience HR (Turner and Ashworth, 2011).

Le rôle du HR dans la résistance à d'autres chimiothérapies a également été mis en évidence. Par exemple, la surexpression de RAD51 a été rapportée dans 24 à 66% des cancers du sein, de la tête et du cou, du pancréas, des cancers bronchiques non à petites cellules et des sarcomes des tissus mous et corrélée à une résistance aux sels de platine et à un mauvais pronostic (Hosoya, 2014). On peut imaginer le même rôle de la déficience du HR, en aval de MGMT, pour ce qui concerne la cytotoxicité du TMZ liée aux lésions O6 méthylguanines, mais la BRCAness a été peu étudiée dans les glioblastomes de l'enfant comme de l'adulte (Roos et al., 2009).



**Figure 30** : Système de réparation par recombinaison homologue (HR)  
(D'après Hoyosa et al, 2014)

## **II.B Hypoxie Intra-tumorale, Facteurs HIFs et Résistance aux Traitements**

### **II.B.1 L'hypoxie, une caractéristique du microenvironnement tumoral des GBM**

#### **II.B.1.1 Définitions de l'hypoxie**

L'hypoxie tissulaire se définit relativement et à l'opposé de ce qui peut être défini comme la « normoxie », c'est à dire la pression tissulaire partielle en O<sub>2</sub> (pO<sub>2</sub>) physiologique. Cette pression partielle est exprimée en mm Hg tandis que la concentration en O<sub>2</sub> correspond au pourcentage de pO<sub>2</sub> par rapport aux autres gaz (N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O) présents dans l'atmosphère relativement à la pression totale atmosphérique qui est invariablement égale à 760 mm Hg.

Or cette pO<sub>2</sub> est variable d'un tissu à l'autre et au sein d'un même tissu. Elle varie en moyenne de 40 à 120 mm Hg, soit une concentration de 5 à 15% (ex : 40 mmHg dans les capillaires et 100 mmHg dans l'alvéole pulmonaire). Les niveaux d'oxygénation tissulaires sont donc largement en deçà de la pO<sub>2</sub> atmosphérique mesurée au niveau de la mer, classiquement de 160 mm Hg (soit 21% en termes de pression partielle). La pO<sub>2</sub> tissulaire est déterminée par les échanges gazeux qui se font par diffusion des molécules d'O<sub>2</sub> à travers les parois des capillaires sanguins qui vascularisent les tissus des organes. Cette diffusion se fait passivement selon le gradient de pression différentiel régnant entre les capillaires et les tissus. Or cette diffusion passive n'assure l'oxygénation des tissus que sur une distance inférieure à 100 microns si bien que l'oxygénation homogène d'un tissu repose sur un réseau capillaire (ou microvascularisation) dense, bien organisé et finement régulé (Jain, 2013).

Il n'existe en outre pas de définition « quantitative » stricte de la normoxie vs l'hypoxie : la normoxie tissulaire est la pression habituelle en oxygène lorsque le tissu est normalement vascularisé alors que l'hypoxie résulte d'une altération de la vascularisation qu'elle soit d'origine ischémique par exemple ou intra-tumorale

comme nous allons le voir. Toutefois des niveaux de pO<sub>2</sub> inférieurs à 3% signent en général une hypoxie tandis qu'une anoxie est définie par des niveaux <0,5%.

Dans le cerveau humain, les concentrations physiologiques en oxygène varient de 2,5 à 12,5% (pO<sub>2</sub> = 20 à 100 mm Hg). Plus de 50% du tissu cortical normal présente des niveaux de pO<sub>2</sub> inférieurs à 30 mmHg (4%). Plusieurs études ont montré que la plupart des gliomes de haut grade présentaient une hypoxie sévère à modérée avec des concentrations en O<sub>2</sub> comprises entre 0,5 et 2,5%. Ces niveaux d'oxygénation sont donc pertinents et utilisables pour la modélisation de l'hypoxie intra-tumorale observée dans les gliomes de haut grade (Collingridge et al., 1999; Evans et al., 2004, 2008).

L'oxygène joue un rôle primordial dans le métabolisme cellulaire car il sert d'accepteur final des électrons transportés par la chaîne respiratoire mitochondriale au cours de réactions de phosphorylation oxydative réalisées à partir des cofacteurs réduits (NADH, H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub>) générés par le cycle de Krebs, la glycolyse et la beta-oxydation des acides gras. La production d'ATP et donc la survie cellulaire dépendent donc de ce métabolisme oxydatif. Un défaut d'oxygénation local est de ce fait associé à un risque immédiat de génération de radicaux libres qui altèrent rapidement les macromolécules (ADN, lipides membranaires...), entraînant rapidement le dysfonctionnement puis la mort cellulaire.

### **II.B.1.2 Hypoxie et vascularisation des tumeurs**

L'environnement tumoral est caractérisé le plus souvent par une faible pression en oxygène (<3% O<sub>2</sub>) associée à une architecture vasculaire anormale (Vaupel et al., 2001). Les vaisseaux tumoraux sont anormaux à la fois structurellement et fonctionnellement. Les vaisseaux tumoraux sont tortueux, sacculaires, dilatés et totalement chaotiques dans leur organisation. La structure des parois des vaisseaux est également anormale (endothélium désorganisé laissant paraître de larges lacunes, péricytes détachés et membranes basales épaissies ou au contraire amincies). Cette vascularisation aberrante tumorale donne ainsi lieu à une perfusion hétérogène et anarchique, variable dans le temps et dans l'espace. Cette perfusion peut-être altérée par plusieurs mécanismes et ainsi être:

- interrompue par des mécanismes de compression vasculaire par la masse tumorale dont la croissance excède la néovascularisation ou par des phénomènes d'occlusion par des thrombi intra-vasculaires

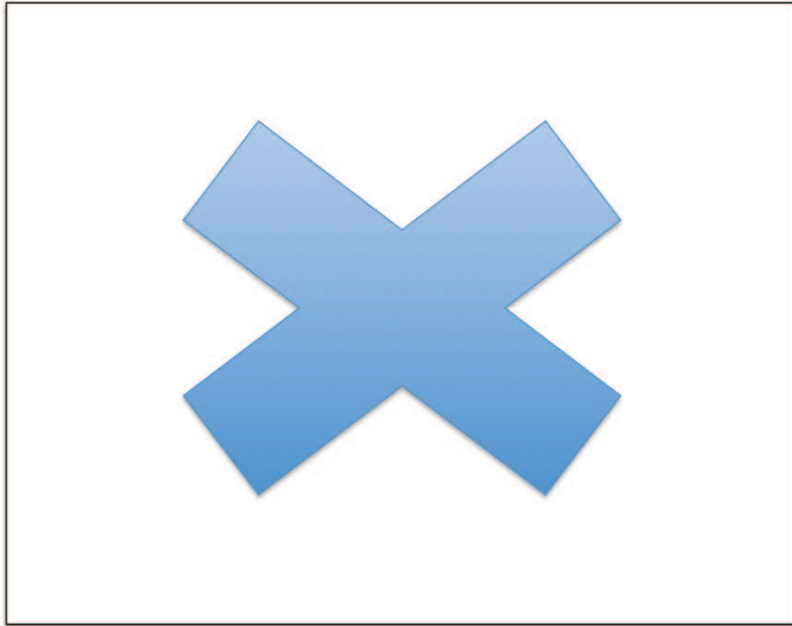
- associée à une augmentation excessive de la perméabilité vasculaire, conduisant à une fuite plasmatique dans l'espace interstitiel, une augmentation de la pression des fluides interstitiels et une stase de la circulation sanguine.

Cette perfusion anormale a pour conséquence de limiter l'accès aux thérapies systémiques et aux cellules de l'immunité et dans tout les cas induit une hypoxie intra-tumorale (Jain, 2013).

L'hypoxie intra-tumorale ainsi générée par cette perfusion aberrante est elle-même très variable à la fois:

- dans le temps** : l'hypoxie dite cyclique alterne des périodes d'anoxie aigüe et des phases de réoxygénation dans une même zone tumorale (Dewhirst, 2009; Dewhirst et al., 2008);

- dans l'espace** : étant donné que toutes les cellules ne sont pas soumises à la même pO<sub>2</sub> mais à un gradient de pO<sub>2</sub> autour d'axes vasculaires aberrants, certaines zones seulement (souvent les zones les plus centrales de la tumeur) sont soumises à de l'hypoxie plus ou moins chronique voire à de la quasi-anoxie.



**Figure 31** : Exemple de vascularisation tumorale anormale de tumeurs humaines xéno greffées chez la souris NOD/SCID (D'après Jain, 2013; Vakoc et al., 2009)

Des fenêtres transparentes ont été implantées et ont permis de visualiser les tumeurs implantées (de gauche à droite) dans les glandes mammaires, en intra-crânien (hémisphère droit) et en sous-cutané dorsal grâce à une technique d'imagerie par domaine de fréquence optique (OFDI). La profondeur des vaisseaux est marquée par la couleur jaune (réseau superficiel) ou rouge (réseau profond) Echelle = 500  $\mu\text{m}$

### II.B.1.3 Conséquences de l'hypoxie sur la physiologie tumorale

La croissance tumorale accompagnée de sa vascularisation anormale induit le plus fréquemment une hypoxie intra-tumorale qui joue également un rôle majeur dans l'acquisition d'un phénotype invasif et métastatique.

Les implications de l'hypoxie dans la progression tumorale sont les suivantes:

- 1) Les vaisseaux sanguins sont indispensables à la croissance et la progression tumorale. L'augmentation du volume tumoral n'est possible que par une activation permanente de l'angiogénèse dès les stades précoces de la croissance tumorale. Cependant cette angiogénèse dérégulée induit une microvascularisation aberrante et de l'hypoxie intra-tumorale, qui active à son tour et entretient le processus d'angiogénèse en un cercle vicieux (Carmeliet and Jain, 2000) ;

- 2) la cellule tumorale est soumise à un environnement hypoxique mais également pauvre en nutriments auquel elle doit s'adapter pour survivre et répondre à des besoins prolifératifs élevés. Cette adaptation est possible grâce à une reprogrammation métabolique connue sous le nom d'effet Warburg, et qui consiste en la déviation du métabolisme énergétique vers la glycolyse anaérobie parallèlement à une inhibition de la phosphorylation oxydative. Ceci s'accompagne d'un accroissement du transport intracellulaire du glucose et de l'expression des enzymes de la glycolyse pour maintenir une production d'ATP suffisante en shuntant la respiration mitochondriale (Yeung et al., 2008; WARBURG, 1956). Cette adaptation métabolique s'accompagne d'une acidification du milieu extra-cellulaire qui favorise l'activation de protéinases impliquées dans l'invasion tumorale.
- 3) A côté de ces effets adaptatifs, l'hypoxie intra-tumorale favorise également l'instabilité génétique, la migration et l'invasion tumorale mais aussi le maintien ou l'acquisition de propriétés dites souches. L'hypoxie tumorale est également associée à une résistance à l'apoptose et à une dérégulation immunitaire locale (immunosuppression, inflammation) (Majmundar et al., 2010).

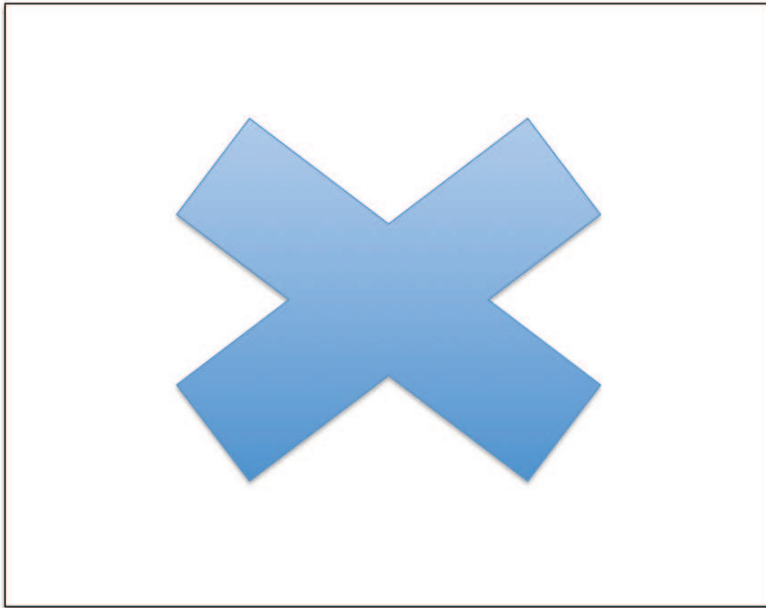
La plupart de ces mécanismes induits par l'hypoxie sont régulés par des facteurs de transcription appelés HIFs (Hypoxia-inducible Factors), également impliqués dans la progression tumorale et métastatique ainsi que dans la résistance au traitement.

#### **II.B.1.4 Adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie : rôle des facteurs HIFs**

##### **II.B.1.4.1 Les facteurs HIFs : HIF-1 et HIF-2**

L'adaptation des cellules tumorales à un environnement hypoxique est principalement régulée par des facteurs de transcription induits par l'hypoxie appelés HIFs (Hypoxia Inducible Factor) (Semenza, 2007). Ces protéines sont des facteurs de transcription hétérodimériques et comportent:

- une sous-unité HIF-1 $\beta$ , codée par le gène *ARNT* (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), invariable et exprimée de façon constitutive quel que soit le niveau d'oxygène
- une sous-unité HIF- $\alpha$ , variable, dont la stabilité est régulée par la pression en oxygène



**Figure 32:** Structure des facteurs HIFs (Hypoxia Inducible Factors)

(D'après Prabhakar and Semenza, 2012)

Les HIFs appartiennent à la famille des facteurs de transcription dits « bHLH/PAS ». Les sous-unité HIF- $\alpha$  se dimérisent avec la sous-unité HIF1- $\beta$  via leurs domaines HLH (Helix-loop-Helix) et une partie A du domaine PAS (acronyme de PER, ARNT, SIM, nom des trois protéines dans lesquelles ce motif a été identifié pour la première fois). Au niveau de leurs gènes cibles, les HIFs reconnaissent et se lient via leur domaine PAS-B à des boîtes de type enhancer dites HREs, pour « Hypoxia Responding Element », comprenant la séquence consensus G/ACGTG. Leur domaine de transactivation comprend une partie N-terminale (TAD-N) et une partie C-terminale (TAD-C). Le TAD-C comprend le résidu asparagine (N) hydroxylé par FIH (Factor inhibiting HIF) et interagit avec le cofacteur de transcription p300. Le domaine ODD (oxygen-dependent degradation) est la partie interagissant avec la pVHL (protéine de Von Hippel Lindau) et qui contient les résidus proline (P) qui seront hydroxylés par les PHDs (prolyl hydroxylase). Les positions des résidus diffèrent sur HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ .

3 facteurs HIFs ont été décrits et définis selon la sous-unité  $\alpha$  impliquée :

- HIF-1** le plus connu, défini par la sous-unité HIF-1 $\alpha$  codée par le gène *HIF1A*, est d'expression ubiquitaire
- HIF-2**, défini par la sous-unité HIF-2 $\alpha$  codée par le gène *EPAS1* (Endothelial PAS domain protein 1), d'expression restreinte à certains tissus (ex : endothelium)



**-HIF-3**, défini par la sous-unité HIF-3 $\alpha$  codée par le gène *IPAS* (Inhibitory PAS domain protein).

HIF-1 et HIF-2 activent l'expression de nombreux gènes cibles communs impliqués dans la réponse cellulaire à l'hypoxie. HIF-3 ne sera pas détaillé dans le cadre de ce travail.

#### **II.B.1.4.2 Régulation de l'expression des HIF $\alpha$ :**

Les sous-unités HIF- $\alpha$  sont stabilisées par l'hypoxie intra-tumorale mais peuvent l'être également de façon O<sub>2</sub>-indépendante via des altérations génétiques présentes dans la tumeur.

##### **Rôle de la pO<sub>2</sub> sur la stabilité et la dégradation des HIF $\alpha$**

L'expression et l'accumulation protéique des facteurs HIFs est essentiellement régulée par la pression en oxygène (Semenza, 1998). En condition de normoxie, les sous-unités HIF- $\alpha$  sont rapidement dégradées par le protéasome, après avoir été préalablement hydroxylées par:

- **les prolyl hydroxylases PHD1, 2 et 3**, responsables de l'hydroxylation de deux résidus prolines hautement conservés contenus dans le domaine ODD, dans une réaction impliquant la co-oxydation de l' $\alpha$ -ceto-glutarate en succinate via une étape du cycle de Krebs. Les PHD contiennent en outre un centre actif contenant un ion ferreux Fe<sup>2+</sup> maintenu dans un état réduit grâce à l'ascorbate et plus généralement par les molécules anti-oxydantes.

- **l'asparaginyl hydroxylase ou protéine FIH** (Factor Inhibiting HIF), capable d'hydroxyler un résidu asparagine contenu dans le C-TAD domaine. Cette hydroxylation facilite la dégradation par le protéasome mais perturbe également l'interaction de HIF $\alpha$  avec le cofacteur de transcription p300, altérant ainsi la capacité transcriptionnelle de HIF.

L'hydroxylation de la sous-unité HIF- $\alpha$  favorise ensuite son ubiquitinylation par un complexe protéique incluant la protéine Von Hippel-Lindau (pVHL) puis sa dégradation par le protéasome. En situation d'hypoxie, les PHDs sont inactivées et la protéine HIF-1 $\alpha$  s'accumule dans la cellule. Le rôle crucial de la pVHL dans la dégradation de HIF $\alpha$  a été mis en évidence dans la maladie de Von Hippel Lindau dans laquelle l'inactivation germinale du gène *VHL* se traduit par l'apparition de

tumeurs rénales, de la rétine et du SNC. La perte somatique de l'expression de VHL, est de plus bien décrite dans les cancers du rein (Kondo et al., 2002).

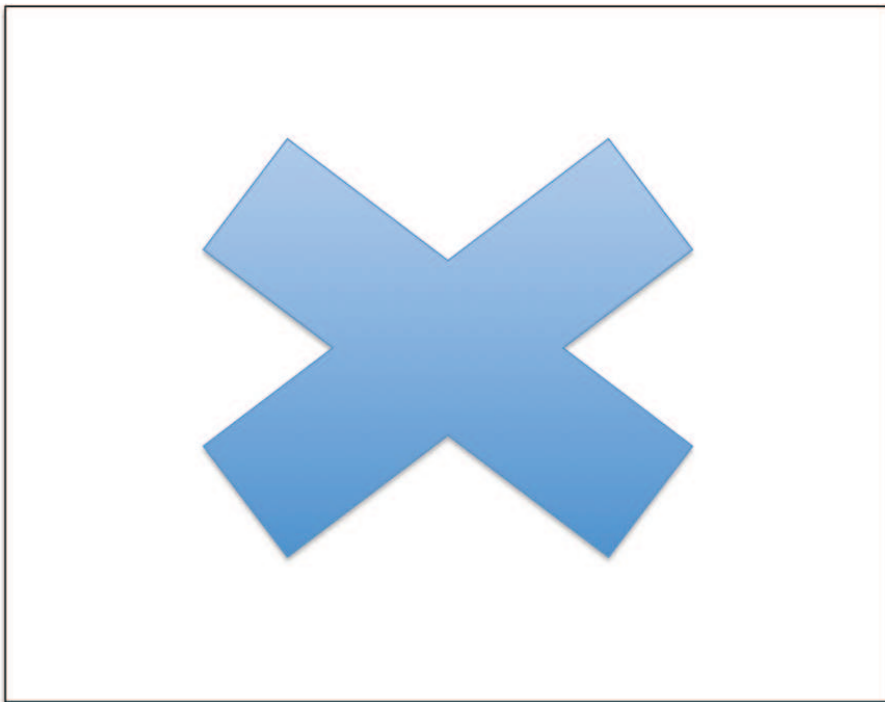
L'hypoxie limite, de fait, l'activité des PHDs qui nécessitent de l'oxygène pour leur réaction enzymatique. Cependant d'autres mécanismes contribuent à inactiver les PHDs en hypoxie à travers par exemple le dysfonctionnement mitochondrial et la génération de dérivés actifs de l'oxygène (ROS), produits en particulier lors de la phase finale du transfert des électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les ROS sont des dérivés actifs de l'oxygène, produits intermédiaires de son métabolisme. A faible concentration, les ROS ont un rôle physiologique et sont impliqués dans la régulation de nombreux processus cellulaires en tant que second messenger. A plus forte concentration, ils peuvent causer la mort cellulaire par apoptose ou nécrose en altérant la structure de l'ADN et des membranes lipidiques. La perturbation de la respiration mitochondriale causée par l'hypoxie ou « stress oxydatif » génère rapidement des ROS. Ces ROS oxydent le  $Fe^{2+}$  en fer ferrique  $Fe^{3+}$ , inhibant ainsi l'hydroxylation médiée par la PHD et entraînant l'accumulation de HIF $\alpha$  (Brunelle et al., 2005). En retour, HIF-1 $\alpha$  limite la génération des ROS en inhibant l'entrée des métabolites du glucose dans le cycle de Krebs et contribue au maintien de l'équilibre redox en hypoxie (Simon, 2006a).

Ce mécanisme de régulation via une dégradation pVHL-protéasome dépendante, est commun à HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ , cependant des distinctions commencent à être identifiées. Par exemple, les différentes hydroxylases peuvent avoir une activité différentielle envers HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  : PHD3 et FIH hydroxylent de façon préférentielle HIF-2 $\alpha$  et HIF-1 $\alpha$  respectivement dans certaines lignées cellulaires (Appelhoff et al., 2004; Bracken et al., 2006). De plus, HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  s'accumulent à des niveaux de pression d'oxygène différents dans divers types cellulaires. Pahlman et al ont montré dans plusieurs modèles cellulaires tumoraux, notamment des gliomes, que HIF-2 $\alpha$  s'accumulait dès 2-5% d'O<sub>2</sub>, tandis que HIF-1 $\alpha$  s'accumulait à des pressions plus faibles, inférieures à 2% d'O<sub>2</sub> (Holmquist et al., 2005; Li et al., 2009; Nilsson et al., 2005). Par ailleurs, la stabilisation de HIF-2 $\alpha$  semble plus durable (>48H) que celle d' HIF-1 $\alpha$  qui augmente de façon plus aigüe et diminue progressivement en quelques heures (Holmquist-Mengelbier et al., 2006; Löfstedt et al., 2007).

L'expression médiée par HIF-1 $\alpha$  de transcrits anti-sens est un des mécanismes

pouvant expliquer son expression transitoire (Uchida et al., 2004). Par ailleurs l'expression de différentes ligases E3 ubiquitines peut aussi influencer la stabilité différentielle des HIF- $\alpha$  : les facteurs HAF (HIF-associated factor) déstabilisent HIF-1 $\alpha$  tandis qu'ils augmentent l'activité transcriptionnelle de HIF-2 $\alpha$ , permettant un véritable switch vers une transcription HIF-2 dépendante ; la protéine CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interaction protein) en association avec HSP70 (Heat Shock protein 70) permet la dégradation de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie mais pas de HIF-2 $\alpha$  (Koh et al., 2011; Luo et al., 2010).

La dégradation des sous-unités HIF- $\alpha$  via la voie du pVHL-protéasome est également régulée par d'autres mécanismes dépendants de la pO<sub>2</sub>, comme par exemple la sumoylation ou l'intervention d'autres composants du complexe d'ubiquitylation (Yee Koh et al., 2008).



**Figure 33** : Dégradation de HIF-1 $\alpha$  par la voie du pVHL-protéasome (Erwan Pencreach, données personnelles non publiées); Pro : proline ; Asn : asparagine

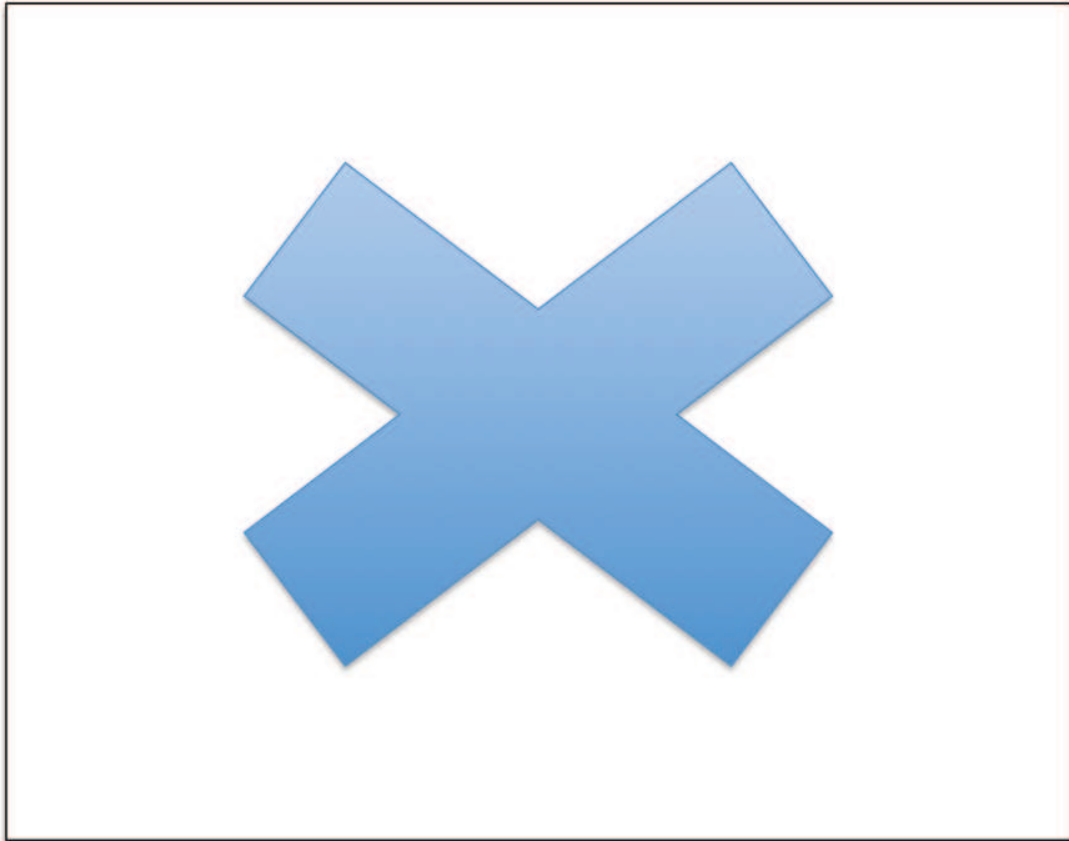
## Stabilisation des HIFs indépendante de la pO<sub>2</sub>

### Rôle des voies de signalisation oncogéniques

La dérégulation des voies de signalisation oncogéniques **PI3K-AKT-mTOR** et **RAS-MAPK** peut induire l'accumulation protéique des HIFs en condition de normoxie, conduisant à un phénotype pseudo-hypoxique. En effet ERK et mTORC1 régulent positivement l'initiation de la traduction via leur action respective sur S6K et 4EBP1 (pour mTOR) ou sur eIF-4E (pour ERK / MNK). Leur suractivation oncogénique entraîne une synthèse accrue de HIF qui dépasse alors les capacités de dégradation par le protéasome de la cellule et ainsi permet l'accumulation des HIFs en condition de normoxie.

Dans les cancers du rein à cellules claires, HIF-1 $\alpha$  semble être régulé par les 2 kinases du complexe mTOR : mTORC1 et mTORC2, tandis que l'expression de HIF-2 $\alpha$  semble être dépendante de mTORC2 et indépendante de mTORC1 (Jiang et al., 2001; Toschi et al., 2008).

mTORC1 augmente à la fois la synthèse de HIF-1 $\alpha$  mais également sa capacité transcriptionnelle. En effet, RAPTOR (regulatory associated protein of mTOR), composant du complexe mTORC1, interagit et active HIF1 $\alpha$  par le biais d'un motif dit TOS pour « mTOR signaling » localisé au niveau de sa partie N terminale (Land and Tee, 2007).



**Figure 34** : Rôle des voies de signalisation oncogénique PI3K/AKT/mTOR et RAS/MAPK dans la régulation traductionnelle de HIF-1 $\alpha$   
(Erwan Pencrach, données personnelles non publiées)

### **Génération excessive de ROS**

Une génération excessive de ROS peut inactiver les PHDs et ainsi entraîner la stabilisation de HIF en normoxie. Cette génération excessive peut être liée à un dysfonctionnement mitochondrial accompagné de surcroît d'une accumulation métabolique du succinate ou du fumarate, capables également de limiter l'activité de la PHD comme par exemple lors des mutations inactivatrices de la succinate déshydrogénase fréquentes dans les formes héréditaires de paragangliomes. L'activité de la NADPH oxydase en réponse à l'inflammation et plutôt favorisée par l'hypoxie intermittente, peut également générer des ROS et une stabilisation de HIF-1 $\alpha$  (Yuan et al., 2008).

## Régulation de HIF au niveau transcriptionnel

Les mécanismes de la régulation de l'expression des gènes codant les HIF- $\alpha$  via leur transcription sont peu connus. NF-KB régule la transcription de *HIF-1A* via une activation cytokinique Th1-dépendante (Nizet and Johnson, 2009). *EPAS-1* (codant HIF-2 $\alpha$ ) serait, quant à lui, régulé par la voie des cytokines Th2-dépendantes via les interleukines IL-4 et IL-1 (Takeda et al., 2010). La transcription de *HIF-1A* serait également régulée par la protéine de remodelage de la chromatine SWI/SNF appelée BAF57 (Kenneth et al., 2009).

## Modulation de l'activité de HIF- $\alpha$ par d'autres modifications post-traductionnelles

L'activité des HIFs peut également être modulée par des modifications post-traductionnelles des sous-unités  $\alpha$ , comme :

-la phosphorylation par ERK, activant HIF-1 $\alpha$  (Mylonis et al., 2006), tandis que la phosphorylation de HIF-2 $\alpha$  (et pas de HIF-1 $\alpha$ ) par PDK1 empêche l'inhibition de MYC (cf sous-chapitre suivant)

-la déacétylation de résidus lysine par différentes sirtuines (SIRT1,3 et 6) en réponse au NAD<sup>+</sup>, permet de réguler différenciellement HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  (Keith et al., 2012).

### II.B.1.4.3 Implications différentielles de HIF-1 $\alpha$ et de HIF-2 $\alpha$ dans la régulation de l'activité de MYC, mTOR et p53

#### Interconnexions MYC/HIF

Dans de nombreux modèles cellulaires, l'hypoxie inhibe la prolifération. Koshiji et al ont été les premiers à montrer que la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  à 1% d'oxygène provoquait l'arrêt du cycle cellulaire en inhibant l'oncogène *MYC* qui est un facteur de transcription dérégulé dans plus de 40% des tumeurs humaines (Koshiji et al., 2004). Les dérégulations de *MYC* dans les cancers peuvent être liées à une simple surexpression protéique ou provenir d'altérations génomiques comme des

amplifications, des translocations ou des mutations associées dans ce cas à de très haut niveau d'expression de MYC (Dang et al., 2008).

MYC régule de nombreux gènes cibles en formant notamment des hétérodimères avec la protéine MAX.

MYC contrôle la progression du cycle cellulaire et en particulier le point de contrôle du passage de la phase G1 à la phase S. Le complexe MYC/MAX induit ainsi l'expression de gènes comme la cycline D2 (*CCND2*) et de *E2F1*, impliqués dans la progression du cycle cellulaire. En parallèle, MYC inhibe l'expression des inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes, *CDKN1A* et *CDKN1B* codant respectivement pour p21 et p27, cette fois ci par le déplacement de la protéine SP1 du facteur de transcription MIZ1 (Dang et al., 2008).

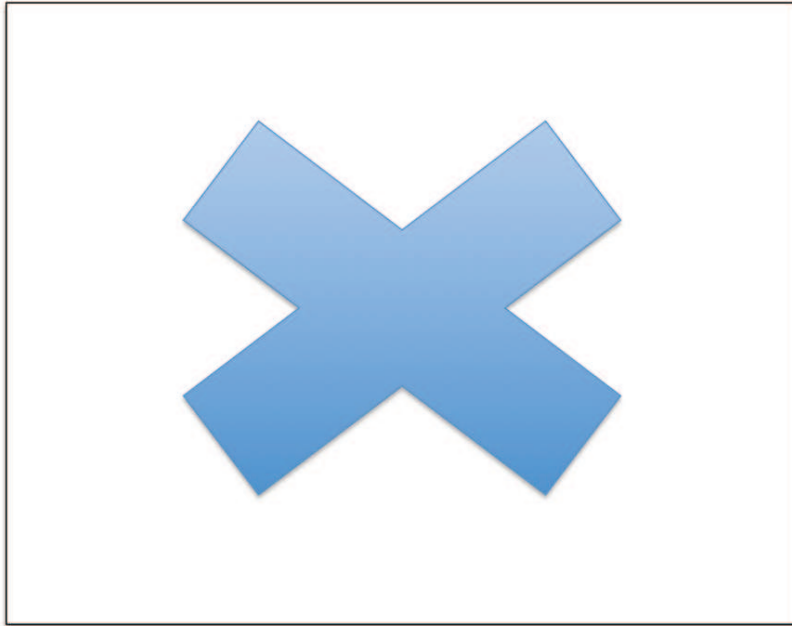
MYC régule également positivement un grand nombre de gènes de réparation de l'ADN (*MSH2*, *MSH6*, *NBS1*, *BRCA1*, *BARD1*, *XRCC2*, *CENPE* et *BUB1*) et intervient dans la régulation du métabolisme et de la biogenèse mitochondriale via des gènes tels que *ODC1* (ornithine decarboxylase) et *PGC-1 $\beta$*  (peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 $\beta$ ) (Zhang et al., 2007). Enfin MYC favorise la prolifération et la croissance cellulaire en induisant la plupart des gènes du métabolisme du glucose (glycolyse), de la glutamine (glutaminolyse) et de la synthèse protéique (Dang et al., 2008).

En hypoxie, HIF-1 $\alpha$  inhibe l'interaction de MYC avec MAX en se liant à SP1 réduisant l'expression d'un grand nombre de gènes cibles de MYC (Gordan et al., 2007a; Koshiji et al., 2005). Lors d'une hypoxie chronique, HIF-1 $\alpha$  favorise la dégradation de MYC et induit l'expression de l'inhibiteur de MYC, *MXI1* qui interagit avec MAX (Corn et al., 2005). A travers ces différents mécanismes, HIF-1 $\alpha$  limite le métabolisme anabolique, la synthèse protéique et la division cellulaire dépendants de MYC.

A l'opposé, les cellules tumorales qui expriment exclusivement HIF2 $\alpha$  montrent une activité de MYC augmentée avec une entrée plus rapide en phase S du cycle cellulaire, une augmentation de l'expression de *CCND2*, *E2F1* et *ODC1* (Gordan et al., 2007a) et une augmentation de l'occupation de MYC sur le promoteur de ses gènes cibles. Cet effet différentiel de HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  sur MYC pourrait être lié à de nombreux mécanismes et notamment à la phosphorylation par PKD1 de HIF-2 $\alpha$  et pas de HIF-1 $\alpha$ , empêchant l'interaction de HIF-2 $\alpha$  avec la protéine SP1 (To et al.,

2006).

Enfin, dans le cas des dérégulations de MYC associées à de très hauts niveaux d'expression, MYC peut également coopérer avec HIF-1 $\alpha$  pour induire l'expression des gènes de la glycolyse (*HK2*, *LDHA*) et de la glutaminolyse voire de *VEGFA*. Des observations comparables ont été faites pour les amplifications de *MYCN* dans les neuroblastomes. (Kim et al., 2007; Qing et al., 2010).



**Figure 35:** Rôle des HIFs dans la stabilisation du complexe MYC-MAX  
(D'après Keith et al, 2012)

### **Interconnexions HIF/p53**

La faible concentration en oxygène et le stress cellulaire (acidose, taux de nutriments insuffisants, perte allélique, mutation...) lié à la croissance tumorale, activent p53, un gène suppresseur de tumeur muté ou inhibé dans la plupart des cancers humains (Vousden and Prives, 2009). La protéine p53 est maintenue à un niveau d'activité faible dans les cellules normales par l'ubiquitinylation médiée par MDM2 et dégradée par le protéasome; p53 est modifiée et stabilisée en réponse à de nombreux stimuli incluant des signaux de prolifération anormaux, le stress osmotique, les lésions de l'ADN et l'hypoxie (Lavin and Gueven, 2006). La protéine p53 forme des homotétramères qui lient et régulent de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme, l'arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire.



HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  ont des effets opposés sur la voie p53. De nombreuses études ont montré que l'accumulation de p53 avait lieu dans les régions hypoxiques des tumeurs solides et était corrélée à l'apoptose. Par exemple, HIF-1 $\alpha$  semble augmenter l'activation de p53 et l'apoptose médiée par p53. Les rayons ionisants augmentent l'activité de HIF-1 $\alpha$  dans les tumeurs et les dérivés ROS permettent la phosphorylation de p53 par un mécanisme HIF-1 $\alpha$  dépendant (Moeller et al., 2005). A l'inverse, HIF-2 $\alpha$  semble inhiber p53 par de multiples mécanismes indirects. Par exemple, Bertout et al ont montré que l'augmentation d'expression de HIF-2 $\alpha$  inhibe la phosphorylation de p53 dans les cancers du rein à cellules claires, alors que l'absence d'expression de HIF-2 $\alpha$  augmente l'activité transcriptionnelle de p53 et l'expression de ses gènes cibles (Bertout et al., 2009).

### **Interconnexions entre hypoxie, mTOR et l'UPR**

Les facteurs HIFs sont transcrits et synthétisés de façon continue en hypoxie alors même que la synthèse protéique est globalement réprimée. En effet, une concentration tissulaire en O<sub>2</sub> inférieure à 3% entraîne l'inhibition quasi-immédiate de la synthèse protéique globale. Cette inhibition permet l'épargne énergétique nécessaire à la survie au stress hypoxique. Deux voies sont impliquées dans cette inhibition de la synthèse protéique lors de l'hypoxie : la voie mTOR et la voie de la réponse au stress médiée par le réticulum endoplasmique (UPR / Unfolded Protein Response), que nous ne détaillerons pas ici (pour plus de détails voir la revue de Wouters and Koritzinsky, 2008).

La kinase mTOR intègre et transmet des signaux provenant de nombreuses voies de signalisation et ainsi régule la survie et la croissance cellulaire. Elle régule en particulier la synthèse protéique, la biogenèse ribosomale, l'autophagie et le métabolisme anabolique. Dans des conditions nutritionnelles et énergétiques favorables, mTOR, au sein du complexe mTORC1, stimule la synthèse protéique en phosphorylant les protéines p70S6K, 4E-BP1 et EEF2K. L'hypoxie, surtout prolongée et plus ou moins combinée avec des situations de stress énergétique ou nutritionnel, entraîne une inhibition de mTORC1 par de multiples mécanismes moléculaires.

Cette inhibition est médiée :

-Soit par une activation du complexe TSC1-TSC2

Par **AMPK** (AMP-activated protein kinase) : celle-ci inhibe mTORC1 via la phosphorylation de TSC2 et de Raptor et peut être activée en réponse à une déplétion en ATP ou par la perte du gène suppresseur de tumeur *LKB1* (Liu et al., 2006).

Par **REDD1** (codée par *DDIT4*), qui libère TSC2 de son interaction inhibitrice avec les protéines 14-3-3 (Brugarolas et al., 2004).

-Soit par une inhibition de RHEB (RAS homolog enriched in brain)

Par **BNIP3** (Bcl2/adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein 3) (Li et al., 2007).

-Soit par séquestration protéique

Après liaison de mTOR avec **PML** (promyelotic leukemia tumor suppressor) et sa conséquente dégradation dans les corps nucléaires (Bernardi et al., 2006).

Parmi ces acteurs de l'inhibition de mTORC1, seuls *BNIP3* et *DDIT4* sont induits par HIF-1 $\alpha$ , tandis que les autres font partie de la réponse à l'hypoxie HIF-indépendante.

Une des fonctions clé de mTORC1 est l'initiation de la traduction Cap-dépendante des mRNA par le biais de la phosphorylation de 4E-BP1, libérant ainsi le facteur EIF4E, nécessaire à cette traduction. L'inhibition de mTOR par l'hypoxie inhibe donc principalement la synthèse protéique Cap-dépendante et limite donc la prolifération. Etant donné les fonctions de mTOR, son inhibition est susceptible de représenter une barrière « suppresseur de tumeur » en condition d'hypoxie et un mécanisme de sélection d'altérations génomiques de la voie mTOR telles que les mutations de *PI3K* ou de *PTEN* dès les stades précoces de la cancérogenèse (Connolly et al., 2006; Graeber et al., 1996).

Cependant la régulation négative de mTOR par l'hypoxie semble également représenter un mécanisme de tolérance à l'hypoxie important pour la progression tumorale.

-l'inhibition de la synthèse protéique (forte consommatrice d'ATP) permet la préservation de l'homéostasie énergétique en contexte de stress hypoxique (Wouters and Koritzinsky, 2008).

-l'hypophosphorylation et des hauts niveaux d'expression de 4E-BP1 favorisent en hypoxie la traduction Cap-indépendante de certains gènes comme

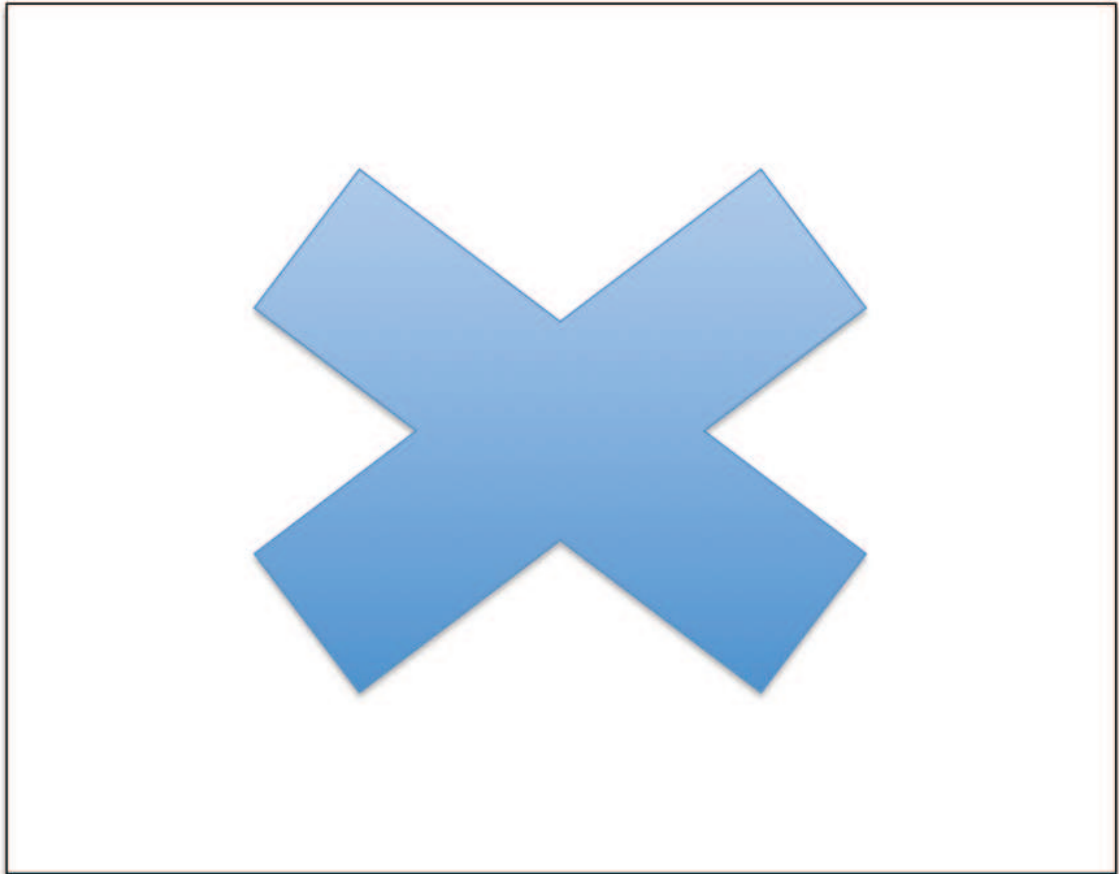
*HIF1A* et ses gènes cibles, qui seront donc préférentiellement traduits en hypoxie (Braunstein et al., 2007).

-l'inhibition de mTOR ainsi que l'induction de BNIP3 et AMPK favorisent l'autophagie, qui selon le contexte cellulaire et l'importance du stress cellulaire peut représenter un mécanisme de survie ou de mort cellulaire (Mathew and White, 2011; Zhang et al., 2008).

L'inhibition de HIF-1 lors du traitement par rapamycine (inhibiteur de mTORC1) souligne le paradoxe de l'importance de mTOR pour la stabilisation de HIF alors même que mTOR est inhibé en hypoxie. Comme précédemment décrit, l'interaction de HIF-1 $\alpha$  avec RAPTOR serait en effet importante pour son activité transcriptionnelle (Land and Tee, 2007). En outre, il a été démontré que l'hypoxie cyclique était capable d'induire mTORC1, à l'opposé de l'hypoxie chronique (Yuan et al., 2008).

L'inhibition de mTOR en contexte tumoral et/ou de dérégulation est donc complexe et doit dépendre de multiples interactions au sein d'un micro-environnement très hétérogène. De plus ces mécanismes, s'ils inhibent mTORC1, n'affectent pas nécessairement le complexe mTORC2 dont le rôle en cas d'hypoxie reste à préciser. Certaines études ont suggéré que HIF-2 $\alpha$  pouvait au contraire stimuler l'activation de mTORC1 (Gan et al., 2005; Roberts et al., 2009).

Ainsi les HIFs et l'hypoxie influencent le métabolisme, la synthèse protéique et le cycle cellulaire via des interactions complexes et potentiellement antagonistes avec MYC, mTOR et p53. Le poids oncogénique de HIF-1 versus HIF-2 peut donc en partie dépendre de ces interactions différentielles suivant le type cellulaire, le background génétique et le type d'hypoxie impliquée.



**Figure 36** : Régulation de mTOR par l'hypoxie  
(D'après Wouters et al., 2008)  
Parmi ces mécanismes inhibiteurs, seuls *REDD1* et *BNIP3* sont induits par HIF-1 $\alpha$ .

#### **II.B.1.4.4 Rôle des facteurs HIFs dans la progression tumorale**

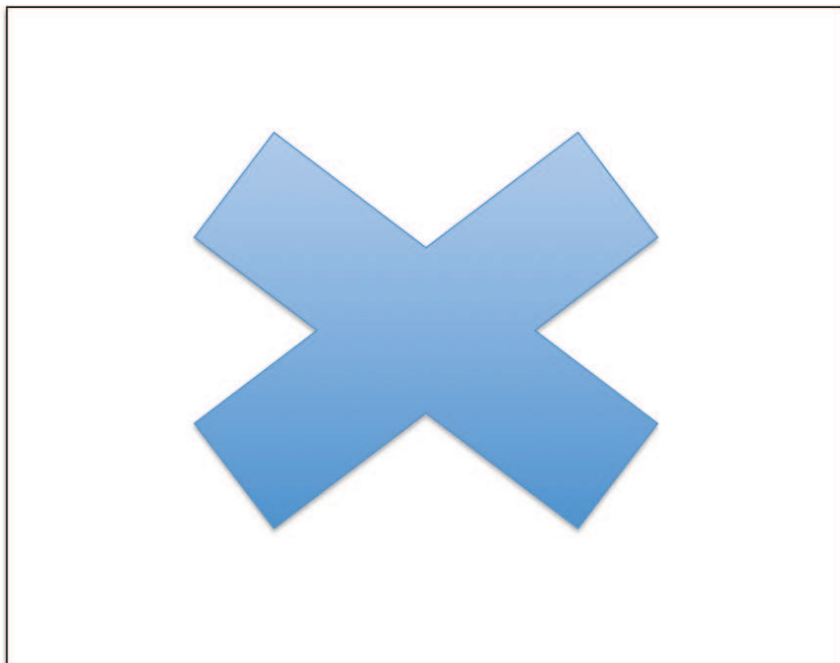
L'accumulation des protéines HIFs, induites soit par l'hypoxie soit par des voies oncogéniques aberrantes, permet la croissance et la progression tumorale en régulant l'expression de très nombreux gènes cibles impliqués dans la survie

cellulaire, l'adaptation métabolique à l'hypoxie, l'angiogenèse, la migration, l'invasion et la dissémination tumorale (Semenza, 2012, 2013).

### **Survie et prolifération cellulaire**

Les facteurs HIFs contribuent à la survie et la croissance cellulaire en hypoxie en activant de nombreux gènes codant des facteurs de croissance sécrétés permettant le maintien de boucles autocrines de survie au sein des tumeurs et leur indépendance envers les stimuli de l'environnement. On peut citer parmi ceux-ci : le TGF $\alpha$  (transforming growth factor), l'IGF2 (insulin-like growth factor-2), le VEGFA (vascular endothelial growth factor), l'EDN1 (endothelin-1), l'EPO (erythropoietine) dont certains sont plus spécifiques d'HIF-2 $\alpha$  comme le TGF $\alpha$  et l'EPO (Semenza, 2012).

### **Adaptation métabolique à l'hypoxie**



**Figure 37** : Effet Warburg médié par HIF-1

(D'après Pencreach, données personnelles non publiées)

HIF-1 contribue directement à deux effets majeurs de l'effet Warburg qui consiste en la déviation du métabolisme du glucose vers la glycolyse « anaérobie » aux dépens de la respiration mitochondriale.

- 1) HIF-1 induit l'expression des transporteurs du glucose (GLUT1 et GLUT3) et de la quasi totalité des enzymes de la voie glycolytique (ALDOA, ENO1, GAPDH, HK1, HK2, PFKL, PGK1, PKM2) y compris la LDHA (Lactate deshydrogenase) qui permet le renouvellement final du NAD<sup>+</sup>. La détection des métastases par le PET-FDG repose sur cette majoration de l'utilisation du glucose par les cellules tumorales (Gordan et al., 2007b).
- 2) HIF-1 induit l'expression de PDK1 (pyruvate deshydrogenase kinase-Isoenzyme 1) responsable de l'inhibition de la pyruvate deshydrogénase (PDH). La PDH permet la conversion du pyruvate en acetyl-CoA et constitue donc l'étape clé permettant la connexion du métabolisme glycolytique avec le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative (Simon, 2006b).

L'inhibition du métabolisme mitochondrial permet la diminution de la formation des ROS par une chaîne respiratoire défectueuse en contexte d'hypoxie et ainsi préserve l'équilibre redox de la cellule. L'inhibition concomitante de mTOR en hypoxie ainsi que l'induction de BNIP3 et / ou AMPK induisent par ailleurs l'autophagie. En particulier BNIP3 et BNIP3L cibles de HIF-1 $\alpha$  permettent la réduction du pool mitochondrial en favorisant l'autophagie sélective des mitochondries (ou mitophagie) (Bellot et al., 2009).

L'augmentation de la glycolyse permet la préservation de la production d'ATP et favorise un métabolisme anabolique permettant la synthèse des macromolécules nécessaires à la prolifération cellulaire, grâce à l'utilisation préférentielle par exemple de la voie non-oxydative des pentoses phosphates (via l'induction des transkétolases TKT et TKTL2) et qui permet la synthèse des nucléotides à partir d'intermédiaires de la glycolyse en situation d'hypoxie (Sun et al., 2010). Ainsi l'effet Warburg confère également un avantage aux cellules très prolifératives en situation de normoxie comme on peut le voir dans la plupart des lignées cellulaires cultivées *in vitro* dans des milieux riches en glucose.

Enfin, les lactates produits en excès par la LDHA lors de ce métabolisme glycolytique sont excrétés hors de la cellule tumorale par des transporteurs spécifiques tels que MCT4, également cible de HIF-1. Ce dernier induit aussi l'expression des transporteurs impliqués dans la régulation du pH cellulaire comme l'anhydrase carbonique IX. L'excrétion des lactates contribue à l'acidification du

milieu extra-cellulaire, elle-même favorisant l'invasion des cellules tumorales dans la MEC (Majmundar et al., 2010).

La glycolyse ne semble pas être régulée par HIF-2 (Raval et al., 2005). Cependant HIF-2 a d'autres effets métaboliques :

-De concert avec HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  module l'expression des isoformes de la cytochrome c oxydase afin de maximiser l'efficacité de la chaîne respiratoire mitochondriale lors de l'hypoxie et ainsi limiter la génération de ROS (Gordan et al., 2007b).

-HIF-2 $\alpha$  stimulerait l'expression de gènes codant des enzymes anti-oxydantes comme SOD2 ou HMOX1. Ainsi dans les cancers du rein, la perte de HIF-2 $\alpha$  est corrélée à une augmentation cellulaire des ROS, une activation de p53 et la mort cellulaire par apoptose avec un effet majoré après irradiation (Bertout et al., 2009).

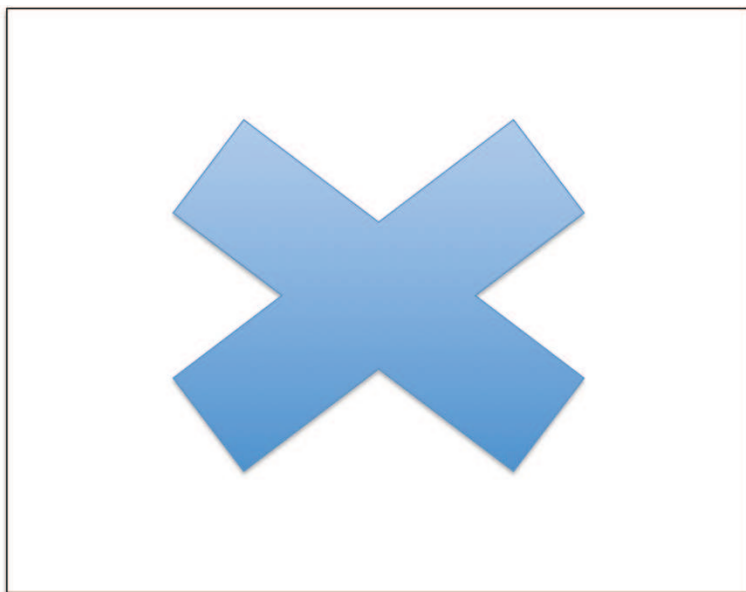
- L'hypoxie entraîne un switch du métabolisme lipidique en favorisant le stockage lipidique et en inhibant la  $\beta$ -oxydation des acides gras (Boström et al., 2006). HIF-2 $\alpha$ , plus que HIF-1 $\alpha$  serait responsable de ce switch (Rankin et al., 2009).

### **Angiogenèse et vasculogenèse**

L'angiogenèse est définie par l'émergence de nouvelles branches capillaires à partir de vaisseaux préexistants tandis que la vasculogenèse repose sur le recrutement de progéniteurs endothéliaux d'origine périphérique pour l'élaboration de nouveaux vaisseaux. Dans l'angiogenèse physiologique, les effets des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) sont finement contrebalancés par des facteurs anti-angiogéniques comme les thrombospondines. Or, au cours de l'angiogenèse tumorale, parallèlement à l'induction de facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGFA, l'hypoxie est responsable de l'accumulation de facteurs déstabilisant les tubes vasculaires, comme l'angiopoïétine 2/ANG2 (Carmeliet and Jain, 2011). Dans de nombreux modèles tumoraux, l'expression de HIF-1 est associée à une vascularisation tumorale importante et à un phénotype agressif tandis que la perte d'HIF-1 est associée à une croissance et une vascularisation tumorales diminuées (Lee et al., 2009). HIF-2 $\alpha$  est également impliqué dans cette régulation mais son rôle est encore peu connu (Majmundar et al., 2010).

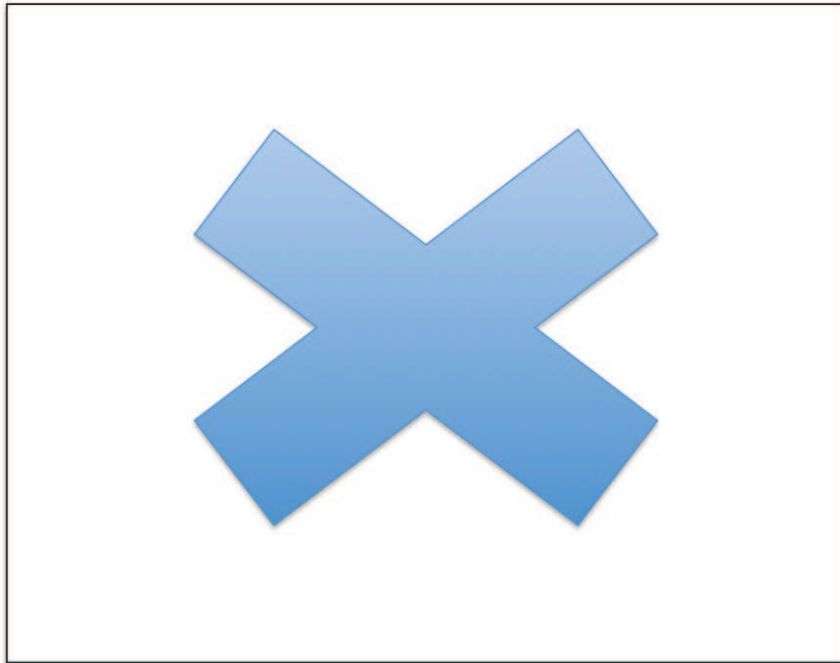
L'expression de l'ensemble des facteurs pro-angiogéniques est sous la dépendance de HIF-1 comme le VEGF mais aussi CXCL12 (aussi connu sous le nom de SDF1 ou stromal derived factor 1), l'angiopoïetine 1 et 2 (ANGPT1/2), le facteur de croissance placentaire (PIGF) et le PDGFB (platelet-derived growth factor B). Ces facteurs angiogéniques se lient ensuite à leurs récepteurs spécifiques à la surface des cellules endothéliales et des péricytes: VEGFR1/VEGFR2 pour VEGF, CXCR4 pour SDF1, TIE2 pour ANGPT1 et 2, VEGFR1 pour PIGF, PDGFR pour PDGFB et C-KIT pour SCF. La réponse angiogénique à l'hypoxie implique de multiples types cellulaires (tumoraux et non tumoraux) en une orchestration finement régulée dans le temps et dans l'espace. L'interaction ligand-récepteur de ces différents acteurs active ces différentes cellules et promeut l'angiogenèse tumorale c'est-à-dire l'émergence de nouveaux vaisseaux (Semenza, 2012).

Les facteurs angiogéniques sécrétés VEGF, SDF-1 et PLGF, permettent également une vasculogenèse à partir de la mobilisation et du recrutement à distance de progéniteurs pro-angiogéniques à partir de sites périphériques ou de la moelle osseuse pour former le pool des cellules angiogéniques circulantes (CACs). Celles-ci sont constituées de cellules progénitrices endothéliales (EPCs), de cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses (CSMs), et de cellules myéloïdes dérivées de la moelle osseuse (Semenza, 2013).



**Figure 38:** Rôle de HIF-1 dans la régulation de l'angiogenèse et de la vasculogenèse (Erwan Pencreach, données personnelles non publiées)





**Figure 39** : Rôle de HIF-1 dans la dissémination métastatique des tumeurs solides (Erwan Pencreach, données personnelles non publiées)

### **La dissémination tumorale**

Les facteurs HIFs et l'hypoxie contribuent à toutes les étapes de la dissémination métastatique dans les cancers solides. Les HIFs jouent un rôle crucial dans ce processus comme le confirme l'importance de l'accumulation de HIF-1 dans les tissus métastatiques et dans la génération de métastases dans de nombreux modèles pré-cliniques (De Bock et al., 2011; Semenza, 2013).

HIF-1 régule la migration dite mésenchymale en promouvant **la transition épithélio-mésenchymateuse (ou EMT)** des cellules tumorales à travers l'activation des gènes Twist-related protein 1 (*TWIST1*), Zinc finger protein Snai1/2 (*SNAIL*) et Zinc finger E-box-binding homeobox 1/2 (*ZEB1/2*), *ID2* et *TCF3*. Ces facteurs de transcription activent à leur tour de multiples gènes comme *TGF- $\beta$* , *HGF*, *MET*, *WNT*, *NOTCH* et *NF- $\kappa$ B*. Les cellules tumorales acquièrent ainsi un phénotype mésenchymateux invasif (typiquement traduit par l'expression de la N-cadhérine (cadherin-2) et de la vimentine) et perdent certaines caractéristiques épithéliales en cessant d'exprimer des molécules d'adhésion inter-cellulaire telle que la E-cadhérine (cadherin-1).

Les HIFs favorisent également l'invasion et la migration tumorale via l'induction de protéases :

- qui dégradent la matrice extra-cellulaire (MEC) comme les métalloprotéases (MMP-2, MMP-9) , l'urokinase plasminogen activator (uPAR/PLAUR), les cathepsines (CTSC), induites par HIF-1
- ou qui remodelent la MEC comme la protéine lysine 6-oxidase (LOX et ses variants LOXL2 et LOXL4) régulée par HIF-1 et/ou HIF-2.

Les  $\beta$ 1-intégrines, la protéase MTI-MMP et la glycoprotéine podoplanine, up-régulées par HIF-1 sont quant à elles impliquées dans la migration collective des cellules tumorales. HIF-1 induit également la sécrétion de **facteurs de motilité** cellulaire tels que MET et AMF et de médiateurs de l'angiogenèse déstabilisant la paroi vasculaire comme VEGF et ANGPT2. L'up-régulation de L1CAM et ANGPTL4 favorise l'extravasation des cellules tumorales aux sites métastatiques. Enfin Le **chimiotactisme** induit par les HIFs comme l'axe CXCR4/CXCL12 (SDF-1) favorise le ciblage non aléatoire des cellules tumorales vers les vaisseaux et/ou vers les sites métastatiques (Semenza, 2013).

### **Inflammation et échappement au système immunitaire**

La réponse au stress hypoxique est étroitement couplée à la réponse immunitaire via la voie NF-KB. Les HIFs et l'hypoxie induisent l'activation de NF-KB dans les cellules myéloïdes associées à l'inflammation (macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques) (Nizet and Johnson, 2009). Réciproquement, NF-KB stimule la transcription de HIF-1 $\alpha$  via une réponse cytokinique de type Th1 comme l'INF- $\gamma$  dans les macrophages (Rius et al., 2008). Des données conflictuelles ont été publiées en ce qui concerne HIF-2 $\alpha$ , puisque sa transcription semblerait plutôt indépendante de NF-KB et induite par des cytokines Th2-dépendantes comme IL-4 et IL-1 tandis que d'autres auteurs ont décrit une régulation dépendante de l'IFN- $\gamma$  et du LPS (lipopolysaccharide) (Majmundar et al., 2010; Poitz et al., 2014). L'inactivation de HIF-1 $\alpha$  comme HIF-2 $\alpha$  entraîne une altération des fonctions macrophagiques en réponse au LPS, cependant cette altération est médiée par une inhibition transcriptionnelle distincte (Fang et al., 2009).

L'infiltration par des macrophages associés aux tumeurs (TAMs) est associée dans de multiples cancers à un mauvais pronostic (Lewis and Pollard, 2006). Ces

macrophages sont recrutés dans la tumeur par la production de molécules chimio-attractantes (comme les cibles d'HIF, CSF1 et VEGF) par les cellules hypoxiques tumorales et stromales (Murdoch et al., 2004). Les TAMs peuvent également être attirés par la production de TGF- $\beta$  par les cellules en apoptose des zones hypoxiques (Herr et al., 2009). Les TAMs présentent des niveaux d'expression élevée de HIF-1 et HIF-2 et plusieurs études ont démontré le rôle pro-tumorigénique et angiogénique de l'expression de HIF-2 $\alpha$  dans les TAMs (Imtiyaz et al., 2010).

### **Immortalisation, maintien ou acquisition d'un phénotype « souche »**

Les cellules tumorales dites souches requièrent l'expression de facteurs de pluripotence tels que NANOG ou OCT4, de la télomérase (TERT), dont les gènes sont induits plus spécifiquement par HIF-2. Ce phénotype est souvent associé à un blocage de la sénescence via l'expression « HIF-1 dépendante » d'enzymes comme la glucosephosphate-isomérase (GPI) et de la phosphoglycérate mutase (PGM) qui sont aussi impliquées dans le métabolisme du glucose (Kondoh et al., 2007; Mathieu et al., 2011; Nishi et al., 2004).

### **Rôles tumorigéniques respectifs de HIF-1 et HIF-2**

HIF-2 $\alpha$  peut réguler l'expression de gènes importants dans l'**angiogénèse** (VEGF, EPO, angiopoïétine et récepteur TIE-2) (Gruber et al., 2007), le **processus métastatique** (E-Cadherine, LOX, TWIST) (Erler et al., 2006), la **différenciation** en activant sélectivement l'expression d'OCT4 (Covello et al., 2006) et la **prolifération** en activant spécifiquement l'expression de TGF $\alpha$ , la cycline D1 et MYC, en particulier dans les cancers du rein à cellules claires (Raval et al., 2005). Enfin, l'équipe de Franovic et al a montré récemment que la surexpression de l'EGFR semblait sélectivement induite par l'activation de HIF-2 $\alpha$  (Franovic et al., 2007). Cependant, HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  ont parfois des rôles pro-tumorigéniques différentiel comme dans les cellules souches ou dans certains cancers (ex : neuroblastomes, cancers du rein et bronchiques pour lesquels HIF-2 $\alpha$  et pas HIF-1 $\alpha$ , est un facteur de progression) (Simon and Keith, 2008). Ces réponses différentes pourraient être liées à une régulation indépendante de gènes cibles distincts ou à des interactions avec les

complexes protéiques régulés par des oncoprotéines et des gènes suppresseurs de tumeurs (Guérin et al., 2012).

#### **II.B.1.4.5 Rôles de l'hypoxie et des HIFs dans la progression des gliomes**

Dans les astrocytomes, la présence, au sein de la tumeur, de **nécrose** (témoignant d'une anoxie sévère) et d'une intense **prolifération microvasculaire** (témoignant d'une angiogenèse tumorale) signent le diagnostic histologique du glioblastome (grade IV) par rapport à l'astrocytome anaplasique (grade III) et l'astrocytome diffus (grade II) qui n'ont pas ces caractéristiques. De façon typique, la nécrose intra-tumorale des glioblastomes se présente microscopiquement sous la forme de petites zones de nécrose entourées par des cellules organisées en « **pseudo-palissade** » alors qu'en imagerie, la nécrose se présente sous la forme d'une vaste zone centrale très hétérogène. Dans la plupart des études, le degré de nécrose est corrélé à la survie des patients atteints de glioblastome (Flynn et al., 2008). Les glioblastomes font partie des tumeurs les plus vascularisées. En plus des aberrations morphologiques habituelles et de l'augmentation de la densité vasculaire, la prolifération microvasculaire se présente souvent sous la forme de **structures gloméruloïdes** épaissies typiques (Sharma et al., 2006). Une prolifération des péricytes peut accompagner ces structures (Takeuchi et al., 2010).

Enfin, les glioblastomes et les gliomes malins en général, ont la particularité de ne pas (ou exceptionnellement) métastaser en dehors du SNC. Ainsi leur pattern d'invasion ne comporte pas de dissémination hémato ou lymphophile mais consiste en une diffusion des cellules gliales malignes autour de la masse tumorale. Cette diffusion peut s'étendre loin dans le parenchyme cérébral, jusque dans l'hémisphère controlatéral. Le Docteur Scherer fut le premier à décrire, en 1938, les différents patterns d'invasion du glioblastome, grâce à l'analyse histo-morphologique post-mortem d'une centaine de patients (Scherer, 1938; Zagzag et al., 2008). Celui-ci a décrit **4 types de structures secondaires dites de Scherer** :

- la satellitose péri-neuronale
- la satellitose péri-vasculaire
- la dissémination le long des fibres nerveuses de la substance blanche
- la dissémination corticale sous-piale

Celui-ci a donc mis en évidence une diffusion tumorale préférentielle le long de structures préexistantes, en l'occurrence les neurones et les vaisseaux sanguins.

### **Rôle des facteurs HIFs et de l'hypoxie dans l'angiogenèse et la formation des pseudopalissades**

L'expression de HIF-1 $\alpha$  dans les gliomes de l'adulte a été corrélée avec un grade élevé, une forte densité vasculaire et un mauvais pronostic (Birner et al., 2001; Korkolopoulou et al., 2004; Zagzag et al., 2000). La plupart des facteurs angiogéniques régulés (directement ou indirectement) par HIF-1 $\alpha$  sont exprimés ou sécrétés par les glioblastomes et ont été corrélés à un moins bon pronostic: VEGFR2, ANG-1/2, PDGFB, bFGF, HGF, IL8, EPO, EDN1, ADM (adrenomedulline), PAI-1, TGF $\alpha$ , CXCL12, CXCR4 (Kaur et al., 2005; Norden et al., 2009). Les métalloprotéinases MMP1, 2 et 9 sont également induites dans les gliomes et impliquées dans leur progression (Wick et al., 2001).

Dans les glioblastomes, la protéine HIF-1 $\alpha$  est fortement accumulée à la périphérie des zones nécrotiques, au niveau des pseudo-palissades et est co-localisée avec l'expression de VEGF (Shweiki et al., 1992). L'importante sécrétion du VEGF entretenue par l'hypoxie dans les glioblastomes est en grande partie responsable de leur intense prolifération microvasculaire. La co-expression des protéines HIF-1 $\alpha$ , VEGF, GLUT-1 et CA-IX est associée aux gliomes de haut grade (Flynn et al., 2008; Jensen et al., 2006). Peu d'études ont été publiées concernant l'expression de HIF-2 dans les gliomes. Une étude suggère que la co-expression des mRNAs de *EPAS1* (HIF-2 $\alpha$ ), *IGFBP2* et *EGFR* serait corrélée à un grade plus élevé et à une moins bonne survie dans les astrocytomes (Scrideli et al., 2007).

Brat et Van Meier ont émis l'hypothèse que la formation des pseudo-palissades résultait de la formation d'un thrombus intra-vasculaire occlusif (suite à une apoptose endothéliale ou à des anomalies de la coagulation) générant de l'hypoxie autour du thrombus. Dans ce modèle l'hypoxie et HIF-1 $\alpha$  favorisent alors la migration des cellules en dehors de la zone d'hypoxie formant les pseudo-palissades tumorales alors que la zone centrale hypoxique devient nécrotique. L'hypoxie a donc joué donc un rôle majeur dans la progression et l'invasion des cellules glioblastomateuses (Brat et al., 2004; Rong et al., 2006).

## **Invasion : le rôle de l'axe CXCL12/CXCR4**

L'expression de HIF-1 est également observée au niveau du front d'invasion des glioblastomes (Zagzag et al., 2000). Dans les cellules de glioblastomes, HIF-1 $\alpha$  a été impliqué dans la migration et l'invasion cellulaire (Méndez et al., 2010).

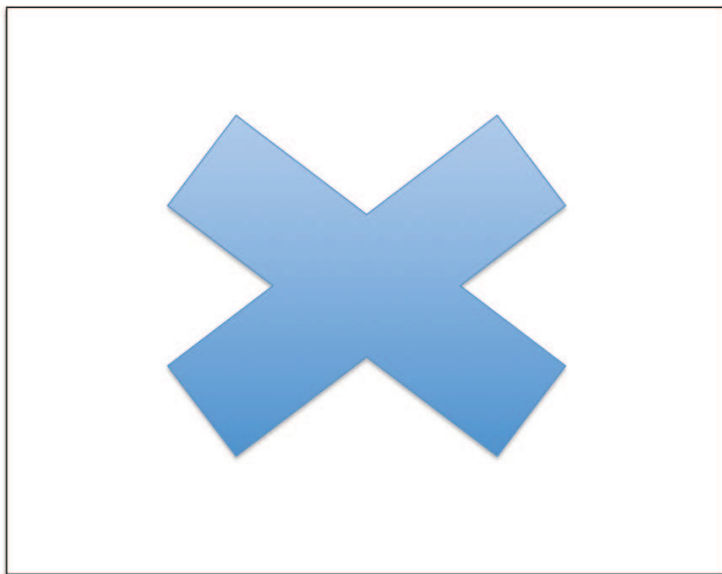
L'axe HIF-1/VEGF/CXCL12/CXCR4 a été particulièrement étudié dans les gliomes chez lesquels il a été impliqué dans la prolifération, l'angiogenèse, la migration et l'entretien ou l'acquisition d'un phénotype souche. SDF1/CXCL12 est la principale chimiokine décrite à avoir été impliquée dans la migration des cellules gliomateuses. Celle-ci est le ligand du récepteur membranaire CXCR4, fréquemment surexprimé dans les glioblastomes. Le taux d'expression de CXCR4 a pu être corrélé positivement au pouvoir infiltrant des glioblastomes ainsi qu'à la proportion de cellules à propriété souche (Zheng et al., 2011). Cette expression permettrait une chimio-attraction vers les zones cérébrales riches en CXCL12 et expliquerait la formation des pseudo-palissades et des structures secondaires de Scherer (Voir figure 40). Cet axe contribue de plus à la vasculogenèse tumorale en permettant le recrutement de cellules endothéliales progénitrices ou hématopoïétiques pour favoriser la formation des vaisseaux tumoraux (Zagzag et al., 2008).

## **Invasion VEGF-indépendante**

Le rôle de l'hypoxie dans l'initiation de l'angiogenèse a été élégamment exploré dès 1999 par Holash et ses collaborateurs en utilisant le modèle cellulaire de gliome C6 transplanté en orthotopique chez le rat (Holash et al., 1999). Dans ce modèle, les étapes précoces d'invasion et d'angiogenèse des gliomes, dépendent d'un mécanisme de cooption vasculaire, selon lequel les cellules tumorales disséminent et prolifèrent autour des vaisseaux préexistants et qui rappelle le pattern d'invasion péri-vasculaire observé par Scherer. Dans cette étude, cette première étape est associée à l'augmentation de l'expression de ANG2 alors que VEGF n'est pas encore exprimé. Une étape secondaire consiste en une régression des vaisseaux de base et la survenue d'une hypoxie et de la sécrétion du VEGF et à l'apparition d'une néo-angiogenèse. Les résistances aux thérapies anti-angiogéniques basées sur le ciblage de VEGF(R) viennent récemment de confirmer l'existence de tels patterns d'invasion périvasculaire qui surviennent sous traitement chez les patients (voir chapitre sur les résistances). Des modèles animaux ont

montré l'existence d'une cooption vasculaire sous anti-VEGF mais également lors du knocking de HIF-1 (Baker et al., 2014; Blouw et al., 2003). Il est cependant difficile de savoir comment intégrer ces mécanismes dans l'histoire naturelle du glioblastome et il est probable que plusieurs mécanismes d'invasion et de progression coexistent au sein de la tumeur.

Par ailleurs, d'autres voies ont été impliquées dans la migration comme la voie MET ou la voie des neuropilines induites par l'hypoxie qui favoriseraient la migration et l'invasion des cellules gliomateuses (Eckerich et al., 2007).



**Figure 40:** Les structures secondaires de Scherer et le rôle de l'axe CXCL12/CXCR4 (D'après Zagzag et al, 2008, Copyright © American Society for Investigative Pathology) CXCR4 est exprimé au niveau des cellules gliales au niveau du front d'invasion tandis que CXCL12/SDF1 $\alpha$  est exprimé au niveau des structures préexistantes (neurones, vaisseaux, régions sous-piales et fibres nerveuses). Ce gradient différentiel peut donc expliquer les structures secondaires de Scherer. Le VEGF sécrété par la tumeur à sa périphérie pourrait induire l'expression de SDF1 $\alpha$  dans les structures normales et ainsi contribuer à la chimio-attraction de l'axe CXCR4-SDF1 et ainsi à l'invasion tumorale.

### **Cellules « souche » tumorales et niche hypoxique**

Les cellules souches neurales normales sont distribuées dans certaines zones bien précises du cerveau adulte : la zone sous-granulaire (SGZ) au niveau du gyrus dentelé de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire (SVZ) au niveau des ventricules latéraux. Ces zones contribuent donc à la neurogenèse et la gliogenèse

post-natale de l'adulte et sont organisées en niches péri-vasculaires. Les cellules souches interagissent avec ce microenvironnement péri-vasculaire composé de cellules gliales, endothéliales, épendymaires, immunitaires et de la microglie et intègrent les différents signaux provenant de ces cellules, du flux sanguin et du liquide céphalo-rachidien (Vescovi et al., 2006).

Des niches similaires ont été mises en évidence dans les glioblastomes. En effet, les cellules endothéliales interagissent avec les cellules souches tumorales et jouent un rôle important dans le maintien de leur état indifférencié (Calabrese et al., 2007). Parmi les facteurs juxtacriniers sécrétés par les cellules endothéliales, le ligand de NOTCH, DLL4 (Delta-like ligand 4) serait particulièrement impliqué dans la maintenance des cellules souches tumorales (Gürsel et al., 2012; Zhu et al., 2011). Ces niches sont donc situées au contact des vaisseaux tumoraux. Or, cette localisation péri-vasculaire, ne signifie pas nécessairement que ces niches soient de fait normoxiques, étant donné le caractère en général non fonctionnel des vaisseaux tumoraux. De façon intéressante, il a été démontré que l'augmentation de l'oxygénation à des niveaux sub-physiologiques (20%) entraînait la différenciation *in vitro* de précurseurs neuronaux normaux alors que des niveaux physiologiques de 5% maintenaient leur caractère indifférencié (Pistollato et al., 2007). De la même façon, une exposition aiguë à 21% d'O<sub>2</sub> de cellules de glioblastomes CD133+ est associée à l'activation des voies pro-apoptotiques intra-cellulaires et une différenciation en cellules CD133- / GFAP+. Dans les glioblastomes, l'expression de HIF-1 a été corrélée à l'activation de la voie NOTCH et à la répression de la réponse aux BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), protéines responsables de la différenciation/apoptose des cellules souches neurales normales (Gustafsson et al., 2005; Pistollato et al., 2009a, 2009b). HIF-2 semble avoir un rôle majeur dans le maintien et la propagation des niches péri-vasculaire puisqu'il peut être stabilisé à des niveaux plus élevés d'O<sub>2</sub> et qu'il cible, comme on l'a vu les gènes de stemness comme OCT4 (Koh and Powis, 2012; Koh et al., 2011).

Au total, le glioblastome, à l'instar de sa qualification de multiforme par les premières observations purement anatomo-pathologiques, est donc une tumeur particulièrement hétérogène. Cette hétérogénéité est sous-tendue par des aberrations génétiques et épigénétiques complexes et la présence de niches de



cellules souches tumorales coexistant avec une masse de cellules plus prolifératives et différenciées, au sein d'un gradient d'hypoxie, lui-même déterminé par une perfusion hautement hétérogène et variable. Le glioblastome peut être modélisé comme une masse multi-couche au sein de laquelle un gradient d'hypoxie détermine la distribution des cellules souches (Pistollato et al., 2010). Au cœur de la tumeur siègent des cellules souches exprimant le CD133 et la Nestin, tandis que la périphérie de la tumeur, mieux perfusée est le siège de cellules plus différenciées coexistant avec de plus rares cellules souches. Piccirillo et al, ont décrit différents types de cellules souches caractérisés par des anomalies génétiques distinctes au sein de la même tumeur. Ces différents sous-types seraient sélectionnés par un microenvironnement hétérogène et donc soumis à une évolution génétique indépendante (Piccirillo et al., 2009). Les cellules de GBM issues des zones hypoxiques centrales sont également associées à une plus forte expression de NF- $\kappa$ B et des facteurs pro-inflammatoires par rapport aux zones plus périphériques (Tafari et al., 2011).

La niche hypoxique associée à l'expression de HIF jouerait également un rôle important dans la promotion de la migration et l'invasion des cellules gliales malignes dans le tissu cérébral sain périphérique, à travers l'expression de metalloprotéinases et de récepteurs impliqués dans la migration tels que CXCR4 (Coma et al., 2011). Grâce à ces propriétés, les cellules tumorales hypoxiques à propriété souches auraient donc la capacité de migrer du centre de la tumeur vers la périphérie et pourraient ainsi enrichir et coloniser les tissus sains normaux péri-tumoraux (Pistollato et al., 2010).

Dans les gliomes malins pédiatriques, aucune étude ne s'est attachée à caractériser l'expression intra-tumorale des facteurs HIFs. Certaines études ont cependant mis en évidence le rôle de l'hypoxie intra-tumorale dans la résistance aux traitements des gliomes de haut grade de l'enfant (Choi et al., 2014; Gaspar et al., 2010).

## **II.B.2 Hypoxie et résistance aux traitements**

### **II.B.2.1 Rôle de l'hypoxie dans la résistance à la radio- et la chimiothérapie**

Les mécanismes impliqués dans la résistance à la chimiothérapie d'une tumeur donnée, sont complexes et souvent multifactoriels. Ces mécanismes peuvent être liés à une résistance d'origine pharmacocinétique, à une résistance tumorale intrinsèque ou au microenvironnement tumoral (Gatti and Zunino, 2005). Parmi les mécanismes de résistance intrinsèque, on peut citer les altérations du transport et du métabolisme intra-cellulaire des molécules de chimiothérapie, l'augmentation de la réparation des dommages faits à l'ADN et la résistance à l'apoptose (Engelmann and Pützer, 2010). L'hypoxie intra-tumorale et la mauvaise perfusion sanguine qui lui est associée représentent les causes environnementales de radio et chimiorésistance les mieux décrits. En ce qui concerne la radiothérapie, la présence des molécules d'O<sub>2</sub> est même nécessaire à son action biologique en augmentant le pourcentage des lésions faites à l'ADN via la production de radicaux libres formés lors de l'interaction des radiations avec l'eau intracellulaire. En l'absence d'O<sub>2</sub>, des doses trois fois supérieures de radiothérapie sont nécessaires pour obtenir le même effet radio-toxique (Spence et al., 2008).

Le microenvironnement hypoxique tumoral est caractérisé, comme on l'a vu, par une acidose, une quantité limitée en nutriments et une augmentation de la pression du compartiment interstitiel (Jain, 2013). La présence d'hypoxie et d'une surexpression de HIF-1 $\alpha$  et/ou HIF-2 $\alpha$  a été associée à la progression tumorale, à une résistance aux traitements et à un mauvais pronostic dans une grande variété de cancers humains (Keith et al., 2012). L'adaptation nécessaire des cellules tumorales à ce microenvironnement constitue une pression majeure de sélection clonale conduisant à une progression vers un phénotype plus résistant et plus agressif (Vaupel, 2004). Cette pression sélective peut contribuer à l'émergence d'un phénotype de résistance à l'apoptose et d'instabilité génomique par perte de la sensibilité à l'apoptose p53-médiée ou par l'acquisition d'une déficience du système MMR (Bertout et al., 2008; Kondo et al., 2001).

### II.B.2.1.1 Distribution et efflux des chimiothérapies systémiques

L'altération de la perfusion et l'augmentation de la pression interstitielle limitent en premier lieu la bonne diffusion de la chimiothérapie au sein de la masse tumorale et particulièrement dans les zones hypoxiques (Zlotecki et al., 1995). Mais les cellules tumorales et endothéliales sont aussi capables de refluer hors de la cellule ou du compartiment tissulaire, diverses macromolécules grâce à des transporteurs membranaires. La barrière hémato-encéphalique en est particulièrement pourvue. HIF-1 $\alpha$  est capable d'activer deux gènes de la famille des **transporteurs ABC** (ATP-binding cassette) : a) **MDR1** (multidrug resistance-1) qui code pour la protéine P-gp (P-glycoprotein) impliquée dans l'efflux d'un grand nombre de chimiothérapies comme les vinca-alkaloides et les anthracyclines (Comerford et al., 2002) b) **MRP1** (multidrug-resistance-associated protein), impliqué notamment dans la résistance à l'irinotecan et à l'étoposide (Chen et al., 2009a; Liu et al., 2008; Zhu et al., 2005).

### II.B.2.1.2 Modifications du cycle cellulaire et réparation de l'ADN

L'hypoxie et HIF-1 $\alpha$  via leurs effets sur mTOR et MYC (cf chapitre précédent) peuvent réduire le nombre des cellules en division en entraînant un arrêt du cycle cellulaire et ainsi réduire l'efficacité des chimiothérapies phase-S dépendantes (Maddika et al., 2007). Par ailleurs, un arrêt prolongé du cycle cellulaire, s'il ne conduit pas à la mort cellulaire par apoptose, peut induire la mort cellulaire par senescence. La cytotoxicité d'un grand nombre de chimiothérapies repose en partie sur ce mécanisme médié par la voie de signalisation des dommages faits à l'ADN (DNA-damage response ou DDR). Le DDR est un point de contrôle crucial qui permet la signalisation des cassures de l'ADN induites par les agents cytotoxiques ou les ROS et qui peut-être « by-passé » ou activé selon que l'hypoxie est chronique ou aiguë (d' Adda di Fagagna, 2008; Bristow and Hill, 2008). Plusieurs équipes ont montré que l'expression de HIF-1 $\alpha$  en normoxie ou en hypoxie était capable de supprimer la senescence induite par certaines chimiothérapies dans divers modèles cellulaires de cancers (Sullivan et al., 2008).

L'hypoxie intra-tumorale est associée à une augmentation de l'instabilité génétique des tumeurs, avec une augmentation du taux de mutations et du nombre de cassures sur les brins de l'ADN. Globalement l'hypoxie chronique inhibe la plupart des enzymes **a)** du système de réparation par recombinaison homologue impliqué

dans la réparation des cassures ADN double brin, **b)** du système de réparation par excision des bases (ou BER pour Base excision repair) et **c)** du système de réparation des mésappariements post-réplicatifs (système MMR pour mismatch repair). Cette inhibition est à la fois transcriptionnelle et traductionnelle et ne dépend pas de HIF, sauf pour les enzymes du système MMR et pour NBS1 (la nibrine qui fait partie du système de reconnaissance des cassures double brin de l'ADN) qui sont des cibles de MYC, lui-même inhibé par HIF-1 $\alpha$  et pas par HIF-2 $\alpha$ . La déficience du système MMR représente de plus un mécanisme de résistance secondaire au temozolomide dans les glioblastomes.

A l'opposé, l'hypoxie aiguë entraînerait une activation de la signalisation DDR et une activation du système de réparation non homologue par jonction terminale (NHEJ pour non homologous end joining) qui est un autre système impliqué dans la réparation des cassures double brin de l'ADN. L'hypoxie aiguë contribuerait donc plutôt à une radio et chimio-résistance alors que l'hypoxie chronique permettrait l'augmentation virtuelle de la chimio ou radio-sensibilité et serait le creuset de l'instabilité génétique et de la pression clonale vers l'acquisition d'un phénotype plus résistant (Bristow and Hill, 2008).

### **II.B.2.1.3 Hypoxie et résistance à l'apoptose :**

Le stress hypoxique s'accompagne d'une modification de l'équilibre de synthèse entre les facteurs pro- et anti-apoptotiques médiée par HIF-1. Cependant HIF-1 peut activer à la fois des facteurs pro-apoptotiques (ex : BNIP3, NIX and NOXA) comme des facteurs anti-apoptotiques (ex : Bak, Bax, Bcl-xL, Bcl-2, Bid, Mcl-1, NF-KB et la survivin) (Chen et al., 2009b). L'équilibre de ces facteurs qui déterminent le destin cellulaire face à un stress, dépend des altérations génétiques acquises par la tumeur mais aussi de la durée de ce stress et de la capacité de la cellule à résoudre ce stress. Cependant, dans la majorité des cellules tumorales, HIF-1 fonctionne comme un robuste suppresseur de l'apoptose et la perte de sa fonction augmente la cytotoxicité par apoptose d'un certain nombre de chimiothérapies (Flamant et al., 2010; Hao et al., 2008; Sermeus et al., 2008).

### **Interconnexions HIFs-p53:**

Amato Giaccia et ses collaborateurs, ont été les premiers à montrer que les cellules tumorales déficientes en p53 étaient capables de résister à l'apoptose induite par l'hypoxie, suggérant ainsi que la perte de ce gène suppresseur de tumeur était un facteur de progression tumorale liée à l'hypoxie (Graeber et al., 1996). Les HIFs peuvent avoir un rôle opposé sur la stabilisation de p53. HIF-1 $\alpha$  favorise la stabilisation et l'accumulation de p53 en interagissant avec MDM2 et en interférant donc avec sa dégradation par le protéasome, y compris en présence d'une surexpression de MDM2 (Chen et al., 2003). Cependant, le rôle de HIF-1 $\alpha$  sur la stabilisation de p53 fait l'objet de résultats très contradictoires dans le contexte de cellules tumorales traitées par radiothérapie ou chimiothérapie. L'inactivation fonctionnelle de HIF-1 $\alpha$  peut sensibiliser des cellules traitées par cisplatine ou 5-FU en hypoxie via la production de ROS et une stabilisation de p53 suivie d'apoptose (Hao et al., 2008). De façon intéressante, cette sensibilisation est abrogée en cas de mutation de *TP53* et dépend donc d'une voie p53 intacte. Rohwer et al., 2010 ont montré que la stabilisation d'HIF-1 $\alpha$  dans des cellules de cancer gastrique traitées par 5-FU en normoxie était associée à une suppression de la production de ROS, une déstabilisation de p53 et une résistance à l'apoptose (Rohwer et al., 2010). A l'inverse, d'autres ont montré que l'activation de HIF-1 $\alpha$  suivant une irradiation était liée à une augmentation des ROS et était associée à une augmentation de la stabilité de p53 suivie d'une apoptose p53-médiée (Moeller et al., 2005). Ces observations soulignent donc la complexité et l'importance des ROS et de leur régulation par HIF-1 $\alpha$  dans la stabilisation de p53, qui dépend du statut mutationnel du gène et du niveau de ROS intracellulaires.

Quant à HIF-2 $\alpha$ , celui-ci n'est pas capable d'interagir avec MDM2 et au contraire inhibe p53 par de multiples mécanismes (notamment la suppression de l'accumulation des ROS via l'induction d'enzymes anti-oxydantes ou l'activation d'AKT). L'expression de HIF-2 $\alpha$  dans les modèles de cancer rénal à cellules claires est associée à la suppression de l'apoptose induite par p53 après irradiation (Bertout et al., 2009; Keith et al., 2012).

#### **II.B.2.1.4 L'hypoxie cyclique, les ROS et l'autophagie**

Les mitochondries en plus de leur rôle central dans le métabolisme oxydatif, sont aussi les effecteurs de la voie apoptotique intrinsèque et régulent d'autres mécanismes de mort cellulaire comme la nécrose programmée (Galluzzi and Kroemer, 2008). Les mitochondries représentent aussi une source majeure de ROS, produits notamment lors du stress hypoxique. Ces ROS peuvent entraîner la mort cellulaire si les capacités de détoxification de la cellule sont dépassées. En outre, la cytotoxicité de certaines chimiothérapies et de la radiothérapie repose sur la génération de ces ROS, capables d'induire la mort cellulaire même quand les voies de l'apoptose sont altérées (Fruehauf and Meyskens, 2007). HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  sont stabilisés par les ROS et ont des rôles majeurs dans leur détoxification ainsi que dans la limitation du métabolisme et du pool mitochondrial en hypoxie (Zhang et al., 2008).

Une ré-oxygénation est fréquemment observée après un traitement par radiothérapie ou par certaines chimiothérapies (Dewhirst et al., 2008). Cette ré-oxygénation est liée à une normalisation de la vascularisation tumorale et la diminution de la consommation en oxygène en raison de la réduction de la masse cellulaire tumorale. Cette ré-oxygénation s'accompagne paradoxalement d'une activation prononcée de HIF-1 $\alpha$ , stabilisé par des ROS produits massivement après reperfusion, de façon comparable aux ischémie-reperfusions dans les modèles cardiovasculaires. La stabilisation de HIF-1 $\alpha$  a été corrélée à une apoptose p53-induite dans les cellules tumorales et à une radioprotection au niveau des cellules endothéliales (Moeller et al., 2005). L'expression de HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  a été plutôt associée à un phénotype de radio-résistance et l'inhibition fonctionnelle de HIF-1 $\alpha$  après radiothérapie par des siRNA ou des inhibiteurs pharmacologiques a conduit dans la majorité des modèles de xénogreffes à une diminution transitoire de la croissance tumorale (Rohwer and Cramer, 2011). L'effet différentiel de la radiothérapie sur les différentes structures tumorales et le statut de HIF-1 $\alpha$  et de p53 au sein de la tumeur déterminent de façon complexe l'efficacité finale de la radiothérapie. Etant donné l'effet transitoire de la radiothérapie dans les glioblastomes, il est probable que cette activation des facteurs HIFs et notamment de HIF-2 puisse faire le lit d'une résistance secondaire.

Parallèlement, l'importance du caractère cyclique de l'hypoxie alternant hypoxie

et réoxygénation a été mise en évidence *in vivo* et également associée à une stabilisation soutenue de HIF-1 causée par une production de ROS accrue (Dewhirst et al., 2008). Cette génération de ROS a été reliée à l'activité de la NADPH oxydase, qui de surcroît entraîne une surexpression de mTOR (Hsieh et al., 2010, 2012). Impliquée dans la régulation des ROS à travers une réduction du pool mitochondrial, la mitophagie induite notamment par *BNIP3*, cible de HIF-1, contribue à la tolérance de l'hypoxie cyclique. L'autophagie induite par l'hypoxie permet l'élimination des organelles déficientes et des agrégats protéiques induits par les ROS (Koritzinsky and Wouters, 2013). HIF-2 $\alpha$  a quant à lui un rôle majeur dans la détoxification et l'élimination des ROS, en activant les voies anti-oxydantes tandis que l'UPR régule les voies du glutathion. L'autophagie et les voies de détoxification des ROS sont donc des voies importantes de survie cellulaire et contribuent à la chimio et à la radiorésistance en hypoxie. Cependant, une activation excessive de l'autophagie fait toutefois partie des mécanismes de mort cellulaire induits par la radiothérapie et les agents cytotoxiques si bien que le débat autour de son ciblage potentiel est toujours d'actualité.

#### **II.B.2.1.5 Résistance liée au maintien de la niche hypoxique et des cellules dites souches**

Les cellules dites souches gliomateuses sont associées à une chimio et radio-résistance et sont probablement à la source des rechutes gliomateuses après traitement. Les phénotypes tumoraux les plus agressifs ou résistants sont en général associés à la présence de ces cellules souches. Ces cellules présentent notamment plus d'ABC transporteurs à leur surface, des capacités anti-oxydatives et de réparation de l'ADN supérieures, des mécanismes de survie activés via l'autophagie et les voies de signalisation développementales (NOTCH, Wnt...) et l'ensemble de ces propriétés sont promues par la niche hypoxique (Cojoc et al., 2014).

Les cellules de GBM maintenues en hypoxie expriment des marqueurs de cellules souche et sont résistantes au TMZ. L'expression de HIF-1 dans les couches profondes hypoxiques des GBMs a été corrélée à l'expression de MGMT et à celle des marqueurs de cellules souche (Bar et al., 2010; Pistollato et al., 2010). Alors que certaines études ont montré que le TMZ induisait la sélection d'une « side

population » dans les lignées adhérentes (Chua et al., 2008), d'autres ont montré que le TMZ pouvait dépléter les neurosphères MGMT- (expression) mais pas les neurosphères MGMT + à des doses applicables à la clinique (Beier et al., 2008). Cette sensibilité semble donc principalement dépendante de *MGMT* qui semble sur-exprimé en hypoxie et dans les cellules souche tumorales.

Les gliomes de haut grade rechutent le plus souvent de façon locale, à partir de la périphérie directe de la cavité d'exérèse avec un délai plus ou moins rapide. L'implication de ces cellules souches dans les rechutes après exérèse qui semblent situées dans les zones hypoxiques et centrales de la tumeur est donc controversée (Glas et al., 2010).

Par ailleurs, outre les capacités intrinsèques de résistance à la chimio/radiothérapie, les modifications du microenvironnement tumoral induits par les traitements, en particulier sur la vascularisation, pourraient expliquer les rechutes rapides généralement observées, comme après la réoxygénation post-radiothérapie ou lors des traitements anti-angiogéniques.

### **II.B.2.2 Normalisation vasculaire et échappement aux traitements anti-angiogéniques**

Les thérapies anti-angiogéniques ont été initialement développées pour dépriver les tumeurs et leurs métastases de leur alimentation sanguine en bloquant l'angiogenèse. Cependant cette stratégie s'est révélée inefficace, du moins en monothérapie et aux doses usuelles, comme le montrent la plupart des essais cliniques avec une amélioration limitée de la survie sans progression et une absence d'effet sur la survie globale (Ebos and Kerbel, 2011).

La théorie avancée pour expliquer ce paradoxe est celle de la normalisation vasculaire transitoire en réponse aux thérapies anti-angiogéniques. Autrement dit, les thérapies anti-angiogéniques, permettraient une normalisation de la structure et de la fonction des vaisseaux tumoraux et ainsi la diminution de l'hypoxie, une meilleure délivrance intra-tumorale de la chimiothérapie cytotoxique et une levée de l'immunosuppression locale. Cette normalisation, via une rééquilibration de la balance des facteurs pro et antiangiogéniques, permettrait un remodelage des



vaisseaux tout en éliminant les vaisseaux anormaux. Cependant, cette fenêtre de normalisation vasculaire serait rapidement suivie d'une phase de destruction vasculaire associée à un accroissement de l'hypoxie intra-tumorale conduisant à un échappement rapide au traitement. Ces effets délétères pourraient être liés aux doses administrées (Jain, 2013).

Ainsi les thérapies anti-angiogéniques peuvent être associées à une normalisation du microenvironnement dans une fenêtre précise de dose et de temps déterminée par la rééquilibration obtenue sur les facteurs pro et anti-angiogéniques. A côté de ces effets différentiels liés à la dose utilisée, les tumeurs peuvent également échapper aux thérapies anti-angiogéniques utilisées en monothérapie par le biais de voies alternes de l'angiogenèse, en sécrétant d'autres facteurs anti-angiogéniques ou en utilisant d'autres mécanismes de vascularisation tumorale indépendant de l'angiogenèse « classique » et du VEGF. Parmi ces mécanismes, on peut citer :

- la différenciation de cellules souches tumorales en cellules endothéliales porteuses d'anomalies génomiques identiques

- le recrutement de cellules myéloïdes angio-compétentes et l'activation de fibroblastes associés au cancer

- le recouvrement de l'enveloppe externe des vaisseaux par un mur épais de péricytes activés

- l'intussusception par subdivision des vaisseaux existants, permettant une extension et un remodelage vasculaire très rapide, sans prolifération des cellules endothéliales

Ces mécanismes dans les glioblastomes incluent en particulier la cooption vasculaire et la transdifférenciation des cellules souche en cellules endothéliales et peuvent être associés à l'expression de MET, ANG2 ou SDF1 (Takano, 2012).

La normalisation vasculaire a pu être observée dans un premier temps dans des modèles animaux puis dans de nombreux essais incluant des thérapies anti-angiogéniques directes ou indirectes (y compris la chimiothérapie métronomique), montrant des bénéfices en association avec la radiothérapie, différentes chimiothérapies ou immunothérapies. Chez des patients atteints de glioblastome et traités par du cediranib (inhibiteur pan-VEGFR) sans ou avec radiochimiothérapie, cette normalisation s'est traduite par une amélioration soutenue (pendant 1 à 4 mois

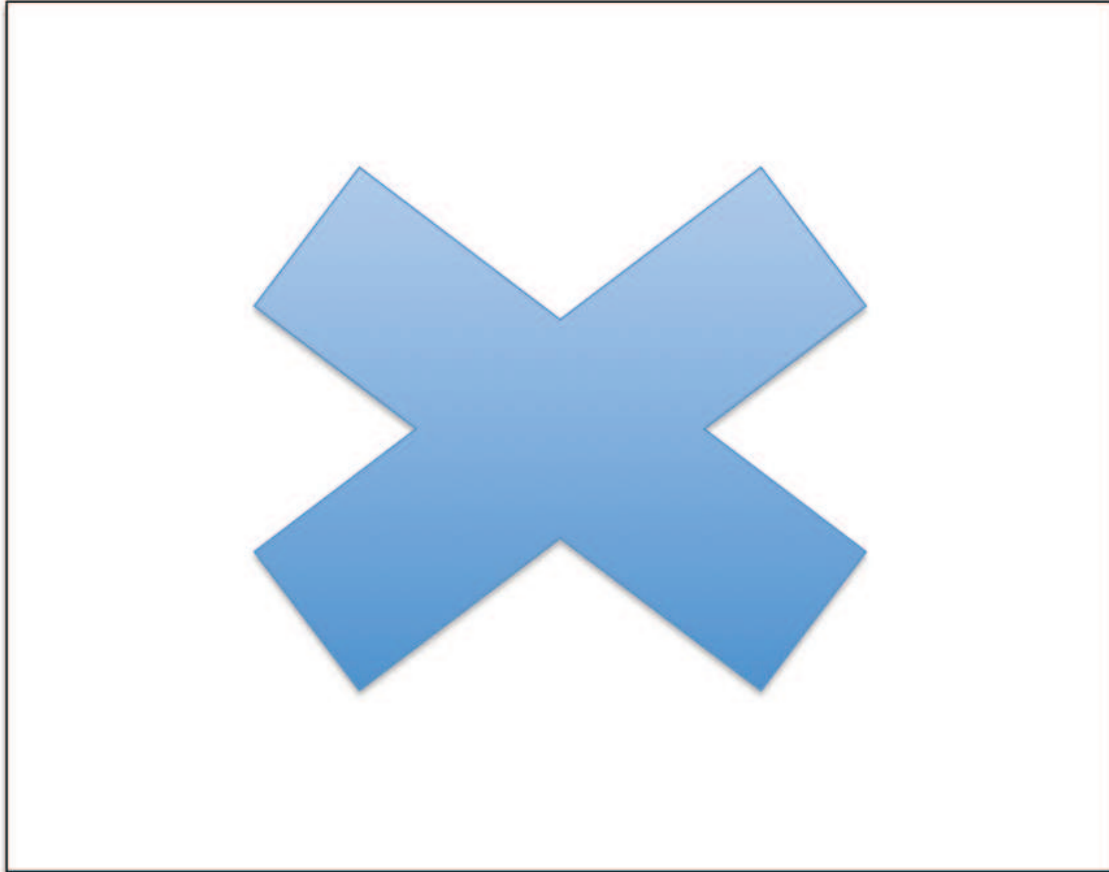
selon les patients) de la perfusion tumorale, une disparition de l'œdème péri-lésionnel et une restauration de la structure des faisceaux de substance blanche sous-corticale. De façon intéressante, seuls les patients présentant une amélioration de la perfusion intra-tumorale ont bénéficié d'une meilleure survie (survie globale prolongée de 6 à 9 mois) alors que les patients ne présentant pas cette amélioration de la perfusion tumorale n'ont présenté aucune amélioration de la survie globale (Batchelor et al., 2007, 2013).

A côté de la réponse en termes de perfusion détectable en imagerie (Emblem et al., 2013), deux principaux biomarqueurs moléculaires prédictifs ont pu être mis en évidence :

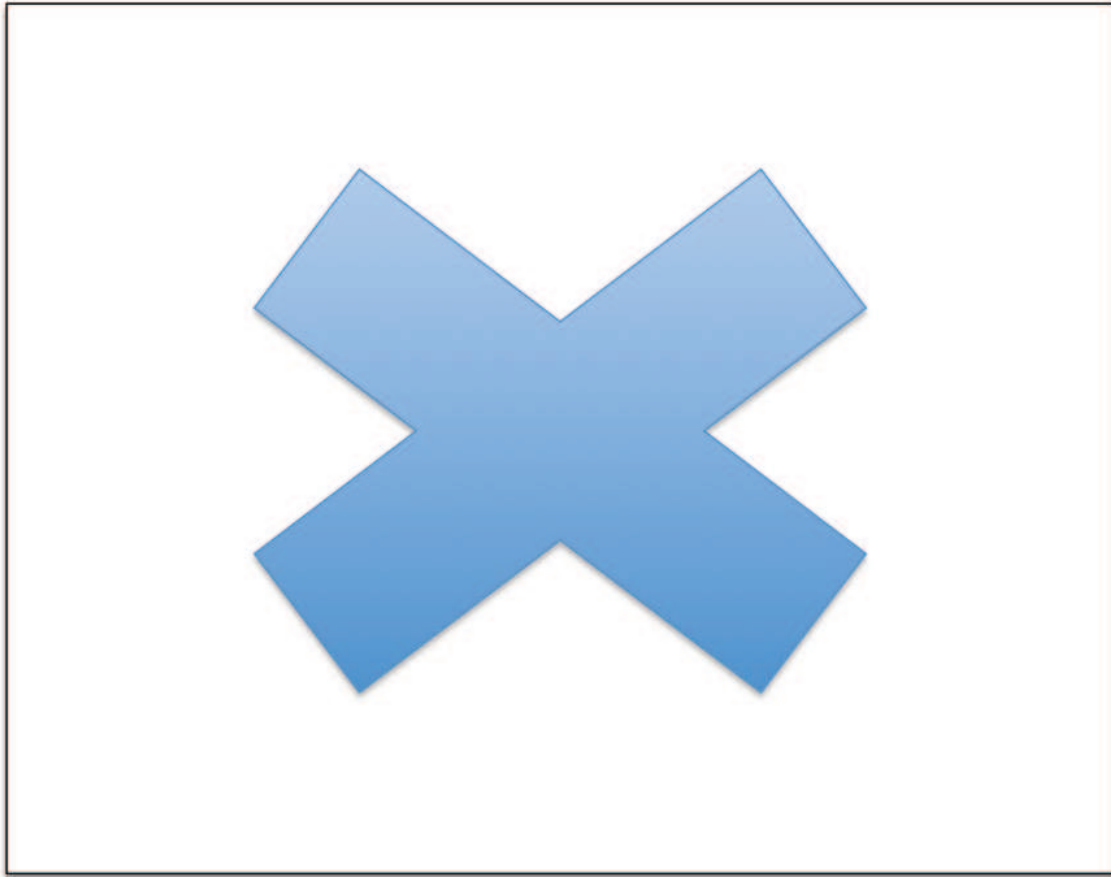
- L'élévation pré-traitement du taux de sVEGFR1 plasmatique est un facteur intrinsèque de mauvaise réponse à un traitement par bevacizumab, comme l'ont montré de nombreux essais cliniques réalisés sur différents cancers. Cette sur-expression serait corrélée à certains polymorphismes du gène de *VEGFR1* (Batchelor et al., 2013; Lambrechts et al., 2012).
- L'élévation du taux circulant de SDF1/CXCL12 chez des patients présentant un échappement au traitement, souligne l'importance de l'axe SDF1/CXCR4 dans les mécanismes de résistance secondaire (Duda et al., 2011).

Soutenant cette théorie, les grands essais randomisés de phase II/III incluant du bevacizumab en association avec de la radiochimiothérapie (AVAglio, RTOG avec le temozolomide ou GLARIUS avec l'irinotecan) dans les glioblastomes nouvellement diagnostiqués ont montré, pour la plupart, un bénéfice en termes de survie sans progression mais pas de bénéfice en termes de survie globale (Weller and Wick, 2014). Le même différentiel a été montré dans d'autres cancers (cancers du sein...). Ainsi la dose utilisée de bevacizumab (souvent >15mg/kg dans la plupart de ces études) pourrait être incriminée dans la survenue d'une résistance promue par l'hypoxie avec l'émergence secondaire d'un phénotype particulièrement agressif à la rechute comme cela a été montré dans des modèles murins dans lesquels de fortes doses de bevacizumab ont été associées à une augmentation de l'invasion et des métastases (Jain, 2013). De la même façon, des progressions rapidement fatales, sous forme de diffusion des cellules tumorales le long des fibres nerveuses et des vaisseaux ou de lésions microsatellitaires invasives, survenant après une période transitoire de

stabilisation ou de réponse ont été mises en évidence chez certains patients atteints de glioblastome traités par bevacizumab ou cediranib (Gerstner et al., 2010; Norden et al., 2009).



**Figure 41:** Fenêtre de normalisation vasculaire  
(D'après Jain et al., 2013)



**Figure 42** : Progression chez un patient traité par bevacizumab

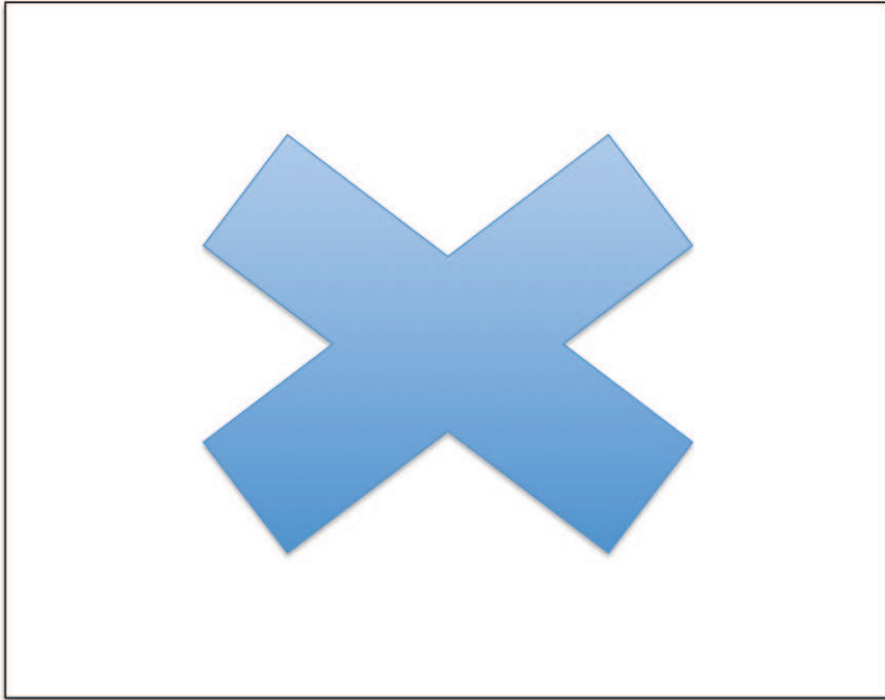
Non accompagnée de prise de contraste à l'IRM

(D'après Nordan et al., 2009)

a, b : T1 injecté et c, d : FLAIR

a, c : avant traitement ; b, d : 4 mois après le début du traitement

(



**Figure 43:** Les 6 mécanismes impliqués dans la vascularisation tumorale et la résistance aux anti-VEGF(R)  
(Jain and Carmeliet, 2012)

### **II.B.2.3 Intérêt du ciblage des facteurs HIFs**

L'ensemble de ces données montre l'intérêt potentiel du ciblage de HIF-1 $\alpha$  dans le traitement des gliomes de haut grade de l'adulte comme de l'enfant. En effet une inhibition de HIF-1 $\alpha$  présente l'avantage de bloquer de façon étendue les processus d'angiogenèse ainsi que le métabolisme tumoral, ce que ne peut pas réaliser la simple inhibition de VEGF. Une inhibition de HIF-2 $\alpha$  aurait de plus l'avantage d'affecter la survie des niches hypoxiques.

Plusieurs molécules ont été développées pour inhiber pharmacologiquement HIF-1 $\alpha$  ou les facteurs HIFs (Wilson and Hay, 2011). D'autres médicaments sont des inhibiteurs plus ou moins directs d'HIF-1 $\alpha$  comme les anti-topoisomerase I dérivés des camptothécines (ex irinotecan ou topotecan) ou les inhibiteurs de mTORC1 comme les rapalogs (ex : rapamycine), deux thérapies que nous avons choisi d'utiliser dans ce travail en vue d'inhiber HIF-1 $\alpha$ .

### **II.B.2.3.1 L'irinotecan :**

L'irinotecan, et plus largement les dérivés de la camptothécine, sont des inhibiteurs de la topoisomérase I (TOP1). La camptothécine a été identifiée comme agent anti-cancéreux au début des années 70 et rapidement abandonnée en raison de ses effets secondaires (Wall and Wani, 1995). Ce n'est qu'en 1985 que la cible cellulaire de la camptothécine, la TOP1, a été mise en évidence par les travaux de Hsiang (Hsiang et al., 1985). A partir de là, des dérivés hydrosolubles ont été développés, le topotecan et l'irinotecan, et ont montré leur efficacité en clinique ainsi qu'une toxicité moindre en comparaison avec la camptothécine. L'irinotecan est l'une des premières molécules à avoir montré une efficacité dans les cancers colorectaux métastatiques. Il a de plus été testé dans les premiers modèles développés de xénogreffes de tumeurs cérébrales pédiatriques et a été utilisé en association avec le bevacizumab pour le traitement des glioblastomes (Vassal et al., 1997; Wick et al., 2014).

On considère que la présence d'au moins deux topoisomérases fonctionnelles, l'une générant des coupures transitoires simple brin (type I) et l'autre double brin (type II) est nécessaire à la survie cellulaire. Chez l'homme, sept gènes codant pour des topoisomérases ont été isolés à ce jour : quatre codent pour des enzymes de type I et trois pour des enzymes de type II. La famille des topoisomérases de type I regroupe des protéines générant des coupures simple-brin de l'ADN, comme la TOP1 (Leppard and Champoux, 2005). La TOP1 est une enzyme du groupe IB formant une liaison de type 3'-phospho-tyrosyl avec l'ADN nucléaire, c'est la cible des dérivés de la camptothécine (Champoux, 2000).

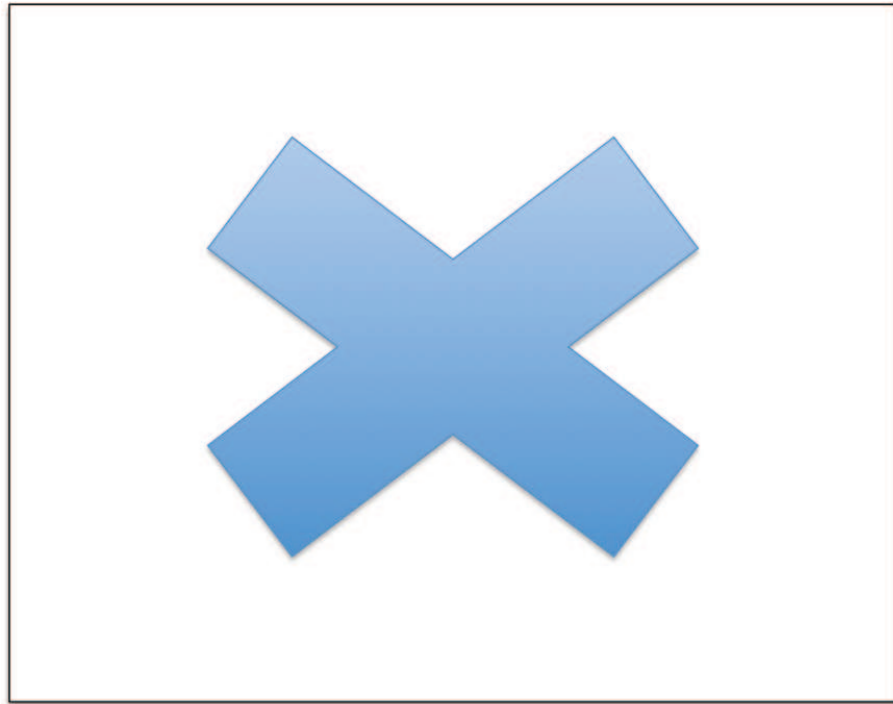
La capacité de la TOP1 à générer une lésion simple brin de l'ADN en se fixant de façon covalente par attaque nucléophile de l'ADN assure une fonction essentielle de la cellule : la relaxation de l'ADN super-enroulé. L'ADN est en effet extrêmement compacté en formant des boucles (forme I) et la séparation des deux brins de l'ADN en particulier au moment de la réplication, de la transcription, de la recombinaison et de la réparation, génère des contraintes supplémentaires qui conduisent à la formation de supertours positifs en amont de la fourche de réplication et négatifs en aval. La TOP1 assure une relaxation transitoire de ces super-enroulements positifs et négatifs permettant la progression de la fourche et assure ainsi un rôle majeur de régulation de la topologie de l'ADN en association avec les complexes de réplication

ou de transcription (Pommier, 2006). Cette fonction est assurée sans apport énergétique (ATP). Après relaxation de l'ADN, la TOP1 assure la religation du brin libre, donc la « réparation » de la lésion simple brin générée. La formation de complexes de clivage covalents ADN-TOP1 est ainsi transitoire en condition physiologique.

La toxicité cellulaire des dérivés de la camptothécine résulte d'une stabilisation des complexes de clivage dans un premier temps par collision entre la TOP1 liée à l'ADN et les complexes protéiques de la réplication ou de la transcription. Cette collision empêche l'alignement du résidu 5'OH de l'extrémité libre du DNA avec le résidu tyrosyl-phosphodiester du complexe de clivage : la religation est inhibée et l'extrémité 5'OH libre forme une lésion simple brin stabilisée. Cette accumulation de complexes de clivages non résolus a deux types de conséquences :

-la formation de lésions double brins (DSBs, double-strand breaks) de l'ADN après collision avec la fourche de réplication dans les cellules en division. L'accumulation de DSBs active des mécanismes de réparation de l'ADN avec arrêt du cycle cellulaire ou peut conduire à l'apoptose en particulier via l'activation de la protéine p53 qui induit l'apoptose cellulaire. L'un des marqueurs de cette accumulation de DSBs est la phosphorylation de l'histone H2AX ( $\gamma$ H2AX) (Furuta et al., 2003).

-l'absence de relaxation de l'ADN et l'inhibition de l'activité TOP1 induisent une inhibition des mécanismes de transcription, en particulier l'étape d'élongation ainsi qu'une inhibition de la formation des ribosomes et, secondairement, de la traduction. Ces effets sont gène-dépendant et pourraient expliquer pourquoi les dérivés de la camptothécine comme l'irinotécan ont globalement un effet inhibiteur sur l'expression de nombreux gènes. L'effet inhibiteur spécifique de l'irinotécan sur la transcription de *HIF1A* serait du, entre autre, à la dérégulation de la transcription au locus de *HIF1A* conduisant à l'activation de transcrits antisens. (Bertozi et al., 2014; Capranico et al., 2010; Marinello et al., 2013).



**Figure 44** : Rôle de la TOP1 pendant la transcription.

La TOP1 résout les torsions de l'hélice de l'ADN générées par la progression de l'ARN polymérase II. L'inhibition par l'irinotécan de l'activité de TOP1, conduit à la formation d'une SSB et à l'accumulation de super-tours de l'ADN. Une collision peut survenir entre le complexe TOP1 stabilisé et le complexe de transcription progressant sur l'ADN. (D'après Capranico et al., 2010)

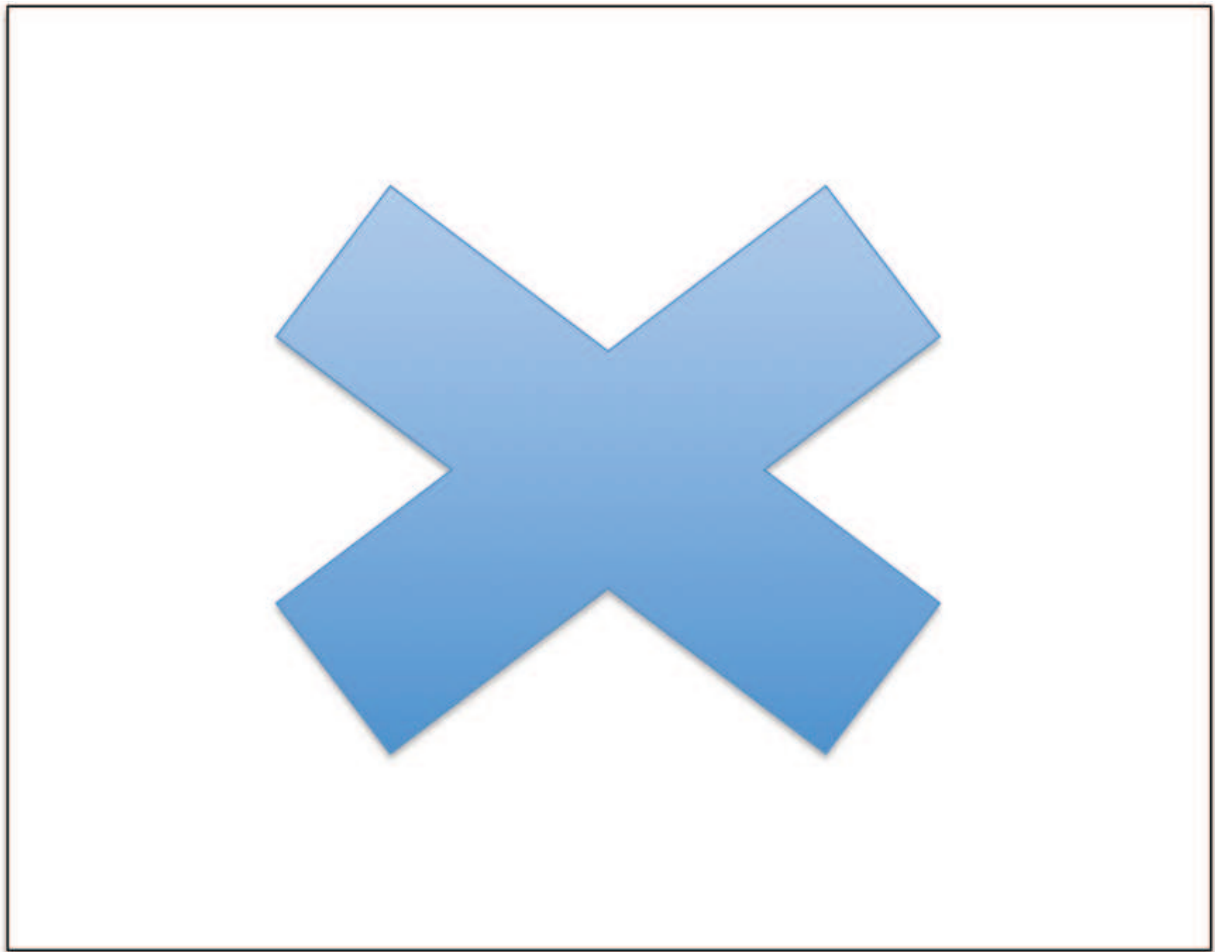
#### **II.B.2.3.2 La rapamycine, inhibiteur de mTORC1**

##### **La voie mTOR**

mTOR est une sérine/thréonine kinase impliquée dans des processus aussi divers que la biogenèse des ribosomes, la synthèse protéique, la croissance cellulaire et la prolifération, l'autophagie, la migration ou l'angiogenèse. La kinase mTOR, composée de deux complexes – mTORC1 et mTORC2 - participe à la transmission du signal induit par des cytokines ou des facteurs de croissance (Yang et al., 2013).

mTORC1, dont l'activation dépend essentiellement des nutriments et acides aminés, est un complexe constitué de 5 protéines - mTOR, RAPTOR, mLST8, PRAS40 et DEPTOR :





**Figure 45** : Voie de signalisation mTOR  
(D'après Laplante and Sabatini, 2012)

- PRAS40 et DEPTOR sont des inhibiteurs du complexe mTORC1,
- RAPTOR serait essentiel à l'assemblage du complexe, son recrutement aux lysosomes et endosomes tardifs et la colocalisation avec RHEB, une petite GTPase activatrice de mTORC1, - le rôle de mLST8 est mal compris encore à ce jour, et serait un activateur nécessaire à la solubilisation et au fonctionnement du complexe mTORC1.

mTORC2 répond essentiellement aux facteurs de croissance en activant l'entrée dans le cycle, la survie, la polarisation cellulaire ou le métabolisme. Les principaux substrats connus du complexe sont les Ser/Thr protéines kinases AKT et PKC ; le complexe est constitué de 6 protéines : mTOR, RICTOR, PROTOR-1, mLST8, DEPTOR, et mSIN1.

L'activité de mTORC1 est dépendante des protéines TSC1/2 (Tuberous Sclerosis protéines 1 et 2). En effet, les protéines TSC1 (hamartin) et TSC2 (tuberin) inhibent l'activité de mTORC1 en inactivant la protéine RHEB (Ras homolog enriched in brain). Plusieurs voies de signalisation permettent l'activation de mTORC1. Une de ces voies les plus connues est la voie PI3K/AKT/mTOR. L'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR aboutit à l'inhibition des protéines TSC1/2. De ce fait, l'inhibition exercée sur RHEB est levée, ce qui permet l'activation du complexe mTORC1. AKT peut aussi activer mTORC1 via l'inhibition de PRAS40. Enfin, mTORC1 permet à son tour, l'activation du complexe de traduction eIF-4E ou la protéine kinase S6, impliquée elle aussi dans la traduction protéique notamment celle du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (Laplante and Sabatini, 2012).

Le ciblage de cette kinase présente donc un intérêt: -de manière générale pour diminuer la prolifération cellulaire, l'autophagie, la migration, l'angiogénèse

-et plus particulièrement pour inhiber la traduction du facteur de transcription HIF-1 et in fine son accumulation cytosolique.

### **Les Rapalogues**

Le chef de file de cette classe thérapeutique est la rapamycine, connue également sous le nom de sirolimus. Ce médicament a été découvert en 1975 à partir de la bactérie streptomyces hygroscopicus provenant de l'île de Pâques, dont le nom dans la langue autochtone est rapa. Les recherches concernant cette molécule ont d'abord montré qu'il s'agissait d'un antibiotique de type macrolide, d'où son suffixe en -ycine comparable à d'autres antibiotiques de la même famille, comme la streptomycine. Il s'est avéré que son activité antimicrobienne était insuffisante pour continuer le développement de cette molécule en infectiologie. Cependant, la mise en évidence de ses propriétés immunosuppressives a conduit au

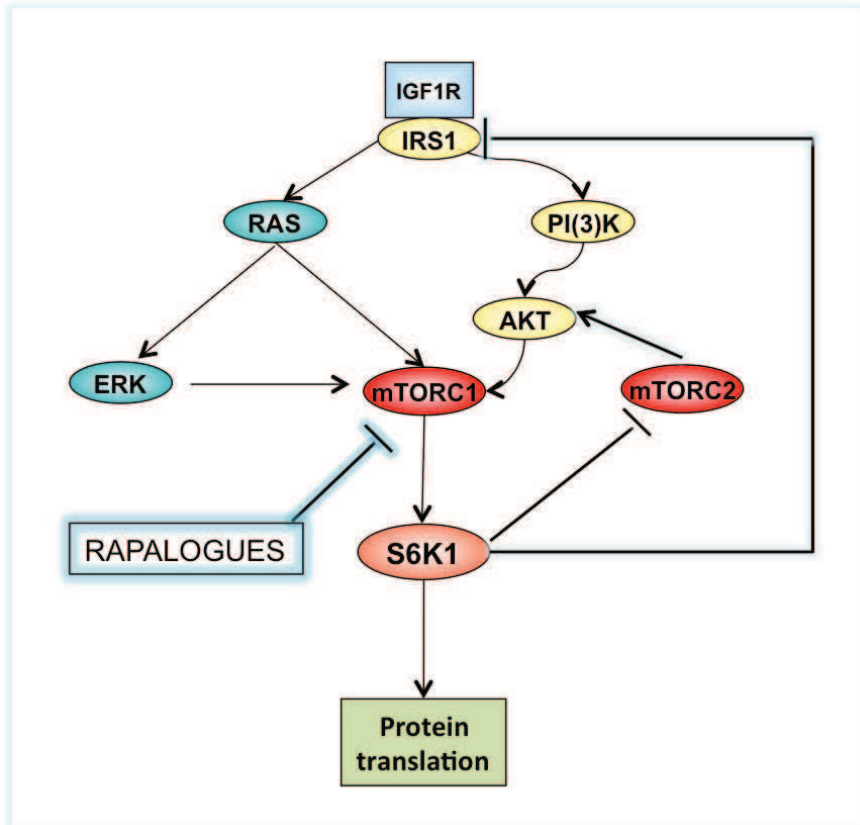
développement rapide de son utilisation en transplantation pour la prévention du rejet de greffe. D'autres propriétés sont rapportées, comme notamment ses effets sur la longévité probablement liées aux effets métaboliques et à l'activation de l'autophagie (Johnson et al., 2013). Enfin, au cours des dernières années, l'intérêt pour les inhibiteurs de mTOR s'est principalement focalisé sur leurs effets anti-tumoraux avec le développement de nombreux analogues structuraux (rapalogues).

Les Rapalogues sont une famille de médicaments ayant le même mécanisme d'action et une structure similaire à la rapamycine. On y retrouve : L'everolimus (RAD0001), le temsirolimus (CCI-779) et le deforolimus (MSD, ARIAD). Ce dernier ne présente pas d'AMM actuellement mais est en test dans des essais cliniques dans les sarcomes osseux. L'everolimus est un dérivé hydroxyethyl du sirolimus et le temsirolimus est une prodrogue (dérivé ester) du sirolimus. Le premier est indiqué comme immunosuppresseur, et est utilisé aussi en oncologie. Le second est utilisé seulement en oncologie, notamment dans le cancer du rein (Benjamin et al., 2011).

La rapamycine inhibe le complexe mTORC1 en se liant à FK506 binding protein 12 (FKBP12), une protéine intracellulaire qui active préférentiellement mTORC1 et peu mTORC2, sauf à des doses élevées (Sabatini, 2006).

Outre le rôle de la rapamycine sur l'inhibition de mTORC1 et de ses effets sur l'inhibition de la traduction, de la progression tumorale, de la survie cellulaire, de l'induction de l'autophagie et ses effets immunosuppresseurs, d'autres effets sont démontrés à l'heure actuelle, notamment ceux sur l'immunité antitumorale. En effet, à de faibles doses, la rapamycine a des effets immunostimulants en améliorant quantitativement et qualitativement la réponse adaptative des lymphocytes T CD8, alors qu'aux doses employées en thérapeutique, elle en empêche la prolifération et l'expansion clonale, ce qui lui confère ses propriétés immunosuppressives (Chi, 2012)

Les rapalogues ont montré une efficacité limitée en monothérapie dans les glioblastomes et les cancers en général en raison notamment de la réactivation de mTORC2 et AKT suite à la levée d'inhibition d'une boucle de rétrocontrôle médiée par IGFR1 et S6K1 (Chresta et al., 2010; Cloughesy et al., 2008; Iwanami et al., 2013).



**Figure 46** : Boucle de feedback control négatif sur mTORC2 et IRS1  
 Médiée par S6K1 et levée par les rapalogues.

(schéma personnel)

### III Objectifs

Les gliomes de haut grade de l'enfant et de l'adolescent sont des tumeurs hautement résistantes aux traitements actuels et nécessitent le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Les spécificités biologiques de la gliomagenèse pédiatrique commencent à être élucidés mais les mécanismes sous-tendant leur chimio-résistance relative sont encore peu connus.

Les **objectifs principaux** de ce travail ont été d'analyser les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance :

- 1) Des mécanismes de réparations de l'ADN (méthylation du promoteur de MGMT et du système MMR)
- 2) Des mécanismes associés de résistance liés à la modulation des voies de signalisation de l'hypoxie dont le marqueur central est HIF-1

**Par ailleurs, ce travail nous aura permis :**

1. De mieux caractériser l'hypoxie intra-tumorale dans les gliomes de haut grade et la réponse des cellules de gliomes à une baisse de pression en oxygène
2. De développer de nouveaux modèles à partir de tumeurs de patients, *in vitro* (en normoxie et en hypoxie) et *in vivo* (xenogreffes hétérotopiques et orthotopiques)

# Résultats

## 1<sup>ère</sup> partie

# Exploration des mécanismes de réparation de l'ADN dans les gliomes pédiatriques

# IV Exploration des mécanismes de réparation de l'ADN

## IV.A Hypothèse :

L'adjonction du témozolomide (TMZ) à la radiothérapie pour le traitement des gliomes malins pédiatriques n'a pas permis d'obtenir un bénéfice de survie aussi clair que chez l'adulte. Or, la cytotoxicité du TMZ repose principalement sur les lésions covalentes qu'il induit sur l'ADN et qui provoquent la mort cellulaire par apoptose. Ainsi les systèmes de réparation de l'ADN, responsables de la réparation de ces lésions, sont susceptibles d'interférer avec l'efficacité du TMZ et peuvent potentiellement expliquer la différence de réponse intrinsèque au TMZ des gliomes malins pédiatriques par rapport aux adultes. Venant corroborer cette hypothèse, l'hyperméthylation du promoteur du gène de la MGMT (O6-méthylguanine-méthyltransférase) représente actuellement le marqueur prédictif de réponse au TMZ le plus robuste dans le glioblastome de l'adulte. Cette enzyme est capable d'exciser et réparer directement les groupements méthyl transférés par le TMZ en position O6 des guanines (lésions O6-méthylguanine), lésions qui, bien que minoritaires, sont d'une particulière toxicité et mutagénicité pour la cellule. MGMT protège donc la cellule contre les effets mutagènes des agents alkylants environnementaux et s'oppose aux effets cytotoxiques des chimiothérapies alkylantes méthylantes, comme le TMZ. À l'opposé, la perte d'expression de cette enzyme par le biais de l'hyperméthylation du promoteur de son gène est associée aux étapes précoces de la cancérogenèse, par l'acquisition d'un phénotype mutateur. L'hyperméthylation du promoteur de *MGMT* est donc fréquente dans les gliomes malins de l'adulte (entre 40 et 50%) et est associée à une meilleure sensibilité au TMZ et donc une meilleure survie globale des patients adultes traités par radio-chimiothérapie.

Dans les gliomes malins pédiatriques, la fréquence rapportée de l'hyper-méthylation du promoteur de *MGMT* est très variable (16-50%) et son impact sur la survie controversée. Ces résultats émanent de cohortes réduites et utilisent des techniques différentes d'évaluation de la méthylation du promoteur. Ces disparités peuvent, en partie, être liées au manque de standardisation des techniques spécifiques de méthylation permettant la



détection de cette méthylation en routine. En effet, alors que l'intérêt clinique de ce marqueur est clairement établi chez l'adulte, les techniques de détection de la méthylation souffrent d'un manque de standardisation, en termes de seuil de détection et de positivité mais aussi de ciblage des CpGs les mieux corrélés à la survie.

**Ainsi la première partie de ce travail s'est focalisée sur la mise au point d'une technique de PCR spécifique de méthylation fluorescente et semi-quantitative,** aisément transposable en routine pour déterminer la fréquence relative de l'hyperméthylation du promoteur de *MGMT* dans les gliomes malins pédiatriques et son impact sur la survie, comparativement aux adultes. Cette technique a d'abord été validée dans une cohorte de gliomes de haut grade de l'adulte, bien caractérisée sur le plan moléculaire et traitée de façon homogène par un protocole de radio-chimiothérapie (RT/TMZ-TMZ) dit de Stupp.

Cependant, d'autres systèmes de réparation de l'ADN sont impliqués dans la modulation de la cytotoxicité des agents alkylants. Ainsi, la reconnaissance des lésions O6 méthylguanines par le système de réparation post-répliatif « mismatch repair » (MMR) est nécessaire à la formation de lésions intermédiaires de type cassures de l'ADN double-brin, elles-mêmes responsables de la signalisation de l'apoptose liée à p53. Le système de réparation par recombinaison homologue (système HR) représente quant à lui, un mécanisme d'ultime « by-pass » de l'apoptose en réparant ces cassures de l'ADN double-brin. Enfin, plus de 80% des lésions induites par les agents alkylants sont en réalité réparées par le système de réparation par excision des bases (BER). Ainsi, des altérations de ces systèmes de réparation de l'ADN peuvent moduler la réponse aux chimiothérapies alkylantes et pourraient expliquer les réponses différentielles observées entre adulte et enfant **et font l'objet de la deuxième partie de ce travail.**

## **IV.B Matériels et Méthodes:**

J'ai donc étudié dans une cohorte de 124 gliomes malins de l'adulte et 30 gliomes malins de l'enfant, le statut génomique et l'expression protéique d'enzymes clés des systèmes de réparation impliqués dans la réparation des lésions induites par les agents alkylants. L'expression protéique de *MGMT*, de p53, des enzymes du système MMR (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2), de RAD51 (système HR) et des enzymes principales du système BER (PARP1, XRCC1, APE1, MPG) a été étudiée par immunohistochimie sur tissu micro-array (TMA) réalisés à partir des tumeurs des patients de la cohorte. Le phénotype

d'instabilité des microsatellites (phénotype MSI) permettant la détection d'une déficience du système MMR, a été recherché par PCR. La méthylation du promoteur de *MGMT* a été étudiée après la mise au point préalable d'une PCR fluorescente semi-quantitative spécifique de la méthylation. Cette technique a été validée dans un premier temps sur la cohorte de gliomes malins adultes et a permis de calculer un ratio relatif de méthylation pour chaque tumeur (allèles méthylés versus non méthylés). Le seuil de significativité clinique en termes de ratio de méthylation a été déterminé en analysant l'impact sur la survie sans progression (PFS) des patients. Une analyse pronostique multivariée a été effectuée en confrontant l'impact sur la survie de la méthylation du promoteur de *MGMT* avec celui des autres marqueurs pronostiques bien connus décrits dans la littérature (*TP53*, *EGFR*, *PTEN*, *IDH1*, codélétion *1p19q*). Les altérations génomiques des gènes *TP53*, *EGFR*, *PTEN* et la codélétion des chromosomes 1p et 19q, ont été analysées par PCR grâce à l'allélotypage de microsatellites localisés dans ou encadrant chacun des gènes ou régions chromosomiques d'intérêt. Les mutations de l'isocitrate déshydrogénase 1 (*IDH1*), ont été recherchées par immunohistochimie sur le TMA. Enfin, les statuts génomiques et les niveaux d'expression protéique des différents acteurs de la réparation de l'ADN ont été comparés entre population pédiatrique et adulte, puis corrélés à la survie des patients.

## IV.C Résultats

### 1. Développement et validation d'une technique de MS-PCR semi-quantitative.

Une bonne reproductibilité a été obtenue pour des pourcentages de méthylation > 5%, sur des échantillons congelés ou conservés en paraffine. Un ratio relatif de méthylation du promoteur de *MGMT* (allèles méthylés versus non méthylés) a pu être calculé pour chacune des 124 tumeurs de la cohorte. 60% des tumeurs présentaient une méthylation avec un ratio moyen de 60% (min : 1% ; max : 100%). Le seuil de significativité clinique déterminé par rapport à la PFS des patients a été fixé à 15% (médiane de 8 mois pour les patients non méthylés vs 15 mois pour les patients méthylés,  $p < 0.001$ ). Avec ce seuil, 55% des patients présentaient une méthylation significative. Les tumeurs avec les ratios de méthylation les plus élevées (>60%) avaient les meilleures PFS par rapport à celles présentant des ratios intermédiaires (entre 15 et 60%) (médiane de 22 mois vs 13 mois,  $p < 0.05$ ). La méthylation du promoteur de *MGMT* a montré la valeur pronostique la plus significative en analyse multivariée (HR=0,020,  $p < 0.001$ ), ainsi que *IDH1* dans les oligodendrogliomes. En conclusion, cette technique de PCR semi-quantitative, aisément

transposable en routine, est donc très sensible, reproductible et a permis la détermination d'un seuil de significativité clinique corrélé à une bonne valeur prédictive pour les patients.

Ci-après, l'article accepté avec révision au *Journal of Molecular Diagnostics*.

# An innovative fluorescent semi-quantitative methylation-specific PCR method for the determination of *MGMT* promoter methylation is reflecting intra-tumor heterogeneity

Aurélia Nguyen<sup>1,2,3</sup>, MD, Michèle Legrain<sup>1</sup>, PhD, Georges Noel<sup>3,4</sup>, MD, PhD, Pierre Kehrlé<sup>5</sup>, MD, PhD, Roland Schott<sup>6</sup>, MD, Christelle Lasthaus<sup>1,3</sup>, Marie-Pierre Chenard<sup>7,8</sup>, MD, PhD, Marie-Pierre Gaub<sup>1,2,3</sup>, PhD, Dominique Guenot<sup>3</sup>, PhD, Natacha Entz-Werlé<sup>2,3,9</sup>, MD, PhD\*

1 Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire – CHU Hautepierre – Avenue Molière – 67098 – Strasbourg, France

2 FMTS, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg – Faculté de Médecine – Université de Strasbourg – 4 rue Kirschleger – 67000 – Strasbourg, France

3 EA4340 – Progression tumorale et microenvironnement. Approches translationnelles et épidémiologie – 3 Avenue Molière – 67000 – Strasbourg, France

4 Service de Radiothérapie – Centre anti-cancéreux Paul Strauss – 3 rue de la porte de l'hôpital – 67000 – Strasbourg, France

5 Service de Neurochirurgie – CHU Hautepierre – Avenue Molière – 67098 – Strasbourg, France

6 Service d'Oncologie – Centre anti-cancéreux Paul Strauss – 3 rue de la porte de l'hôpital – 67000 – Strasbourg, France

7 Laboratoire d'Anatomie Pathologique – CHU Hautepierre – Avenue Molière – 67098 – Strasbourg, France

8 Centre de Ressource Biologique – CHU Hautepierre – Avenue Molière – 67098 – Strasbourg, France

9 Service de Pédiatrie Onco-Hématologie – CHU Hautepierre – Avenue Molière – 67098 – Strasbourg, France

\*corresponding author - Natacha.entz-werle@chru-strasbourg.fr

**Keywords:** methylation specific PCR - high grade glioma - adult - tumor heterogeneity

**Source of support :** CHU Hautepierre, PHRC inter-régional, STIC, ARAME association

**Abstract word count :** 220 / **Text word count :** 7635

No conflict of interest has to be declared.

## Abstract

High grade gliomas (HGG) are usually associated with a very dismal prognosis, which was moderately improving in the last decade with the introduction of the alkylating agent temozolomide in their treatment. The methylation status of *MGMT* (O<sup>6</sup> methylguanine DNA-methyltransferase) promoter is one of the strongest predictive and prognostic factors for the patient chemoresponse. For instance, the molecular method of assessment for *MGMT* promoter status is not standardized. In this background, we developed a fluorescent capillary gel electrophoresis-based methylation specific-PCR. This technique allowed a semi-quantitative estimate of the relative ratio between methylated and unmethylated alleles. The efficacy and accuracy of the technique was assessed in a retrospective cohort of 124 newly diagnosed adult HGGs, who were homogeneously treated. First, we analyzed the impact on survival of different cut-off points in the *MGMT* promoter methylation and, to go further, we correlated these different rates to other well-known prognostic molecular factors involved in adult HGGs. This strategy allowed to validate our technique as a very sensitive technique (detection of a low methylation percentage, <5%), which was feasible in fresh-frozen as well as in FFPE samples and had the propensity to detect intra-tumor heterogeneity. This technique identified a new subgroup of anaplastic oligodendrogliomas defined by a minor methylation and a worse outcome and, therefore, will help to stratify accurately into more homogeneous subgroups of methylated tumors.

## Introduction

In adulthood, gliomas represent 30 to 35% of brain tumors and 80% of high-grade brain tumors, which are characterized by grade IV and III in the WHO classification [1]. Grade IV gliomas are composed of glioblastomas (GBMs), usually associated with a very dismal prognosis, which was moderately improving with the introduction of the alkylating agent temozolomide (TMZ) in their treatment. After surgical resection, the current standard of care in GBMs includes radiotherapy combined with concomitant and adjuvant TMZ (e.g. Stupp protocol) [2]. Grade III gliomas consist in oligodendrogliomas, anaplastic astrocytomas and oligoastrocytomas, which have a better prognosis than GBMs. Among those, the detection of an oligodendroglial component higher than 25% confers a much better prognosis and can be grouped as anaplastic oligodendrogliomas (AODs) [1]. In grade III gliomas, the current management is to use either radiotherapy or chemotherapy alone but the place of a combined modality treatment is debated, especially in 1p19q codeleted tumors [3, 4]. Most of these high-grade gliomas are defined by their histological features, which are now refined by a molecular stratification impacting on prognosis and/or chemosensitivity. One of those strongest predictive and prognostic factors for patients with anaplastic gliomas or GBMs, treated by a protocol comprising radiotherapy, chemotherapy or both treatments is the methylation status of *MGMT* ( $O^6$  methylguanine DNA-methyltransferase) promoter [5]. This DNA repair enzyme is able to directly remove methyl adducts induced at  $O^6$  position on guanines by alkylating agents (e.g. TMZ or nitrosoureas). As TMZ cytotoxicity mainly relies on these modified bases, the presence of *MGMT* expression results in resistance to this drug, while its inactivation results in an increased sensitivity to alkylating chemotherapies. Surprisingly, this inactivation of *MGMT* is a frequent and early carcinogenic event in cancer cells, which confers a mutator phenotype favoring tumor cell proliferation. This inactivation is mainly due to the aberrant methylation of a CpG-rich *MGMT* promoter region, leading to gene silencing and consequently reducing the ability of tumor cells to repair DNA damage induced by alkylating agents [6, 7]. The epigenetic inactivation of *MGMT* by promoter methylation has been shown to be involved in 40 to 50% GBMs and in 50 to 70% grade III gliomas [4]. In GBMs, *MGMT* promoter methylation is clearly predictive of a better response to TMZ (EORTC 26981) and is particularly useful in elderly patients for treatment decision (NOA-08, Nordic trial) [8, 9]. In the grade III glioma setting, *MGMT* promoter status is considered as a prognostic factor of longer survival, independently from the treatment modality (radiotherapy, chemotherapy or both treatments) (NOA-04, EORTC 26951) [3]. The *MGMT* promoter methylation status was and is currently used for prognostic stratification in clinical trials. Its prognostic or predictive value has been integrated with other important clinical and molecular features like the CIMP-phenotype, *IDH1/2* mutations and the 1p19q codeletion [4, 9, 10]. This methylation status can also change at recurrence after a first line therapy especially in GBMs, questioning the initial clonal heterogeneity of *MGMT* promoter methylation within tumor cells [11, 12].

However, despite the clear prognostic impact of this biomarker in high-grade gliomas (HGGs), the molecular method of assessment for *MGMT* promoter status has not reached enough standardization for a routine and international consensus. The first and milestone technique used in the EORTC trial to assess *MGMT* promoter methylation was the MS-PCR (methylation specific PCR) [8, 13]. This qualitative MS-PCR was based on a nested PCR strategy with analysis by gel electrophoresis, whose limitations resulted in a poor specificity and reproducibility.

Currently, many other methylation specific quantitative real-time PCR (e.g. MethyLight assay) or sequencing methods (e.g. pyrosequencing) have been developed in order to circumvent these technical issues [14-17]. However, quantitative real-time PCR techniques cannot be used as precise quantitative assays as they do not take into account the contribution of normal cells in the tumor. The sequencing techniques were also aimed to define the best CpG sites in the promoter whose methylation leads to gene silencing. Nevertheless, these expensive and time-consuming sequencing techniques cannot be easily and widely used in routine diagnostic [18, 19]. Thus, we developed in our laboratory a fluorescent capillary gel electrophoresis-based MS-PCR that combines simplicity, sensitivity and reproducibility. This technique allowed a semi-quantitative estimate of the relative ratio between methylated and unmethylated alleles, ratio that was adjusted to the percentage of tumor cells, determined by the pathologist. This adjustment allowed taking off the signal of normal cells from the tumor sample and might reflect a potential heterogeneity in the methylation of *MGMT* promoter within the tumor cells. We analyzed the efficacy and accuracy of our technique in a retrospective and monocentric cohort of 124 newly diagnosed adult HGGs patients. The patients were homogeneously treated by radiotherapy with concurrent and adjuvant TMZ treatment. First, we analyzed the impact on survival of different cut-off points in the *MGMT* promoter methylation and, to go further in the assessment of this technique, we correlated these different rates with other well-known prognostic molecular factors involved in the current molecular stratification of adult HGGs, like *EGFR*, *PTEN* and *TP53* status, *IDH1* mutation and 1p19q codeletion. This strategy was in agreement with the published results and showed interestingly that intra-tumor heterogeneity in *MGMT* promoter methylation may exist within GBMs and AODs. We identified with this technique a new sub-group of AODs defined by a minor methylation and a worse outcome.

## **Material and methods**

### **Patients' tumors and clinical data**

124 patients with newly diagnosed GBMs or AODs were consecutively treated and followed in our oncological center between July 2006 and July 2008. The patients were included in our retrospective study if they had been diagnosed by the local pathologist with a GBM or AOD according to the WHO classification, were older than 18 years, treatment naive and underwent, after surgery, radiotherapy with concomitant and adjuvant TMZ according to a Stupp protocol [8]. 75 patients diagnosed with GBM and 49 with AOD were enrolled in our study. A written informed consent was obtained for all patients. The research protocol was approved by our institutional ethic committee for human tissue experiments. The anonymized fresh-frozen or paraffin-embedded tumor samples and the paired blood samples were collected at diagnosis and stored at the Biological Resource Centre (CRB) of the University Hospital of Strasbourg. All patients began their therapeutic management with a neurosurgery. The extent of resection was evaluated on the surgical report and on a MRI performed within the first 48 hours after surgery and was defined as following: gross-total (no residual tumor on MRI), subtotal (residual tumor on MRI), partial resection or biopsy. Radiotherapy (RT) was delivered with a total dose of 60 Gys in 30 fractions of 2 Gys, except for patients older than 70 year-old, who received a total dose of 40.5 Gys in 15 fractions of 2.7 Gys. TMZ was administered at 75mg/m<sup>2</sup>/day during RT. Six adjuvant TMZ courses were planned for each patient.

The first course was starting 4 weeks after the end of RT. Adjuvant TMZ was administered in 28-day courses from D1 to D5 at 150 mg/m<sup>2</sup>/day for the first course and then at 200 mg/m<sup>2</sup>/day for the subsequent courses. The tumor evolution was followed on MRI at the end of radiotherapy and every two course of TMZ.

### **DNA extraction and quality controls**

For each fresh-frozen or FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) tumor sample used in the study, three hematoxylin and eosin-stained sections of frozen tissues were reviewed by a pathologist to evaluate the percentage of tumor cells, at the beginning, middle and end of the tissue cut. The percentage of tumor cells corresponds to the number of tumor cells reported to the number of all cells (tumor and non-tumor cells) analyzed on a slide. Genomic DNA was isolated using conventional techniques with the QIAamp DNA purification kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). DNA quality and quantification were assessed using a Nanodrop® spectrophotometer (ThermoScientific, Wimington, DE, USA). The genomic DNA concentrations obtained from tumor or blood samples ranged from 50 to 400 ng/μl and from 50 to 150 ng/μl, respectively.

### ***MGMT* promoter methylation analysis by the Fluorescent Semi-Quantitative Methylation Specific-PCR (FSQ-MS-PCR)**

100 ng or 500 ng of genomic DNA (for fresh-frozen or FFPE samples respectively) were first treated with sodium bisulfite and subsequently purified using the Epitect Bisulfite kit (Qiagen, Hilden, Germany). The chemical treatment of DNA with bisulfite converts cytosine residues to uracil, but leaves 5-methylcytosine residues unaffected, allowing the targeting of either unmethylated or methylated sequences. The technique is using specific primers in a semi-quantitative multiplexed fluorescent MS-PCR. Primer sequences recognizing unmethylated cytosines were 5'-TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTGT-3' (forward primer, UF) and 5'-AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA-3' (reverse primer, UR), and the specific primers for methylated cytosines were 5'-TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTCGC-3' (forward primer, MF) and 5'-GCACTCTTCCGAAAACGAAACG-3' (reverse primer, MR). The analyzed sequences were designed to target the distal part of the CpG island region of *MGMT* promoter, whose complete methylation has been correlated with *MGMT* promoter silencing in cancer cell lines and primary tumors [18]. Primers were labeled at their 5' end with a fluorescent reporter dye (FAM). PCR amplifications were performed in a Biometra thermocycler (Labgene, Archamps, France) with a final volume of 50 μl consisting of 1 μM of each primer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1M Betaine, 70 μM of each dNTP, Taq Gold Buffer 1x, 5 units Taq Gold and ~ 10 ng of bisulphite converted tumor DNA. After an initial denaturation step at 95°C for 10 min, 33 cycles were performed at 94°C for 45 sec, 62°C for 90 sec and 65°C for 25 sec, followed by a final elongation step at 65°C for 30 min. Thereafter, the PCR products were analyzed by capillary gel electrophoresis on a ABI PRISM® Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using GeneMapper software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All primers (MF, MR, UF and UR) were multiplexed in one PCR reaction allowing the relative quantification of the amount of methylated alleles relative to the unmethylated alleles. The discrimination between methylated and unmethylated PCR products was based on their different sizes. UF and UR were designed to target the same region than MF and MR but with 6

additional bp upstream and downstream so that the unmethylated and methylated amplification peaks were detected after capillary electrophoresis with sizes of 94 bp and 82 bp respectively (see Figure 1). An additional amplification peak could be also identified with an intermediate size of 88 bp, corresponding to the partial methylation of either the forward or the reverse part of the amplified fragment (see Figure 1). In order to determine which part of the fragment was methylated in case of partial methylation, MF was mixed with UR (matching the partial methylation of the forward region) and UF with MR (matching the partial methylation of the reverse region) in 2 additional PCR, included in each experiment. A fully methylated DNA (CpGGenome™ Universal Methylated DNA, MP Biomedicals, Irvine, USA) was used as a positive control and unmethylated DNA from HT29 cell line was used as a negative control. A third control made of a mixture containing 5% methylated DNA + 95% unmethylated DNA, was included in each experiment delineating the threshold of quantification accuracy of the technique (determined in the technical assessment of the FSQ-MS-PCR detailed in the results). Each experiment was performed in triplicate with 3 different PCR. The estimation of the relative amount of methylated *MGMT* promoter was performed by calculation of the following ratio: (peak height of the methylated fraction/sum of the peak heights of the unmethylated and the methylated fractions) x 100. The percentage of methylated *MGMT* promoter was then reported to the percentage of tumor cells determined by the pathologist in each sample in order to remove signals from the normal cells and calculate the final estimated percentage of *MGMT* promoter methylation specifically in the tumor cells.

#### ***IDH1 R132H* mutation screening using immunohistochemistry (IHC) and Tissue microarray (TMA)**

From each tumor block, 3 representative tumor areas were selected concomitantly with one paired normal area if available. Using a tissue arrayer (MTA BOOSTER 01 V2.04, Excilone, France), the selected areas were punched from the corresponding FFPE blocks to obtain 0.6-mm-diameter cores. The cores were then positioned in a recipient paraffin block in which 20 different tumors could be inserted. A total of 35 GBMs and 38 AODs could be gathered in 4 TMAs, which were subsequently cut to 4 µm sections for immunohistochemical staining. IHC was then performed using an automated tissue staining system (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). Endogenous peroxidase activity was blocked by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antigen retrieved using CC1 reagent (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). After washing, TMA sections were incubated with the mouse monoclonal anti-*IDH1 R132H* antibody (clone H09, Dianova, Hamburg, Germany) at 1/50 dilution for 20 minutes, followed by incubation with UltraView HRP-conjugated multimer antibody reagent (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA) [20]. The antigen detection was performed using the UltraView diaminobenzidine chromogen step (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). TMA sections were finally counterstained with hematoxylin and scored independently by two pathologists. For scoring, the presence of a moderate to strong cytoplasmic staining in tumor cells in at least 1 spot was considered as positive for the screening of *R132H* mutation.

#### ***1p19q* codeletion, *EGFR*, and *TP53* genomic status**

Microsatellites targeting the studied loci (usually surrounding them) were analyzed on paired normal and tumor DNA. The chromosome 1p was analyzed with *D1S201*, *D1S250* and *D1S468* (covering 1p13.2 to 1p36.3 loci) and the chromosome 19q with *D19S180*, *D19S217* and *D19S397* (covering 19q13.2 to 19q13.42 loci). *P53*



gene located at 17p13 locus was targeted with *TP53* microsatellite and *EGFR* with *D7S2475*, *D7S2542*, *EGFR*, *D7S2550*, *D7S659* and *D7S801* at 7p12 locus. The sequence primer description can be obtained from <http://www.gdb.org> and <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap99>. DNA from both paired samples (10 ng) were amplified by PCR in a total volume of 25 µl using 0.125 µl of Taq polymerase and 4 pmol of both forward and Cy5 labeled reverse primers. PCR was carried out in an Omnigen Hybaid Thermocycler (Hybaid Ltd, Ashford, United Kingdom) using the following protocol: 5 minutes at 95°C, 30 cycles of 1 minute at 95°C, 1 minute at 55°C and 1 minute at 72°C, followed by 5 minutes at 72°C. The PCR products were analyzed by capillary electrophoresis on ABI PRISM® Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The data were analyzed with the Genemapper Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). This technique detects allelic imbalances (AI), which correspond to the modification of the allele ratio in tumor DNA compared to paired blood DNA. These AI result from either deletions or amplifications of the targeted loci. Previous analyses performed on normal tissues allowed determining a cut-off point of 20% of AI as significant [21]. Each AI was confirmed by a duplicate PCR.

### **Statistical analysis**

The statistical analysis was performed using the SPSS 11.0 for Windows (SPSS, Inc Chicago, IL) and the R statistical software (version 3.0.2, <http://www.Rproject.org>). Inter-group comparisons and associations between factors were assessed using Fisher's exact test (5% significance) and the Spearman correlation coefficient (5% significance with  $r$  equal or higher than 0.2). Distributions of continuous variables were analyzed (mean and median) and tested for normality with the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests. Comparison of medians was performed using the Mann-Whitney-Wilcoxon test. PFS and OS were estimated using the Kaplan-Meier method. The impact of each factor (age, sex, histological grade, type of surgery, total dose of RT, *MGMT* promoter methylation, *IDH1* mutation, 1p19q codeletion, *EGFR* and *PTEN* AI) on survival was assessed with the log rank test for univariate analysis and the Cox regression model with and without forward stepwise selection for multivariate analysis (5% significance). The analysis of clinical relevant cut-off points for *MGMT* promoter methylation was performed using an outcome-based approach. First, we proceeded to a systematic analysis of multiple cut-off points (1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100%) on survival (PFS and OS) for the determination of the cut-off point with the best statistical significance (best  $p$  value) and the ones associated with the shortest and the longest survivals (PFS and OS) respectively. Secondly, we used a PFS-based method for the determination of an optimal risk cut-off point in the percentage of methylation continuous distribution and able to best discriminate low-risk from high-risk patients based on the duration of their clinical remission or at least stabilization defined by PFS. The optimal cut-off was defined as the minimal percentage of methylation threshold associated with the best area under the curve (AUC) able to discriminate PFS longer than the time-point analysis fixed at 6, 12, 24 and 36 months. These AUC were derived from time-dependent receiver operating characteristic curves (ROC) obtained with a Cox model after adjustment for age. *MGMT* promoter methylation defined by this cut-off point was then analyzed in a multivariate cox regression model. After the determination of all independent prognostic factors for PFS and OS, we defined integrated sub-groups according to *MGMT* promoter methylation level.

## Results

### Cohort clinical and pathological background

The patients' clinical data and the tumor molecular characteristics are presented in Table 1, Table 2 and Figure 2. The follow-up period for the 49 AOD patients ranged from 2.75 to 106.7 months (median of 53.2 months) and for the 75 GBM patients, from 2 to 92.8 months (median of 17.4 months) ( $p < 0.05$ ). The minimal follow-up for censored patient was 12 months. The median PFS and OS in the whole cohort were 14.6 months and 23.5 months, respectively. As expected, AODs had a significantly better PFS and OS than GBMs (median of 39.3 versus 10.9 months and 71.1 versus 17.5 months, respectively,  $p < 0.0001$ ). Among the 124 HGGs, we could obtain fully clinical and molecular data for 70 patients.

### Technical assessment of the FSQ-MS-PCR

The technical assessment of the FSQ-MS-PCR consisted, first, in determining the threshold of detection and the limit of quantification for which reproducible ratios, defined by a coefficient of variation lower than 20%, were obtained. For this, the fully methylated control was iteratively diluted with the unmethylated control to obtain 9 samples with theoretical percentages of methylation ranging from 0 to 100% (0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75 and 100%). Four different bisulfite conversions were performed on each sample and processed for methylation analyses in triplicate. The 0% and 100% mixtures were invariably detected as negative and 100% positive, respectively, in all experiments. A methylated peak was detected in all methylated samples with a dilution as low as 1%. The qualitative reproducibility (methylated versus unmethylated) was 100% with the lowest 1% percentage of methylation obtained by dilution so that the detection threshold was fixed at this limit. Then, in order to assess the quantitative accuracy of the assay, the observed percentages of methylation were calculated with the following ratio: methylated peak height / methylated + unmethylated peak height and reported in a linearity curve linking a fixed percentage of methylation to observed peak height methylation. The resulting curve was non-linear as the observed percentage of methylation overestimated from 2 to 3 times the theoretical value, obviously fitting semi-quantitative rather than quantitative assay standards (see Figure 3). The calculated ratio for the methylation percentages of 20% and 60% were systematically linked to the theoretical percentages obtained by dilution of known fully methylated and unmethylated samples of 5% and 25%, respectively. The quantitative inter and intra-assay precisions were only satisfactory for the samples above a 5% dilution of methylation. Below a dilution of 5% (1% and 2%), the coefficients of variation were higher than 20%. As a result of this analysis and in addition to the fully methylated and unmethylated controls, a third control made of a mixture containing 5% methylated DNA + 95% unmethylated DNA was included in each experiment, delineating the threshold of quantification accuracy of the technique. We, then, retrospectively checked the accuracy of these 3 controls used throughout the time of the study. The fully methylated control was invariably associated with a percentage of methylation of 100% and the unmethylated control yielded no false positive peaks. The 5% methylated control was associated with observed ratio of the peak height (methylated peak height / methylated + unmethylated peak height) ranging from 9 to 20% with a mean and median of 15% ( $\pm 0.4$  SD) and a coefficient of inter-assay variation of 19.4%.

To confirm the reproducibility of the FSQ-MS-PCR in a routine-use setting, 4 fresh-frozen methylated HGG samples (A288, A302, A307 and A311) were analyzed

(see Table 3). Three different bisulfite conversions were performed on each tumor sample and then analyzed for *MGMT* promoter methylation in triplicate with 3 different runs. Coefficients of variation were calculated from the three conversion runs (inter-assay precision) and from the 3 different PCR (intra-assay precision). They were all below 20%, confirming the high intra and inter-assay precision of the FSQ-MS-PCR. Notably, the A311 sample displayed a very low calculated percentage of methylation with a mean value of 7%. This percentage was far below from the observed percentage of the 5% methylated control, which displayed a calculated ratio of 16% (mean value). So, the FSQ-MS-PCR allows the detection of very small levels of DNA methylation (1%) with a high intra and inter-assay reproducibility. However, the best accuracy in quantification was obtained with a quantification threshold delineated by the 5% methylated control as showed in Figure 3.

### **Feasibility in FFPE samples**

The classical MS-PCR is usually reproached to lead to sub-optimal results when using low-quality DNA extracted from FFPE samples. These technical issues result in amplification failures leading to false-negative results or in incomplete bisulfite conversion leading to false-positive results. To test the feasibility and accuracy of the FSQ-MS-PCR in FFPE samples, the paired fresh-frozen and FFPE samples from 14 HGG tumors were analyzed (see Table 4). Each sample was converted and analyzed in duplicate. The variation of the percentage of methylation (% coefficient of variation, CV) before and after adjustment to the percentage of tumor cells were analyzed for each pair of fresh-frozen and FFPE samples. A 100% concordance was obtained with 9 tumors found unmethylated and 5 methylated in both fresh-frozen and FFPE samples. All methylated pairs showed very similar percentages of methylation with coefficients of variation lower than 20%, except for tumor n°9 (38%).

### ***MGMT* status in the HGG cohort, the methylation patterns and their outcome correlation**

The FSQ-MS-PCR was performed after DNA extraction and sodium bisulfite conversion. A total of 31 independent controlled experiments (consisting for each experiment of 1 conversion of the 3 controls together with 4 different HGG samples in duplicate) were performed to assess *MGMT* promoter methylation in the overall 124 HGGs. The methylation rate in the whole cohort was 67.7% (84/124). In fact, the methylation signal was detected in 42 out of 49 AODs (85.7%) and in 42 out of 75 GBMs (56%) ( $p < 0.001$ ). The impact on survival of the partial methylation was analyzed to be integrated in the calculation of the final methylation percentages.

For 57 tumors of the cohort, an additional peak was identified with an intermediate size of 88 bp, corresponding to the partial methylation of either the forward or the reverse part of the amplified fragment (see Figure 1). Three different patterns of methylation could be described: the type 1 pattern with 1 peak of 82 bp length indicating a complete methylation, the type 3 pattern with 1 peak of 88 bp length indicating a partial methylation and the type 2 pattern with the 2 peaks coexisting (82 bp and 88 bp) indicating both a partial and a complete methylation. Twenty-seven tumors (8 AODs and 19 GBMs) harbored the type 1 methylation pattern, thirty-six tumors (24 AODs and 12 GBMs) the type 2 and twenty-one tumors (10 AODs and 11 GBMs) had the type 3 pattern. Among the type 2, the partial methylation involved the forward region in 10 cases (3 AODs and 7 GBMs) and the

reverse region in 26 cases (21 AODs and 5 GBMs). Among type 3 pattern, the partial methylation involved the forward region in 4 cases (2 AODs and 2 GBMs) and the reverse region in 17 cases (8 AODs and 9 GBMs).

In AODs, type 1, 2 and 3 patterns presented a median PFS of 36.9 months (95% CI: 18.6-55.1), 64.1 months (95% CI: 0-128.7) and 30.4 months (95% CI: 0-72.0) respectively, without significance between groups. The median OS was not reachable for pattern 1 and 2 but was 46.6 months (95% CI: 29.2-63.9) for pattern 3 ( $p=0.005$ , comparison between pattern 3 and the 2 other patterns 1 and 2). All 3 patterns had significantly better PFS and OS than unmethylated AODs which harbored a median PFS of 8.3 months (95% CI: 7.4-9.1) and a median OS of 11.5 months (95% CI: 4.2-18.8),  $p<0.001$ .

In GBMs, type 1, 2 and 3 patterns presented a median PFS of 13.1 months (95% CI: 8.0-18.2), 8.0 months (95% CI: 5.1-11.6) and 10.9 months (95% CI: 5.9-16.0) respectively, without significant difference between groups. The median OS was of 24.4 months (95% CI: 12.2-36.6), 17.4 months (95% CI: 1.1-33.6) and 19.4 months (95% CI: 16.9-22.0) for type 1, 2 and 3 patterns, respectively, without significant difference between groups. Only type 1 pattern had a significantly better PFS (13.1 months) than unmethylated GBMs, which harbored a median PFS of 6.9 months (95% CI: 5.3-8.5),  $p=0.004$ . All 3 patterns had a significantly better OS than unmethylated GBMs (median OS of 14.8 months (95% CI: 10.5-19.1);  $p<0.05$ ).

In general, a partial methylation of the forward versus the reverse region across the type 2 and 3 patterns had a bad impact on both PFS and OS. Indeed, in AODs, the median PFS associated in pattern 2 with a partial methylation of the forward region was 17.5 months (95% CI: 16.3-67.4) compared to 64.1 months (95% CI: 7.0-121.2) for the reverse region and in pattern 3 of 6.2 months (95% CI: 1.5-20.8) for the forward region compared to 50.2 months (95% CI: 0-101.1) for the reverse region ( $p=0.046$ ). The median OS was not reachable in type 2 pattern AODs whatever the region of methylation was, but was 6.6 months (95% CI: 0-65.7) and 63.2 months (95% CI: 16.9-109.6) in type 3 pattern with a forward or reverse partial methylation ( $p=0.360$ , not significant). All these methylated sub-groups of AODs had a better PFS and OS than unmethylated tumors ( $p<0.001$ ) except for the sub-group of the pattern 3 with methylation of the forward region. In type 2 pattern GBMs, the median PFS associated with a partial methylation of the forward region was 6.4 months (95% CI: 2.3-10.5) compared to 18.5 months (95% CI: 0-41.1) for the reverse region ( $p=0.035$ ). In type 3 pattern GBMs, the median PFS associated with a partial methylation of the forward region was of 6.5 months (95% CI: 2.4-9.6) compared to 10.9 months (95% CI: 5.5-18.3) for the reverse region ( $p=0.046$ ). Only the GBMs of type 2 and 3 patterns with a partial methylation of the reverse region had a better PFS compared to unmethylated tumors ( $p<0.05$ ). No significant correlations were observed on OS in type 2 and 3 pattern GBMs ( $p=0.255$  and  $p=0.135$ , respectively). Only the GBMs of type 2 and 3 patterns with a partial methylation of the reverse region had a better OS (32.6 months (95% CI: 6.4-58.7) and 19.4 months (95% CI: 17.0-21.8) ) compared to unmethylated tumors ( $p<0.05$ ).

### **Determination of an optimal risk cut-off**

The partial methylation peak was finally integrated in the calculation of the methylation percentage, as follows: (peak height of the completely methylated fraction + peak height in the partially methylated fraction) / (sum of the peak heights of the unmethylated + completely methylated + partially methylated fractions) x 100. Thereafter, these methylation percentages were adjusted to the percentage of tumor

cells assessed by the pathologist. All tumor samples harbored a percentage of tumor cells higher than 20% (max 95%) with a median of 80%, with no significant difference between AODs and GBMs. The final methylation rate in tumor cells ranged from 2 to 100% in AODs and from 1 to 100% in GBMs. In AODs, the median and mean methylation rates were 59% and 57%, (+/- 26 SD) respectively with a Gaussian distribution. Median and mean values were lower in GBMs (30% and 40% respectively,  $p < 0.05$ ) with a non-Gaussian distribution. The analysis of clinically relevant cut-off points for *MGMT* promoter methylation was performed using an outcome-based approach. First, we proceeded to a systematic analysis of multiple cut-off points (1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100%) on survival (PFS and OS). In AODs and GBMs, the detection of *MGMT* promoter methylation was correlated with a better outcome for both PFS and OS, even with the lowest detected percentage. Interestingly, the prognostic value of *MGMT* promoter methylation was persistent when increasing cut-off points up to 80% (PFS) and 70% (OS) in AODs and 60% (PFS and OS) in GBMs. The shortest PFS was obtained for tumors with undetectable methylation in both GBMs (6.9 months) and AODs (8.3 months). The longest PFS was obtained for tumors with cut-off points higher than 60% in both AODs (64.1 months) and GBMs (13.1 months). Secondly, we used a PFS-based method for the determination of an optimal risk cut-off point in the percentage of methylation continuous distribution, able to discriminate low-risk from high-risk patients based on the duration of their clinical remission or stabilization defined by PFS. This cut-off was defined as the minimal percentage of methylation associated with the best area under the curve (AUC) able to discriminate PFS longer than the time-point analysis fixed at 6, 12, 24 and 36 months (see Table S1 and S2). These AUCs were derived from time-dependent receiver operating characteristic curves (ROC) obtained with a Cox model after adjustment for age. In AODs, the best AUCs were obtained with a cut-off of 15% for PFS longer than 6 months, 20% for PFS longer than 12 months and 60% for PFS longer than 36 months. In GBMs, the best AUCs were obtained with a cut-off of 20% for a PFS longer than 6 months, 30% for a PFS longer than 36 months. Based on this analysis, a cut-off of 15-20% was chosen as the optimal threshold value to separate methylated from unmethylated tumors. This cut-off value was correlated to the 5% methylated control, which displayed a calculated ratio of 16% and could represent the threshold for positivity and accurate semi-quantification. With this cut-off point, 38 AODs (77.6%) and 33 GBMs (44%) were considered as methylated tumors. According to this analysis, 3 sub-groups might be defined: patients with unmethylated tumors (ratios lower than the 5% methylated control) had the worse prognosis, patients which tumors displayed methylation rates lower than 60% had an intermediate prognosis and, those with methylation rates equal or higher than 60% presented the best survival for both PFS and OS and both in AODs and GBMs (see Figure 4).

### **Multivariate analysis**

Survival data are summarized in Table 5 for AODs and Table 6 for GBMs. Age was not prognostic in GBMs, whereas AODs patients less than 50 year-old had a better OS (median of 77.4 versus 46.5 months,  $p = 0.049$ ). The quality of resection was not prognostic in GBMs conversely to AODs for which the median PFS and OS increased with the extent of surgery. The total delivered radiation dose (60 Gys or less) was prognostic for PFS (median of 12.6 versus 5.5 months,  $p = 0.024$ ) and OS (19.4 versus 7.2 months,  $p = 0.01$ ) in GBMs but not in AODs for which a simple trend for a better PFS is noticed. Screening for *IDH1* R132H mutation was performed by

IHC on 36 AODs and 34 GBMs FFPE samples. *IDH1* R132H mutation was detected in 21 AODs (58%) but in only one GBM. This mutation was correlated with a better PFS and OS in AODs. The 1p19q codeletion as well as *EGFR*, *TP53* and *PTEN* genomic status were determined by allelotyping in 47 AODs and 68 GBMs. As expected, the 1p19q codeletion was more frequently detected in AODs (20 out of 39, 51%) than in GBMs (7 out of 68, 10%) and associated with a better PFS in AODs. In AODs, *MGMT* promoter methylation was correlated with *IDH1* mutation (18 out 22 mutated AODs had *MGMT* promoter methylation,  $r=0.7$ ,  $p<0.05$ ) and 1p19q codeletion (15 out 21 codeleted AODs had *MGMT* promoter methylation,  $r=0.59$ ,  $p<0.05$ ). Allelic imbalances at the *EGFR* and *PTEN* loci were more frequent in GBMs than in AODs (79.1% versus 29.5% and 79.2 versus 40.5 % respectively,  $p<0.001$ ) and mutually correlated in both groups. *EGFR* and *PTEN* AI were nearly exclusive of *IDH1* mutation or 1p19q codeletion in AODs and correlated with a worse outcome ( $p<0.05$ ). Finally, AOD patients, who benefited from a complete or subtotal resection, were more frequently *IDH1* mutated and *EGFR* and *PTEN* normal. In GBMs, there was no correlation between *MGMT* promoter methylation and other molecular markers. Only *PTEN* status had a prognostic impact (a better PFS and OS in patients with *PTEN* allelic imbalance ( $p<0.01$ )). Allelic imbalance at *TP53* locus was detected in 9/38 AODs (23.7%) and in 25/64 GBMs (39.1%) and was not correlated with survival. Then, the *IDH1* mutation, 1p19q codeletion, *EGFR* and *PTEN* status were analysed according to increasing levels of *MGMT* promoter methylation (see Figure 5). Interestingly, AODs with *MGMT* promoter methylation lower than 60% were more frequently rearranged at the *PTEN* and *EGFR* loci but less frequently *IDH1* mutated and 1p19q codeleted. Beyond 70%, only one tumor harbored a *PTEN* allelic imbalance. We performed a multivariate survival analysis using the Cox regression model in the whole cohort, in AODs, in GBMs and after adjustment with treatment (resection and radiotherapy). This analysis integrated *MGMT* promoter methylation defined by the optimal risk cut-off delineated by the 5% methylated control. For both AODs and GBMs, *MGMT* promoter methylation was the only significant and independent molecular predictive factor of better PFS (HR=0.283 (0.146-0.520)  $p<0.01$  and HR=0.010 (0.001-0.074)  $p<0.001$ , respectively) before and after adjustment on treatment. For OS, *MGMT* promoter methylation was also an independent prognostic factor in AODs and GBMs (HR=0.003 (95% CI: 0.003-0.284) and HR=0.052 (95% CI: 0.0011-0.258) respectively,  $p<0.001$ ). It was the only predictive factor of better OS in GBMs, but in AODs, allelic imbalance at the *PTEN* locus and *IDH1* mutation were also independent predictive factors (HR=0.099 (95% CI: 0.009-0.281)  $p<0.01$  and HR=5.496 (95%CI: 1.226-24.629)  $p<0.05$ , respectively). Therefore, we analysed the different survivals of AOD patients according to the *MGMT* promoter methylation status, *IDH1* mutation and/or 1p19q codeletion and lastly their *EGFR* and/or *PTEN* genomic status (see Figure 6). The 22 tumors harbouring an *IDH1* mutation and/or 1p19 codeletion without any alteration on *PTEN* or *EGFR* loci (group 1) had the best median PFS and OS (not reachable for both) whatever the status of methylation (2 unmethylated and 20 methylated). The 10 unmethylated tumors harboring *EGFR* and/or *PTEN* alteration with or without *IDH1* mutation and /or 1p19q codeletion (group 2) had the worst median PFS (7.9 months, 95% CI: 6.5-9.4) and OS (11.5 months, 95% CI: 5.9-17.1), while the corresponding 12 methylated tumors (group 3) had an intermediate median PFS (21.7 months, 95% CI: 7.4-35.9) and OS (54.7 months, 95%: 34.2-75.2). A statistical significance ( $p<0.001$ ) was met by comparing these 3 sub-groups. The survival was equal for

patients when their tumors had a methylation rate below or higher than 60%, except for tumors with isolated EGFR and/or PTEN alterations ( $p=0.041$ ).

## Discussion

### Technical issues

The strong prognostic or predictive value of *MGMT* promoter methylation in high-grade gliomas was first established in 2005 by Esteller et al. [5] and, then, confirmed in the landmark EORTC-NCIC study [8] with the reference nested MS-PCR technique. However, up to date, the question of which technique would be the best for the routine assessment of *MGMT* promoter methylation is still debated. In our study, the development of a fluorescent semi-quantitative MS-PCR technique (FSQ-MS-PCR) was aimed to quantify the relative amount of methylated alleles vs unmethylated alleles in the same non-nested PCR reaction. As the methylation of the CpG island region of *MGMT* promoter targeted in the reference MS-PCR has been robustly associated with gene silencing and survival in tumors and cell lines [18, 22], the FSQ-MS-PCR was designed to target the same promoter region (see Figure 1). To date, other methylation-specific methods have been developed, like quantitative real-time PCR (e.g. MethyLight assay), pyrosequencing and more recently high-throughput sequencing [14] but our FSQ-MS-PCR had the clear advantage to be costless, simple and rapid in execution and, easily translatable into routine laboratories. Recent comparative studies have highlighted pyrosequencing but also the classical qualitative MS-PCR as the best clinically relevant techniques [14-17, 23, 14]. The MethyLight assay is a very specific assay, but its sensitivity may be limited by the contamination with unquantified normal cells, so that the enrichment in tumor cells requires micro-dissection. In our study, to exclude contamination by normal cells, the methylation ratio was adjusted to the percentage of tumor cells assessed by the pathologist in each sample. Final results were expressed as relative rates of *MGMT* promoter methylation in tumor cells only and could reflect the intra-tumor heterogeneity throughout the low methylation ratio detection. In fact, the FSQ-MS-PCR showed a very high sensitivity, detecting levels of methylation as low as 1%, with a good qualitative reproducibility. The limit of quantification accuracy of a semi-quantitative technique is usually defined as the lowest dilution of the positive control yielding a coefficient of variation (CV) lower than 20%. This limit for our FSQ-MS-PCR was obtained with the 5% dilution methylated control, above which the inter and intra-assay reproducibility was very good. The other technical issue to be addressed was the feasibility of this FSQ-MS-PCR in the context of FFPE samples. Indeed, the classical MS-PCR is often reproached to be less efficient on damaged DNA extracted from FFPE samples, yielding false-positive results due to incomplete bisulfite conversion [25]. In our study, the comparison of paired fresh-frozen and FFPE samples showed no false positive results and very similar percentages of methylation and allowed to perform FSQ-MS-PCR in both samples with a high reproducibility. Finally, the last technical advantage of the FSQ-MS-PCR over the classical MS-PCR was its ability to detect heterogeneous patterns of methylation. Indeed, the classical MS-PCR is unable to specifically discriminate these patterns. Surprisingly, an intermediate amplification peak of methylation could be detected with the FSQ-MS-PCR defining 3 patterns of methylation in our tumors. The partial methylation was identified concomitantly with a peak of complete methylation (pattern 2) or as a unique peak of methylation (pattern 3). By performing 2 other PCR reactions mixing forward and reverse methylated and

unmethylated primers, we could specify in each tumor the region of partial methylation. Interestingly, a partial methylation of the forward region was associated with a worse PFS in AODs, for both pattern 2 and 3 ( $p=0.04$ ). This heterogeneity in *MGMT* promoter methylation has been described in literature but not linked statistically as in our cohort [9, 19, 26, 27, 28]. These studies were aimed to refine the CpG sites that are associated with a better survival and showed that these individual CpG sites over-lapped with the reverse primer classically used in the standard MS-PCR and in our FSQ-MS-PCR. So, in a study performed in glioblastoma cultured cells and in xenografts, Malley et al. [19] identified two critical regions in *MGMT* promoter: DMR1 and DMR2. 4 CpGs located in DMR2 played a critical role in the transcriptional silencing of *MGMT*, increasing the sensitivity to alkylating agents. Notably, 3 of those CpG islands are targeted by the reverse primer used in our FSQ-MS-PCR (CpG 84 to 87). More recently, using a high-throughput sequencing technique, Hegi et al. described a new prediction model (*MGMT*-STP27) using 2 individual probes (cg1243587 and cg12981137) located in the DMR1 and DMR2 regions respectively [26, 27]. Interestingly, this model was validated as a predictive marker of chemosensitive tumors. It shows that the choice of the targeted promoter region is crucial for a good prediction and that, as shown in our study, the reverse region of the promoter targeted by the MS-PCR is one of the best clinically relevant and significant marker to chemoresponse ever described.

#### **Determination of a clinically relevant cut-off**

The next challenge was to test the FSQ-MS-PCR in a cohort of patients and to determine a clinically relevant cut-off point for an appropriate routine use. Thus, a homogeneously-treated patient cohort of newly diagnosed high-grade gliomas was chosen. In this study, 84 HGGs (56% GBMs and 86% AODs) displayed a detectable *MGMT* promoter methylation amplification peak. With our technique, a calculated methylation ratio lower than 15% was corresponding to extremely low levels of methylation, 5% of methylated tumor cells, and the ratios between 20 and 60% was correlated to minor methylation levels (inferior to 25% tumor cells). As OS is influenced by heterogeneous second-line treatments administered throughout the period study, we used a PFS-based method for the determination of a clinically relevant cut-off point. For both GBMs and AODs, a cut-off for positive calculated ratio was set at 15%. As the FSQ-MS-PCR is only a semi-quantitative method, the positive cut-off was then easily determined according to the 5% methylated control included in each experiment and corresponding to a calculated ratio of 20%. Interestingly, this cut-off point correlates also with the low levels of physiological methylation (less than 5%) described in the literature for normal brain tissues [6, 7, 29]. With this cut-off, 44% of GBMs and 78% of AODs were considered methylated at *MGMT* promoter. These percentages are concordant with the results obtained in literature with the standard MS-PCR, where 40 to 55% GBMs and 60% to 76% AODs are *MGMT* promoter methylated [2, 3, 8, 9, 14, 26, 27, 30-33].

#### **Multivariate analysis and sub-stratification according to *MGMT* promoter methylation percentages**

Several studies have highlighted different clinical and molecular prognostic factors and proposed different scores for the substratification of malignant glial tumors. The main molecular prognostic factors currently described in AODs is the *IDH1* mutation, 1p19q codeletion and the CpG island methylator phenotype (CIMP) [4, 20, 27, 28, 34, 35, 36]. *EGFR* amplification, *PTEN* alteration and chromosome 10



loss has also been correlated with outcome in GBMs and AODs [37-40]. Therefore, to test the predictive independency of *MGMT* promoter methylation, our whole cohort was screened for all these molecular markers. As previously described, AOD tumors displayed frequent *IDH1* mutation (58%) and concomitant 1p19q codeletion (49%), which were strongly associated to *MGMT* promoter methylation. These 3 alterations were significantly correlated to a better outcome. In the last EORTC study, using the new *MGMT*-STP27 prediction model [26], *MGMT* promoter methylation status was a predictive marker of chemoresponse, independently from 1p19q codeletion or *IDH1* mutation. As our study was not randomized towards temozolomide, we could not assess the real predictive versus prognostic value of these markers, but we could only compare the PFS to the OS. In AODs, *MGMT* promoter methylation was the unique independent predictive factor of better PFS and OS. To go further in the analysis, we clustered AOD tumors according to: i) their *MGMT* methylation status (unmethylated, methylated lower or higher than 60% ratios), ii) to the presence of *EGFR* and/or *PTEN* allelic imbalances, iii) to the presence of *IDH1* mutation and/or 1p19q codeletion. Notably, the presence of *EGFR* and/or *PTEN* allelic imbalances, even in the rare concomitant presence of *IDH1* mutation and/or 1p19q codeletion, badly impacted the survival of the patients as previously described for the *EGFR* amplification or chromosome 10 loss in the last EORTC study [26]. In a model where *MGMT* promoter methylation would be predictive of chemoresponse to alkylating agents, tumors with low methylation would be expected to have worse PFS than tumors with higher levels. Such a difference in PFS could only be evidenced in tumors with *EGFR* and/or *PTEN* allelic imbalances, but not in tumors with *IDH1* mutation and/or 1p19q codeletion. To our knowledge, such a sub-stratification has never been described so far for temozolomide-treated AODs. In GBMs, there was no such association and *MGMT* promoter methylation remains the unique prognostic and predictive factor.

### **Intra-tumor heterogeneity of *MGMT* promoter methylation**

*MGMT* promoter methylation is usually considered as an early and homogeneous event in malignant gliomagenesis [11, 29]. However, some studies have shown that the methylation status can change after a first line therapy especially in relapsing GBMs [11, 12, 41, 42], questioning the initial clonal homogeneity of *MGMT* promoter methylation within tumor cells and the value of low methylation rates [43, 44]. Our data suggests a clonal heterogeneity based on the heterogeneous rates of methylation within tumor cells. Studies that showed tumor homogeneity in *MGMT* promoter methylation in stereotaxic biopsies did not use such semi-quantitative assays for the determination of *MGMT* promoter methylation, so that they could have missed heterogeneity within tumors [43, 44]. Therein, analysis of paired relapses confirmed the higher frequency of unmethylated tumors after treatment, especially in GBMs (data not shown). These results plead in favor of an initial clonal heterogeneity leading to the selection of an unmethylated sub-clone not affected by the treatment. Thus, the FSQ-MS-PCR integrating the proportion of tumor cells is an interesting method to unravel the intra-tumor heterogeneity of *MGMT* promoter methylation and prove a transient and partial chemosensitivity in those tumors. This calculation could be influenced by the presence of a chromosome 10 monosomy or partial deletion of 10q chromosome, bearing the *MGMT* and *PTEN* genes. *PTEN* rearrangements were correlated in our cohort to a better survival in GBMs as in cohort treated by TMZ [37], so that the worse prognosis of low

methylated GBMs cannot be explained by an under-estimation of the ratio due to chromosome 10 loss.

**In conclusion**, this retrospective study performed on a HGG cohort allowed us to assess the FSQ-MS-PCR method. In comparison to other quantitative methods, this technique combines low cost, high reproducibility, simplicity and sensitivity. Its prognostic relevance is comparable to the standard MS-PCR method with a clinically relevant cut-off for *MGMT* promoter methylation of 5% methylated tumor cells (calculated ratio of 15%). Moreover this technique allows the detection of partial methylation leading to the detection of an informative intra-tumor *MGMT* status heterogeneity.

**Acknowledgements:** We thank all technicians working in the routine Lab of Molecular Biochemistry and especially Mrs Isabelle Keller, involved in the development of FSQ-MS-PCR

## References

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P : The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007, 114:97-109.
2. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group : Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005, 352:987-996
3. Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, Sabel MC, Koeppen S, Ketter R, Meyermann R, Rapp M, Meisner C, Kortmann RD, Pietsch T, Wiestler OD, Ernemann U, Bamberg M, Reifenberger G, von Deimling A, Weller M : NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol.* 2009, 27:5874-5880
4. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, Hegi ME : *MGMT* promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol.* 2010, 6:39-51
5. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG : Inactivation of the DNA-repair gene *MGMT* and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000, 343:350-354
6. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP : *MGMT*: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst).* 2007, 6:1079-1099
7. Harris LC, Potter PM, Tano K, Shiota S, Mitra S, Brent TP : Characterization of the promoter region of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Res.* 1991, 19:6163-6167.
8. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J,

- Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group : Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009, 10:459-466
9. Wiestler B, Claus R, Hartlieb SA, Schliesser MG, Weiss EK, Hielscher T, Platten M, Dittmann LM, Meisner C, Felsberg J, Hoppold C, Simon M, Nikkhah G, Papsdorf K, Steinbach JP, Sabel M, Grimm C, Weichenhan D, Tews B, Reifenberger G, Capper D, Müller W, Plass C, Weller M, Wick W: Neuro-oncology Working Group (NOA) of the German Cancer Society. Malignant astrocytomas of elderly patients lack favorable molecular markers: an analysis of the NOA-08 study collective. *Neuro Oncol* 2013, 15:1017-26.
  10. Masui K, Cloughesy TF, Mischel PS: Review: molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2012, 38:271-91.
  11. Christmann M, Nagel G, Horn S, Krahn U, Wiewrodt D, Sommer C, Kaina B: MGMT activity, promoter methylation and immunohistochemistry of pretreatment and recurrent malignant gliomas: a comparative study on astrocytoma and glioblastoma. *Int J Cancer* 2010, 127:2106-18.
  12. Park CK, Kim JE, Kim JY, Song SW, Kim JW, Choi SH, Kim TM, Lee SH, Kim IH, Park SH: The Changes in MGMT Promoter Methylation Status in Initial and Recurrent Glioblastomas. *Transl Oncol* 2012, 5:393-7.
  13. Vlassenbroeck I, Califice S, Diserens AC, Migliavacca E, Straub J, Di Stefano I, Moreau F, Hamou MF, Renard I, Delorenzi M, Flamion B, DiGuseppi J, Bierau K, Hegi ME: Validation of real-time methylation-specific PCR to determine O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene promoter methylation in glioma. *J Mol Diagn.* 2008, 10:332-337.
  14. Quillien V, Lavenu A, Karayan-Tapon L, Carpentier C, Labussière M, Lesimple T, Chinot O, Wager M, Honnorat J, Saikali S, Fina F, Sanson M, Figarella-Branger D: Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer* 2012, 118:4201-11.
  15. Håvik AB, Brandal P, Honne H, Dahlback HS, Scheie D, Hektoen M, Meling TR, Helseth E, Heim S, Lothe RA, Lind GE: MGMT promoter methylation in gliomas-assessment by pyrosequencing and quantitative methylation-specific PCR. *J Transl Med* 2012, 10:36.
  16. Preusser M, Berghoff AS, Manzl C, Filipits M, Weinhäusel A, Pulverer W, Dieckmann K, Widhalm G, Wöhrer A, Knosp E, Marosi C, Hainfellner JA: Clinical Neuropathology practice news 1-2014: Pyrosequencing meets clinical and analytical performance criteria for routine testing of MGMT promoter methylation status in glioblastoma. *Clin Neuropathol* 2014, 33:6-14.
  17. Quillien V, Lavenu A, Sanson M, Legrain M, Dubus P, Karayan-Tapon L, Mosser

- J, Ichimura K, Figarella-Branger D. Outcome-based determination of optimal pyrosequencing assay for MGMT methylation detection in glioblastoma patients. *J Neurooncol* 2014, 116:487-96.
18. Everhard S, Tost J, El Abdalaoui H, Crinière E, Busato F, Marie Y, Gut IG, Sanson M, Mokhtari K, Laigle-Donadey F, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Thillet J : Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro Oncol.* 2009, 11:348-356
  19. Malley DS, Hamoudi RA, Kocalkowski S, Pearson DM, Collins VP, Ichimura K : A distinct region of the MGMT CpG island critical for transcriptional regulation is preferentially methylated in glioblastoma cells and xenografts. *Acta Neuropathol.* 2011, 121:651-661
  20. Capper D, Weissert S, Balss J, Habel A, Meyer J, Jäger D, Ackermann U, Tessmer C, Korshunov A, Zentgraf H, Hartmann C, von Deimling A : Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol* 2010, 20:245-254.
  21. Weber JC, Schneider A, Rohr S, Nakano H, Bachellier P, Méchine A, Hamel G, Kanor M, Chenard MP, Gaub MP, Oudet P, Meyer C, Jaeck D: Analysis of allelic imbalance in patients with colorectal cancer according to stage and presence of synchronous liver metastases. *Ann Surg* 2001, 234:795-802; discussion 802-3.
  22. van Vlodrop IJ, Niessen HE, Derks S, Baldewijns MM, van Criekinge W, Herman JG, van Engeland M : Analysis of promoter CpG island hypermethylation in cancer: location, location, location! *Clin Cancer Res.* 2011, 17:4225-4231.
  23. Christians A, Hartmann C, Benner A, Meyer J, von Deimling A, Weller M, Wick W, Weiler M: Prognostic value of three different methods of MGMT promoter methylation analysis in a prospective trial on newly diagnosed glioblastoma. *PLoS One.* 2012, 7:e33449.
  24. Shah N, Lin B, Sibenaller Z, Ryken T, Lee H, Yoon JG, Rostad S, Foltz G : Comprehensive analysis of MGMT promoter methylation: correlation with MGMT expression and clinical response in GBM. *PLoS One.* 2011, 6:e16146.
  25. Preusser M, Plumer S, Dirnberger E, Hainfellner JA, Mannhalter C: Fixation of brain tumor biopsy specimens with RCL2 results in well-preserved histomorphology, immunohistochemistry and nucleic acids. *Brain Pathol* 2010, 20:1010-20.
  26. van den Bent MJ, Erdem-Eraslan L, Idbaih A, de Rooi J, Eilers PH, Spliet WG, den Dunnen WF, Tijssen C, Wesseling P, Sillevis Smitt PA, Kros JM, Gorlia T, French PJ : MGMT-STP27 methylation status as predictive marker for response to PCV in anaplastic Oligodendrogliomas and Oligoastrocytomas. A report from EORTC study 26951. *Clin Cancer Res.* 2013, 19:5513-5522
  27. Bady P, Sciuscio D, Diserens AC, Bloch J, van den Bent MJ, Marosi C, Dietrich PY, Weller M, Mariani L, Heppner FL, McDonald DR, Lacombe D, Stupp R, Delorenzi M, Hegi ME : MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta Neuropathol.* 2012, 124:547-560
  28. Weller M, Stupp R, Hegi ME, van den Bent M, Tonn JC, Sanson M, Wick W, Reifenberger G : Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice.

Neuro Oncol. 2012, 14 Suppl 4:iv100-8.

29. Christmann M, Verbeek B, Roos WP, Kaina B: O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim Biophys Acta*. 2011, 1816:179-190
30. Cairncross G, Wang M, Shaw E, Jenkins R, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Curran W, Mehta M: Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. *J Clin Oncol*. 2013, 31:337-343
31. van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJ, Kros JM, Kouwenhoven MC, Delattre JY, Bernsen HJ, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipos L, Enting RH, French PJ, Dinjens WN, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T, Hoang-Xuan K. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol*. 2013, 31:344-350
32. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Sanson M, van der Lee-Haarloo CR, Hegi M, Jeuken JW, Ibdaih A, Brandes AA, Taphoorn MJ, Frenay M, Lacombe D, Gorlia T, Dinjens WN, Kros JM: MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol*. 2009, 27:5881-5886
33. van den Bent MJ, Gravendeel LA, Gorlia T, Kros JM, Lapre L, Wesseling P, Teepen JL, Idbaih A, Sanson M, Smitt PA, French PJ: A hypermethylated phenotype is a better predictor of survival than MGMT methylation in anaplastic oligodendroglial brain tumors: a report from EORTC study 26951. *Clin Cancer Res*. 2011, 17:7148-7155
34. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, Brandes AA, Taphoorn MJ, Wesseling P, Frenay M, Tijssen CC, Lacombe D, Idbaih A, van Marion R, Kros JM, Dinjens WN, Gorlia T, Sanson M: IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Clin Cancer Res*. 2010, 16:1597-1604
35. Mulholland S, Pearson DM, Hamoudi RA, Malley DS, Smith CM, Weaver JM, Jones DT, Kocialkowski S, Bäcklund LM, Collins VP, Ichimura K: MGMT CpG island is invariably methylated in adult astrocytic and oligodendroglial tumors with IDH1 or IDH2 mutations. *Int J Cancer*. 2012, 131:1104-1113
36. Gorlia T, Delattre JY, Brandes AA, Kros JM, Taphoorn MJ, Kouwenhoven MC, Bernsen HJ, Frénay M, Tijssen CC, Lacombe D, van den Bent MJ: New clinical, pathological and molecular prognostic models and calculators in patients with locally diagnosed anaplastic oligodendroglioma or oligoastrocytoma. A prognostic factor analysis of European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour Group Study 26951. *Eur J Cancer*. 2013, 49:3477-3485
37. Carico C, Nuño M, Mukherjee D, Elramsisy A, Dantis J, Hu J, Rudnick J, Yu JS, Black KL, Bannykh SI, Patil CG: Loss of PTEN is not associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma patients of the temozolomide era. *PLoS One*. 2012, 7:e33684.

38. Carico C, Nuño M, Mukherjee D, Elramsisy A, Dantis J, Hu J, Rudnick J, Yu JS, Black KL, Bannykh SI, Patil CG: Loss of PTEN is not associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma patients of the temozolomide era. *PLoS One* 2012, 7:e33684.
39. Bieńkowski M, Piaskowski S, Stoczyńska-Fidelus E, Szybka M, Banaszczyk M, Witusik-Perkowska M, Jesień-Lewandowicz E, Jaskólski DJ, Radomiak-Załużka A, Jesionek-Kupnicka D, Sikorska B, Papierz W, Rieseke P, Liberski PP: Screening for EGFR amplifications with a novel method and their significance for the outcome of glioblastoma patients. *PLoS One* 2013, 8:e65444.
40. Zalutino O, Zoccoli CM, Patel A, Weston CL, Glantz M: Impact of genetic targets on primary brain tumor therapy: what's ready for prime time? *Adv Exp Med Biol* 2013, 779:267-89.
41. Christmann M, Nagel G, Horn S, Krahn U, Wiewrodt D, Sommer C, Kaina B : MGMT activity, promoter methylation and immunohistochemistry of pretreatment and recurrent malignant gliomas: a comparative study on astrocytoma and glioblastoma. *Int J Cancer*. 2010 127:2106-2118
42. Jung TY, Jung S, Moon KS, Kim IY, Kang SS, Kim YH, Park CS, Lee KH. Changes of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation and MGMT protein expression after adjuvant treatment in glioblastoma. *Oncol Rep*. 2010, 23:1269-1276
43. Grasbon-Frodl EM, Kreth FW, Ruitter M, Schnell O, Bise K, Felsberg J, Reifenberger G, Tonn JC, Kretzschmar HA : Intratumoral homogeneity of MGMT promoter hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Int J Cancer*. 2007, 121:2458-2464
44. Parkinson JF, Wheeler HR, Clarkson A, McKenzie CA, Biggs MT, Little NS, Cook RJ, Messina M, Robinson BG, McDonald KL : Variation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in serial samples in glioblastoma. *J Neurooncol*. 2008, 87:71-78

**Table 1: Numbers (N) and percentage (%) of patients for the clinical data in AODs or GBMs**

PATIENTS' CLINICAL DATA	AODs	GBMs	p value
	N (%)	N (%)	
<b>Global cohort</b>	49 (40)	75 (60)	
<b>Age (years)</b>			
≥50	21 (43)	65 (87)	<0,001
<50	28 (57)	10 (13)	
≥70	2 (4)	16 (21)	<0,05
<70	47 (96)	59 (79)	
<b>Sex</b>			
Male	27 (55)	47 (63)	NS
Female	22 (45)	28 (37)	
<b>Evolution from a low-grade oligodendroglioma</b>			
Yes	13 (27)	1 (1)	<0,001
No	36 (73)	74 (99)	
<b>Extent of surgery (%)</b>			
Gross Total resection	18 (37)	22 (30)	NS
Sub-total resection	12 (25)	27 (36)	
Partial resection	11 (22)	10 (13)	
Biopsy	5 (10)	12 (16)	
<b>Radiotherapy total dose (Gy)</b>			
≥60	43 (88)	54 (72)	<0,05
<60	6 (12)	21 (28)	
<b>Adjuvant temozolomide courses</b>			
≥6	33 (68)	34 (45)	<0,01
<6	11 (22)	33 (44)	
Missing data	5 (10)	8 (11)	

A statistical comparison is made between AODs and GBMs with a significant p value <0.05. AOD: Anaplastic oligodendroglioma; GBM: Glioblastoma; NS : Not significant; Gy : Grays

**Table 2: Numbers (N) and percentage (%) of patients for the molecular markers and AODs or GBMs**

MOLECULAR MARKERS	AODs	GBMs	P value
	N (%)	N (%)	
<b>MGMT promoter methylation (calculated ratio of methylated tumor cells)</b>			
Unmethylated <15%	12 (24)	43 (57)	
Methylated (15%-60%)	17 (35)	19 (26)	
Methylated ≥ 60%	20 (41)	13 (17)	<0,001
<b>IDH1 R132 mutation</b>			
Mutation	21 (43)	1 (1)	
Wild-type	15 (31)	33 (44)	<0,001
Missing Data	13 (26)	41 (55)	
<b>1p/19q codeletion</b>			
Presence	20 (41)	7 (9)	
Absence	19 (39)	61 (81)	<0,001
Non informative	3 (6)	1 (8)	
Missing data	7 (14)	6 (2)	
<b>EGFR</b>			
Allelic imbalance	13 (27)	52 (69)	
Normal	29 (59)	14 (19)	<0,001
Non informative	0	0	
Missing data	7 (14)	9 (12)	
<b>PTEN</b>			
Allelic imbalance	15 (31)	37 (49)	
Normal	20 (41)	10 (13)	<0,001
Non informative	7 (14)	17 (23)	
Missing data	7 (14)	11 (15)	
<b>TP53</b>			
Allelic imbalance	8 (17)	25 (33)	
Normal	28 (57)	38 (51)	
Non informative	6 (12)	4 (5)	NS
Missing data	7 (14)	8 (11)	

A statistical comparison is made between AODs and GBMs with a significant p value <0.05. AOD: Anaplastic oligodendroglioma; GBM: Glioblastoma; NS : Not significant



**Table 3: Reproducibility in high grade glioma samples.**

Samples	Conversion 1		Conversion 2		Conversion 3		Inter-Assay	
	Mean	%CV	Mean	%CV	Mean	%CV	Mean	%CV
A288	27	23	26	18	28	3	27	15
A302	16	9	19	10	20	10	18	12
A307	14	17	14	14	13	5	14	12
A311	7	16	8	18	6	6	7	17
5%	17	9	15	7	15	7	16	9

Three different bisulfite conversions were performed on each sample and processed for methylation analysis. The mean percentage of methylation (Mean) and the coefficient of variation (% CV) are reported for each conversion experiment (intra-assay precision) and for a global inter-assay precision. To control the quantification threshold, a mixture of 5% methylated control was included in each experiment.

**Table 4: Comparison between fresh-frozen or FFPE (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded) paired samples of 14 HGG tumors.**

TUMORS	Fresh-Frozen Samples			FFPE Samples			%CV	%CV A
	%TC	Mean	Mean A	%TC	Mean	Mean A		
1	90	72	80	90	60	67	13	13
2	90	0	0	90	0	0	0	0
3	90	0	0	80	0	0	0	0
4	60	0	0	90	0	0	0	0
5	90	69	77	80	63	79	6	2
6	90	0	0	90	0	0	0	0
7	80	0	0	80	0	0	0	0
8	70	15	21	80	13	16	10	19
9	80	15	19	80	26	33	38	38
10	70	30	43	90	50	56	35	19
11	90	0	0	80	0	0	0	0
12	80	0	0	80	0	0	0	0
13	90	0	0	80	0	0	0	0
14	70	0	0	80	0	0	0	0

Each sample was converted and analyzed in duplicate. The percentage of tumor cells (%TC), the mean percentage of methylation (Mean) and the mean percentage of methylation adjusted to the percentage of tumor cells (Mean A) are indicated for each sample. Coefficients of variation of the percentages of methylation (% CV) and the adjusted percentages of methylation (% CV A) were calculated between the fresh-frozen and the FFPE paired samples.

**Table 5: Univariate analysis of survival in AODs tumors.**

	Progression Free Survival		Overall Survival	
	Median in months (95% CI)	5 years % (SE)	Median in months (95% CI)	5 years % (SE)
<b>GLOBAL</b>	31.9 (10.3-53.6)	35 (8)	71.1 (55.8-86.5)	50 (8)
<b>Sex</b>				
<b>Male</b>	30.4 (14.3-46.5)	36 (10)	66.1 (27.5-104.7)	37 (12)
<b>Female</b>	50.2 (27.0-74.5)	38 (12)	71.1 (54.6-79.5)	54 (13)
<b>Age</b>				
<b>≥50y</b>	26.2 (6.6-45.7)	30 (12)	46.5 (10.8-82.2)	37 (12)
<b>&lt;50y</b>	50.2 (14.2-86.2)	41 (10)	77.4 (62.9-91.0)*	48 (15)
<b>Surgery</b>				
<b>Biopsy</b>	5.7 (4.1-7.2)	0	11.5 (2.1-21.0)	0
<b>Resection</b>	39.3 (3.5-75.2)***	40 (9)	77.4 (59.3-84.4)***	47 (11)
<b>Total radiation dose</b>				
<b>60 Gy</b>	39.3 (10.2-68.5)	41 (8)	77.4 (55.5-99.3)	43 (12)
<b>&lt;60 Gy</b>	12.9 (1.3-24.5)	0	71.1 (0-168.8)	30 (24)
<b>MGMT promoter methylation</b>				
<b>&lt;15%</b>	8.3 (5.6-10.9)	0	12.3 (0.1-24.5)	0
<b>15-60%</b>	26.2 (11.0-41.3)*	28 (12)	71.1 (55.8-93.8)**	50 (12)
<b>≥60%</b>	NR**	56 (12)	NR***	50 (19)
<b>1p19q codeletion</b>				
<b>Presence</b>	64.5 (36.8-69.5)	48 (12)	NR	53 (16)
<b>Absence</b>	30.4 (4.9-55.9)	15 (10)	46.6 (28.3-64.8)*	24 (12)
<b>IDH1 mutation</b>				
<b>Mutated</b>	64.1 (42.9-85.3)	41 (12)	NR	51 (14)
<b>Wild type</b>	12.9 (7.1-18.7)**	10 (9)	20.8 (12.9-28.7)**	15 (11)
<b>EGFR</b>				
<b>Allelic imbalance</b>	10.4 (4.7-16.1)	10 (9)	16.2 (3.2-29.2)	8 (8)
<b>Normal</b>	64.1 (47.3-80.9)**	47 (10)	NR***	58 (14)
<b>PTEN</b>				
<b>Allelic imbalance</b>	16.1 (7.4-24.8)	16 (10)	20.8 (0-54.2)	24 (11)
<b>Normal</b>	64.5 (63.6-65.4)**	54 (13)	NR***	57 (21)
<b>TP53</b>				
<b>Allelic imbalance</b>	31.9 (1.2-62.7)	36 (17)	63.2 (35.5-90.9)	19 (22)
<b>Normal</b>	36.9 (0-78.8)	36 (10)	71.1 (53.0-79.3)	51 (10)

AOD : Anaplastic oligodendroglioma; CI : Confidence interval; SE : Standard error; Gy : Grays; NR : Not reached; \* : p<0.05; \*\* : p<0.005; \*\*\* : p<0.0005

**Table 6: Univariate analysis of survival in GBM tumors.**

	Progression Free Survival			Overall Survival		
	Median in months (95% CI)	1 year % (SE)	2 years % (SE)	Median in months (95% CI)	1 year % (SE)	2 years % (SE)
<b>GLOBAL</b>	10.8 (8.7-13.0)	21 (5)	12 (5)	17.5 (15.3-19.6)	31 (5)	16 (4)
<b>Sex</b>						
<b>Male</b>	8.6 (5.6-11.5)	18 (7)	11 (6)	18.7 (15.6-21.8)	23 (6)	13 (5)
<b>Female)</b>	13.1 (7.8-18.4)	25 (9)	14 (8)	17.3 (13.4-21.4)	43 (9)	20 (8)
<b>Age</b>						
<b>≥70y</b>	7.9 (3.7-12.2)	25 (13)	25 (13)	16.6 (5.7-27.5)	25 (11)	11 (8)
<b>&lt;70y</b>	10.9 (9.8-12.1)	20 (6)	10 (5)	18.7 (16.3-21.1)	32 (6)	18 (5)
<b>≥50y</b>	10.9 (8.2-13.6)	21 (6)	11 (5)	17.5 (15.5-19.6)	30 (6)	17 (5)
<b>&lt;50y</b>	10.9 (5.2-16.6)	15 (13)	15 (13)	12.7 (11.8-13.7)	34 (16)	11 (11)
<b>Surgery</b>						
<b>Biopsy</b>	13.1 (10.2-16.1)	32 (16)	0	17.5 (3.5-31.6)	28 (14)	9 (9)
<b>Resection</b>	10.8 (7.9-13.8)	19 (6)	14 (5)	18.8 (16.0-21.5)	34 (6)	19 (5)
<b>Total radiation dose</b>						
<b>60 Gy</b>	11.2 (8.3-14.1)	22 (6)	11 (5)	19.4 (18.1-20.8)	35 (7)	19 (5)
<b>&lt;60 Gy</b>	5.5 (4.0-7.0)*	18 (10)	18 (10)	7.2 (1.9-12.5)**	21 (9)	9 (7)
<b>MGMT promoter methylation</b>						
<b>&lt;15%</b>	6.9 (5.4-8.5)	9 (5)	0	14.8 (10.5-19.1)	18 (6)	7 (4)
<b>15-60%</b>	9.0 (0-17.2)*	26 (13)	26 (13)	20.4 (7.5-33.3)*	50 (13)	25 (12)
<b>≥60%</b>	14.8 (0-30.5)***	50 (15)	30 (14)	28.2 (18.7-37.8)**	58 (14)	42 (14)
<b>1p19q codeletion</b>						
<b>Presence</b>	14.1 (4.8-23.4)	35 (20)	35 (20)	19.8 (16.8-22.7)	29 (17)	29 (17)
<b>Absence</b>	9.9 (6.6-13.2)	18 (6)	10 (5)	17.4 (15.2-19.7)	31 (6)	13 (5)
<b>EGFR status</b>						
<b>Allelic imbalance</b>	10.9 (9.6-12.2)	18 (6)	15 (6)	18.7 (16.4-21.0)	31 (7)	11 (5)
<b>Normal</b>	8.6 (3.2-13.9)	19 (12)	10 (9)	12.4 (6.0-18.8)	29 (12)	21 (11)
<b>PTEN status</b>						
<b>Allelic imbalance</b>	14.6 (9.7-19.4)	30 (9)	21 (8)	18.6 (15.9-21.4)	37 (8)	19 (7)
<b>Normal</b>	5.4 (3.6-7.2)**	0	0	12.4 (9.5-15.3)*	10 (9)	0
<b>TP53 status</b>						
<b>Allelic imbalance</b>	9.9 (6.4-13.4)	14 (7)	5 (5)	17.4 (11.6-23.1)	25 (9)	13 (7)
<b>Normal</b>	10.9 (7.4-14.5)	24 (8)	24 (8)	18.8 (15.4-22.1)	31 (8)	15 (6)

GBM : Glioblastoma; CI : Confidence interval; SE : Standard error; Gy : Grays; NR : Not reached; \* : p<0.05; \*\* : p<0.005; \*\*\* : p<0.0005

## Supplementary data

**Table S1 : Optimal risk cut-off determination in AODs.**

<b>PFS ≥</b>	<b>AUC (95% CI)</b>	<b>SE</b>	<b>SP</b>	<b>PPV</b>	<b>NPV</b>
<b>6 months</b>					
CU=2%	0.640 (0.353-0.928)	88	40	92	29
CU=5%	0.629 (0.343-0.914)	86	40	92	27
<b>CU=15%</b>	<b>0.705 (0.439-0.970)</b>	<b>81</b>	<b>60</b>	<b>94</b>	<b>25</b>
CU=20%	0.693 (0.428-0.958)	79	60	94	24
CU=30%	0.669 (0.404-0.934)	74	60	94	21
CU=50%	0.686 (0.454-0.917)	57	80	96	18
CU=60%	0.614 (0.370-0.859)	43	80	96	14
<b>12 months</b>					
CU=2%	0.736 (0.545-0.926)*	97	50	85	86
CU=5%	0.721 (0.531-0.912)*	94	50	85	75
CU=15%	0.735 (0.551-0.918)*	89	58	86	67
<b>CU=20%</b>	<b>0.776 (0.604-0.948)**</b>	<b>89</b>	<b>70</b>	<b>88</b>	<b>67</b>
CU=30%	0.748 (0.573-0.922)*	83	70	88	57
CU=50%	0.745 (0.588-0.903)*	66	83	92	45
CU=60%	0.715 (0.561-0.869)*	51	92	95	39
<b>24 months</b>					
CU=2%	0.659 (0.498-0.820)	100	32	62	100
CU=5%	0.682 (0.524-0.840)*	100	36	64	100
CU=15%	0.665 (0.505-0.824)	92	41	64	82
CU=20%	0.687 (0.530-0.844)*	92	45	66	83
CU=30%	0.647 (0.486-0.808)	84	45	66	71
CU=50%	0.701 (0.548-0.854)*	72	62	72	68
<b>CU=60%</b>	<b>0.752 (0.609-0.895)**</b>	<b>64</b>	<b>86</b>	<b>84</b>	<b>68</b>
<b>36 months</b>					
CU=2%	0.635 (0.477-0.793)	100	27	53	100
CU=5%	0.654 (0.498-0.810)	100	31	54	100
CU=15%	0.625 (0.466-0.785)	91	35	55	83
CU=20%	0.645 (0.487-0.802)	91	38	56	83
CU=30%	0.640 (0.481-0.799)	86	42	57	78
CU=50%	0.665 (0.520-0.819)*	71	62	60	73
<b>CU=60%</b>	<b>0.694 (0.538-0.850)*</b>	<b>62</b>	<b>77</b>	<b>68</b>	<b>71</b>

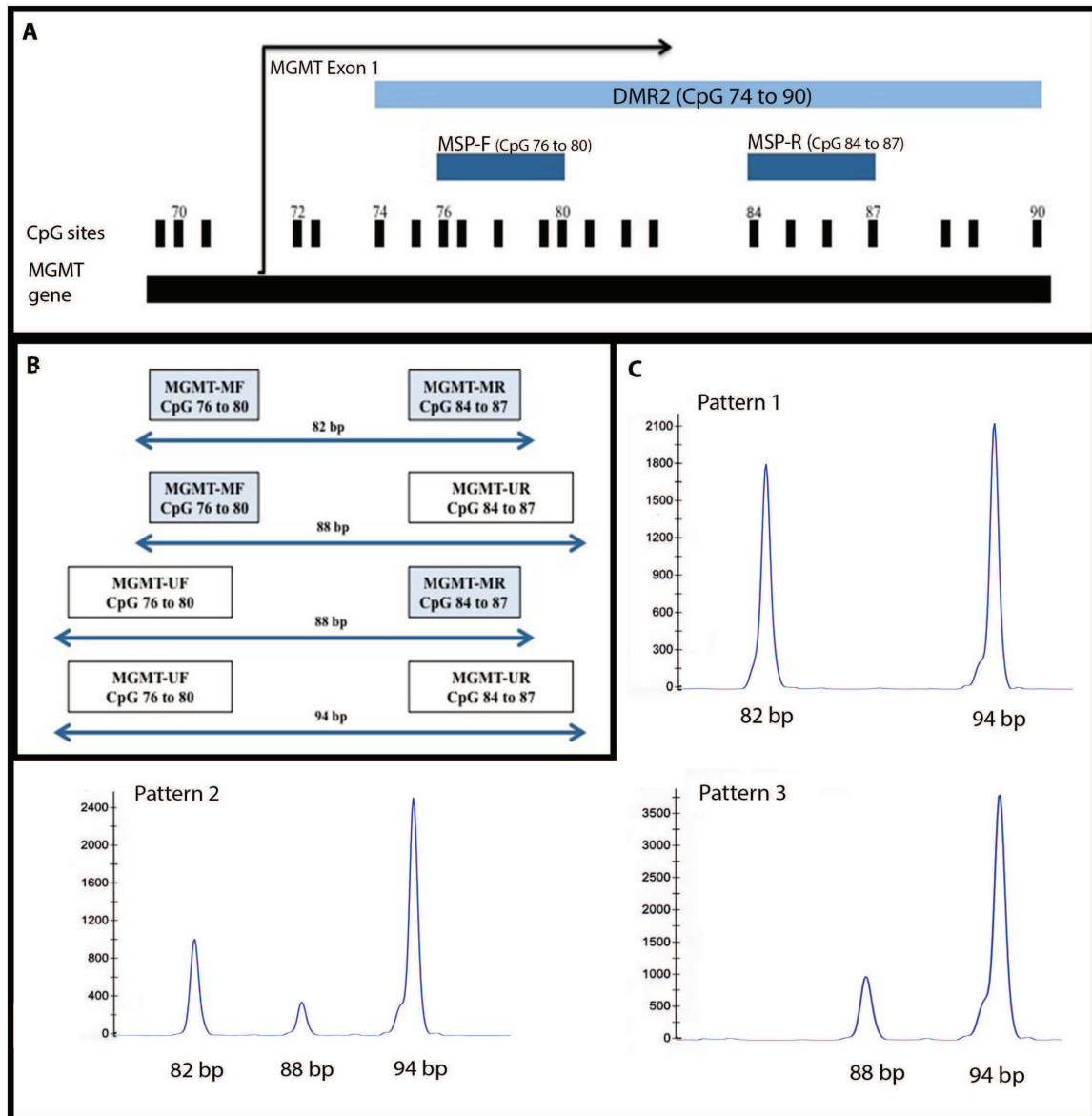
The optimal cut-off (in bold characters) is defined as the cut-off with the best area under the curve (AUC) able to discriminate PFS longer than the time-point analysis fixed at 6, 12, 24 or 36 months. These AUC were derived from time-dependent receiver operating characteristic curves (ROC) obtained with a Cox model. CU= Cut-off points of MGMT methylation percentage; SE : Sensitivity; SP : Specificity; PPV : Positive predictive value; NPV : Negative predictive value; \* : p<0.05; \*\* : p<0.005

**Table S2 : Optimal risk cut-off determination in GBMs.**

<b>PFS ≥</b>	<b>AUC (95% CI)</b>	<b>SE</b>	<b>SP</b>	<b>PPV</b>	<b>NPV</b>
<b>6 months</b>					
CU=1%	0.584 (0.448-0.719)	63	53	65	52
CU=5%	0.576 (0.441-0.711)	59	57	65	50
CU=15%	0.589 (0.455-0.724)	52	67	68	50
CU= CTRL	0.602 (0.468-0.735)	54	67	69	52
<b>CU=20%</b>	<b>0.644 (0.515-0.773)*</b>	<b>49</b>	<b>80</b>	<b>77</b>	<b>53</b>
CU=30%	0.612 (0.481-0.743)	39	83	77	51
CU=50%	0.580 (0.446-0.713)	27	87	77	47
CU=60%	0.567 (0.434-0.701)	24	93	83	47
<b>12 months</b>					
CU=1%	0.683 (0.555-0.811)*	80	56	50	84
CU=5%	0.653 (0.521-0.786)*	72	59	50	79
CU=15%	0.688 (0.556-0.819)*	68	70	55	79
CU= CTRL	0.708 (0.580-0.836)**	72	70	56	82
<b>CU=20%</b>	<b>0.711 (0.580-0.842)**</b>	<b>64</b>	<b>78</b>	<b>62</b>	<b>80</b>
CU=30%	0.673 (0.536-0.810)*	52	83	62	76
CU=50%	0.615 (0.472-0.757)	36	87	62	71
CU=60%	0.647 (0.505-0.790)*	36	93	75	71
<b>24 months</b>					
CU=1%	0.620 (0.469-0.772)	75	50	30	88
CU=5%	0.648 (0.499-0.797)	75	55	32	88
CU=15%	0.702 (0.558-0.847)*	75	65	38	90
CU= CTRL	0.693 (0.548-0.838)*	75	64	38	90
<b>CU=20%</b>	<b>0.707 (0.559-0.856)*</b>	<b>67</b>	<b>73</b>	<b>42</b>	<b>89</b>
CU=30%	0.672 (0.513-0.831)*	56	78	43	86
CU=50%	0.606 (0.439-0.772)	38	84	43	82
CU=60%	0.633 (0.465-0.801)	38	89	50	83
<b>36 months</b>					
CU=1%	0.742 (0.604-0.880)*	100	50	18	100
CU=5%	0.766 (0.637-0.895)*	100	60	19	100
CU=15%	0.813 (0.702-0.923)*	100	66	23	100
CU= CTRL	0.805 (0.691-0.918)**	100	61	23	100
CU=20%	0.852 (0.757-0.946)**	100	72	27	100
<b>CU=30%</b>	<b>0.891 (0.812-0.969)**</b>	<b>100</b>	<b>81</b>	<b>33</b>	<b>100</b>
CU=50%	0.779 (0.576-0.982)*	71	84	33	96
CU=60%	0.802 (0.599-1.000)*	71	89	42	96

The optimal cut-off (in bold characters) is defined as the cut-off with the best area under the curve (AUC) able to discriminate PFS longer than the time-point analysis fixed at 6, 12, 24 or 36 months. These AUC were derived from time-dependent receiver operating characteristic curves (ROC) obtained with a Cox model. CU= Cut-off points of MGMT methylation percentage; SE : Sensitivity; SP : Specificity; PPV : Positive predictive value; NPV : Negative predictive value; \* : p<0.05; \*\* : p<0.005

## FIGURES

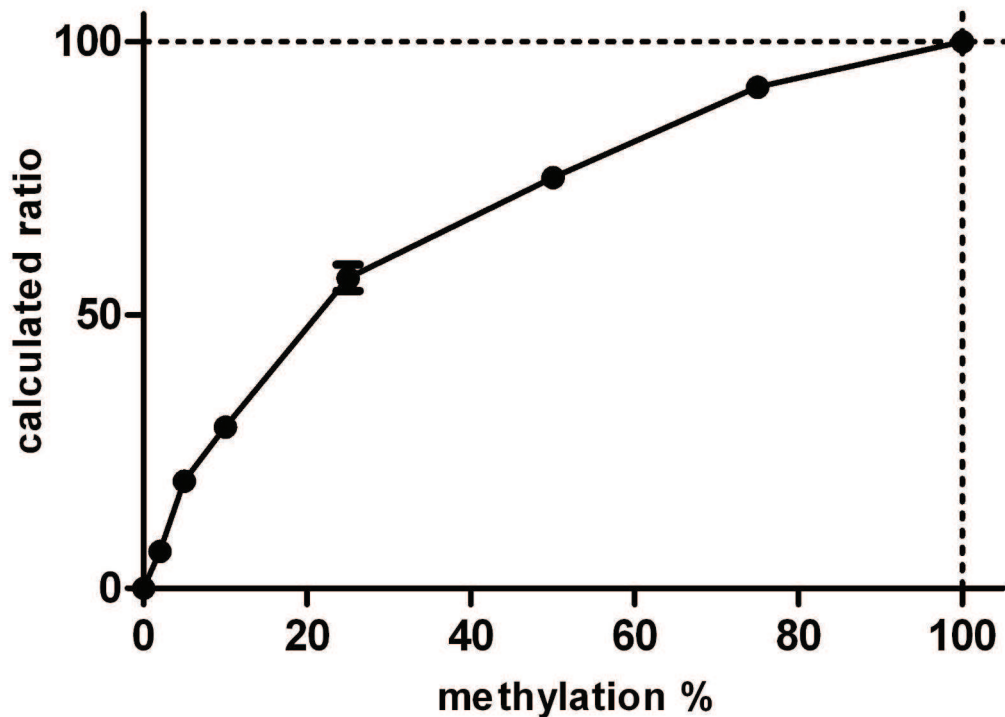


**Figure 1: A) Localization of the MSP primers (MSP-F and MSP-R) within the CpG island of *MGMT* promoter.** The different CpG sites are numbered and annotated relative to the transcription site (TSS), the minimal promoter and enhancer regions, the beginning of exon 1 and the differentially methylated region 2 (DMR2). **B) The 4 different PCR products detected with the FSQ-MS-PCR.** Two pairs of fluorescent-labeled primers UF and UR (recognizing unmethylated cytosines) and MF and MR (recognizing methylated cytosines) were multiplexed in one PCR reaction for the relative quantification of methylated vs unmethylated alleles. The discrimination between methylated and unmethylated PCR products was based on their different sizes after capillary electrophoresis. UF and UR were designed to target the same region than MF and MR but with 6 additional bp upstream or downstream. The unmethylated and methylated PCR products were then detected with sizes of 94 bp and 82 bp respectively. The combination of UF with MR or MF with UR resulted in 88 bp size PCR products, corresponding to the partial methylation of either the forward or the reverse part of the amplified fragment. **C)**

**Examples of the methylation patterns detected with the FSQ-MS-PCR. Pattern 1**, only 1 peak of 82 bp was detected indicating a complete methylation. **Pattern 3**, only 1 peak of 88 bp was detected indicating a partial methylation and **in pattern 2**, the 2 peaks of methylation were coexisting (82 bp + 88 bp) indicating a concomitant partial and complete methylation.

AOD n=49	GBM n=75	AGE >70
AOD n=2 / GBM n=16		
<p style="text-align: center;"><b>Surgery</b></p> Biopsy n=5 Partial n=11 Subtotal n=12 Gross Total n=18 NA n=3	<p style="text-align: center;"><b>Surgery</b></p> Biopsy n=13 Partial n=9 Subtotal n=27 Gross Total n=22 NA n=4	<p style="text-align: center;"><b>Surgery</b></p> Biopsy n=5 Partial n=5 Subtotal n=4 Gross Total n=4
<p style="text-align: center;"><b>RT + TMZ</b></p> 60 Gy n=43 40,5 Gy (age-adapted) n= 2 50-56 Gy (large tumor size) n=4 Death during RT: 0	<p style="text-align: center;"><b>RT + TMZ</b></p> 60 Gy n=54 40,5 Gy (age-adapted) n= 12 50-56 Gy (large tumor size) n=6 Death during RT: 3	<p style="text-align: center;"><b>RT + TMZ</b></p> 60 Gy n=4 40,5 Gy n= 14
<p style="text-align: center;"><b>Adjuvant TMZ</b></p> Yes: n=45 No: n=2 Not detailed: 2	<p style="text-align: center;"><b>Adjuvant TMZ</b></p> Yes: n=60 No: n=10 Not detailed: n=2	<p style="text-align: center;"><b>Adjuvant TMZ</b></p> Yes: n=10 No: n=6

**Figure 2. Patients' treatment Flow-Chart.** AODs: Anaplastic oligodendrogliomas; GBMs: Glioblastomas; RT: radiotherapy; TMZ: temozolomide; NA: not available



**Figure 3: Linearity curve of the FSQ-MS-PCR.** The fully methylated control was iteratively diluted with the unmethylated control to obtain 9 samples with theoretical percentages of methylation ranging from 0 to 100% (0,1,2,5,10,25,50,75 and 100%). Four different bisulfite conversions were performed for each sample and processed for methylation analysis on 3 different PCR. The observed percentages of methylation were calculated and reported in a linearity curve linking theoretical to observed percentages of methylation.



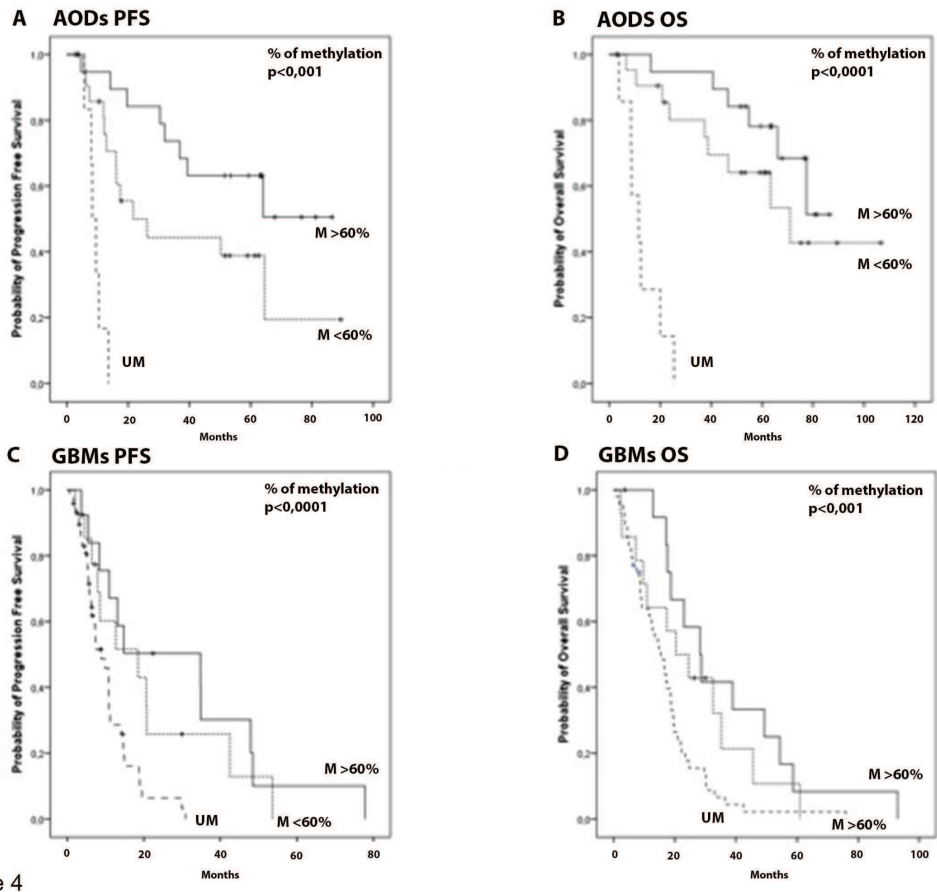
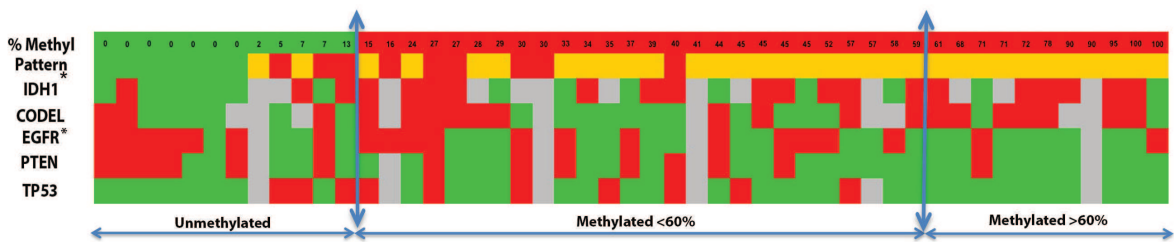


Figure 4

**Figure 4: Survival analysis according to the percentage of MGMT promoter methylation (Kaplan-Meier curves and log-rank analysis).** AODs: Anaplastic oligodendrogliomas; GBMs: Glioblastomas; PFS: Progression free survival; OS: Overall survival



**Figure 5: Clustering of *IDH1* mutation, 1p19q codeletion, *EGFR* and *PTEN* rearrangements according to the percentage of *MGMT* promoter methylation in AODs tumors.** Unmethylated tumors (% of methylation <15%) are reported in green, partial methylations in red and complete methylations in orange. *IDH1* mutated tumors are reported in red and wild-type in green. Codeleted and non-codeleted tumors are noticed in red and green, respectively. *EGFR* and *PTEN* rearrangements are reported in red, while their normal counterparts in green. A difference in the % of each marker between the 3 sub-groups of methylation % (unmethylated vs methylated <60% vs methylated >60%) was reported as significant if  $p < 0,05$ : \*).

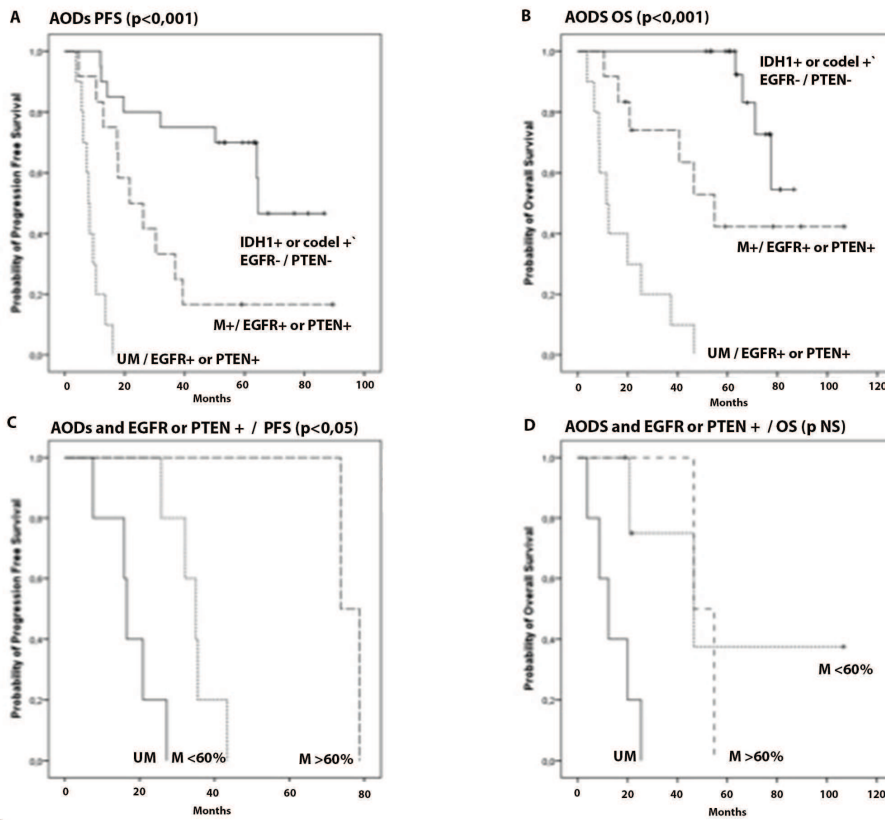


Figure 6

**Figure 6: Survival analysis in AODs tumors. A,B) Sub-classification of AODs tumors according to *MGMT* promoter methylation, *EGFR/PTEN* and *IDH1/1p19q* codeletion status. Group 1 consists in *IDH1* mutated or codeleted tumors without any rearrangement of *EGFR* or *PTEN* (*IDH1*+ or codeletion+, *EGFR*- and *PTEN*-) whatever the status of methylation (methylated or unmethylated). Group 2 includes methylated (M+) *EGFR* or *PTEN* rearranged tumors (*EGFR*+/*PTEN*+) with or without *IDH1* or 1p19q codeletion. Group 3 corresponds to unmethylated *EGFR* or *PTEN* rearranged tumors (UM / *EGFR*+ or *PTEN*+) with or without *IDH1* or 1p19q codeletion. C, D) Survival analysis according to the % of *MGMT* promoter methylation (unmethylated vs methylated <60% vs methylated >60%) in *EGFR* or *PTEN* rearranged tumors (*EGFR*+ or *PTEN*+ and *IDH1*-/codeletion-). AODs: Anaplastic oligodendrogliomas; GBMs: Glioblastomas; PFS: Progression free survival; OS: Overall survival.**

## **2. Rôle différentiel des systèmes de réparation de l'ADN impliqués dans la modulation de la réponse aux chimiothérapies alkylantes dans les gliomes malins pédiatriques vs adultes**

La méthylation du promoteur de *MGMT* est moins fréquente dans les gliomes malins pédiatriques (15% vs 50%,  $p < 0.05$ ) et contrairement aux adultes, n'est pas corrélée à une meilleure survie. L'altération du système MMR semble plus fréquente dans les gliomes malins pédiatriques (15% vs 1%,  $p < 0.05$ ). Un patient présentait une méthylation de *MGMT* et une déficience du système MMR. Un autre patient était porteur d'une mutation germinale bi-allélique de *hMLH1* dans le cadre d'un syndrome de Turcot avec un phénotype MSI sans méthylation de *MGMT*.

Cependant ce travail nécessite une relecture par un pathologiste indépendant. Il semblerait que l'expression protéique de PARP1, XRCC1 et APE1, principaux composants du système BER et RAD51, acteur important du système HR, soit plus fréquente dans les gliomes malins pédiatriques (81% vs 63% et 90% vs 68% respectivement,  $p = \text{NS}$ ) avec une tendance statistique non significative. Enfin, *TP53*, impliqué dans la signalisation de l'apoptose des lésions de l'ADN, est plus fréquemment altéré (en termes de déséquilibre allélique) dans les gliomes malins pédiatriques (70% vs 42%,  $p < 0.05$ ).

## **IV.D Conclusion et perspectives:**

Il semble que dans les gliomes malins pédiatriques, les systèmes de réparation de l'ADN impliqués dans la réparation des lésions induites par les chimiothérapies alkylantes (*MGMT* et les systèmes BER et HR) sont plus fréquemment proficients et/ou sur-exprimés, alors que les voies nécessaires à l'induction de l'apoptose par les agents alkylants (systèmes MMR et *TP53*) sont plus fréquemment altérées et déficientes. Ces différences entre gliomes adultes et pédiatriques peuvent contribuer à la moins bonne réponse de ces derniers aux chimiothérapies alkylantes.

Le ciblage du système BER (par exemple avec des inhibiteurs anti-PARP) représenterait une nouvelle stratégie thérapeutique pour sensibiliser les gliomes malins pédiatriques aux chimiothérapies alkylantes. Cependant comme l'efficacité de ces inhibiteurs repose principalement sur une létalité synthétique en présence d'une déficience du système HR, l'hypothèse d'une hyperactivation du système HR dans les gliomes malins pédiatriques devra être au préalable, être confirmée et explorée sur le plan fonctionnel.

Pour ce qui concerne notre technique de F-SQ-MSP, celle-ci est actuellement utilisée en routine et participe à un projet d'évaluation technique inter-laboratoire national (STIC-ECOM). Une révision de l'article est en cours avec notamment une extension de la cohorte afin de mieux analyser la valeur pronostique des méthylations partielles.

2<sup>ième</sup> partie

Développement de modèles *in vitro*  
et *in vivo*

## **V Développement de modèles *in vitro* et *in vivo***

### **V.A Rationnel**

Les lignées dérivées de tumeurs de patients maintenues en culture ou en xénogreffe restent, malgré les limitations inhérentes à chacun de ces modèles, des outils incontournables de prédiction pré-clinique de l'efficacité d'un nouvel agent thérapeutique (Sharma et al., 2010). Ainsi, afin de pouvoir identifier et valider de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des gliomes malins pédiatriques, le développement d'un large panel de modèles pré-cliniques *in vitro* et *in vivo* capables de représenter la diversité et la spécificité de leurs caractéristiques moléculaires est fondamental (Neale et al., 2008). Jusqu'à présent peu nombreux en pédiatrie, ces modèles font actuellement l'objet d'un important effort collaboratif international autour de leur développement et de leur échange (Jones et al., 2012; Taylor et al., 2014).

### **V.B Objectifs**

Ce travail de thèse s'inscrit donc dans cet élan international collaboratif à travers le groupe de la SIOP-HGG et celui du développement strasbourgeois de la recherche préclinique pédiatrique qui se situerait en amont de l'élaboration d'essais cliniques de phase précoce. Cette recherche préclinique tend vers le développement d'un programme de médecine personnalisée à Strasbourg à travers la caractérisation génomique des tumeurs et l'élaboration de modèles pré-cliniques *in vitro* et *in vivo*. Cette stratégie de recherche préclinique / médecine personnalisée a pour but final d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques d'une part et d'identifier des biomarqueurs prédictifs de réponse d'autre part.

## **V.C Méthodologie**

### **V.C.1 Les plateformes d'oncobiologie et de recherche préclinique à Strasbourg**

Ce travail est réalisé sous l'égide de l'équipe translationnelle d'oncologie de Strasbourg (EA 3430, Dominique Guenot), créée en parallèle du projet du futur Institut Régional Contre le Cancer (IRC) de Strasbourg. L'EA dispose de plusieurs plateformes :

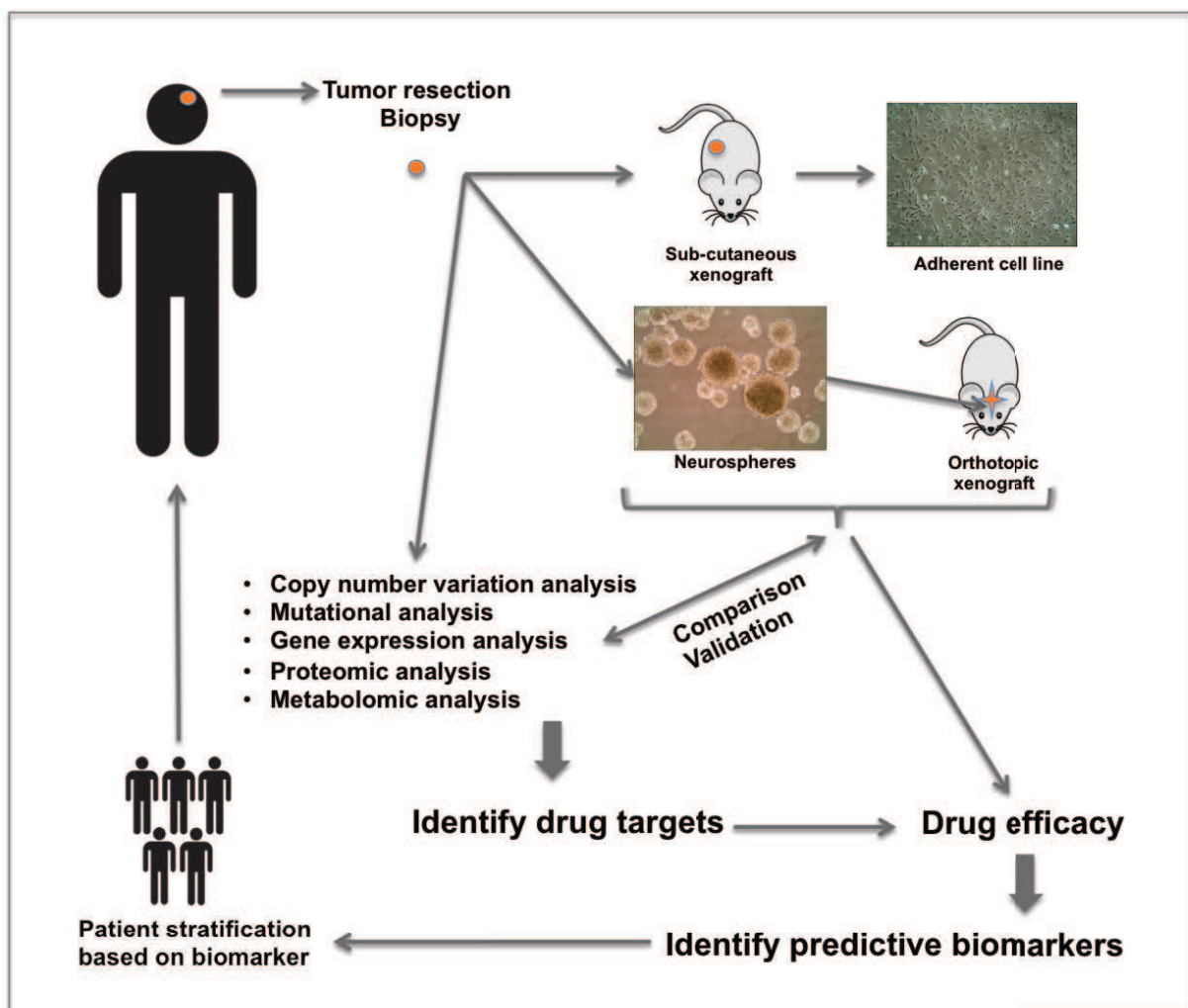
- Une plateforme d'oncobiologie (M-P Gaub et Eric Guérin) permettant la caractérisation génomique des tumeurs avec des technologies innovantes telles que le pyroséquençage et le séquençage haut débit ;
- Une plateforme de xénogreffe (Eric Guérin) permettant le développement de modèles *in vivo* ainsi que le testing de nouveaux agents ou nouvelles combinaisons thérapeutiques ;
- Une plateforme d'analyse *in vitro* haut débit (Natacha Entz-Werlé), en cours de développement.

### **V.C.2 Les collaborations**

Plusieurs collaborations nationales et internationales permettent la réalisation et la complétion du programme :

- Avec le service de Neuro-chirurgie (Prof. Pierre Kehrl) de Strasbourg qui, situé en amont du programme, permet le recueil des échantillons tumoraux de chaque enfant bénéficiant d'une chirurgie pour gliome malin ;
- Avec le service d'Anatomie pathologique (Prof. Marie-Pierre Chenard) et le Centre de Ressource Biologique de Strasbourg, qui permet le diagnostic des tumeurs mais aussi la cryopréservation des échantillons tumoraux et la coordination des différents programmes de recherche associés à ces collections tumorales

- avec L'ICR (Institute of Cancer Research, Chris Jones) de Londres, qui permet la validation des modèles développés et de la méthodologie ayant généré ces modèles, grâce à leur caractérisation pangénomique (CGH array, SNParray, transcriptome, méthylome) ;
- avec le service de médecine nucléaire (Prof. Izzie Namer) de Strasbourg, qui permet l'analyse métabolomique des tumeurs et des réponses au traitement objectivées sur nos modèles précliniques.



**Figure 47 :** Programme de médecine personnalisée à Strasbourg, appliqué aux tumeurs cérébrales pédiatriques



### **V.C.3 La cohorte de patients pédiatriques**

Les patients pédiatriques (<18 ans) sont inclus dans une étude de recherche translationnelle sur les tumeurs cérébrales pédiatriques, sous l'égide du Centre de Ressource Biologique de Strasbourg et la responsabilité du Prof. Natacha Entz-Werlé. Un consentement écrit des 2 parents ou du tuteur légal (et quand cela est possible de l'enfant lui-même) est obtenu pour l'utilisation de chaque prélèvement réalisé au cours d'une résection ou biopsie chirurgicale. Le protocole d'étude a été validé par le comité d'éthique local. Certains de ces patients sont également inclus dans le protocole de phase I « RAPIRI » sur l'association de la rapamycine avec l'irinotecan dans les tumeurs réfractaires de l'enfant (PHRC 2010, Pr N. Entz-Werlé, Dr E. Pencreach).

### **V.C.4 La stratégie**

- Les échantillons tumoraux d'un patient ont donc plusieurs destinées :
  - fixation et conservation en paraffine pour le diagnostic histologique (morphologique et immunophénotypique) en anatomo-pathologie;
  - cryopréservation au sein du CRB pour une analyse génomique et métabolomique ultérieure;
  - implantation sous-cutanée dans les flancs d'une souris immuno-déficiente et dérivation éventuelle d'une lignée cellulaire à partir de la xénogreffe;
  - culture en neurosphères dans un milieu exempt de sérum fœtal bovin et enrichi en FGF et EGF;
  - réimplantation orthotopique par stéréotaxie des neurosphères dans le striatum ou le tronc cérébral d'une souris immunodéficiente.
- Les différents modèles *in vitro* et *in vivo* obtenus sont ensuite validés en les comparant avec le profil génomique de la tumeur d'origine. Un premier screening génomique est réalisé à l'aide d'une technique simple d'allélotypage qui consiste à analyser les microsatellites ciblant des gènes d'intérêt par PCR.

En comparant l'ADN sanguin du patient avec celui de la tumeur d'origine et celui de la lignée dérivée, on peut déterminer un pourcentage de déséquilibre allélique pour des gènes classiques de l'oncogenèse tels que *TP53* par exemple. Si ce premier screening est positif, la lignée est envoyée à l'ICR de Londres pour une caractérisation pangénomique.

- Le phénotype des lignées cultivées *in vitro* est également étudié, dans des conditions de cultures standard ou hypoxiques, selon les aspects suivants:
  - leurs caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques (différenciation, hétérogénéité) ;
  - leurs caractéristiques prolifératives (temps de doublement, nombre de passages possibles) ;
  - leurs capacités clonogéniques (tests clonogéniques);
  - leurs capacités tumorigéniques (réimplantation en souris et capacité à reproduire les caractéristiques morphologiques, immunophénotypiques et invasives de la tumeur d'origine)
- Le phénotype des lignées de xéno greffes est également caractérisé selon :
  - leurs délais de prise et leurs temps de passage
  - leurs capacités à mimer les caractéristiques histologiques et immunophénotypiques de la tumeur d'origine mais aussi sa microvasculature et son pattern d'invasion et de diffusion dans le parenchyme cérébral.
- Enfin la validité et le domaine d'application des modèles sont déterminés selon le niveau de concordance génomique et phénotypique avec les tumeurs d'origine.

## V.D Résultats

### V.D.1 Patients inclus

Pendant les 3 ans de mon travail de thèse, 33 patients porteurs d'une tumeur cérébrale ont été inclus dans cette étude. Un fragment de leurs tumeurs a été systématiquement implanté en souris immunodéficiente et/ou cultivé *in vitro*. Parmi ceux-ci, 4 étaient porteurs d'un gliome malin et 3 d'un DIPG (caractéristiques détaillées dans le **Tableau 5**). Pour 1 patient porteur d'un astrocytome anaplasique, les matériels de la tumeur initiale mais aussi de la rechute ont pu être utilisés et comparés.

Patient	Cell.	Xéno Sc.	Diagnostic histologique	Age	Sexe	Loc.
	Passages (n)					
TC24	-	2	Xanthoastrocytome pléomorphe anaplasique	3	M	H
TC35	38*	2	Gangliogliome anaplasique (rechute)	18	F	H
TC46	15	-	Astrocytome anaplasique	11	H	H
TC53	16	-	DIPG : astrocytome anaplasique	12	F	P
TC60	12	-	Gliomatosis cerebri (syndrome CMMRD)	9	H	H
TC68	45**	-	DIPG : astrocytome anaplasique	9	F	P
TC69	44**	4	Astrocytome anaplasique (rechute de TC46)	12	H	H
TC79	3**	-	DIPG : glioblastome	?	F	P

**Tableau 6** : Caractéristiques cliniques des patients et des lignées cellulaires et/ou xéno greffes dérivées directement des tumeurs initiales de ces patients.

Abréviations : Cell. : Lignée cellulaire cultivée directement *in vitro* ; Xeno sc. : Xéno greffe sous-cutanée ; Loc. : Localisation ; DIPG : Diffuse intra-pontic glioma ; CMMRD : Congenital mismatch repair deficiency. A noter \* : la lignée TC35 a été dérivée à partir de sa propre xéno greffe; un double astérisque \*\* signifie que ces lignées ont été cultivées sous forme de neurosphères.

## V.D.2 Lignées cellulaires développées

### 1. Lignées cellulaires à court terme

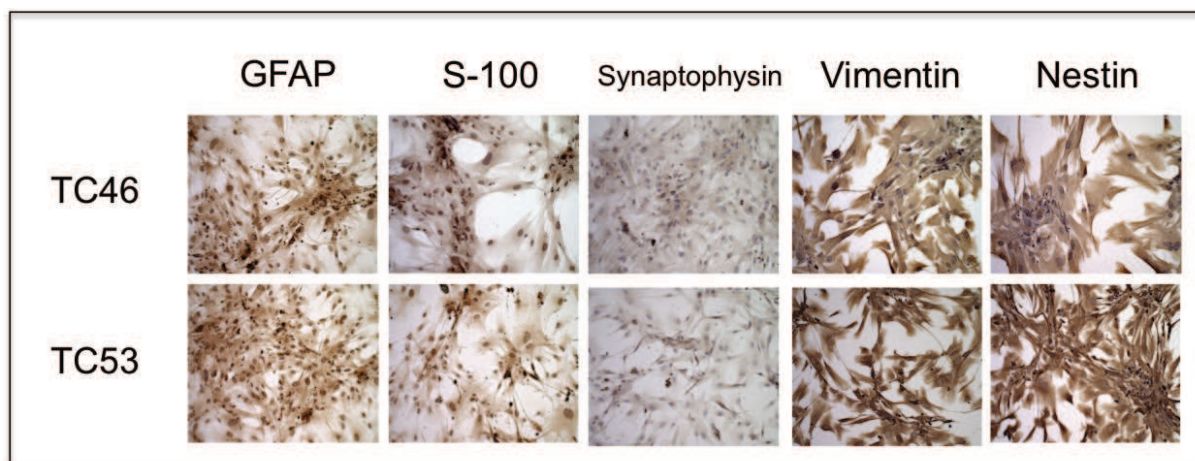
Après une dissociation mécanique, notre stratégie initiale a consisté à cultiver les fragments de tissu tumoral des patients dans un milieu de culture standard (RPMI) avec du sérum fœtal bovin et un supplément enrichi en facteurs de croissance utilisé en cytogénétique pour la culture d'amniocytes de fœtus dans le cadre du diagnostic prénatal (Amniomax).

Ainsi 3 lignées cellulaires (TC46, TC53, TC60) ont pu être dérivées avec cette méthode. TC46 et TC53 ont pu être caractérisées. Celles-ci présentaient des caractéristiques immunophénotypiques compatibles avec une différenciation astrocytaire (GFAP+) conformément à leur tumeur d'origine. La vimentine et la nestine étaient également fortement exprimées dans les 2 lignées (**Figure 48**). Leur temps de doublement en normoxie et en hypoxie était compris entre 1,5 et 3 jours. Cependant ces lignées n'ont pas continué à proliférer au delà d'une quinzaine de passage.

La recherche d'anomalies par allélotypage n'a montré que la présence de rares déséquilibres alléliques communs. Ces déséquilibres étaient de plus présents en pourcentage faible par rapport à la tumeur d'origine (données non montrées).

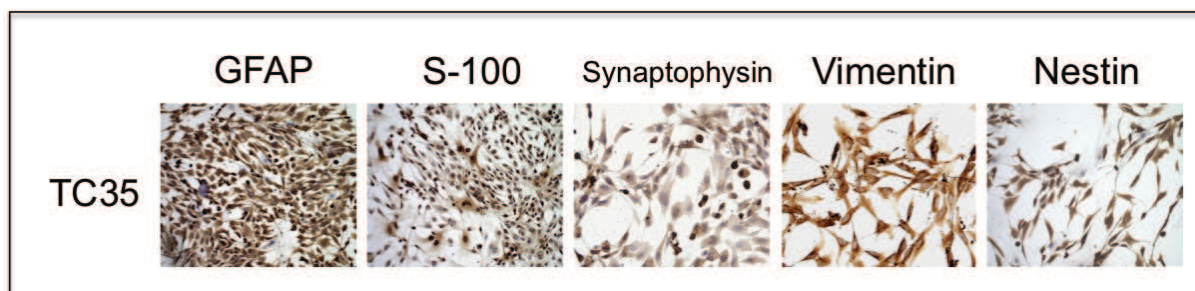
Enfin, leur injection sous-cutanée dans les flancs d'une souris nude athymique n'a pas généré de tumeur.

Ces lignées sont donc, de « court terme » (« short-term » cell lines), très hétérogènes et contiennent vraisemblablement peu de cellules tumorales. L'utilisation de ces lignées comme modèle validé est donc difficile à envisager étant donné la variabilité expérimentale que cette hétérogénéité et cette instabilité dans le temps peut générer.



**Figure 48** : Immunomarquage réalisé sur les deux lignées TC46 et TC35

•



**Figure 49** : Immunomarquage réalisé sur TC35

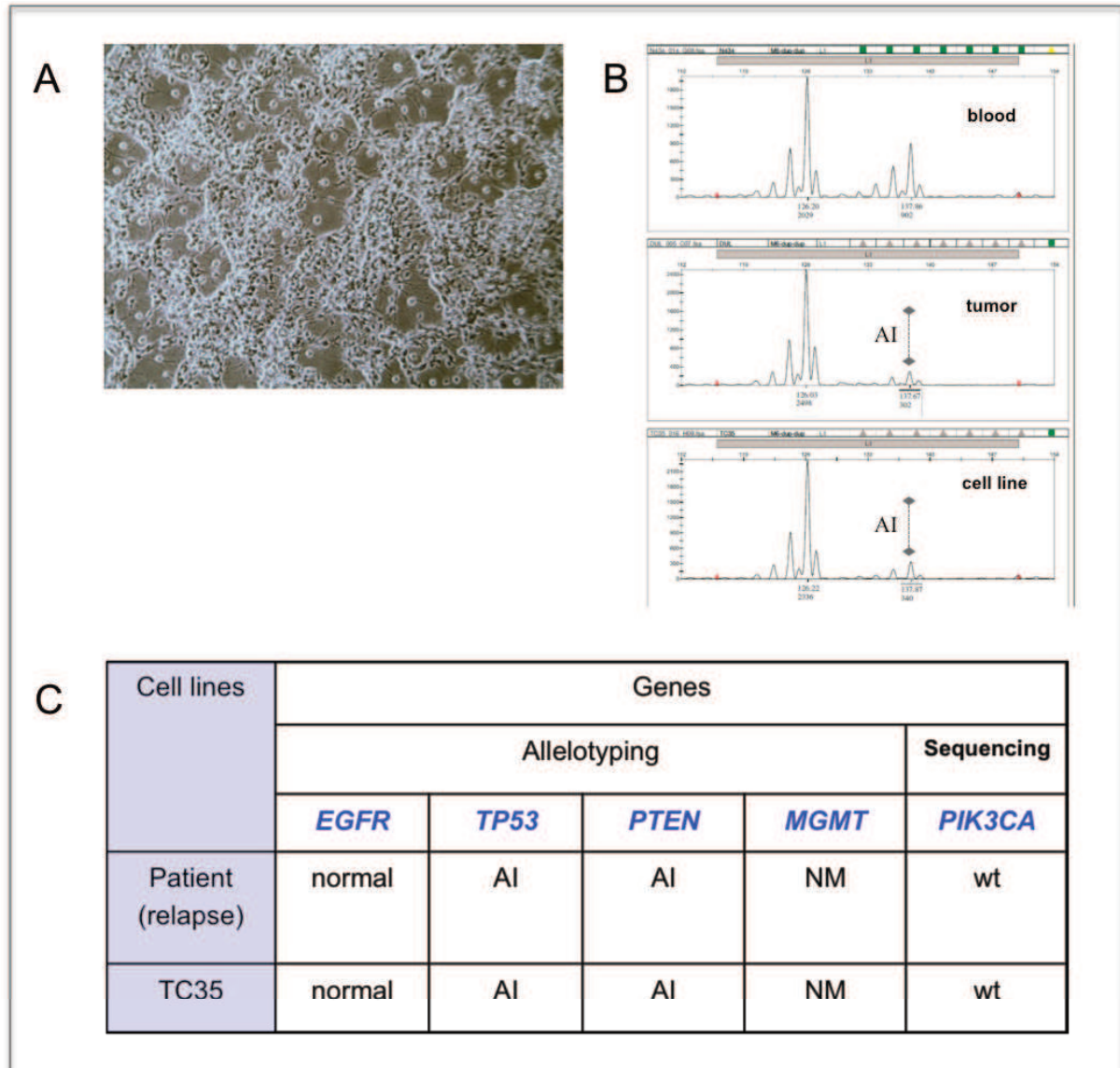
Sa caractérisation génomique réalisée grâce à l'analyse du panel de gènes étudiés par allélotypage a montré une concordance de 100% entre la lignée et la tumeur d'origine, en termes de pourcentages de déséquilibre allélique (**Figure 50**).

## 2. Lignées cellulaires permanentes

Deux stratégies différentes ont permis le développement de 4 lignées permanentes.

- La première a consisté à dériver une lignée cellulaire à partir de la première pousse de xénogreffe (F0) sur souris athymique. Il s'agit de TC35. TC35 a un temps de doublement de 36h (21% O<sub>2</sub>) et de 48h en hypoxie (1% O<sub>2</sub>). Elle a pu être cultivée au delà de 40 passages. Issue d'une tumeur neuro-gliale (gangliogliome anaplasique), elle présente des éléments de différenciation astrocytaire (GFAP+++ ) et neuronale (S-100 ++ et synpatophysin ++). La vimentine et la nestine y sont fortement exprimées (**Figure 49**). TC35 également

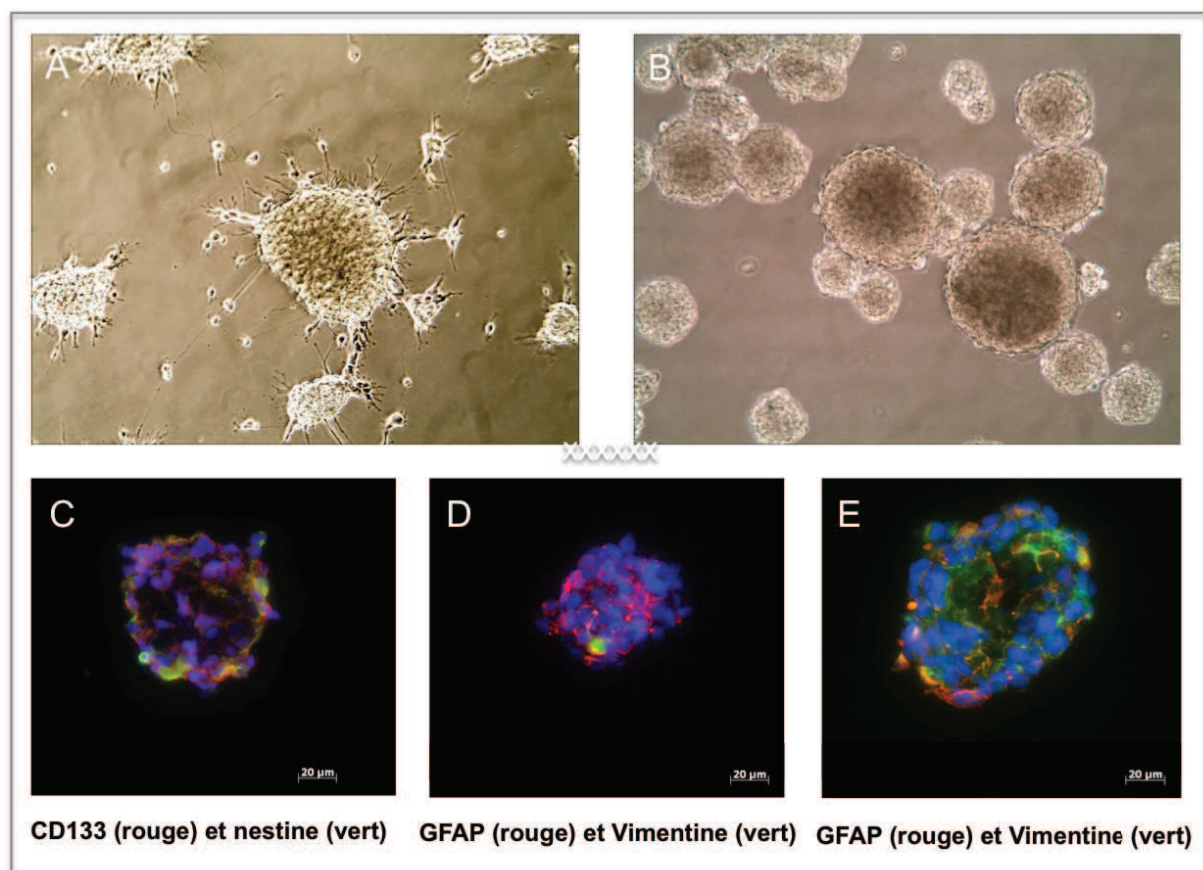
été capable de générer des clones à l'issu d'un test clonogénique réalisé sur 21 jours. Pour l'instant son injection orthotopique en souris nude ne donne pas de tumeur.



**Figure 50** : Caractérisation de TC35

A : Aspect morphologique en contraste de phase de TC35. B : exemple de déséquilibre allélique (AI pour allelic imbalance) sur le locus de *TP53*. C : Caractéristiques génomiques de TC35 par rapport à la tumeur d'origine; NM : promoteur non méthylé ; wt : Wild type.

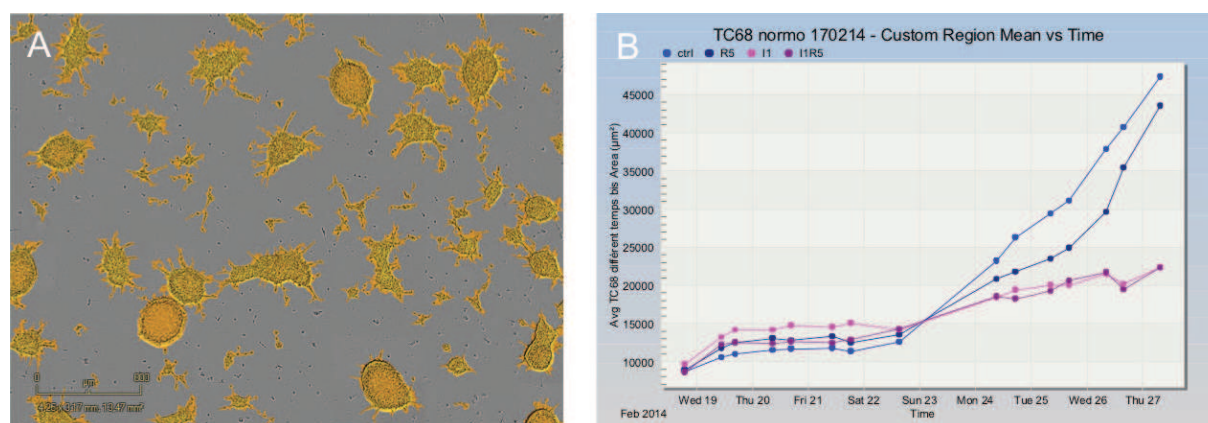
- La deuxième stratégie repose sur la **culture de neurosphères** afin de permettre l'isolement des cellules tumorales dites « souches-like », censées être les plus intéressantes sur le plan clinique puisqu'en théorie les plus représentatives des phénotypes de chimio-résistance observés dans les gliomes malins. Elles sont également décrites dans la littérature comme étant plus proches génomiquement parlant des tumeurs d'origine que les lignées cellulaires standard et de mieux reproduire l'histologie et le pattern de diffusion des gliomes quand elles sont injectées en orthotopique. 3 lignées cultivées sous forme de neurosphères ont pu être dérivées à partir d'une rechute d'astrocytome anaplasique et de 2 DIPGs : TC68, TC69 et TC79. TC79 vient tout juste d'être mise en culture et ne sera pas décrite. 2 lignées ont pu être caractérisées sur le plan phénotypique et génomique (**Figure 51**).



**Figure 51** : Aspects morphologiques de TC68

(A) et TC69 (B) en contraste de phase. Immunomarquage (CD133, nestine, GFAP et vimentine) réalisé sur les neurosphères de TC68. A noter que la GFAP est surtout exprimée au niveau des sphères de petite taille (D) tandis que la vimentine est exprimée au niveau des cellules situées au centre des sphères plus volumineuses (E).

TC68 et TC69 ont été cultivées toutes les deux au delà de 40 passages. Les 2 lignées conservent les mêmes caractéristiques après décongélation. Leurs caractéristiques prolifératives ont pu être étudiées grâce à une technologie de live-microscopy haut débit (Incucyte™ Kinetic Live Cell Imaging System, Essen Biosciences, ), même si leur comptage automatisé (nombre et diamètre des sphères), notamment en condition hypoxique, nécessite encore de nombreuses mises au point (**Figure 52**).



**Figure 52** : Prolifération de TC68 à 21% d'oxygène.

Comptage automatisé de l'aire des sphères au cours du temps après réalisation d'un masque de comptage prenant en compte l'aire des sphères (A). Le nombre de sphères est mesuré selon l'aire moyenne cumulée au cours du temps (B) déterminant ainsi un temps de doublement de 4 jours (le contrôle est en bleu).

### V.D.3 Modèles de xénogreffes

#### 1. Xénogreffes hétérotopiques, sous-cutanées

Sur 8 tumeurs implantées en sous-cutané chez la souris nude athymique, seules 3 ont généré une xénogreffe (TC24, TC35, TC69). 2 de ces 3 tumeurs étaient des rechutes ou progression après traitement (TC35 et TC69). De façon intéressante, alors que TC46 n'avait donné lieu qu'à une lignée à court terme et pas de xénogreffe, TC69, sa rechute, a donné naissance à des neurosphères et une lignée de xénogreffe actuellement en cours d'expansion (temps de passage 4 mois). TC24 et TC35 n'ont pu être entretenues que sur 2 passages.



## 2. Xénogreffes orthotopiques

Etant donné ce problème de prise de greffe des tumeurs primaires, une approche orthotopique, sur souris NSG a été entreprise et est en cours de validation grâce à l'injection orthotopique stéréotaxique des neurosphères TC68 et TC69. Pour cela, des coordonnées ciblant le striatum et le tronc cérébral des souris ont été déterminées et validées *in situ*.

## V.E Perspectives

Tous ces modèles sont actuellement en cours de caractérisation pangénomique dans le laboratoire de Chris Jones à l'ICR (Londres). De nombreuses mises au point sont encore nécessaires pour arriver à utiliser ces modèles dans un objectif de testing d'agent thérapeutique, notamment pour les neurosphères. En ce qui concerne les xénogreffes orthotopiques, le développement de techniques d'imagerie adaptées au petit animal ayant la résolution nécessaire pour détecter des tumeurs millimétriques situées au niveau du tronc cérébral ou des zones hémisphériques profondes est fondamental. Ces développements sont en train de voir le jour grâce à une IRM métabolique pour souris, acquise par l'équipe du Professeur Izzie Namer. Les cultures 3D sont aussi une perspective intéressante à envisager. Enfin, l'extension de cette démarche de validation peut être étendue aux autres modèles de tumeurs cérébrales (épendymomes, médulloblastomes, gliomes diffus de bas grade etc...). Parmi les autres types de tumeurs cérébrales incluses dans cette étude, on peut distinguer : 1 médulloblastome à grandes cellules, 1 médulloblastome, 10 astrocytomes de bas grade, 13 épendymomes comprenant leurs rechutes éventuelles, qui sont autant de modèles en stand-by (xénogreffes et cellules entretenues pendant quelques passages et cryopréservées), à valider.

## 3 ième PARTIE

### Exploration et ciblage de l'axe mTOR-HIF-1 $\alpha$ dans les gliomes malins pédiatriques

# VI Exploration et ciblage de l'axe mTOR-HIF-1 $\alpha$ dans les gliomes malins pédiatriques

## VI.A Rationel

L'hypoxie intra-tumorale et l'expression des facteurs HIFs sont associées à la progression tumorale et à la résistance à la chimio- et à la radiothérapie. L'expression des facteurs HIFs (HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ ) n'a pas été étudiée dans les gliomes malins pédiatriques mais ceux-ci présentent les caractéristiques histologiques de prolifération microvasculaire et / ou de nécrose habituellement associées à l'hypoxie et à la vascularisation tumorale aberrante et les troubles de perfusion qui lui sont habituellement associés. La stabilisation des facteurs HIFs est induite par l'hypoxie mais peut également être favorisée par des dérégulations des voies de signalisation oncogéniques PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MEK/ERK. Les altérations génomiques altérant ces voies, en termes d'anomalies du nombre de copies de gènes, sont moins fréquentes en pédiatrie, ce qui n'empêche pas une sur-activation très fréquente de ces voies au niveau protéique. Le ciblage de HIF-1 $\alpha$  est donc une stratégie qui pourrait permettre de contourner la chimio-résistance de ces tumeurs qui expriment le plus souvent MGMT et sont donc résistantes au TMZ. De plus, l'inhibition combinée de mTOR permettrait une inhibition complète de l'accumulation de HIF-1 $\alpha$  dans les tumeurs ayant une dérégulation de cet axe, comme cela a été démontré dans des modèles de cancers du côlon.

De façon intéressante, l'adaptation des cellules à ce microenvironnement tumoral repose sur un switch métabolique médié par les facteurs HIFs qui consiste en l'activation préférentielle de la glycolyse anaérobie avec l'inhibition parallèle de la respiration mitochondriale, ou effet Warburg. De façon plus générale, les cellules cancéreuses sont soumises à une reprogrammation métabolique qui leur donne un avantage prolifératif et de survie en leur permettant une adaptation à un

environnement très instable, hypoxique et pauvre en nutriments. Cette reprogrammation est largement régulée par les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs tels que les facteurs HIFs mais aussi MYC, AKT, p53, mTOR et AMPK. Ceux-ci jouent un rôle dans la régulation de la glycolyse (HIF-1 $\alpha$ , AKT, p53 et MYC), la glutaminolyse (MYC), la lipogenèse de novo (mTORC2, HIF-2 $\alpha$ ) et l'activation d'autres voies anaplérotiques permettant un anabolisme plus efficace et la production d'ATP en situation de stress. De plus, les facteurs HIFs peuvent interagir et souvent de façon antagoniste, sur mTOR, MYC et p53. Le statut de ces différents acteurs dans la tumeur est donc susceptible de moduler la réponse thérapeutique à une inhibition pharmacologique de HIF-1 $\alpha$  et de mTOR, et pourrait entraîner des modifications métaboliques identifiables par une technique de spectroscopie RMN haute résolution (RMN HRMAS). Cette technique d'analyse métabolomique présente l'avantage de fournir des données spectrales directement utilisables en spectroscopie IRM chez le patient.

Par conséquent, nous avons étudié par immunohistochimie, les niveaux d'activations des voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MEK/ERK et l'accumulation des facteurs HIFs, dans une cohorte de 26 gliomes malins pédiatriques et montré que ces voies sont activées dans plus de 70% des tumeurs. Puis, nous avons évalué l'intérêt du ciblage de mTORC1 par un rapalogue (la rapamycine) et de HIF-1 $\alpha$  par un inhibiteur de la topoisomérase 1 (l'irinotecan) dans des modèles cellulaires de gliomes malins pédiatriques cultivés dans des conditions de normoxie (21% O<sub>2</sub>) et d'hypoxie (1% O<sub>2</sub>). Pour cela, trois lignées cellulaires (KNS42, SF188 et UW479) caractérisées par des anomalies génomiques spécifiques des voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MEK/ERK, ont été utilisées. Nous avons tout d'abord caractérisé le niveau de prolifération de ces lignées en normoxie et en hypoxie, puis leur réponse à l'action de l'irinotecan et de la rapamycine en mono et bithérapie en normoxie et en hypoxie. L'activation des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MEK/ERK a été analysée par western blot, les profils transcriptomiques par RT-QPCR, et métabolomiques par spectroscopie RMN HRMAS.

## VI.B Résultats

Cette caractérisation a mis en évidence :

1) Trois profils distincts de réponse à l'hypoxie et à l'inhibition pharmacologique de mTORC1/HIF-1 $\alpha$ , sous-tendus par des altérations génomiques différentes :

- **KNS42** caractérisée par une mutation de *H3F3A/G34* associée à une surexpression de *MYCN*, un gain de *PIK3CA* et une surexpression d'*IGFR1*, présente une activation majeure d'AKT et de mTORC2 et une accumulation modérée d'HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ . En termes d'effet sur la prolifération, cette lignée est résistante à la rapamycine et à l'irinotecan.
- **SF188** caractérisée par une amplification de *MYC* et une délétion de *NF1*, présente une activation prédominante d'ERK et une accumulation modérée d'HIF-1 $\alpha$  et faible d'HIF-2 $\alpha$ . En termes d'effet sur la prolifération, cette lignée est sensible à la rapamycine et à l'irinotecan
- **UW479** caractérisée par l'absence d'anomalie génomique sur ces voies, présente une accumulation majeure de HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ , sans activation d'AKT ou d'ERK. En termes d'effet sur la prolifération, cette lignée est sensible à la rapamycine mais résistante à l'irinotecan.

2) De même, **en hypoxie** nous avons observé :

- Une inhibition faible mais significative de la prolifération pour SF188 et UW479, sans effet sur KNS42.
- Un effet anti-prolifératif de l'irinotecan qui n'est maintenu que pour la lignée SF188
- une absence d'inhibition de l'accumulation de HIF-1 $\alpha$  par l'irinotecan dans les 3 lignées cellulaires mais l'implication potentielle de HIF-2 $\alpha$  dans la résistance à l'irinotecan
- L'implication de la réactivation d'AKT et de mTORC2 dans la résistance intrinsèque à la rapamycine de la lignée KNS42
- Un effet synergique entre l'irinotecan et la rapamycine, observé essentiellement pour de faibles doses dans la lignée sensible SF188, mais moindre et ne

permettant pas de reverser la résistance à l'irinotécan dans les deux autres lignées UW479 et KNS42

- Les réponses métaboliques des lignées évaluées par spectroscopie RMN HRMAS, se caractérisent par une inversion des ratios glutamate / glutamine et glycerophosphocholine/phosphocholine. Seule la spectroscopie, par comparaison avec l'analyse du transcriptome ou de l'expression protéique, a mis en évidence la synergie de l'irinotécan et la rapamycine pour inhiber la prolifération cellulaire. Une sensibilité modérée des neurosphères de TC68 (neurosphères dérivées d'une tumeur DIPG) à l'irinotécan et à la rapamycine, sans synergie évidente
- Une approche d'inhibition par siRNA de HIF-1 $\alpha$  et/ou HIF-2 $\alpha$  dans ces lignées, en hypoxie, a montré qu'en présence d'une dérégulation de MYC ou de l'expression de MYCN (SF188 et KNS42), l'inhibition unique de HIF-1 $\alpha$  n'est pas suffisante pour inhiber la prolifération.

L'article qui suit n'a pas encore été soumis et est en cours de finalisation.

## **Characterization of the transcriptional and metabolic responses of pediatric malignant gliomas to mTOR-HIF-1 $\alpha$ axis inhibition**

Nguyen Aurélie<sup>1</sup>, Moussalieh François Marie\*<sup>2</sup>, MacKay Alan\*<sup>3</sup>, Coca Andres<sup>4</sup>, Chenard Marie Pierre<sup>5,6</sup>, Weingertner Noelle<sup>5</sup>, Pencreach Erwan<sup>1</sup>, Laithier Veronique<sup>7</sup>, Namer Izzie Jacques<sup>2</sup>, Guenot Dominique<sup>1</sup>, Kehrlé Pierre<sup>4</sup>, Jones Chris<sup>3</sup>, Entz-Werlé Natacha<sup>1</sup>

\* equivalent work

1: Laboratory EA 3430: Progression tumorale et micro-environnement. Approches translationnelles et épidémiologie, University of Strasbourg, France

2: Department of Nuclear medicine, University hospital of Strasbourg, France

3: Institute of Cancer Research, Sutton, New England

4: Department of neurosurgery, University hospital of Strasbourg, France

5: Department of pathology, University hospital of Strasbourg, France

6: Centre de Ressources Biologiques, University hospital of Strasbourg, France

7: Department of pediatric oncology, University hospital of Besançon, France

**Running title:** Response profile to the targeting of HIF-1 $\alpha$  and mTOR in pediatric malignant glioma models

**Corresponding author:** Entz-Werlé Natacha

natacha.entz-werle@chru-strasbourg .fr

**Statement funding:**

Alan McKay and Chris Jones acknowledge NHS funding to the Biomedical Research Centre. Natacha Entz-Werlé and Aurélie Nguyen acknowledge for the funding from Enfants et Santé, the SFCE (Société Française des Cancers de l'Enfant), the PhRC for the RAPIRI project.

**Statement conflict of interest:** None

**Word count:** 5974

**References:** 62

**Figures:** 7

## Background

Pediatric high grade gliomas (pHGGs), despite their low incidence, are the leading cause of mortality in pediatric oncology. Most pHGGs are localized in midline structures (thalamus, pons), are resistant to standard chemotherapy, and harbor specific genomic alterations.<sup>1</sup> Recent studies have begun to unravel new cancer pathways specific to pediatric gliomagenesis with the discovery of frequent mutations of histone H3.3 in pHGGs.<sup>2,3</sup> Cooperative international efforts are aimed at developing new prognostic and predictive biomarkers as well as novel, therapeutic strategies aimed at the specific underlying biology of the childhood disease.

The necrosis resulting from severe intra-tumor hypoxia and the aberrant microvasculature, usually associated with it, are important radiological and histological adverse prognostic criteria in gliomas.<sup>4</sup> Intra-tumor hypoxia is known to favor angiogenesis, but also genetic instability through resistance to apoptosis and decreased DNA repair capacities, promoting a metastatic and highly chemo- and radio-resistant phenotype.<sup>5-8</sup> As the tumor proliferates and grows, tumor cells have to adapt to high anabolic requirements, and to extreme environmental conditions due to the incapacity of the tumor microvasculature to provide sufficient oxygen and nutrient supply leading to hypoxia. This adaptation is sustained by a whole metabolic reprogramming of cancer cells through the preferential use of alternative metabolic pathways, favoring glycolysis (the “Warburg” phenotype), but also glutaminolysis, de novo lipogenesis, and other anaplerotic pathways.<sup>9-11</sup>

Cancer metabolic reprogramming is now considered as a hallmark of cancer and is largely driven by oncogenic and tumor suppressor gene deregulation, involving *TP53*, *AMPK*, *AKT*, *mTOR*, *HIF-1 $\alpha$* , *HIF-2 $\alpha$*  and/or *MYC*.<sup>12</sup> The glycolytic switch of tumor cells is mainly induced by the accumulation of HIF (Hypoxia-inducible Factor) proteins. HIFs form heterodimers, whose  $\alpha$  subunit is stabilized under hypoxia through the inhibition of the oxygen-dependent hydroxylases (PHDs) and its subsequent degradation by the proteasome. It also can be stabilized in normoxic conditions through different mechanisms of dysregulation at the transcriptional, translational and post-translational levels, leading to a pseudo-hypoxic phenotype.<sup>13</sup> HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ , the two most studied isoforms, activate numerous target genes. Noticeably, HIF-1 $\alpha$  can activate the majority of genes involved in glycolysis, but, also, those involved in pH regulation, angiogenesis and metastatic progression.<sup>14,15</sup> HIF-2 $\alpha$  acts synergistically with HIF-1 $\alpha$  to regulate many of these genes and its expression seems to be correlated with a more aggressive phenotype.<sup>16-18</sup> *TP53*, *MYC* and *AKT* cooperate with the HIFs to synergistically induce glycolysis, while *MYC* is the main regulator of glutaminolysis.<sup>19</sup> Moreover, HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  have opposite effects on *MYC* or *TP53* stabilization.<sup>20</sup> Therefore, the interaction between these different factors is crucial for the understanding of the global cellular adaptation to hypoxia.<sup>21</sup>

The other major regulator of metabolism in hypoxia is mTOR. When hyperactivated, mTOR promotes HIF-1 $\alpha$  protein translation, counteracting its degradation in normoxic conditions, leading to pseudo-hypoxia. Essential for tumor growth and survival, mTOR is also a sensor of nutrient level, favors lipogenesis and inhibits autophagy.<sup>22,23</sup> mTOR kinase interacts with different protein partners, forming two distinct multiprotein complexes called mTORC1 (comprising Raptor and PRAS40) and mTORC2 (comprising Rictor and Protor). mTORC1 is responsible for the downstream activation of protein translation (through its effects on S6K1 and 4EBP1), while mTORC2 is responsible for the complete activation of AKT. mTORC1 is positively regulated by receptor tyrosine kinases, leading to the downstream activation of PI3K/AKT and RAS/MAPK signaling pathways, and



negatively regulated by PTEN and AMPK. Under hypoxia, mTORC1 is also inhibited by REDD1 and BNIP3, themselves induced by HIF1 $\alpha$ <sup>24</sup> and tightly regulated through a negative inhibitory feedback loop via S6K1, which once activated, induces the upstream degradation of IRS1 and the inactivation of RICTOR/mTORC2.<sup>25-27</sup> mTor inhibitors, like rapamycin, have shown limited efficacy in cancers when used in monotherapy, partly due to the reactivation of AKT.<sup>28</sup> These mechanisms of resistance to rapamycin were particularly described in the context of mTOR deregulation due to genomic alterations of the PI3K/AKT, but also the RAS/MAPK pathways.<sup>29</sup>

A strategy of bi-therapy consisting of inhibiting both mTOR by rapamycin and HIF-1 $\alpha$  by irinotecan might be, as described in colon cancers, efficient by completely abolishing HIF-1 $\alpha$  accumulation.<sup>30</sup> Concerning the pHGGs, the RAS-PI(3)K-mTOR pathway is altered in around 25%, while *PIK3CA/PIK3R1* and *TP53* are mutated in less than 40%.<sup>3</sup> However, AKT and ERK have been reported to be highly activated at the protein level in 60-70% of pHGGs, while PTEN expression is lost in less than 50% of them.<sup>31-35</sup> While *MYC* or *MYCN* amplifications occur at low frequency in pHGGs, G34V H3.3 mutations were reported to be associated with *MYCN* over-expression.<sup>36,37</sup> In terms of hypoxia, pHGGs display the classical characteristics of microvascular proliferation and/or necrosis, associated with intra-tumor hypoxia, although HIF-1 or HIF-2 expression has not been specifically assessed. Therefore, a bi-therapy combining irinotecan with rapamycin, through a double hit on mTor/HIF-1 $\alpha$ , could be beneficial to pHGGs and is currently being evaluated in pediatric malignant refractory tumors (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01282697).

Due to their crucial role in mTOR regulation and in the metabolic switch of tumors under hypoxia, we hypothesized that the distinctive genomic alterations of RAS/ERK and PI3K/AKT pathways and HIF-1 $\alpha$ /HIF-2 $\alpha$ /MYC relative expressions would differentially modulate the tumor response to the targeting of mTORC1 and HIF-1 $\alpha$ . Furthermore, we hypothesized that the response modulation would result in differential metabolic changes, potentially detectable by magnetic resonance spectroscopy (MRS) used as an innovative non-invasive tool of response prediction and monitoring.<sup>38</sup> The objective of this preclinical study was to determine the relevance of such a bi-therapy in pHGG *in vitro* models to use metabolomic, transcriptomic and/or protein profiles to predict response. We performed the *in vitro* analyses in three well-known cell lines (SF188, UW479 and KNS42), which showed three distinct pathway activations under hypoxia and three distinct response profiles to the drugs. Pathway activation and markers of hypoxia were then assessed in a set of 26 pHGGs.

## **Material and Methods (1131 mots, 7934 caractères)**

### **Patient cohort**

21 pediatric patients with supratentorial PMGs and 6 with diffusely infiltrating pontine gliomas (DIPG) were included in the study after obtaining written informed consents from their parents. Aged from 8 to 19 years, they were treated between January 2005 and December 2013. The research protocol was validated by the local institutional ethic committee for human tissue experiments. The anonymized fresh-frozen or paraffin-embedded tumor samples were collected at diagnosis from surgical biopsy or resection and stored at the Biological Resource Centre (CRB) of the University Hospital of Strasbourg. Patients' clinical characteristics are detailed in Fig 1.

## **Cell lines and reagents**

Cell lines were cultured in DMEM/F-12 Glutamax™ (Gibco®) with 10% SVF. TC68 (a patient-derived cell line) was grown as neurospheres with a SVF-free medium supplemented with B27 (Gibco®), FGF (Millipore®) and EGF (Gibco®). All cells were maintained at 37°C in normoxic (21% O<sub>2</sub>) or hypoxic (94% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub>) conditions in a Sanyo® incubator. Rapamycin was obtained from LC Laboratories (Woburn, USA) and irinotecan from Sandoz (Levallois-Perret, France). For hypoxic analyses, a prior progressive adaptation to hypoxia was realized to reach a final 1% concentration. For immunohistological, immunocytological and/or immunoblotting assays, the following antibodies were used against: αβ tubulin, LC3B, phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr 202, Tyr 204), phospho-RICTOR (Thr 1135)<sup>26,27</sup>, phospho-S6RP (Ser 235) and purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme, St-Quentin-en-Yvelines, France). GLUT1, HIF1α, HIF-2α, PARP, cleaved PARP, phospho-STAT3 (Tyr705) were purchased from Abcam (Paris, France), and H2AX and phospho-H2AX (Ser 139) from Merck Millipore (Darmstadt, Germany).

## **Proliferation and growth inhibition assay**

Proliferation and growth inhibition were determined using a crystal violet staining viability assay with optical spectrophotometry analysis as previously described.<sup>39</sup> For each drug, the GI<sub>50</sub> (dose leading to 50% of the maximal growth inhibition effect on cultured cells) was assessed at 72 hours after treatment exposure. Values of optical density are reported as means±SD (standard deviation) obtained from three independent experiments.

## **Western blot analyses**

Protein was extracted after 24h of drug exposure and processed for western blotting as previously described.<sup>30</sup> Quantification of protein amounts was performed comparatively to alpha beta tubulin expression with ImageJ software (<http://imagej.nih.gov>). These measures were then normalized according to the control sample and expressed as means ±SD obtained from replicates of two independent experiments.

## **Immunohistochemistry (IHC) and Immunocytofluorescence**

FFPE tumor samples from patients were gathered on a tissue-microarray (TMA) block using a tissue arrayer (MTA BOOSTER 01 V2.04, Excilone, France) with 3 representative areas selected per tumor. IHC was performed using an automated tissue staining system (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). Two pathologists (MPG and WN) analyzed protein expression independently. The scoring system was combining intensity and proportion of positive cells. A positive staining was considered in at least 50% tumor cells, when overexpression was analyzed, and was associated to a moderate to strong intensity. PTEN analysis was considering a loss when no PTEN expression was detected on the slides. The cell lines were cultured on Lab-Tek Chamber Slide™ Systems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) until 60% confluence and processed for immunocytofluorescence staining as previously described.<sup>30</sup>

## **siRNA transfection**

Pre-designed small interfering RNAs (siRNA) duplexes against HIF-1α and HIF-2α were purchased from Qiagen (Courtaboeuf, France). Cells were transfected using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Life Technologies, St Aubin, France) according to the manufacturer's instructions. Two different siRNAs were tested alone

or in combination for each target, as well as a scrambled sequence control duplex. The efficacy of transfection was confirmed with RT-PCR on RNAs extracts and immunoblotting on protein extracts made at 48 h post-transfection. The effect on proliferation was determined with crystal violet viability assay at 24, 48 and 72 h post-transfection.

### **mRNA expression profiling analyses**

Expression profiling of KNS42, SF188 and UW479 after 24h treatment exposure with rapamycin (10 nM), irinotecan (5  $\mu$ M) and both drugs were performed under normoxia and hypoxia, with two replicates for each condition. Gene expression analysis was performed using U133Plus2 Affymetrix arrays. Data were read with the affy package and normalized with rma. Gene expression was annotated with ensembl genes from build 37 assembly 71.

### **HRMAS NMR Spectroscopy**

HRMAS NMR spectroscopy was performed for KNS42, SF188 and UW479 in normoxic and hypoxic conditions of proliferation and after 24h exposure with rapamycin (10nM), irinotecan (5 $\mu$ M) and both drugs. Six replicates for each condition were analyzed. For cell lines, a pellet of  $10^7$  cells was collected and directly snap-frozen in liquid nitrogen.<sup>40</sup> HRMAS NMR spectra were analyzed on a Bruker Avance III 500 spectrometer operating at a proton frequency of 500.13MHz. HRMAS NMR data acquisition and spectra processing were performed as previously described.<sup>41</sup> A one-dimensional (1D) proton spectrum was acquired for each sample. The chemical shift was referenced to the peak of the methyl proton of L-lactate at 1.33 ppm. Two-dimensional (2D) homonuclear and heteronuclear experiments were also recorded in order to confirm resonance assignments. The quantification procedure was based on the pulse length-based concentration measurement (PULCON). Spectra were normalized according to each sample weight and calibrated using the signal intensity of a 19.3 nmol reference solution of lactate. Quantification results were expressed as nmol/mg of tissue. Metabolites were assigned using standard metabolite chemical shift tables.<sup>42</sup>

### **Semi-quantitative PCRs (qPCRs) and sequencing analyses**

*PIK3CA*, *BRAF* and *PDGFRA* genes were sequenced with a standard Sanger technique. Microsatellite analyses were performed for *PTEN*, *NF1* and *TP53* genes. qPCRs were performed for the determination of copy number alterations of *PDGFRA* comparatively to *APP* and *DCK* reference genes. All these techniques were performed as previously described.<sup>30,43,44</sup>

### **Statistical analyses**

GI50 and combination indexes (CI) were determined according to the Chou & Talalay method using the CalcuSyn software (Biosoft<sup>®</sup>, Cambridge, UK). A CI greater than 1.2 means was considered as a drug antagonism, less than 0.8 as a synergism and comprised between 0.8 and 1.2 as an additive effect. For mRNA expression profiling, a significant differential expression was assigned as a 2 fold up and a 2 fold down in comparison with control. Up and down-regulated genes were determined for each drug versus the control in normoxic and hypoxic conditions. The hypoxic control was also compared to the normoxic control for each cell line. Data was clustered as a whole and separately for each cell line using standard un-supervised clustering. Biological modules according to gene ontology were clustered amongst the up or

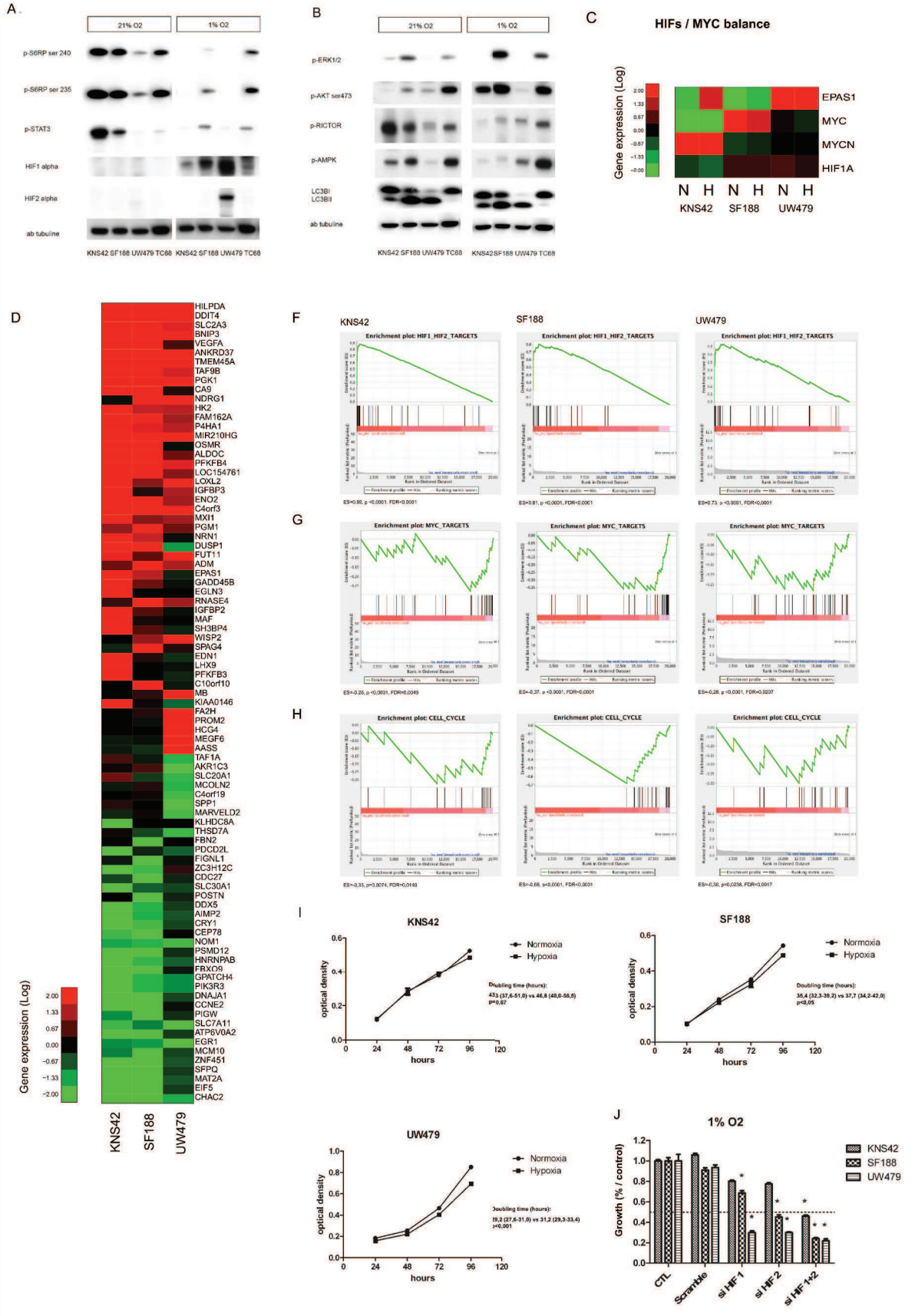
down-regulated gene list using Babelomics v4.2 online software (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>). For NMR HRMAS spectroscopy data, a combination of principal component analysis (PCA) and partial least square discriminant analysis (PLS-DA) was performed to determine the most discriminant metabolites for each group. The statistical comparison of mean values issued from replicates of protein or metabolite amounts was performed using ANOVA test followed by a Tukey's multiple comparison test or the non-parametric Mann-Whitney U-test. Statistics were performed using the Prism software package (Graphpad Software Inc., San Diego, CA). A p value less than 0.05 was considered as significant.



## RESULTS

### **mTOR/HIF pathway protein expression in pHGGs samples (Figure 1)**

The first step of our study was to confirm the activation of the studied targets of mTOR and HIF-1/2 $\alpha$  in pHGGs. Indeed, in the unicentric cohort of 26 pHGGs, the immunohistochemical assessment showed phospho-S6RP overexpression (as a surrogate of mTOR activation) in 14/26 tumors, whereas HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  and carbonic anhydrase IX (HIF-1 $\alpha$  target) were overexpressed respectively in 12, 17 and 10 tumors out of 26 (Fig 1A and 1B). Only five patients had a concomitant absence of HIF-1/HIF-2 staining. The hypoxia (presence of concomitant HIF-1 $\alpha$ /HIF-2 $\alpha$ /carbonic anhydrase IX overexpression) was present in 12 tumors. All those data underlined the highly frequent activation of the mTOR/HIF-1 $\alpha$  axis in pHGGs



**Figure 2: *In vitro* analysis of KNS42, SF188 and UW479 cell lines: Impact of hypoxia (1% O<sub>2</sub>) on mTOR pathway activation, gene expression and proliferation. Figure 2A and 2B: Comparative immunoblotting analysis of mTOR pathway activation in KNS42, SF188, UW479 and the patient-derived neurosphere cell line TC68 cultured in both normoxic and hypoxic conditions. Figure 2A: mTORC1 and HIF-1/2 $\alpha$  relative expressions. mTORC1 activity is reflected by the downstream activations of phospho-S6RP and phospho-STAT3; Figure 2B: Relative expressions of the upstream mTORC1 regulators phospho-ERK and phospho-AKT and impact on autophagy. Phospho-AKT (Ser 473) is also a downstream substrate of mTORC2. The inactivation of mTORC2 is reflected by the phosphorylation of one of its component RICTOR. This inactivation is part of the feedback inhibitory loop mediated by S6K1 in response to mTOR activation. The impact on autophagy is traduced by the conversion of LC3BI to LC3BII. Figure 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2H: Comparative transcriptomic analysis. The relative expressions of *HIF-1/2 $\alpha$*  and *MYC* are described in Figure 2C. Unsupervised analysis showing the top genes most up-regulated or down-regulated in response to hypoxia (1% O<sub>2</sub>) is described in Figure 2D. Gene set enrichment analysis testing HIFs gene targets is shown in Figure 2F, *MYC* gene targets in Figure 2G and genes involved in cell cycle progression in Figure 2H. Figure 2I: Different impact of hypoxia on the proliferations of KNS42, SF188 and UW479 assessed by a colorimetric proliferation assay using crystal violet. A significant inhibitory effect could be observed in SF188 and UW479 under hypoxia. Figure 2J: Effect on proliferation of siRNA transient transfection against HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  or both in the three cell lines, under hypoxia This effect was measured and compared at 72 hours relatively to the control growth. \*: p<0,05. ES: enrichment score; FDR: false discovery rate**

## Cell line responses to hypoxic conditions of culture

### Impact on mTOR pathway

We assessed the impact of hypoxia on mTOR and its upstream PI3K-AKT and RAS-MAPK pathways by measuring the activation of their components by immunoblotting. In normoxic conditions of culture, KNS42 (which is characterized by genomic gain at the locus of *PIK3CA* and high activation of *IGFR1* pathway, as previously described) presented the highest activation of mTORC1, as shown by the phosphorylation of mTORC1 downstream substrates (S6RP and STAT3) (Fig 2A). This mTOR activation was associated with a strong inhibition of mTORC2, shown by the inhibitory phosphorylation of RICTOR and a subsequent low level of phospho-AKT. Under hypoxia, mTORC1 inhibition resulted in the release of the inhibitory feedback loop on AKT and its subsequent phosphorylation and activation by mTORC2 (showed by the dephosphorylation of RICTOR) (Fig 2B). This feedback regulation was less prominent in the two other cell lines. Indeed, SF188 cell line (which is characterized by *MYC* amplification and *NF1* deletion) showed intermediate levels of mTOR expression, but high levels of phospho-ERK. For this cell line, a further activation of ERK1/2 in hypoxia was correlated with a less important inhibition of S6RP. UW479, carrying no genomic alteration in any of those pathways, showed the lowest level of mTOR activation in normoxia. mTOR was also inhibited under hypoxia, but not associated with AKT nor ERK activation (Fig 2A and 2B). Hypoxia-induced mTOR inhibition was associated in the three cell lines with a strong upregulation of *REDD1* and *BNIP3* gene expression (Fig 2D). Consistent with the role of mTOR in inhibiting autophagy, the autophagy activity reflected by the conversion of LC3B I to LC3B II, was induced in UW479 in normoxia compared to the two other cell lines and induced by hypoxia in the 3 cell lines. (Fig 2A and 2B).



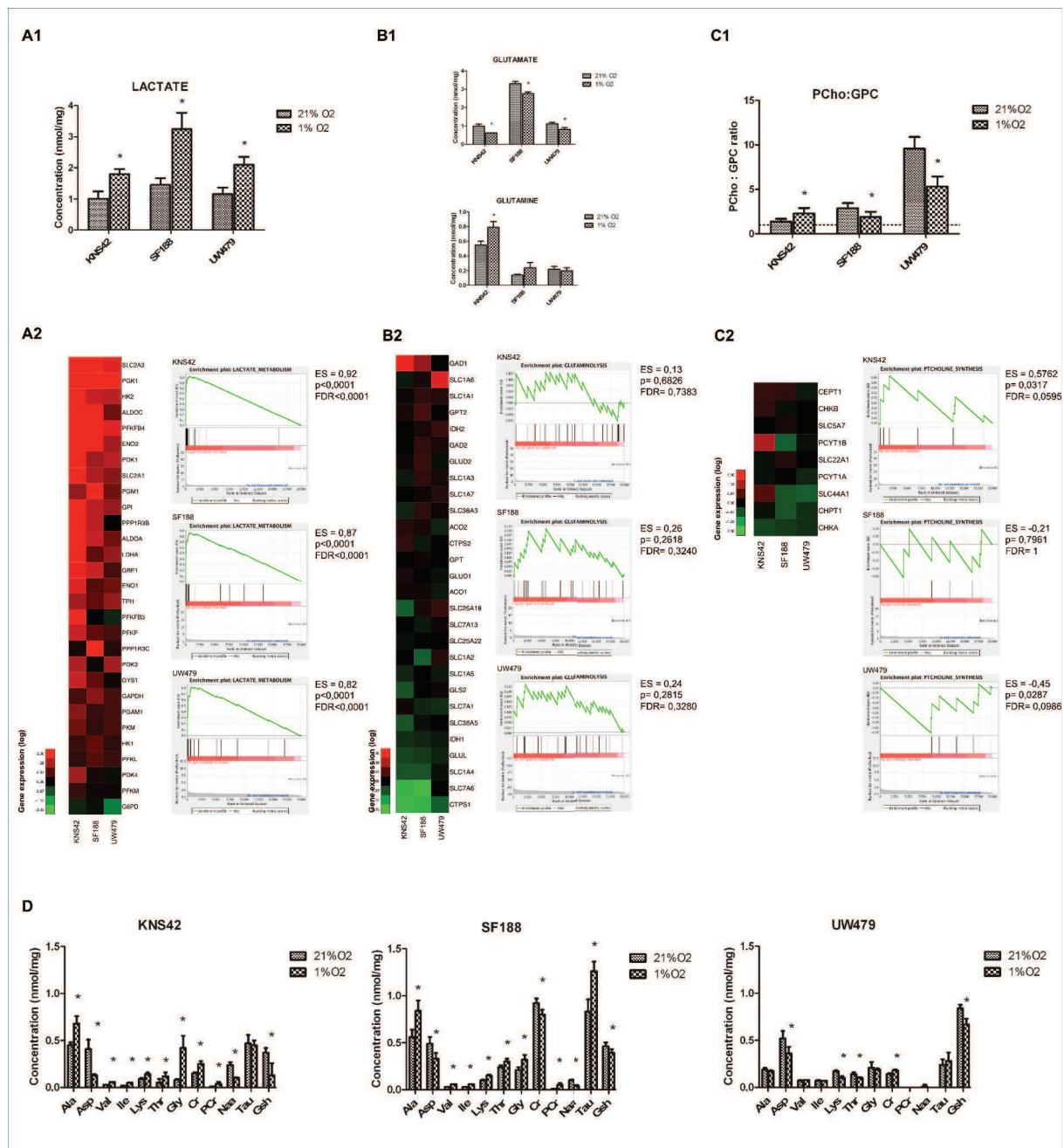
### **HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ and MYC expression in normoxic and hypoxic conditions**

We compared the differential expression of HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  and MYC/MYCN in all three cell lines. In normoxia, no significant protein accumulation of HIF-1 $\alpha$  or HIF-2 $\alpha$  could be seen. Under hypoxia (Fig 2A), HIF-1 $\alpha$  protein accumulation was inversely correlated to the level of mTOR activation, with the highest level in UW479 and the lowest HIF-1 $\alpha$  expression in KNS42. HIF-2 $\alpha$  was also highly accumulated in UW479 (Fig 2B). Only immunocytofluorescence analysis allowed the detection of a moderate and slight HIF-2 $\alpha$  expression in KNS42 and SF188, respectively (data not shown). Those protein levels were correlated with their mRNA expression levels (Fig 2C). As expected, *MYCN* and *MYC* were strongly over-expressed in KNS42 and SF188, respectively. The unsupervised analysis of the transcriptomic response to hypoxia determined the top genes most up-regulated (n=50) and most down-regulated (n=38) (Fig 2D). Amongst these, 27 are well-described usually up-regulated HIF-1 $\alpha$  targets. The GSEA analysis confirmed the strong enrichment in HIF1/2 target gene expression in all three cell lines ( $p < 0,0001$ ). However the spectra of gene activation seems to be slightly different in UW479 compared to the two others. Consistent with HIF-1 $\alpha$  inhibition of MYC target genes in hypoxia, a significant downregulated expression of MYC target genes (other than glycolysis or glutaminolysis) was observed in the three cell lines. as shown by the negative enrichment scores but with a higher significance in SF188 (Fig 2G and 2H). Genes involved in cell cycle progression (also MYC target) were significantly down-regulated in SF188 (ES=-0,68,  $p < 0,0001$ ; ES=-0,33,  $p = 0,0074$ ) and to a less extent in KNS42 and UW479 (ES=-0,33,  $p = 0,0236$ ).

### **Impact of hypoxia on cell proliferation**

Despite this negative effect on cell cycle gene expression, proliferation was efficiently maintained in KNS42, while hypoxia had moderate inhibitory effects on the proliferation of SF188 and UW479 with 20% and 30% decrease respectively at 72h ( $p < 0.05$ ) (Fig 2I).

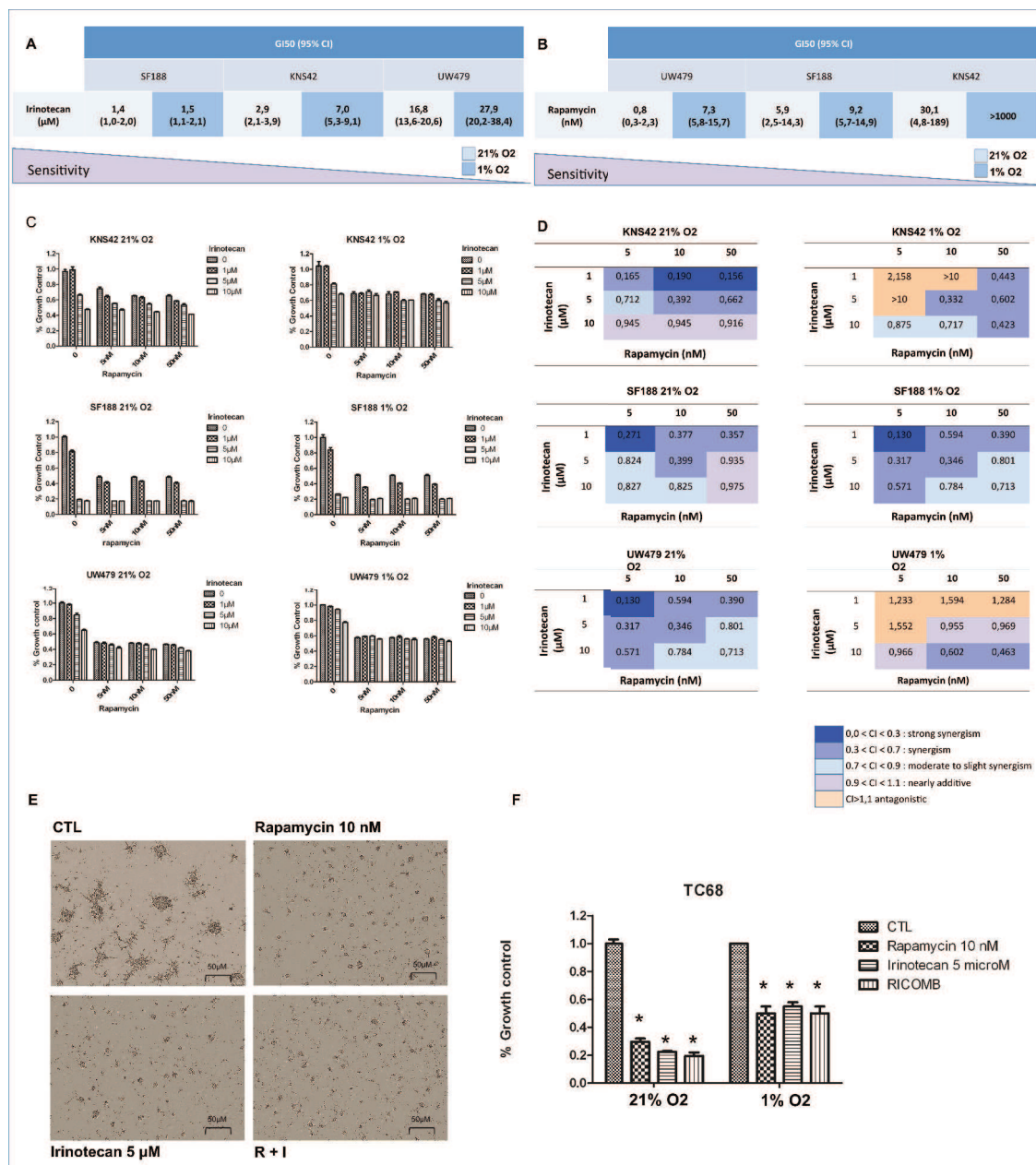
To determine the respective impact of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  on the proliferative capacities of the cell lines under hypoxia, a transient transfection was performed with siRNAs against HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  and the combination of both (Fig 2J). The inhibition of HIF-1 $\alpha$  and/or HIF-2 $\alpha$  contributed to a major proliferation inhibition in UW479: 75% for HIF-1 $\alpha$  or HIF-2 $\alpha$  inhibition and 80% with the combination of both siRNAs ( $p < 0.05$ ). In KNS42 and SF188, the inhibition of HIF-1 $\alpha$  had no significant anti-proliferative effect (20 and 25% respectively). The inhibition of HIF-2 $\alpha$  led to a slight effect in KNS42 (22%, NS) and a moderate effect in SF188 (50% growth inhibition,  $p < 0.05$ ), while a stronger effect could be observed with a combined inhibition leading to a 80% growth inhibition in both cell lines ( $p < 0.05$ ).



**Figure 3: *In vitro* analysis of KNS42, SF188 and UW479 cell lines: Impact of hypoxia (1% O<sub>2</sub>) on metabolism.** Each metabolic pathway was comparatively analyzed in terms of metabolite accumulation by HRMA NMR spectroscopy (concentrations expressed in nmol/mg) and in terms of gene expression by microarrays with GSEA analysis. Glycolysis was analyzed in terms of lactate accumulation and gene expression (**Figure 3A1, 3A2**), glutaminolysis in terms of glutamine and glutamate accumulations and gene expression (**Figure 3B1, 3B2**), the lipid synthesis and degradation pathway in terms of PCho:GPC ratio and gene expression (**Figure 3C1, 3C2**), the amino-acid, creatine and glutathione (GSH) pathways in terms of metabolite accumulations (**Figure 3D**). Ala: alanine; Asp: aspartate; Val: valine; Ile: isoleucine; Lys: lysine; Thr: threonine; Gly: glycine; Cr: creatine; PCr: phospho-creatine; Naa: N-acetyl-aspartate; Tau: taurine; Gsh: glutathione; PCho: phosphor-choline; GPC: glycerophosphocholine; PtCholine: phosphatidyl-choline.

### **Hypoxia-driven metabolic switches are linked to glycolytic, glutaminolytic, serinolytic and lipolytic pathways.**

In order to understand the changes in metabolic fluxes associated with hypoxia, the metabolomic profiles were compared to gene expression. A significant accumulation of lactate was evidenced in all three cell lines in hypoxia, correlated with an up-regulation of the glycolysis genes at the mRNA level especially in *MYCN*-dysregulated KNS42. (Fig 3A). SF188 was characterized by the highest accumulation of glutamate in normoxia, associated with the highest basal up-regulation of glutaminolysis gene expression (Fig 3B). Alanine, glycine and its metabolic derivative creatine were also mostly accumulated in SF188, concomitant with a high expression of the serine/glycine biosynthetic pathway (also named serinolysis) genes (Fig 3C). In SF188 and KNS42 but not in UW479, the accumulation of glutamine, alanine and glycine (together with creatine and phospho-creatine) reflected the activation of glutaminolysis and serinolysis in hypoxia. The activation of glutaminolysis was particularly evident through the up-regulation of *IDH2* and *ACO2* expressions in SF188. Lipid storage and triacyl-glycerol synthesis pathways were induced by hypoxia through the up-regulation of *HILPA* and *TPI* in all cell lines. SREBF1, master regulator of lipogenesis, was significantly up-regulated in hypoxia in KNS42. Consistent with this, KNS42 showed a global up-regulation of the expression of the genes involved in lipid biosynthesis like cholesterol and sphingolipid biosynthesis. It also showed an increase in the PCho:GPC (phosphocholine/glycerophosphocholine) ratio, reflecting an increase in phosphatidylcholine (PtCholine) synthesis (Fig 3D). In UW479, the PCho:GPC ratio decrease was concomitant with the induction of PtCholine degradation genes. Noticeably, in UW479 cell line, the genes involved in lipolysis like *MAGL* and *LPL* were highly up-regulated in both conditions of oxygenation.

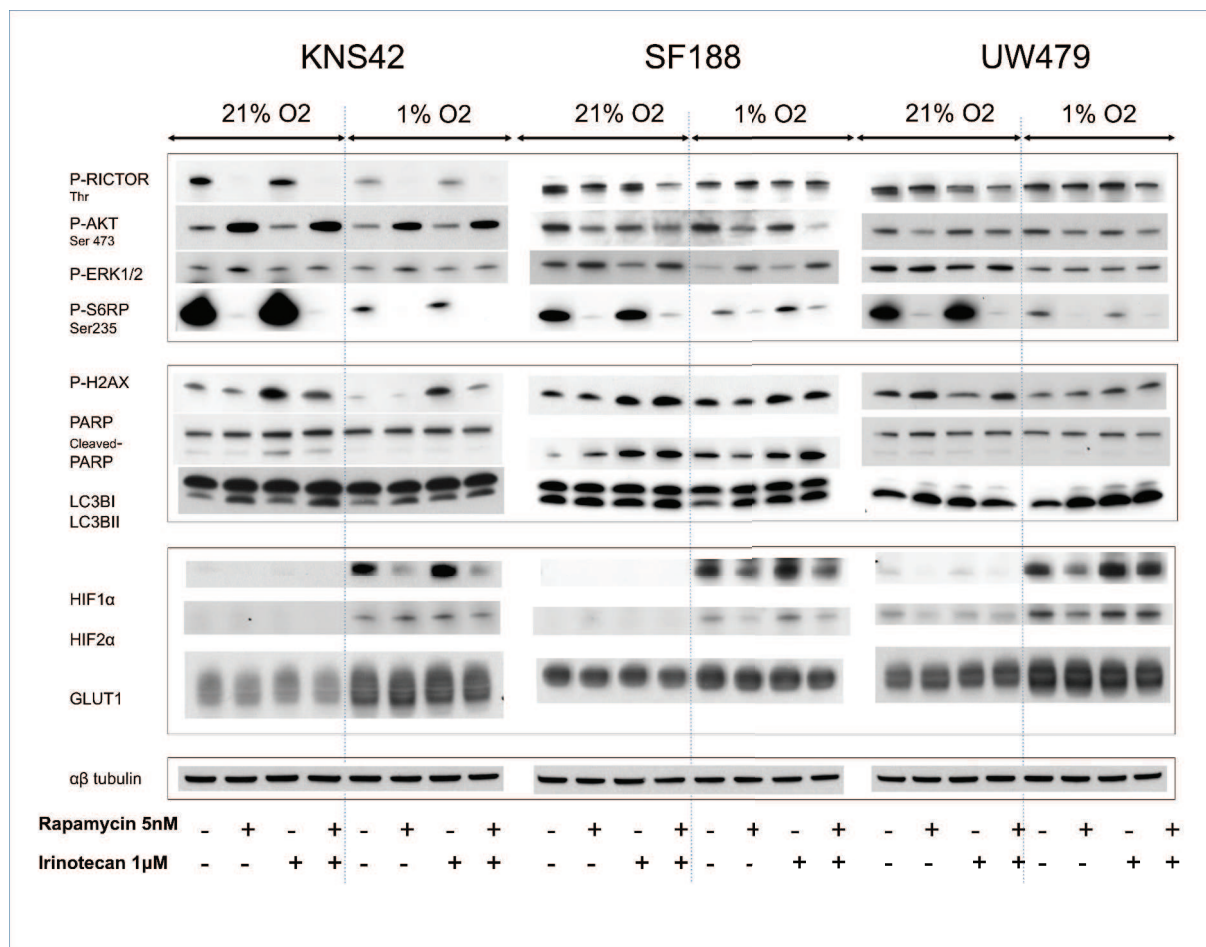


**Figure 4: Efficacy of rapamycin, irinotecan and the combination of both** in terms of anti-proliferative effect measured at 72 hours from treatment in normoxic and hypoxic conditions in the 3 cell lines and in TC68. This anti-proliferative effect was measured using a crystal violet colorimetric proliferation assay in the 3 cell lines and a trypan blue exclusion assay with automatized counting of cells after neurosphere dissociation in TC68. The 50% growth inhibition ( $GI_{50}$ ) values (95% CI) are reported for rapamycin in **Figure 4A** and for irinotecan in **Figure 4B**. Proliferation curves are reported in **Figure 4C** and combination indexes (CI) in **Figure 4D**. For TC68, the effect of drugs on neurosphere formation is described in **Figure 4E** (phase contrast microscopy) and the effect on proliferation in **Figure 4F**.

## **Sensitivity to mTOR/HIF-1 $\alpha$ inhibition correlates with AKT/PI3K activation and HIF-2 $\alpha$ accumulation**

### **Differential effect on proliferation**

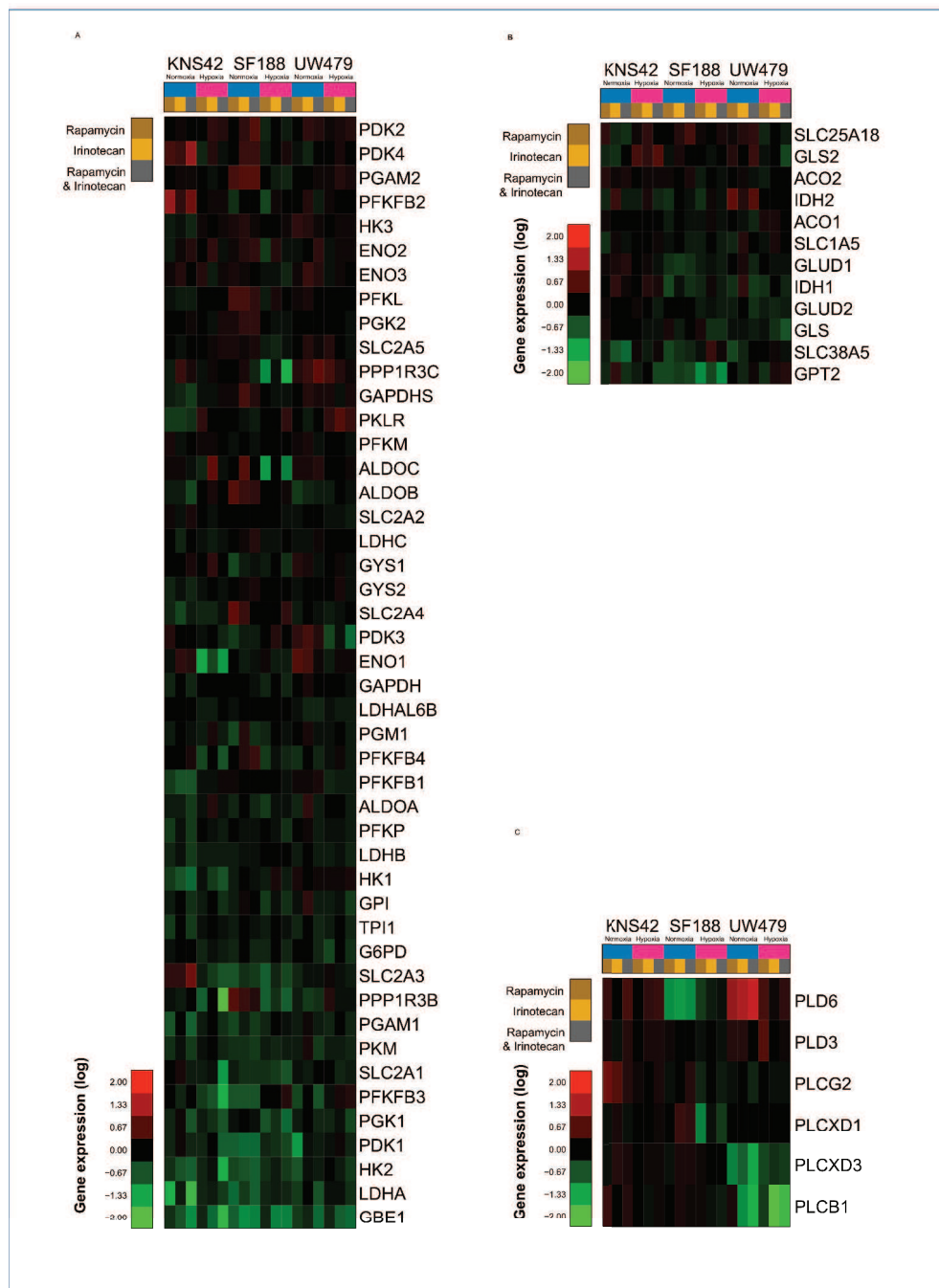
The GI<sub>50</sub> values are reported in Fig 4A for rapamycin and 4B for irinotecan. The GI<sub>50</sub> was obtained for small doses of rapamycin (ranging from 0,8 to 30 nM in normoxia and 7,3 to 100 nM in hypoxia). However, the effect on proliferation was moderate in all three cell lines (Fig 4C). UW479, the most sensitive cell line to rapamycin, showed a maximal plateau effect of 50% with a dose as small as 1 nM. SF188, harboring intermediate sensitivity, showed the same response at 5 nM, whereas KNS42, the most resistant, reached a maximal 40% growth inhibition for a dose of 10 nM. In hypoxia, these maximal effects were obtained for higher doses of rapamycin (10, 20 and 50 nM, respectively). UW479 was highly resistant to irinotecan in normoxia and hypoxia. With a GI<sub>50</sub> around 2  $\mu$ M in normoxia and hypoxia, SF188 was the most sensitive to irinotecan, while KNS42 showed a moderate response. In order to assess the potential synergy of the combination, we tested these drugs with the Chou and Talalay method (rapamycin: 5, 10 and 50 nM and irinotecan: 1, 5 and 10  $\mu$ M) (Fig 4D). In KNS42, a synergy (CI<0.9) could be obtained with the combination but only with doses of irinotecan lower than 10  $\mu$ M, in normoxia. In hypoxia, a synergism could be obtained by increasing the doses of rapamycin and irinotecan at least at 10 nM and 5  $\mu$ M, respectively. In SF188, a synergy was obtained with the smallest doses of rapamycin and irinotecan in both normoxia and hypoxia. In UW479, a high dose of irinotecan 10  $\mu$ M with rapamycin at 10 nM was necessary to obtain a synergism in both conditions.



**Figure 5: Cell effects of rapamycin, irinotecan and the combination of both and impact on the mTOR-HIF-1/2 $\alpha$  pathway in KNS42, SF188 and UW479 in both normoxic and hypoxic conditions. Figure 5A:** Immunoblotting analysis of the protein expressions of I: cleaved PARP, phospho-H2AX and LC3B as markers of apoptosis, double strand breaks and autophagy, respectively; II: Analysis of the phosphorylated forms of RICTOR, AKT, ERK and S6RP as markers of mTOR pathway and HIF-1/2 $\alpha$  protein accumulations.

### Differential effects on cell death

Rapamycin treatment (5-50nM) was not associated with apoptosis in any of the three cell lines, but induced autophagy, especially in UW479. Irinotecan treatment (1-10  $\mu$ M) resulted in apoptosis, as shown by the cleavage of PARP, in SF188 in both conditions and in normoxic culture for KNS42 (Fig 5A). This apoptosis increased with the doses of irinotecan, along with a concomitant increase of phospho-H2AX. No apoptosis or phospho-H2AX induction, but an induction of autophagy was evidenced in UW479 in response to irinotecan. The combination of treatment increased the induction of apoptosis only in normoxic and hypoxic cultures of SF188 cell line.



**Figure 6** Effects of rapamycin, irinotecan and the combination of both, on metabolism gene expression in KNS42, SF188 and UW479 in hypoxic relatively to normoxic conditions. **Figure 6A:** effects on glycolysis pathway, **Figure 6B:** effects on glutaminolysis pathway; **Figure 6C:** effects on phosphatidyl-choline degradation pathway.

CELL LINE	KNS42						SF188						UW479						
	21%			1%			21%			1%			21%			1%			
	R	I	RI	R	I	RI	R	I	RI	R	I	RI	R	I	RI	R	I	RI	
<b>O2 %</b>																			
<b>TREATMENT / CTL</b>																			
<b>Glycolysis</b>	1.20	1.07	1.36	1.48	1.49	2.52	1.09	1.10	1.16	0.85	0.83	0.83	2.45	0.86	1.50	1.79	0.90	0.85	
<b>Glucose</b>	1.22	0.82	0.96	0.94	1.06	1.15	1.30	1.11	0.94	0.90	0.53	1.08	1.07	1.03	1.34	1.45	1.42	1.40	
<b>Glutaminolysis</b>	1.31	1.22	1.60	1.46	1.21	1.51	4.77	3.05	6.99	1.85	1.21	3.27	2.42	1.07	3.19	1.65	1.22	2.26	
<b>Glutamate (Glu)</b>	1.10	1.58	1.49	1.69	1.48	2.30	1.25	1.16	1.16	1.06	0.82	1.15	1.32	0.72	1.12	0.97	0.88	0.89	
<b>Glu : Gln</b>	0.91	1.31	0.94	1.16	1.17	1.49	0.28	0.39	0.17	0.53	0.65	0.25	0.55	0.70	0.38	0.59	0.78	0.40	
<b>Amino acid metabolism</b>	1.17	1.44	1.24	1.54	1.35	1.74	2.19	1.34	2.29	1.85	0.68	1.72	1.42	0.70	1.34	0.96	0.64	0.60	
<b>Aspartate</b>	1.17	1.37	1.45	1.38	1.27	1.44	2.14	1.63	2.71	1.12	0.94	1.52	1.64	1.00	2.05	1.30	1.50	1.63	
<b>Alanine</b>	1.35	1.33	1.78	1.33	1.16	1.22	1.78	1.53	2.28	1.04	0.68	1.50	1.61	0.86	1.65	1.07	1.10	1.19	
<b>Isoleucine</b>	1.43	1.34	2.08	1.39	1.29	1.33	1.90	1.70	2.69	0.98	0.73	1.52	1.74	0.89	1.82	1.17	1.15	1.28	
<b>Lysine</b>	1.13	1.15	1.42	1.21	1.10	1.02	1.60	1.52	1.79	0.95	0.64	1.58	1.37	0.90	1.49	1.07	1.09	1.14	
<b>Glycine</b>	1.15	1.51	1.40	1.42	1.13	0.63	2.00	1.59	2.22	1.06	0.80	1.33	1.52	0.70	1.64	1.21	1.34	1.30	
<b>ROS</b>	1.51	1.25	1.58	1.65	1.32	2.07	1.42	1.18	1.40	1.21	0.84	1.30	1.19	0.65	1.13	0.89	0.92	1.05	
<b>regulation</b>	1.12	1.25	1.30	1.38	1.21	1.49	1.31	1.48	1.42	1.17	0.87	1.25	1.09	0.69	1.08	0.89	0.66	0.73	
<b>Energy storage</b>	2.18	0.83	1.94	2.67	0.98	3.41	1.77	0.70	0.61	0.93	1.34	1.19	1.04	1.71	1.16	0.86	1.49	1.19	
<b>Phospholipids</b>	0.90	0.69	0.63	0.94	0.63	0.52	1.20	0.60	0.59	1.66	0.48	0.92	0.67	1.01	0.68	0.93	0.84	0.77	

Relative quantification of metabolites / control in each condition of culture

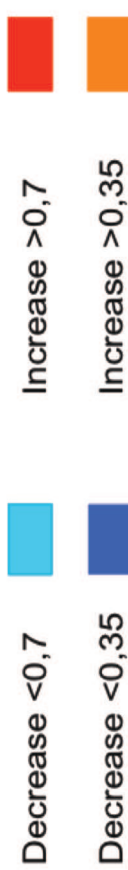




Figure 7: **Effects of treatment on metabolite accumulation.** The results are expressed relatively to control. The significant ( $p < 0,05$ ) changes are shown in red color when the metabolites are increased or in blue color when they are decreased. The relative increase with respect to each treatment or the combination is expressed by a gradation in color from pale orange (small increase), orange (moderate increase) to red (strong increase). Ala: alanine; Asp: aspartate; Val: valine; Ile: isoleucine; Lys: lysine; Thr: threonine; Gly: glycine; Cr: creatine; PCr: phospho-creatine; Naa: N-acetyl-aspartate; Tau: taurine; Gsh: glutathione; PCho: phospho-choline; GPC: glycerophosphocholine; PtCholine: phosphatidyl-choline.

### **Differential effects on mTOR pathway and metabolism**

The KNS42 response to rapamycin was characterized by a strong activation of mTORC2 as shown by the phosphorylation of AKT with a concomitant dephosphorylation of RICTOR. Phospho-AKT was not induced in SF188 and UW479 and even repressed with the highest dose of rapamycin (50 nM). The downstream substrate of mTOR, S6RP, was importantly repressed by rapamycin in all three cell lines. Phospho-ERK was strongly induced by rapamycin in SF188 and particularly in hypoxia, while it was only slightly induced in KNS42 and not in UW479. Phospho-AKT or phospho-ERK expressions were not influenced by irinotecan. In combination, irinotecan did not lower the activation of AKT or ERK induced by rapamycin (Fig 5).

Under hypoxia, HIF-1 $\alpha$  accumulation was strongly repressed by rapamycin in KNS42 and only partially in SF188 and UW479. HIF-2 $\alpha$  was not repressed by in KNS42 under hypoxia with low doses of rapamycin but was clearly repressed in SF188 and more slightly in UW479. Noticeably, there was no inhibition of HIF-1 $\alpha$  or HIF-2 $\alpha$  protein accumulation in any of these cell lines by irinotecan monotherapy. In UW479 an increase of HIF1 and HIF2 accumulation could be observed with the combination of the 2 drugs. At the mRNA level, only few HIF-1/2 $\alpha$  target genes were significantly inhibited by rapamycin in KNS42 and SF188 while no significant down-regulation could be observed in UW479 (Fig 6A). Like the majority of glycolysis genes, which were not down-regulated, the protein expression of GLUT1 (SLC2A1), a downstream target of HIF-1 $\alpha$ , and the levels of glucose or lactate metabolites were not decreased by rapamycin or irinotecan (Fig 5). With the combination, no further protein inhibition of HIF- $\alpha$  accumulation could be observed, compared to rapamycin alone. At the mRNA level, a further down-regulation of HIFs targets could be obtained in KNS42 and SF188 with the combination compared to rapamycin alone for very few genes of the glycolytic pathway (Fig 6A). However, this combined effect did not significantly impact on lactate or glucose metabolism (Fig 7).

*MYC* and *MYCN* expression was not modulated by treatments (data not shown). However, glutaminolysis was strongly inhibited by rapamycin (in SF188 and UW479) as shown by the inversion of the glutamate/glutamine ratio and the down-regulation of glutaminolysis genes (Fig 7). Irinotecan monotherapy had the same inhibitory effect on glutaminolysis in SF188 but only in normoxia. In SF188 and UW479, the combination of both drugs led to a further glutaminolysis inhibition in both cell lines and in both culture conditions. The variation in terms of gene expression of the glutaminolysis pathway was not significant (Fig 6B). Mirroring glutaminolysis inhibition, the accumulation of aspartate, alanine, valine, isoleucine, lysine and glycine was observed as a response to rapamycin (in SF188 and UW479) and irinotecan (in SF188) treatments in normoxia (Fig 7). The phospho-creatine:creatine ratios increased with rapamycin treatment in KNS42 normoxic and

hypoxic cultures. This ratio decreased with irinotecan or the combined treatment in SF188 in normoxia only (Fig 7). The response to irinotecan in SF188 and KNS42 was associated with a decrease in the PCho:GPC ratio in normoxia and hypoxia, but with a stronger effect of the combination in KNS42. Conversely, in UW479, the PCho:GPC ratio increased with irinotecan and decreased with rapamycin or the combination of both drugs (Fig 7). Correlating with these observations, some phospholipases at the origin of the generation of GPC were down-regulated at the mRNA level with irinotecan treatment in UW479 under hypoxia (Fig 6C). Finally, GSH levels were significantly decreased with irinotecan treatment in UW479 as a marker of resistance.

### **The *in vivo* translation into patient samples showed comparable profiles in protein expression and culture**

The immunohistochemical analyses of the TMA, focusing on the surrogate markers of mTOR/HIF-1 $\alpha$  pathway, screened different patient populations based on the AKT/ERK balance in the tumors. The major activation of AKT was associated with PTEN loss in 10 tumors with in 8 cases an induction of HIF-2 $\alpha$  overexpression, linked in *in vitro* analyses with unresponsiveness to the hypoxia inhibition. The MYC/ERK associated overexpression was present in 4 out of 26 specimens, as described in SF188 culture. Two samples were defined as the resistant profile associating mTOR/HIF-2 $\alpha$  overexpression with no expression of phospho-AKT or phospho-ERK (Fig 1B). In 8 specimens, we could only assess the balance between phospho-ERK and phospho-AKT balance. To afford a confirmation in patient-derived cell lines, we also tested the double inhibition of mTOR and HIF-1 $\alpha$  in TC68. TC68 was a patient-derived cell line developed from a pontine anaplastic astrocytoma of a 8 year-old girl at diagnosis (DIPG with a PTEN loss and a AKT activation) and was cultured as neurospheres. TC68 is mainly characterized by *H3.3 (K27M)* and *TP53* mutations and an EGFR amplification (Fig 4E and F). Its response to hypoxia and to the mTOR/HIF-1 $\alpha$  targeting was associated with a moderate sensitivity.

## **DISCUSSION**

In this study, we showed that the dysregulation of MYC/MYCN and the mTOR/HIF pathway determined the metabolic responses of pHGG cell lines to hypoxia, and also their response to the pharmacological inhibition of mTOR and HIF-1 $\alpha$ . As mTOR is physiologically inhibited by hypoxia, the benefit of a further inhibition by rapamycin need to be addressed by a preliminary analysis of the oncogenic and metabolic adaptations intrinsically adopted by the tumor cells to survive and proliferate under hypoxia.<sup>24</sup> In KNS42, the induction by hypoxia of AKT, HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in conjunction with the basal *MYCN* over-expression lead to a complete metabolic reprogramming through the activation of glycolysis, glutaminolysis and lipogenesis. Compared to the other cell lines, KNS42 was the only one to induce the “*de novo*” lipogenesis pathway under hypoxia correlating with the best adaptation to hypoxia in terms of proliferation. The upregulation of the transcription factor SREBP-1, master regulator of lipogenesis sustained this specific induction. Although supposed to be under the positive control of mTORC1, several studies have highlighted the role of mTORC2 and AKT in activating lipogenesis through SREBP-1, linking this reactivation to the best metabolic adaptation.<sup>45–49</sup> In comparison, AKT was

not activated by hypoxia in SF188 and UW479, consistent with a down-regulation of SREBP-1 and lipogenesis genes.

SF188 showed an important basal activation of glutaminolysis sustained by *MYC* amplification. SF188 is a well-established model of glutamine addiction as it was previously demonstrated<sup>50,51</sup>, but no description of its hypoxic adaptation was yet described. In the cell lines using glutaminolysis, this convergence towards glutamate utilization is used to fuel the TCA cycle to produce energy and sustain lipogenesis.<sup>50</sup> *MYCN* amplification was also described as a driver of glycolysis and glutaminolysis in neuroblastoma and medulloblastoma models.<sup>52</sup> However, in KNS42, *MYCN* over-expression due to histone H3.3 G34V mutation seems to drive these pathways mostly in hypoxia. The response of SF188 to hypoxia was characterized by a high activation of glycolysis and reductive glutaminolysis along with a moderate HIF-1 $\alpha$  and a slight HIF-2 $\alpha$  accumulation. Promoting proliferation and survival, a predominant phospho-ERK activation could be observed in SF188 and related to its *NF1* deletion.<sup>53</sup>

In normoxia, UW479 was characterized by low levels of mTOR, ERK and AKT expressions, without *MYC* or *MYCN* dysregulation. It was also characterized by higher level of free amino acids, potentially resulting from its higher basal autophagic activity.<sup>54</sup> Moreover, the lipases MAGL and LPL were over-expressed in UW479 and are well-known markers of aggressiveness in other cancers.<sup>55</sup> Therefore, UW479 may rely on lipolysis and autophagy to sustain its energy demand and its adaptation to hypoxia. In the absence of *MYC* or *NMYC* dysregulation, the very high accumulations of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  observed in UW479 under hypoxia were correlated with a less predominant activations/addictions to glycolysis and glutaminolysis.

It is likely that of all these factors act synergistically in the promotion of the specific metabolic phenotype of each cell in normoxic and hypoxic conditions<sup>21</sup>. A subtle balance may determine cell adaptations. Interestingly, HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  may act in opposite ways to regulate cell cycle progression, by inhibiting (for HIF-1 $\alpha$ ) or promoting (for HIF-2 $\alpha$ ) *MYC*/*MYCN* stabilization or transcriptional activity.<sup>20</sup> In KNS42 and SF188 in which *MYC*/*MYCN* was deregulated and HIF-2 $\alpha$  not highly expressed, most of the genes involved in cell cycle progression were down-regulated under hypoxia. Nevertheless, in UW479, in which HIF-2 $\alpha$  was highly expressed, this latter was not able to promote proliferation in the absence of *MYC*/*MYCN* deregulation and counteract the effect of mTOR inhibition. In contrast, KNS42 and SF188 were able to maintain high proliferation rates, suggesting that these cells have adapted to the hypoxia-induced effects on *MYC*/*MYCN* through AKT and ERK reactivations or diverse genomic alterations like the *CDK4* and *CCND2* gene amplifications seen in SF188. Indeed, the specific inhibition of HIF-1 $\alpha$  or HIF-2 $\alpha$  by siRNA interference had no impact on proliferation in KNS42 but the combined inhibition of both negatively did, confirming their alternative role to promote survival and proliferation.<sup>18</sup> The same proliferation impact was observed in SF188. These results suggest that, in the context of a *MYC*/*MYCN* dysregulation, the unique inhibition of HIF-1 $\alpha$  is not efficient to control cell proliferation. It also suggests that HIF-2 $\alpha$  can modulate proliferation even at low levels of expression but it may depend on a complex transcriptional synergy with HIF-1 $\alpha$ . Interestingly, in absence of *MYC*/*MYCN* deregulation, in UW479, the sole inhibition of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  was sufficient in inhibiting proliferation, confirming their role as drivers of tumor cell survival.

The method consisting in assessing the metabolomic response to chemotherapy<sup>56-59</sup> and linking it with transcriptomic profiles, has already been performed in multiple models.<sup>60</sup> With this method, distinct profiles of response to rapamycin and irinotecan could be depicted from these *in vitro* models and were shown to rely on the same survival and adaptive mechanisms used by the cell to survive hypoxia. While SF188 and UW479 were relatively sensitive to rapamycin, KNS42 was highly resistant. Similarly to the hypoxia-induced mTOR inhibition, the pharmacological inhibition of mTOR by rapamycin led to the same strong feed-back activation of mTORC2 and AKT.<sup>25</sup> As glycolysis, glutaminolysis and lipogenesis processes were not inhibited by small doses of rapamycin and even promoted under hypoxia in KNS42 despite a strong inhibition of HIF-1 $\alpha$  accumulation, it is likely that HIF-2 $\alpha$  and AKT, both enhancing MYCN activity, are the major drivers of resistance to rapamycin in this cell line. These results are correlated with the modest anti-proliferative effects obtained with siRNAs against the HIFs. In SF188, the modest activity of rapamycin could be related to ERK activation and the subsequent less inhibition of mTOR. A strong anti-glutaminolytic effect was associated with rapamycin treatment response in SF188, but also in UW479. The sensitivity to rapamycin was also correlated with the accumulations of aspartate and glycine, previously described and correlated to a decrease of NTP/dNTP synthesis, which was also the consequence of cell cycle arrest with chloroethylnitrosourea.<sup>56,58</sup> An increase of free amino acids was also observed in the rapamycin sensitive cell lines and could be related to a global inhibition of protein synthesis and/or an increase of autophagy due to mTOR inhibition.<sup>57,61</sup> The PCho:GPC ratio was the best to recapitulate the sensitivity to irinotecan. Its increase was related to high proliferation rates and invasiveness in glioma tumors, as in UW479, whereas the diminution of this ratio was correlated with response to therapy and considered as a surrogate marker for growth inhibition, as observed in SF188 and KNS42 sensitive cell lines.<sup>38,59</sup> Irinotecan, known as a TOP1 inhibitor, was also reported to inhibit HIF-1 $\alpha$  gene transcription.<sup>62</sup> In our PMG cell lines, irinotecan seemed to have only modest effects on HIF-1 $\alpha$  expression. Nevertheless, a synergy could be evidenced with the combination of both drugs in the three cell lines, even at low doses. Interestingly, this complex synergy was better recapitulated by metabolomic changes than protein or transcriptomic variations and confirm the increased efficacy in SF188. The most complete response was traduced in SF188 by concomitant glutaminolysis, amino-acid and lipid synthesis inhibitions. A synergy was also highlighted in UW479 but not sufficient in circumventing the high resistance to irinotecan of this cell line, as the adjunction of rapamycin did not allow reducing irinotecan doses to a clinical benefit.

Most patient tumors seem to present a predominance of either AKT or ERK activation when analyzed by immunohistochemistry. However the real contribution of this differential activation in the sensitivity to treatment need to be addressed in the clinical setting. The HIF-2 $\alpha$  response as observed in UW479, which presents otherwise no alteration in the PI3K/AKT/RAS/MAPK pathways, seems to be rare and present in only two patient tumors. As could be expected on its protein signature, the patient derived cell line, TC68, showed sensitivity to rapamycin plus irinotecan treatments. Despite the limitations of *in vitro* models, these genotypes seem to be associated with specific intrinsic responses, which should be taken into consideration for resistance prediction and patient treatment.

In conclusion, using an *in vitro* model of hypoxia, susceptible to mimic more

closely the *in vivo* hypoxic tumor conditions, we depicted metabolomic profiles of response to the combination of rapamycin + irinotecan, determined by a balance between upstream signals in MYC and mTOR/HIF-1/2 $\alpha$  pathways. Hence we confirmed the high chemo-resistant phenotype driven by hypoxia through the inductions of AKT and HIF-2 $\alpha$ . We also showed that in the presence of MYC or NMYC dysregulation, the unique inhibition of HIF-1 $\alpha$  was not sufficient and necessitated a combined approach. These profiles, which can be easily identified by MRS and IHC could be finally used as predictive biomarkers in future patients treated with the combined therapy.

## REFERENCES

1. Paugh BS, Qu C, Jones C, et al. Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010;28(18):3061-3068.
2. Schwartzenuber J, Korshunov A, Liu X-Y, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*. 2012;482(7384):226-231.
3. Sturm D, Bender S, Jones DTW, et al. Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(2):92-107.
4. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2007;114(2):97-109.
5. Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(3):180-192.
6. Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(6):425-437.
7. Semenza GL. Cancer-stromal cell interactions mediated by hypoxia-inducible factors promote angiogenesis, lymphangiogenesis, and metastasis. *Oncogene*. 2013;32(35):4057-4063.
8. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(6):393-410.
9. Santos CR, Schulze A. Lipid metabolism in cancer. *FEBS J*. 2012;279(15):2610-2623.
10. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell*. 2012;21(3):297-308.
11. WARBURG O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956;124(3215):269-270.
12. Smolková K, Plecítá-Hlavatá L, Bellance N, Benard G, Rossignol R, Ježek P. Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(7):950-968.

13. Yee Koh M, Spivak-Kroizman TR, Powis G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci.* 2008;33(11):526-534.
14. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(4):207-214.
15. Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest.* 2013;123(9):3664-3671.
16. Franovic A, Holterman CE, Payette J, Lee S. Human cancers converge at the HIF-2alpha oncogenic axis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(50):21306-21311.
17. Pietras A, Johnsson AS, Pahlman S. The HIF-2 $\alpha$ -driven pseudo-hypoxic phenotype in tumor aggressiveness, differentiation, and vascularization. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;345:1-20.
18. Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci.* 2012;37(9):364-372.
19. Yeung SJ, Pan J, Lee M-H. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2008;65(24):3981-3999.
20. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(1):9-22.
21. Dang CV, Kim J, Gao P, Yustein J. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(1):51-56.
22. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012;149(2):274-293.
23. Laplante M, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 8):1713-1719.
24. Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(11):851-864.
25. Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(1):35-42.
26. Dibble CC, Asara JM, Manning BD. Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Mol Cell Biol.* 2009;29(21):5657-5670.
27. Julien L-A, Carriere A, Moreau J, Roux PP. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol.* 2010;30(4):908-921.
28. Chresta CM, Davies BR, Hickson I, et al. AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res.* 2010;70(1):288-298.
29. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response.

*Oncotarget*. 2012;3(9):954-987.

30. Pencreach E, Guérin E, Nicolet C, et al. Marked activity of irinotecan and rapamycin combination toward colon cancer cells in vivo and in vitro is mediated through cooperative modulation of the mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor-1alpha axis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009;15(4):1297-1307.
31. Antonelli M, Massimino M, Morra I, et al. Expression of pERK and pAKT in pediatric high grade astrocytomas: correlation with YKL40 and prognostic significance. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol*. 2012;32(2):133-138.
32. Faury D, Nantel A, Dunn SE, et al. Molecular profiling identifies prognostic subgroups of pediatric glioblastoma and shows increased YB-1 expression in tumors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007;25(10):1196-1208.
33. Mueller S, Phillips J, Onar-Thomas A, et al. PTEN promoter methylation and activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in pediatric gliomas and influence on clinical outcome. *Neuro-Oncol*. 2012;14(9):1146-1152.
34. Thorarinsdottir HK, Santi M, McCarter R, et al. Protein expression of platelet-derived growth factor receptor correlates with malignant histology and PTEN with survival in childhood gliomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008;14(11):3386-3394.
35. Bielen A, Perryman L, Box GM, et al. Enhanced efficacy of IGF1R inhibition in pediatric glioblastoma by combinatorial targeting of PDGFR $\alpha/\beta$ . *Mol Cancer Ther*. 2011;10(8):1407-1418.
36. Jones C, Perryman L, Hargrave D. Paediatric and adult malignant glioma: close relatives or distant cousins? *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(7):400-413.
37. Bjerke L, Mackay A, Nandhabalan M, et al. Histone H3.3 Mutations Drive Pediatric Glioblastoma through Upregulation of MYCN. *Cancer Discov*. 2013.
38. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009;15(2):431-440.
39. Henriksson E, Kjellén E, Wahlberg P, Wennerberg J, Kjellström JH. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2006;42(10):320-323.
40. Martínez-Bisbal MC, Martí-Bonmatí L, Piquer J, et al.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo  $^1\text{H}$  MRS study of human high grade gliomas. *NMR Biomed*. 2004;17(4):191-205.
41. Piotto M, Moussallieh F, Imperiale A, Benahmed M, Detour J. *Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques for Metabolic Profiling of Human Tissues by Proton High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance*. Cambridge: Cambridge University Press: Lutz NW, editor; 2013.
42. Wishart D, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo A. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic acids research*. 2007;35:D521-526.

43. Guenot D, Guérin E, Aguilon-Romain S, et al. Primary tumour genetic alterations and intra-tumoral heterogeneity are maintained in xenografts of human colon cancers showing chromosome instability. *J Pathol.* 2006;208(5):643-652.
44. Entz-Werle N, Lavaux T, Metzger N, et al. Involvement of MET/TWIST/APC combination or the potential role of ossification factors in pediatric high-grade osteosarcoma oncogenesis. *Neoplasia N Y N.* 2007;9(8):678-688.
45. Guo D, Prins RM, Dang J, et al. EGFR signaling through an Akt-SREBP-1-dependent, rapamycin-resistant pathway sensitizes glioblastomas to antilipogenic therapy. *Sci Signal.* 2009;2(101):ra82.
46. Guo D, Reinitz F, Youssef M, et al. An LXR agonist promotes glioblastoma cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. *Cancer Discov.* 2011;1(5):442-456.
47. Hagiwara A, Cornu M, Cybulski N, et al. Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. *Cell Metab.* 2012;15(5):725-738.
48. Porstmann T, Griffiths B, Chung Y-L, et al. PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene.* 2005;24(43):6465-6481.
49. Yecies JL, Zhang HH, Menon S, et al. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab.* 2011;14(1):21-32.
50. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(48):18782-18787.
51. Yang C, Sudderth J, Dang T, et al. Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. *Cancer Res.* 2009;69(20):7986-7993.
52. Qing G, Skuli N, Mayes PA, et al. Combinatorial regulation of neuroblastoma tumor progression by N-Myc and hypoxia inducible factor HIF-1alpha. *Cancer Res.* 2010;70(24):10351-10361.
53. Chen J-Q, Russo J. Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1826(2):370-384.
54. Mathew R, White E. Autophagy, stress, and cancer metabolism: what doesn't kill you makes you stronger. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011;76:389-396.
55. Zaidi N, Lupien L, Kuemmerle NB, Kinlaw WB, Swinnen JV, Smans K. Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2013;52(4):585-589.
56. Cao MD, Giskeødegård GF, Bathen TF, et al. Prognostic value of metabolic response in



breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *BMC Cancer*. 2012;12:39.

57. Wei S, Liu L, Zhang J, et al. Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Mol Oncol*. 2013;7(3):297-307.
58. Morvan D, Demidem A. Metabolomics by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of the response to chloroethylnitrosourea reveals drug efficacy and tumor adaptive metabolic pathways. *Cancer Res*. 2007;67(5):2150-2159.
59. Bradshaw-Pierce EL, Pitts TM, Kulikowski G, et al. Utilization of quantitative in vivo pharmacology approaches to assess combination effects of everolimus and irinotecan in mouse xenograft models of colorectal cancer. *PLoS One*. 2013;8(3):e58089.
60. Cuperlovic-Culf M, Ferguson D, Culf A, Morin P Jr, Touaibia M. <sup>1</sup>H NMR metabolomics analysis of glioblastoma subtypes: correlation between metabolomics and gene expression characteristics. *J Biol Chem*. 2012;287(24):20164-20175.
61. Weljie AM, Bondareva A, Zang P, Jirik FR. (1)H NMR metabolomics identification of markers of hypoxia-induced metabolic shifts in a breast cancer model system. *J Biomol NMR*. 2011;49(3-4):185-193.
62. Capranico G, Marinello J, Baranello L. Dissecting the transcriptional functions of human DNA topoisomerase I by selective inhibitors: implications for physiological and therapeutic modulation of enzyme activity. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1806(2):240-250.

## VI.C Conclusion et perspectives

Bien évidemment cette étude réalisée avec des modèles de lignées maintenues *in vitro* ne permet pas de prendre en compte d'éventuels effets des drogues sur le microenvironnement tumoral, notamment sur le système vasculaire pour induire des effets anti-angiogéniques. Cependant, des expériences seront réalisées sur des modèles *in vivo* de xénogreffes intracrâniennes.

En conclusion, l'utilisation de lignées cellulaires dérivées de patients et cultivées en hypoxie afin de mieux mimer des conditions hypoxiques intratumorales, a permis d'établir des profils métabolomiques de réponse à la combinaison rapamycine et irinotécan. Nous avons confirmé la chimio-résistance induite par l'hypoxie via l'activation de HIF-2 $\alpha$  et de la voie PI3K/AKT/mTOR. Nous avons également montré qu'en présence de MYC ou d'une dérégulation de l'expression de MYCN, l'inhibition unique de HIF-1 $\alpha$  n'est pas suffisante et nécessite une approche de combinaisons de drogues. Les profils métaboliques ou d'expression protéiques, qui peuvent être facilement établis par spectroscopie par résonance magnétique et/ou immunohistochimie, pourraient être utilisés comme biomarqueurs prédictifs de réponse pour des patients potentiellement traités par une thérapie combinée.

# Conclusion

Ce travail a permis de développer plusieurs outils, utiles à l'étude des gliomes malins pédiatriques, avec a) la mise au point d'une technique simple et sensible de PCR spécifique de méthylation (MSP) permettant la détermination du statut de *MGMT*, b) le développement de nouveaux modèles *in vitro* et *in vivo*.

Notre MSP semi-quantitative a été validée à l'aide d'une cohorte de gliomes de haut grade de l'adulte et a permis de confirmer la valeur prédictive indépendante de l'hyperméthylation du promoteur de *MGMT* dans les gliomes de haut grade *IDH1* wild type. Cette technique a l'avantage de pouvoir détecter les méthylations partielles qui semblent ne pas être associées au même pronostic. Elle a par ailleurs mis en évidence une corrélation entre le taux de méthylation en termes de pourcentage de cellules méthylées et la survie, suggérant l'existence d'une hétérogénéité intra-tumorale. Grâce à cette technique, nous avons pu confirmer que l'hyperméthylation du promoteur de *MGMT* était moins fréquente chez l'enfant, de l'ordre de 15% sur notre cohorte limitée (n=30). Un travail parallèle dans le but d'étudier les altérations concomitantes des autres systèmes impliqués dans la réparation de l'ADN et dans la réponse au TMZ, est à l'heure actuelle en cours. Les premiers résultats suggèrent une implication moindre de ces systèmes de réparation (en tant que pourvoyeurs de phénotypes mutateurs et d'instabilité génétique) dans la gliomagenèse pédiatrique.

Ce travail s'inscrit dans une volonté nationale et internationale de développer de nouveaux modèles précliniques de gliomes malins pédiatriques et d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques. Il a permis d'en développer un certain nombre dont la caractérisation et la transposition chez la souris NOD/SCID ne fait que commencer. Les neurosphères, cultivées dans des conditions d'hypoxie, représentent un outil intéressant à développer pour tester de nouvelles thérapies mais demandent encore de nombreuses mises au point, entre nos mains.

Enfin une première tentative d'identification de biomarqueurs prédictifs de réponse à partir de modèles précliniques *in vitro*, a été réalisée en parallèle de l'étude phase I « RAPIRI » sur l'association de la rapamycine et de l'irinotécan, lancé il y a 3 ans dans les tumeurs réfractaires de l'enfant. Cette démarche avait pour but d'identifier des biomarqueurs, relevant sur le plan fonctionnel, en corrélant la réponse au génotype. L'étude de l'activation des voies oncogéniques, des signatures

transcriptomiques et du métabolome nous a permis d'identifier HIF-2 et AKT/mTORC2 comme les principaux biomarqueurs de résistance intrinsèque à cette thérapie. Ces réponses ou résistances ont pu être détectées par les variations de certains métabolites en HRMAS RMN spectroscopie. Ces biomarqueurs seront validés au sein de la phase II « RAPIRI » qui sera prochainement lancée. Bien évidemment cette évaluation *in vitro* de RAPIRI, passe à côté de l'ensemble des effets probables de cette thérapie sur le microenvironnement tumoral, notamment anti-angiogéniques, effets qui seront testés sur nos prochains modèles *in vivo*.



# Bibliographie

- Abbotts, R., and Madhusudan, S. (2010). Human AP endonuclease 1 (APE1): from mechanistic insights to druggable target in cancer. *Cancer Treat. Rev.* 36, 425–435.
- D'Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* 8, 512–522.
- Adhikari, S., Choudhury, S., Mitra, P.S., Dubash, J.J., Sajankila, S.P., and Roy, R. (2008). Targeting base excision repair for chemosensitization. *Anticancer Agents Med. Chem.* 8, 351–357.
- Albertella, M.R., Lau, A., and O'Connor, M.J. (2005a). The overexpression of specialized DNA polymerases in cancer. *DNA Repair* 4, 583–593.
- Albertella, M.R., Green, C.M., Lehmann, A.R., and O'Connor, M.J. (2005b). A role for polymerase eta in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage. *Cancer Res.* 65, 9799–9806.
- Albright, A.L., Packer, R.J., Zimmerman, R., Rorke, L.B., Boyett, J., and Hammond, G.D. (1993). Magnetic resonance scans should replace biopsies for the diagnosis of diffuse brain stem gliomas: a report from the Children's Cancer Group. *Neurosurgery* 33, 1026–1029; discussion 1029–1030.
- Almeida, K.H., and Sobol, R.W. (2007). A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair* 6, 695–711.
- Antonelli, M., Massimino, M., Morra, I., Garrè, M.L., Gardiman, M.P., Buttarelli, F.R., Arcella, A., and Giangaspero, F. (2012). Expression of pERK and pAKT in pediatric high grade astrocytomas: correlation with YKL40 and prognostic significance. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* 32, 133–138.
- Appelhoff, R.J., Tian, Y.-M., Raval, R.R., Turley, H., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Gleadle, J.M. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* 279, 38458–38465.
- Arora, R.S., Alston, R.D., Eden, T.O.B., Estlin, E.J., Moran, A., and Birch, J.M. (2009). Age-incidence patterns of primary CNS tumors in children, adolescents, and adults in England. *Neuro-Oncol.* 11, 403–413.

- Baker, G.J., Yadav, V.N., Motsch, S., Koschmann, C., Calinescu, A.-A., Mineharu, Y., Camelo-Piragua, S.I., Orringer, D., Bannykh, S., Nichols, W.S., et al. (2014). Mechanisms of Glioma Formation: Iterative Perivascular Glioma Growth and Invasion Leads to Tumor Progression, VEGF-Independent Vascularization, and Resistance to Antiangiogenic Therapy. *Neoplasia N. Y. N* 16, 543–561.
- Bar, E.E., Lin, A., Mahairaki, V., Matsui, W., and Eberhart, C.G. (2010). Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am. J. Pathol.* 177, 1491–1502.
- Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A.A., Kim, S., Wilson, C.J., Lehár, J., Kryukov, G.V., Sonkin, D., et al. (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483, 603–607.
- Barton, V.N., Donson, A.M., Kleinschmidt-DeMasters, B.K., Gore, L., Liu, A.K., and Foreman, N.K. (2009). PARP1 expression in pediatric central nervous system tumors. *Pediatr. Blood Cancer* 53, 1227–1230.
- Batchelor, T.T., Sorensen, A.G., di Tomaso, E., Zhang, W.-T., Duda, D.G., Cohen, K.S., Kozak, K.R., Cahill, D.P., Chen, P.-J., Zhu, M., et al. (2007). AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell* 11, 83–95.
- Batchelor, T.T., Gerstner, E.R., Emblem, K.E., Duda, D.G., Kalpathy-Cramer, J., Snuderl, M., Ancukiewicz, M., Polaskova, P., Pinho, M.C., Jennings, D., et al. (2013). Improved tumor oxygenation and survival in glioblastoma patients who show increased blood perfusion after cediranib and chemoradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 19059–19064.
- Bauchet, L., Rigau, V., Mathieu-Daudé, H., Fabbro-Peray, P., Palenzuela, G., Figarella-Branger, D., Moritz, J., Puget, S., Bauchet, F., Pallusseau, L., et al. (2009). Clinical epidemiology for childhood primary central nervous system tumors. *J. Neurooncol.* 92, 87–98.
- Bax, D.A., Little, S.E., Gaspar, N., Perryman, L., Marshall, L., Viana-Pereira, M., Jones, T.A., Williams, R.D., Grigoriadis, A., Vassal, G., et al. (2009). Molecular and phenotypic characterisation of paediatric glioma cell lines as models for preclinical drug development. *PloS One* 4, e5209.
- Bax, D.A., Mackay, A., Little, S.E., Carvalho, D., Viana-Pereira, M., Tamber, N.,



- Grigoriadis, A.E., Ashworth, A., Reis, R.M., Ellison, D.W., et al. (2010). A distinct spectrum of copy number aberrations in pediatric high-grade gliomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 3368–3377.
- Beier, D., Röhrl, S., Pillai, D.R., Schwarz, S., Kunz-Schughart, L.A., Leukel, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., Bogdahn, U., Trampe-Kieslich, A., et al. (2008). Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res.* *68*, 5706–5715.
- Beier, D., Schulz, J.B., and Beier, C.P. (2011). Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected. *Mol. Cancer* *10*, 128.
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouysségur, J., and Mazure, N.M. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 2570–2581.
- Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C., and Hall, M.N. (2011). Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 868–880.
- Bensaad, K., and Vousden, K.H. (2007). p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol.* *17*, 286–291.
- Van den Bent, M.J. (2010). Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *120*, 297–304.
- Bernardi, R., Guernah, I., Jin, D., Grisendi, S., Alimonti, A., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Simon, M.C., Rafii, S., and Pandolfi, P.P. (2006). PML inhibits HIF-1 $\alpha$  translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature* *442*, 779–785.
- Bertout, J.A., Patel, S.A., and Simon, M.C. (2008). The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 967–975.
- Bertout, J.A., Patel, S.A., Fryer, B.H., Durham, A.C., Covelto, K.L., Olive, K.P., Goldschmidt, M.H., and Simon, M.C. (2009). Heterozygosity for hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  decreases the incidence of thymic lymphomas in a p53 mutant mouse model. *Cancer Res.* *69*, 3213–3220.
- Bertozi, D., Marinello, J., Manzo, S.G., Fornari, F., Gramantieri, L., and Capranico, G. (2014). The natural inhibitor of DNA topoisomerase I, camptothecin, modulates HIF-1 $\alpha$  activity by changing miR expression patterns in human cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* *13*, 239–248.
- Bhakat, K.K., and Mitra, S. (2000). Regulation of the human O(6)-methylguanine-DNA

- methyltransferase gene by transcriptional coactivators cAMP response element-binding protein-binding protein and p300. *J. Biol. Chem.* 275, 34197–34204.
- Bielen, A., Perryman, L., Box, G.M., Valenti, M., de Haven Brandon, A., Martins, V., Jury, A., Popov, S., Gowan, S., Jeay, S., et al. (2011). Enhanced efficacy of IGF1R inhibition in pediatric glioblastoma by combinatorial targeting of PDGFR $\alpha/\beta$ . *Mol. Cancer Ther.* 10, 1407–1418.
- Birch, J.M., Alston, R.D., Kelsey, A.M., Quinn, M.J., Babb, P., and McNally, R.J.Q. (2002). Classification and incidence of cancers in adolescents and young adults in England 1979-1997. *Br. J. Cancer* 87, 1267–1274.
- Birner, P., Gatterbauer, B., Oberhuber, G., Schindl, M., Rössler, K., Proding, A., Budka, H., and Hainfellner, J.A. (2001). Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer* 92, 165–171.
- Bjerke, L., Mackay, A., Nandhabalan, M., Burford, A., Jury, A., Popov, S., Bax, D.A., Carvalho, D., Taylor, K.R., Vinci, M., et al. (2013). Histone H3.3 Mutations Drive Pediatric Glioblastoma through Upregulation of MYCN. *Cancer Discov.*
- Blouw, B., Song, H., Tihan, T., Bosze, J., Ferrara, N., Gerber, H.P., Johnson, R.S., and Bergers, G. (2003). The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell* 4, 133–146.
- De Bock, K., Mazzone, M., and Carmeliet, P. (2011). Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: risky liaisons, or not? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8, 393–404.
- Boldogh, I., Ramana, C.V., Chen, Z., Biswas, T., Hazra, T.K., Grösch, S., Grombacher, T., Mitra, S., and Kaina, B. (1998). Regulation of expression of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase via protein kinase C-mediated signaling. *Cancer Res.* 58, 3950–3956.
- Boström, P., Magnusson, B., Svensson, P.-A., Wiklund, O., Borén, J., Carlsson, L.M.S., Ståhlman, M., Olofsson, S.-O., and Hultén, L.M. (2006). Hypoxia converts human macrophages into triglyceride-loaded foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1871–1876.
- Bracken, C.P., Fedele, A.O., Linke, S., Balrak, W., Lisy, K., Whitelaw, M.L., and Peet, D.J. (2006). Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha stabilization and transactivation in a graded oxygen environment. *J. Biol. Chem.* 281, 22575–22585.

- Brandes, A.A., Stupp, R., Hau, P., Lacombe, D., Gorlia, T., Tosoni, A., Mirimanoff, R.O., Kros, J.M., and van den Bent, M.J. (2010). EORTC study 26041-22041: phase I/II study on concomitant and adjuvant temozolomide (TMZ) and radiotherapy (RT) with PTK787/ZK222584 (PTK/ZK) in newly diagnosed glioblastoma. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 46, 348–354.
- Brat, D.J., Castellano-Sanchez, A.A., Hunter, S.B., Pecot, M., Cohen, C., Hammond, E.H., Devi, S.N., Kaur, B., and Van Meir, E.G. (2004). Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res.* 64, 920–927.
- Braunstein, S., Karpisheva, K., Pola, C., Goldberg, J., Hochman, T., Yee, H., Cangiarella, J., Arju, R., Formenti, S.C., and Schneider, R.J. (2007). A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Mol. Cell* 28, 501–512.
- Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., et al. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155, 462–477.
- Bristow, R.G., and Hill, R.P. (2008). Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat. Rev. Cancer* 8, 180–192.
- Broniscer, A., Baker, J.N., Baker, S.J., Chi, S.N., Geyer, J.R., Morris, E.B., and Gajjar, A. (2010). Prospective collection of tissue samples at autopsy in children with diffuse intrinsic pontine glioma. *Cancer* 116, 4632–4637.
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R.L., Manning, B.D., Reiling, J.H., Hafen, E., Witters, L.A., Ellisen, L.W., and Kaelin, W.G. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* 18, 2893–2904.
- Brunelle, J.K., Bell, E.L., Quesada, N.M., Vercauteren, K., Tiranti, V., Zeviani, M., Scarpulla, R.C., and Chandel, N.S. (2005). Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 1, 409–414.
- Buczkwicz, P., Hoeman, C., Rakopoulos, P., Pajovic, S., Letourneau, L., Dzamba, M., Morrison, A., Lewis, P., Bouffet, E., Bartels, U., et al. (2014). Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nat. Genet.* 46, 451–456.
- Buttarelli, F.R., Massimino, M., Antonelli, M., Lauriola, L., Nozza, P., Donofrio, V., Arcella,

- A., Oliva, M.A., Di Rocco, C., and Giangaspero, F. (2010). Evaluation status and prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in pediatric high grade gliomas. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* *26*, 1051–1056.
- Cage, T.A., Samagh, S.P., Mueller, S., Nicolaides, T., Haas-Kogan, D., Prados, M., Banerjee, A., Auguste, K.I., and Gupta, N. (2013). Feasibility, safety, and indications for surgical biopsy of intrinsic brainstem tumors in children. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* *29*, 1313–1319.
- Cahill, D.P., Levine, K.K., Betensky, R.A., Codd, P.J., Romany, C.A., Reavie, L.B., Batchelor, T.T., Futreal, P.A., Stratton, M.R., Curry, W.T., et al. (2007). Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 2038–2045.
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M., et al. (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* *11*, 69–82.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* *455*, 1061–1068.
- Capranico, G., Marinello, J., and Baranello, L. (2010). Dissecting the transcriptional functions of human DNA topoisomerase I by selective inhibitors: implications for physiological and therapeutic modulation of enzyme activity. *Biochim. Biophys. Acta* *1806*, 240–250.
- Caretti, V., Hiddingh, L., Lagerweij, T., Schellen, P., Koken, P.W., Hulleman, E., van Vuurden, D.G., Vandertop, W.P., Kaspers, G.J.L., Noske, D.P., et al. (2013). WEE1 kinase inhibition enhances the radiation response of diffuse intrinsic pontine gliomas. *Mol. Cancer Ther.* *12*, 141–150.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* *407*, 249–257.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* *473*, 298–307.
- Cayre, M., Canoll, P., and Goldman, J.E. (2009). Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* *88*, 41–63.
- Champoux, J.J. (2000). Structure-based analysis of the effects of camptothecin on the

- activities of human topoisomerase I. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 922, 56–64.
- Chan, K.K.L., Zhang, Q.-M., and Dianov, G.L. (2006). Base excision repair fidelity in normal and cancer cells. *Mutagenesis* 21, 173–178.
- Chassot, A., Canale, S., Varlet, P., Puget, S., Roujeau, T., Negretti, L., Dhermain, F., Rialland, X., Raquin, M.A., Grill, J., et al. (2012). Radiotherapy with concurrent and adjuvant temozolomide in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma. *J. Neurooncol.* 106, 399–407.
- Chen, D., Li, M., Luo, J., and Gu, W. (2003). Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J. Biol. Chem.* 278, 13595–13598.
- Chen, L., Feng, P., Li, S., Long, D., Cheng, J., Lu, Y., and Zhou, D. (2009a). Effect of hypoxia-inducible factor-1alpha silencing on the sensitivity of human brain glioma cells to doxorubicin and etoposide. *Neurochem. Res.* 34, 984–990.
- Chen, W., Ostrowski, R.P., Obenaus, A., and Zhang, J.H. (2009b). Prodeath or prosurvival: two facets of hypoxia inducible factor-1 in perinatal brain injury. *Exp. Neurol.* 216, 7–15.
- Cheng, C.L., Johnson, S.P., Keir, S.T., Quinn, J.A., Ali-Osman, F., Szabo, C., Li, H., Salzman, A.L., Dolan, M.E., Modrich, P., et al. (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition reverses temozolomide resistance in a DNA mismatch repair-deficient malignant glioma xenograft. *Mol. Cancer Ther.* 4, 1364–1368.
- Chi, H. (2012). Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 325–338.
- Choi, E.J., Cho, B.J., Lee, D.J., Hwang, Y.H., Chun, S.H., Kim, H.H., and Kim, I.A. (2014). Enhanced cytotoxic effect of radiation and temozolomide in malignant glioma cells: targeting PI3K-AKT-mTOR signaling, HSP90 and histone deacetylases. *BMC Cancer* 14, 17.
- Chow, L.M.L., and Baker, S.J. (2012). Capturing the molecular and biological diversity of high-grade astrocytoma in genetically engineered mouse models. *Oncotarget* 3, 67–77.
- Chresta, C.M., Davies, B.R., Hickson, I., Harding, T., Cosulich, S., Critchlow, S.E., Vincent, J.P., Ellston, R., Jones, D., Sini, P., et al. (2010). AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res.* 70, 288–298.
- Christmann, M., Verbeek, B., Roos, W.P., and Kaina, B. (2011). O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter

- methylation and immunohistochemistry. *Biochim. Biophys. Acta* 1816, 179–190.
- Chua, C., Zaiden, N., Chong, K.-H., See, S.-J., Wong, M.-C., Ang, B.-T., and Tang, C. (2008). Characterization of a side population of astrocytoma cells in response to temozolomide. *J. Neurosurg.* 109, 856–866.
- Chung, D.C., and Rustgi, A.K. (1995). DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology* 109, 1685–1699.
- Cloughesy, T.F., Yoshimoto, K., Nghiemphu, P., Brown, K., Dang, J., Zhu, S., Hsueh, T., Chen, Y., Wang, W., Youngkin, D., et al. (2008). Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. *PLoS Med.* 5, e8.
- Cojoc, M., Mäbert, K., Muders, M.H., and Dubrovskaja, A. (2014). A role for cancer stem cells in therapy resistance: Cellular and molecular mechanisms. *Semin. Cancer Biol.*
- Colin, C., Virard, I., Baeza, N., Tchoghandjian, A., Fernandez, C., Bouvier, C., Calisti, A., Tong, S., Durbec, P., and Figarella-Branger, D. (2007). Relevance of combinatorial profiles of intermediate filaments and transcription factors for glioma histogenesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33, 431–439.
- Collingridge, D.R., Piepmeyer, J.M., Rockwell, S., and Knisely, J.P. (1999). Polarographic measurements of oxygen tension in human glioma and surrounding peritumoural brain tissue. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 53, 127–131.
- Coma, S., Shimizu, A., and Klagsbrun, M. (2011). Hypoxia induces tumor and endothelial cell migration in a semaphorin 3F- and VEGF-dependent manner via transcriptional repression of their common receptor neuropilin 2. *Cell Adhes. Migr.* 5, 266–275.
- Comerford, K.M., Wallace, T.J., Karhausen, J., Louis, N.A., Montalto, M.C., and Colgan, S.P. (2002). Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res.* 62, 3387–3394.
- Connolly, E., Braunstein, S., Formenti, S., and Schneider, R.J. (2006). Hypoxia inhibits protein synthesis through a 4E-BP1 and elongation factor 2 kinase pathway controlled by mTOR and uncoupled in breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3955–3965.
- Corn, P.G., Ricci, M.S., Scata, K.A., Arsham, A.M., Simon, M.C., Dicker, D.T., and El-Deiry, W.S. (2005). Mxi1 is induced by hypoxia in a HIF-1-dependent manner and protects cells from c-Myc-induced apoptosis. *Cancer Biol. Ther.* 4, 1285–1294.
- Costello, J.F., Futscher, B.W., Kroes, R.A., and Pieper, R.O. (1994). Methylation-related chromatin structure is associated with exclusion of transcription factors from and

- suppressed expression of the O-6-methylguanine DNA methyltransferase gene in human glioma cell lines. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 6515–6521.
- Covello, K.L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J.D., Arsham, A.M., Hu, C.-J., Labosky, P.A., Simon, M.C., and Keith, B. (2006). HIF-2 $\alpha$  regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* *20*, 557–570.
- Dalerba, P., Cho, R.W., and Clarke, M.F. (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annu. Rev. Med.* *58*, 267–284.
- Dang, C.V., Kim, J., Gao, P., and Yustein, J. (2008). The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 51–56.
- Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., et al. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* *462*, 739–744.
- Dantzer, F., Amé, J.-C., Schreiber, V., Nakamura, J., Ménissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. *Methods Enzymol.* *409*, 493–510.
- Dedes, K.J., Wilkerson, P.M., Wetterskog, D., Weigelt, B., Ashworth, A., and Reis-Filho, J.S. (2011). Synthetic lethality of PARP inhibition in cancers lacking BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 1192–1199.
- Desandes, E., Lacour, B., Belot, A., Molinie, F., Delafosse, P., Tretarre, B., Velten, M., Sauleau, E.-A., Woronoff, A.-S., Guizard, A.-V., et al. (2013). Cancer incidence and survival in adolescents and young adults in France, 2000-2008. *Pediatr. Hematol. Oncol.* *30*, 291–306.
- Desandes, E., Guissou, S., Chastagner, P., and Lacour, B. (2014). Incidence and survival of children with central nervous system primitive tumors in the French National Registry of Childhood Solid Tumors. *Neuro-Oncol.*
- Dewhirst, M.W. (2009). Relationships between cycling hypoxia, HIF-1, angiogenesis and oxidative stress. *Radiat. Res.* *172*, 653–665.
- Dewhirst, M.W., Cao, Y., and Moeller, B. (2008). Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 425–437.
- Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P.A., Vaagbø, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Peña-Díaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., and Krokan, H.E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair* *3*, 1389–1407.

- Drexler, H.G., Fombonne, S., Matsuo, Y., Hu, Z.B., Hamaguchi, H., and Uphoff, C.C. (2000). p53 alterations in human leukemia-lymphoma cell lines: in vitro artifact or prerequisite for cell immortalization? *Leukemia* *14*, 198–206.
- Duda, D.G., Kozin, S.V., Kirkpatrick, N.D., Xu, L., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2011). CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *17*, 2074–2080.
- Dufour, C., Grill, J., Lellouch-Tubiana, A., Puget, S., Chastagner, P., Frappaz, D., Doz, F., Pichon, F., Plantaz, D., Gentet, J.C., et al. (2006). High-grade glioma in children under 5 years of age: a chemotherapy only approach with the BBSFOP protocol. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* *42*, 2939–2945.
- Dufour, C., Cadusseau, J., Varlet, P., Surena, A.-L., de Faria, G.P., Dias-Morais, A., Auger, N., Léonard, N., Daudigeos, E., Dantas-Barbosa, C., et al. (2009). Astrocytes reverted to a neural progenitor-like state with transforming growth factor alpha are sensitized to cancerous transformation. *Stem Cells Dayt. Ohio* *27*, 2373–2382.
- Dungey, F.A., Caldecott, K.W., and Chalmers, A.J. (2009). Enhanced radiosensitization of human glioma cells by combining inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase with inhibition of heat shock protein 90. *Mol. Cancer Ther.* *8*, 2243–2254.
- Ebos, J.M.L., and Kerbel, R.S. (2011). Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *8*, 210–221.
- Eckerich, C., Zapf, S., Fillbrandt, R., Loges, S., Westphal, M., and Lamszus, K. (2007). Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *121*, 276–283.
- Emblem, K.E., Mouridsen, K., Bjornerud, A., Farrar, C.T., Jennings, D., Borra, R.J.H., Wen, P.Y., Ivy, P., Batchelor, T.T., Rosen, B.R., et al. (2013). Vessel architectural imaging identifies cancer patient responders to anti-angiogenic therapy. *Nat. Med.* *19*, 1178–1183.
- Engelmann, D., and Pützer, B.M. (2010). Translating DNA damage into cancer cell death-A roadmap for E2F1 apoptotic signalling and opportunities for new drug combinations to overcome chemoresistance. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* *13*, 119–131.
- Eoli, M., Silvani, A., Pollo, B., Bianchessi, D., Menghi, F., Valletta, L., Broggi, G., Boiardi, A., Bruzzone, M.G., and Finocchiaro, G. (2006). Molecular markers of gliomas: a



- clinical approach. *Neurol. Res.* 28, 538–541.
- Erler, J.T., Bennewith, K.L., Nicolau, M., Dornhöfer, N., Kong, C., Le, Q.-T., Chi, J.-T.A., Jeffrey, S.S., and Giaccia, A.J. (2006). Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 440, 1222–1226.
- Esteller, M., and Herman, J.G. (2004). Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* 23, 1–8.
- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N. Engl. J. Med.* 343, 1350–1354.
- Evans, S.M., Judy, K.D., Dunphy, I., Jenkins, W.T., Nelson, P.T., Collins, R., Wileyto, E.P., Jenkins, K., Hahn, S.M., Stevens, C.W., et al. (2004). Comparative measurements of hypoxia in human brain tumors using needle electrodes and EF5 binding. *Cancer Res.* 64, 1886–1892.
- Evans, S.M., Jenkins, K.W., Jenkins, W.T., Dilling, T., Judy, K.D., Schrlau, A., Judkins, A., Hahn, S.M., and Koch, C.J. (2008). Imaging and analytical methods as applied to the evaluation of vasculature and hypoxia in human brain tumors. *Radiat. Res.* 170, 677–690.
- Fang, H.-Y., Hughes, R., Murdoch, C., Coffelt, S.B., Biswas, S.K., Harris, A.L., Johnson, R.S., Imityaz, H.Z., Simon, M.C., Fredlund, E., et al. (2009). Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia. *Blood* 114, 844–859.
- Fassan, M., Tassone, E., Onisto, M., Perilongo, G., D’Avella, D., and Gardiman, M.P. (2011). MGMT promoter methylation in pediatric high-grade gliomas. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* 27, 7–8.
- Faury, D., Nantel, A., Dunn, S.E., Guiot, M.-C., Haque, T., Hauser, P., Garami, M., Bognár, L., Hanzély, Z., Liberski, P.P., et al. (2007). Molecular profiling identifies prognostic subgroups of pediatric glioblastoma and shows increased YB-1 expression in tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 1196–1208.
- Fernandez, C., Maues de Paula, A., Colin, C., Quilichini, B., Bouvier-Labit, C., Girard, N., Scavarda, D., Lena, G., and Figarella-Branger, D. (2006). Thalamic gliomas in children: an extensive clinical, neuroradiological and pathological study of 14 cases.

- Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg. 22, 1603–1610.
- Figarella-Branger, D., Chappe, C., Padovani, L., Mercurio, S., Colin, C., Forest, F., and Bouvier, C. (2013). [Glial and glioneuronal tumors in adults and children: main genetic alterations and towards a histomolecular classification]. *Bull. Cancer (Paris)* 100, 715–726.
- Fine, H.A., Dear, K.B., Loeffler, J.S., Black, P.M., and Canellos, G.P. (1993). Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 71, 2585–2597.
- Fishel, M.L., and Kelley, M.R. (2007). The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target. *Mol. Aspects Med.* 28, 375–395.
- Fisher, A.E.O., Hohegger, H., Takeda, S., and Caldecott, K.W. (2007). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5597–5605.
- Flamant, L., Notte, A., Ninane, N., Raes, M., and Michiels, C. (2010). Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Mol. Cancer* 9, 191.
- Florio, M., and Huttner, W.B. (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Dev. Camb. Engl.* 141, 2182–2194.
- Flynn, J.R., Wang, L., Gillespie, D.L., Stoddard, G.J., Reid, J.K., Owens, J., Ellsworth, G.B., Salzman, K.L., Kinney, A.Y., and Jensen, R.L. (2008). Hypoxia-regulated protein expression, patient characteristics, and preoperative imaging as predictors of survival in adults with glioblastoma multiforme. *Cancer* 113, 1032–1042.
- Fontebasso, A.M., Schwartzenuber, J., Khuong-Quang, D.-A., Liu, X.-Y., Sturm, D., Korshunov, A., Jones, D.T.W., Witt, H., Kool, M., Albrecht, S., et al. (2013). Mutations in SETD2 and genes affecting histone H3K36 methylation target hemispheric high-grade gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 125, 659–669.
- Franovic, A., Gunaratnam, L., Smith, K., Robert, I., Patten, D., and Lee, S. (2007). Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13092–13097.
- Frappaz, D., Schell, M., Thiesse, P., Marec-Bérard, P., Mottolèse, C., Perol, D., Bergeron, C., Philip, T., Ricci, A.C., Galand-Desme, S., et al. (2008). Preradiation chemotherapy may improve survival in pediatric diffuse intrinsic brainstem gliomas: final results of

- BSG 98 prospective trial. *Neuro-Oncol.* *10*, 599–607.
- Friedmann-Morvinski, D., Bushong, E.A., Ke, E., Soda, Y., Marumoto, T., Singer, O., Ellisman, M.H., and Verma, I.M. (2012). Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science* *338*, 1080–1084.
- Fruehauf, J.P., and Meyskens, F.L. (2007). Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 789–794.
- Fuentealba, L.C., Obernier, K., and Alvarez-Buylla, A. (2012). Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell* *10*, 698–708.
- Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z.-Y., Aune, G.J., Redon, C., Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Rogakou, E.P., Celeste, A., Chen, H.T., et al. (2003). Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J. Biol. Chem.* *278*, 20303–20312.
- Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2008). Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* *135*, 1161–1163.
- Gan, B., Melkounian, Z.K., Wu, X., Guan, K.-L., and Guan, J.-L. (2005). Identification of FIP200 interaction with the TSC1-TSC2 complex and its role in regulation of cell size control. *J. Cell Biol.* *170*, 379–389.
- Garvalov, B.K., and Acker, T. (2011). Cancer stem cells: a new framework for the design of tumor therapies. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *89*, 95–107.
- Gaspar, N., Marshall, L., Perryman, L., Bax, D.A., Little, S.E., Viana-Pereira, M., Sharp, S.Y., Vassal, G., Pearson, A.D.J., Reis, R.M., et al. (2010). MGMT-independent temozolomide resistance in pediatric glioblastoma cells associated with a PI3-kinase-mediated HOX/stem cell gene signature. *Cancer Res.* *70*, 9243–9252.
- Gatti, L., and Zunino, F. (2005). Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. *Methods Mol. Med.* *111*, 127–148.
- Geoerger, B., Hargrave, D., Thomas, F., Ndiaye, A., Frappaz, D., Andreiuolo, F., Varlet, P., Aerts, I., Riccardi, R., Jaspan, T., et al. (2011). Innovative Therapies for Children with Cancer pediatric phase I study of erlotinib in brainstem glioma and relapsing/refractory brain tumors. *Neuro-Oncol.* *13*, 109–118.
- Geoerger, B., Kieran, M.W., Grupp, S., Perek, D., Clancy, J., Krygowski, M., Ananthakrishnan, R., Boni, J.P., Berkenblit, A., and Spunt, S.L. (2012). Phase II trial of temsirolimus in children with high-grade glioma, neuroblastoma and

- rhabdomyosarcoma. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 *48*, 253–262.
- Geraci, M., Birch, J.M., Alston, R.D., Moran, A., and Eden, T.O.B. (2007). Cancer mortality in 13 to 29-year-olds in England and Wales, 1981-2005. *Br. J. Cancer* *97*, 1588–1594.
- Gerstner, E.R., Chen, P.-J., Wen, P.Y., Jain, R.K., Batchelor, T.T., and Sorensen, G. (2010). Infiltrative patterns of glioblastoma spread detected via diffusion MRI after treatment with cediranib. *Neuro-Oncol.* *12*, 466–472.
- Gilbertson, R.J., and Rich, J.N. (2007). Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 733–736.
- Glas, M., Rath, B.H., Simon, M., Reinartz, R., Schramme, A., Trageser, D., Eisenreich, R., Leinhaas, A., Keller, M., Schildhaus, H.-U., et al. (2010). Residual tumor cells are unique cellular targets in glioblastoma. *Ann. Neurol.* *68*, 264–269.
- Gordan, J.D., Bertout, J.A., Hu, C.-J., Diehl, J.A., and Simon, M.C. (2007a). HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* *11*, 335–347.
- Gordan, J.D., Thompson, C.B., and Simon, M.C. (2007b). HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell* *12*, 108–113.
- Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D.E., Koch, C.J., Lowe, S.W., and Giaccia, A.J. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* *379*, 88–91.
- Grill, J., Puget, S., Andreiuolo, F., Philippe, C., MacConaill, L., and Kieran, M.W. (2012). Critical oncogenic mutations in newly diagnosed pediatric diffuse intrinsic pontine glioma. *Pediatr. Blood Cancer* *58*, 489–491.
- Grill, J., Georger, B., Gesner, L., Perek, D., Leblond, P., Cañete, A., Aerts, I., Madero, L., de Toledo Codina, J.S., Verlooy, J., et al. (2013). Phase II study of irinotecan in combination with temozolomide (TEMIRI) in children with recurrent or refractory medulloblastoma: a joint ITCC and SIOPE brain tumor study. *Neuro-Oncol.* *15*, 1236–1243.
- Gruber, M., Hu, C.-J., Johnson, R.S., Brown, E.J., Keith, B., and Simon, M.C. (2007). Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 2301–2306.
- Guenot, D., Guérin, E., Aguilon-Romain, S., Pencreach, E., Schneider, A., Neuville, A., Chenard, M.-P., Duluc, I., Du Manoir, S., Brigand, C., et al. (2006). Primary tumour genetic alterations and intra-tumoral heterogeneity are maintained in xenografts of

- human colon cancers showing chromosome instability. *J. Pathol.* 208, 643–652.
- Guérin, E., Raffelsberger, W., Pencreach, E., Maier, A., Neuville, A., Schneider, A., Bachellier, P., Rohr, S., Petitprez, A., Poch, O., et al. (2012). In vivo topoisomerase I inhibition attenuates the expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  target genes and decreases tumor angiogenesis. *Mol. Med. Camb. Mass* 18, 83–94.
- Gürsel, D.B., Berry, N., and Boockvar, J.A. (2012). The contribution of Notch signaling to glioblastoma via activation of cancer stem cell self-renewal: the role of the endothelial network. *Neurosurgery* 70, N19–N21.
- Gustafsson, M.V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J.L., Poellinger, L., Lendahl, U., and Bondesson, M. (2005). Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev. Cell* 9, 617–628.
- Hao, J., Song, X., Song, B., Liu, Y., Wei, L., Wang, X., and Yu, J. (2008). Effects of lentivirus-mediated HIF-1 $\alpha$  knockdown on hypoxia-related cisplatin resistance and their dependence on p53 status in fibrosarcoma cells. *Cancer Gene Ther.* 15, 449–455.
- Harris, L.C., Remack, J.S., Houghton, P.J., and Brent, T.P. (1996). Wild-type p53 suppresses transcription of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res.* 56, 2029–2032.
- Hassa, P.O., Haenni, S.S., Elser, M., and Hottiger, M.O. (2006). Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 70, 789–829.
- Hegi, M.E., Janzer, R.-C., Lambiv, W.L., Gorlia, T., Kouwenhoven, M.C.M., Hartmann, C., von Deimling, A., Martinet, D., Besuchet Schmutz, N., Diserens, A.-C., et al. (2012). Presence of an oligodendroglioma-like component in newly diagnosed glioblastoma identifies a pathogenetically heterogeneous subgroup and lacks prognostic value: central pathology review of the EORTC\_26981/NCIC\_CE.3 trial. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 123, 841–852.
- Hermisson, M., Klumpp, A., Wick, W., Wischhusen, J., Nagel, G., Roos, W., Kaina, B., and Weller, M. (2006). O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *J. Neurochem.* 96, 766–776.
- Herr, B., Zhou, J., Werno, C., Menrad, H., Namgaladze, D., Weigert, A., Dehne, N., and Brüne, B. (2009). The supernatant of apoptotic cells causes transcriptional activation

- of hypoxia-inducible factor-1alpha in macrophages via sphingosine-1-phosphate and transforming growth factor-beta. *Blood* *114*, 2140–2148.
- Hirose, Y., Berger, M.S., and Pieper, R.O. (2001a). Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* *61*, 5843–5849.
- Hirose, Y., Berger, M.S., and Pieper, R.O. (2001b). p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res.* *61*, 1957–1963.
- Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J. (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* *284*, 1994–1998.
- Holmquist, L., Jögi, A., and Pählman, S. (2005). Phenotypic persistence after reoxygenation of hypoxic neuroblastoma cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *116*, 218–225.
- Holmquist-Mengelbier, L., Fredlund, E., Löfstedt, T., Noguera, R., Navarro, S., Nilsson, H., Pietras, A., Vallon-Christersson, J., Borg, A., Gradin, K., et al. (2006). Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* *10*, 413–423.
- Hosoya, N., and Miyagawa, K. (2014). Targeting DNA damage response in cancer therapy. *Cancer Sci.* *105*, 370–388.
- Houghton, P.J., Morton, C.L., Tucker, C., Payne, D., Favours, E., Cole, C., Gorlick, R., Kolb, E.A., Zhang, W., Lock, R., et al. (2007). The pediatric preclinical testing program: description of models and early testing results. *Pediatr. Blood Cancer* *49*, 928–940.
- Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S., and Liu, L.F. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* *260*, 14873–14878.
- Hsieh, C.-H., Lee, C.-H., Liang, J.-A., Yu, C.-Y., and Shyu, W.-C. (2010). Cycling hypoxia increases U87 glioma cell radioresistance via ROS induced higher and long-term HIF-1 signal transduction activity. *Oncol. Rep.* *24*, 1629–1636.
- Hsieh, C.-H., Wu, C.-P., Lee, H.-T., Liang, J.-A., Yu, C.-Y., and Lin, Y.-J. (2012). NADPH oxidase subunit 4 mediates cycling hypoxia-promoted radiation resistance in glioblastoma multiforme. *Free Radic. Biol. Med.* *53*, 649–658.
- Hunt, C.R., Gupta, A., Horikoshi, N., and Pandita, T.K. (2012). Does PTEN loss impair DNA

- double-strand break repair by homologous recombination? *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 920–922.
- Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D., and Steindler, D.A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* *39*, 193–206.
- Imtiyaz, H.Z., Williams, E.P., Hickey, M.M., Patel, S.A., Durham, A.C., Yuan, L.-J., Hammond, R., Gimotty, P.A., Keith, B., and Simon, M.C. (2010). Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J. Clin. Invest.* *120*, 2699–2714.
- Inaba, N., Fujioka, K., Saito, H., Kimura, M., Ikeda, K., Inoue, Y., Ishizawa, S., and Manome, Y. (2011). Down-regulation of EGFR prolonged cell growth of glioma but did not increase the sensitivity to temozolomide. *Anticancer Res.* *31*, 3253–3257.
- Iwanami, A., Gini, B., Zanca, C., Matsutani, T., Assuncao, A., Nael, A., Dang, J., Yang, H., Zhu, S., Kohyama, J., et al. (2013). PML mediates glioblastoma resistance to mammalian target of rapamycin (mTOR)-targeted therapies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 4339–4344.
- Jain, R.K. (2013). Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *31*, 2205–2218.
- Jaiswal, A.S., Banerjee, S., Panda, H., Bulkin, C.D., Izumi, T., Sarkar, F.H., Ostrov, D.A., and Narayan, S. (2009). A novel inhibitor of DNA polymerase beta enhances the ability of temozolomide to impair the growth of colon cancer cells. *Mol. Cancer Res. MCR* *7*, 1973–1983.
- Jalali, R., Raut, N., Arora, B., Gupta, T., Dutta, D., Munshi, A., Sarin, R., and Kurkure, P. (2010). Prospective evaluation of radiotherapy with concurrent and adjuvant temozolomide in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *77*, 113–118.
- Jansen, M.H.A., van Vuurden, D.G., Vandertop, W.P., and Kaspers, G.J.L. (2012). Diffuse intrinsic pontine gliomas: a systematic update on clinical trials and biology. *Cancer Treat. Rev.* *38*, 27–35.
- Janssens, G.O., Jansen, M.H., Lauwers, S.J., Nowak, P.J., Oldenburger, F.R., Bouffet, E., Saran, F., Kamphuis-van Ulzen, K., van Lindert, E.J., Schieving, J.H., et al. (2013). Hypofractionation vs conventional radiation therapy for newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma: a matched-cohort analysis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*

85, 315–320.

- Jensen, R.L., Ragel, B.T., Whang, K., and Gillespie, D. (2006). Inhibition of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) decreases vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and tumor growth in malignant gliomas. *J. Neurooncol.* 78, 233–247.
- Jeuken, J.W.M., von Deimling, A., and Wesseling, P. (2004). Molecular pathogenesis of oligodendroglial tumors. *J. Neurooncol.* 70, 161–181.
- Jiang, B.H., Jiang, G., Zheng, J.Z., Lu, Z., Hunter, T., and Vogt, P.K. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 363–369.
- Jiang, Y., Li, X., Yang, W., Hawke, D.H., Zheng, Y., Xia, Y., Aldape, K., Wei, C., Guo, F., Chen, Y., et al. (2014). PKM2 regulates chromosome segregation and mitosis progression of tumor cells. *Mol. Cell* 53, 75–87.
- Jin, S., Tong, T., Fan, W., Fan, F., Antinore, M.J., Zhu, X., Mazzacurati, L., Li, X., Petrik, K.L., Rajasekaran, B., et al. (2002). GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity. *Oncogene* 21, 8696–8704.
- Johnson, S.C., Rabinovitch, P.S., and Kaeberlein, M. (2013). mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature* 493, 338–345.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683–692.
- Jones, C., Perryman, L., and Hargrave, D. (2012). Paediatric and adult malignant glioma: close relatives or distant cousins? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9, 400–413.
- Kaina, B., Ziouta, A., Ochs, K., and Coquerelle, T. (1997). Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutat. Res.* 381, 227–241.
- Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., and Roos, W.P. (2007). MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair* 6, 1079–1099.
- Kang, H.J., Kawasawa, Y.I., Cheng, F., Zhu, Y., Xu, X., Li, M., Sousa, A.M.M., Pletikos, M., Meyer, K.A., Sedmak, G., et al. (2011). Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature* 478, 483–489.
- Kanzawa, T., Germano, I.M., Komata, T., Ito, H., Kondo, Y., and Kondo, S. (2004). Role of



- autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* *11*, 448–457.
- Katayama, M., Kawaguchi, T., Berger, M.S., and Pieper, R.O. (2007). DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* *14*, 548–558.
- Kaur, B., Khwaja, F.W., Severson, E.A., Matheny, S.L., Brat, D.J., and Van Meir, E.G. (2005). Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-Oncol.* *7*, 134–153.
- Keith, B., Johnson, R.S., and Simon, M.C. (2012). HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 9–22.
- Kenneth, N.S., Mudie, S., van Uden, P., and Rocha, S. (2009). SWI/SNF regulates the cellular response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* *284*, 4123–4131.
- Keunen, O., Johansson, M., Oudin, A., Sanzey, M., Rahim, S.A.A., Fack, F., Thorsen, F., Taxt, T., Bartos, M., Jirik, R., et al. (2011). Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 3749–3754.
- Khuong-Quang, D.-A., Buczkowicz, P., Rakopoulos, P., Liu, X.-Y., Fontebasso, A.M., Bouffet, E., Bartels, U., Albrecht, S., Schwartzentruber, J., Letourneau, L., et al. (2012). K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *124*, 439–447.
- Killela, P.J., Reitman, Z.J., Jiao, Y., Bettgowda, C., Agrawal, N., Diaz, L.A., Friedman, A.H., Friedman, H., Gallia, G.L., Giovanella, B.C., et al. (2013). TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 6021–6026.
- Killela, P.J., Pirozzi, C.J., Healy, P., Reitman, Z.J., Lipp, E., Rasheed, B.A., Yang, R., Diplas, B.H., Wang, Z., Greer, P.K., et al. (2014). Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas. *Oncotarget* *5*, 1515–1525.
- Kim, J., Gao, P., Liu, Y.-C., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 7381–7393.

- Kim, N.K., Ahn, J.Y., Song, J., Kim, J.K., Han, J.H., An, H.J., Chung, H.M., Joo, J.Y., Choi, J.U., Lee, K.S., et al. (2003). Expression of the DNA repair enzyme, N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in astrocytic tumors. *Anticancer Res.* *23*, 1417–1423.
- Kinsella, T.J. (2009). Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 1853–1859.
- Kitange, G.J., Mladek, A.C., Carlson, B.L., Schroeder, M.A., Pokorny, J.L., Cen, L., Decker, P.A., Wu, W., Lomber, G.A., Gupta, S.K., et al. (2012). Inhibition of histone deacetylation potentiates the evolution of acquired temozolomide resistance linked to MGMT upregulation in glioblastoma xenografts. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 4070–4079.
- Knizhnik, A.V., Roos, W.P., Nikolova, T., Quiros, S., Tomaszowski, K.-H., Christmann, M., and Kaina, B. (2013). Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PloS One* *8*, e55665.
- Koh, M.Y., and Powis, G. (2012). Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem. Sci.* *37*, 364–372.
- Koh, M.Y., Lemos, R., Liu, X., and Powis, G. (2011). The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 $\alpha$ - to HIF-2 $\alpha$ -dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res.* *71*, 4015–4027.
- Kondo, A., Safaei, R., Mishima, M., Niedner, H., Lin, X., and Howell, S.B. (2001). Hypoxia-induced enrichment and mutagenesis of cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res.* *61*, 7603–7607.
- Kondo, K., Klco, J., Nakamura, E., Lechpammer, M., and Kaelin, W.G., Jr (2002). Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* *1*, 237–246.
- Kondoh, H., Leonart, M.E., Nakashima, Y., Yokode, M., Tanaka, M., Bernard, D., Gil, J., and Beach, D. (2007). A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. *Antioxid. Redox Signal.* *9*, 293–299.
- Koritzinsky, M., and Wouters, B.G. (2013). The roles of reactive oxygen species and autophagy in mediating the tolerance of tumor cells to cycling hypoxia. *Semin. Radiat. Oncol.* *23*, 252–261.
- Korkolopoulou, P., Patsouris, E., Konstantinidou, A.E., Pavlopoulos, P.M., Kavantzias, N.,

- Boviatsis, E., Thymara, I., Perdiki, M., Thomas-Tsagli, E., Angelidakis, D., et al. (2004). Hypoxia-inducible factor 1alpha/vascular endothelial growth factor axis in astrocytomas. Associations with microvessel morphometry, proliferation and prognosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *30*, 267–278.
- Koshiji, M., Kageyama, Y., Pete, E.A., Horikawa, I., Barrett, J.C., and Huang, L.E. (2004). HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J.* *23*, 1949–1956.
- Koshiji, M., To, K.K.-W., Hammer, S., Kumamoto, K., Harris, A.L., Modrich, P., and Huang, L.E. (2005). HIF-1alpha induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutSalpha expression. *Mol. Cell* *17*, 793–803.
- Kramm, C.M., Butenhoff, S., Rausche, U., Warmuth-Metz, M., Kortmann, R.-D., Pietsch, T., Gnekow, A., Jorch, N., Janssen, G., Berthold, F., et al. (2011). Thalamic high-grade gliomas in children: a distinct clinical subset? *Neuro-Oncol.* *13*, 680–689.
- Kurpad, S.N., Dolan, M.E., McLendon, R.E., Archer, G.E., Moschel, R.C., Pegg, A.E., Bigner, D.D., and Friedman, H.S. (1997). Intraarterial O6-benzylguanine enables the specific therapy of nitrosourea-resistant intracranial human glioma xenografts in athymic rats with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *39*, 307–316.
- Lai, A., Kharbanda, S., Pope, W.B., Tran, A., Solis, O.E., Peale, F., Forrest, W.F., Pujara, K., Carrillo, J.A., Pandita, A., et al. (2011). Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 4482–4490.
- Lambrechts, D., Claes, B., Delmar, P., Reumers, J., Mazzone, M., Yesilyurt, B.T., Devlieger, R., Verslype, C., Tejpar, S., Wildiers, H., et al. (2012). VEGF pathway genetic variants as biomarkers of treatment outcome with bevacizumab: an analysis of data from the AViTA and AVOREN randomised trials. *Lancet Oncol.* *13*, 724–733.
- Land, S.C., and Tee, A.R. (2007). Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J. Biol. Chem.* *282*, 20534–20543.
- Langman, J., and Sadler, T.-W. (1995). *Embryologie médicale (éditions Pradel)*.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*.
- Lavin, M.F., and Gueven, N. (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell*

- Death Differ. *13*, 941–950.
- Lavon, I., Fuchs, D., Zrihan, D., Efroni, G., Zelikovitch, B., Fellig, Y., and Siegal, T. (2007). Novel mechanism whereby nuclear factor kappaB mediates DNA damage repair through regulation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Cancer Res.* *67*, 8952–8959.
- Lee, J.Y., Park, C.-K., Park, S.-H., Wang, K.-C., Cho, B.-K., and Kim, S.-K. (2011). MGMT promoter gene methylation in pediatric glioblastoma: analysis using MS-MLPA. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* *27*, 1877–1883.
- Lee, K., Zhang, H., Qian, D.Z., Rey, S., Liu, J.O., and Semenza, G.L. (2009). Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17910–17915.
- Leppard, J.B., and Champoux, J.J. (2005). Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma* *114*, 75–85.
- Levin, V.A., Panchabhai, S., Shen, L., and Baggerly, K.A. (2012). Protein and phosphoprotein levels in glioma and adenocarcinoma cell lines grown in normoxia and hypoxia in monolayer and three-dimensional cultures. *Proteome Sci.* *10*, 5.
- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* *88*, 323–331.
- Lewis, C.E., and Pollard, J.W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* *66*, 605–612.
- Lewis, P.W., and Allis, C.D. (2013). Poisoning the “histone code” in pediatric gliomagenesis. *Cell Cycle Georget. Tex* *12*, 3241–3242.
- Li, G.-M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* *18*, 85–98.
- Li, F., Mao, G., Tong, D., Huang, J., Gu, L., Yang, W., and Li, G.-M. (2013). The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS $\alpha$ . *Cell* *153*, 590–600.
- Li, Y., Wang, Y., Kim, E., Beemiller, P., Wang, C.-Y., Swanson, J., You, M., and Guan, K.-L. (2007). Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb. *J. Biol. Chem.* *282*, 35803–35813.
- Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R.E., et al. (2009). Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* *15*, 501–513.
- Liu, C., and Zong, H. (2012). Developmental origins of brain tumors. *Curr. Opin. Neurobiol.* *22*, 844–849.

- Liu, L., and Gerson, S.L. (2004). Therapeutic impact of methoxyamine: blocking repair of abasic sites in the base excision repair pathway. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* 2000 5, 623–627.
- Liu, B., Parsons, R., Papadopoulos, N., Nicolaides, N.C., Lynch, H.T., Watson, P., Jass, J.R., Dunlop, M., Wyllie, A., Peltomäki, P., et al. (1996). Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat. Med.* 2, 169–174.
- Liu, C., Tu, Y., Yuan, J., Mao, X., He, S., Wang, L., Fu, G., Zong, J., and Zhang, Y. (2012). Aberrant expression of N-methylpurine-DNA glycosylase influences patient survival in malignant gliomas. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 760679.
- Liu, L., Cash, T.P., Jones, R.G., Keith, B., Thompson, C.B., and Simon, M.C. (2006). Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol. Cell* 21, 521–531.
- Liu, L., Ning, X., Sun, L., Zhang, H., Shi, Y., Guo, C., Han, S., Liu, J., Sun, S., Han, Z., et al. (2008). Hypoxia-inducible factor-1 alpha contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer. *Cancer Sci.* 99, 121–128.
- Löfstedt, T., Fredlund, E., Holmquist-Mengelbier, L., Pietras, A., Ovenberger, M., Poellinger, L., and Pahlman, S. (2007). Hypoxia inducible factor-2alpha in cancer. *Cell Cycle Georget. Tex* 6, 919–926.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 114, 97–109.
- Lovejoy, C.A., Li, W., Reisenweber, S., Thongthip, S., Bruno, J., de Lange, T., De, S., Petrini, J.H.J., Sung, P.A., Jasin, M., et al. (2012). Loss of ATRX, genome instability, and an altered DNA damage response are hallmarks of the alternative lengthening of telomeres pathway. *PLoS Genet.* 8, e1002772.
- Luo, W., Zhong, J., Chang, R., Hu, H., Pandey, A., and Semenza, G.L. (2010). Hsp70 and CHIP selectively mediate ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha but Not HIF-2alpha. *J. Biol. Chem.* 285, 3651–3663.
- Lupo, B., and Trusolino, L. (2014). Inhibition of poly(ADP-ribosylation) in cancer: Old and new paradigms revisited. *Biochim. Biophys. Acta* 1846, 201–215.
- Maddika, S., Ande, S.R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., Eshraghi, M., Manda, K.D., Wiechec, E., and Los, M. (2007). Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist.*

- Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother. *10*, 13–29.
- Majmundar, A.J., Wong, W.J., and Simon, M.C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol. Cell* *40*, 294–309.
- Malaney, P., Nicosia, S.V., and Davé, V. (2014). One mouse, one patient paradigm: New avatars of personalized cancer therapy. *Cancer Lett.* *344*, 1–12.
- Marieb, E.N. (1993). *Anatomie et physiologie humaine (de Boeck)*.
- Marinello, J., Chillemi, G., Bueno, S., Manzo, S.G., and Capranico, G. (2013). Antisense transcripts enhanced by camptothecin at divergent CpG-island promoters associated with bursts of topoisomerase I-DNA cleavage complex and R-loop formation. *Nucleic Acids Res.* *41*, 10110–10123.
- Martinez, R., Schackert, G., Yaya-Tur, R., Rojas-Marcos, I., Herman, J.G., and Esteller, M. (2007). Frequent hypermethylation of the DNA repair gene MGMT in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* *83*, 91–93.
- Masutani, M., and Fujimori, H. (2013). Poly(ADP-ribosylation) in carcinogenesis. *Mol. Aspects Med.* *34*, 1202–1216.
- Mathew, R., and White, E. (2011). Autophagy, stress, and cancer metabolism: what doesn't kill you makes you stronger. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *76*, 389–396.
- Mathieu, J., Zhang, Z., Zhou, W., Wang, A.J., Heddleston, J.M., Pinna, C.M.A., Hubaud, A., Stadler, B., Choi, M., Bar, M., et al. (2011). HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res.* *71*, 4640–4652.
- Matloff, J., Lucas, A., Polydorides, A.D., and Itzkowitz, S.H. (2013). Molecular tumor testing for Lynch syndrome in patients with colorectal cancer. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* *11*, 1380–1385.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., et al. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* *316*, 1160–1166.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W.T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., et al. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 1263–1284.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Montalto, G., Cervello, M., Nicoletti, F., Fagone, P., Malaponte, G., Mazzarino, M.C., et al. (2012). Mutations and

- deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget* 3, 954–987.
- Méndez, O., Zavadil, J., Esencay, M., Lukyanov, Y., Santovasi, D., Wang, S.-C., Newcomb, E.W., and Zagzag, D. (2010). Knock down of HIF-1alpha in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumor spheres. *Mol. Cancer* 9, 133.
- Meyronet, D., Silva, K., Figarella-Branger, D., Godfraind, C., Delisle, M.-B., Maurage, C.-A., Miquel, C., Varlet, P., Gentet, J.-C., Salamon, A.-I.-B., et al. (2014). [National network of paediatric central nervous system tumours reviewing by the Groupe d'Étude de Neuropathologie Oncologique Pédiatrique (GENOP)]. *Ann. Pathol.* 34, 74–86.
- Michels, J., Vitale, I., Saparbaev, M., Castedo, M., and Kroemer, G. (2014). Predictive biomarkers for cancer therapy with PARP inhibitors. *Oncogene* 33, 3894–3907.
- Mizushima, Y. (2009). Specific inhibitors of mammalian DNA polymerase species. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 1239–1251.
- Modrek, A.S., Bayin, N.S., and Placantonakis, D.G. (2014). Brain stem cells as the cell of origin in glioma. *World J. Stem Cells* 6, 43–52.
- Moeller, B.J., Dreher, M.R., Rabbani, Z.N., Schroeder, T., Cao, Y., Li, C.Y., and Dewhirst, M.W. (2005). Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell* 8, 99–110.
- Moen, E.L., Stark, A.L., Zhang, W., Dolan, M.E., and Godley, L.A. (2014). The role of gene body cytosine modifications in MGMT expression and sensitivity to temozolomide. *Mol. Cancer Ther.* 13, 1334–1344.
- Monje, M., Mitra, S.S., Freret, M.E., Raveh, T.B., Kim, J., Masek, M., Attema, J.L., Li, G., Haddix, T., Edwards, M.S.B., et al. (2011). Hedgehog-responsive candidate cell of origin for diffuse intrinsic pontine glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4453–4458.
- Morton, C.L., and Houghton, P.J. (2007). Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat. Protoc.* 2, 247–250.
- Murdoch, C., Giannoudis, A., and Lewis, C.E. (2004). Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 104, 2224–2234.
- Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A.,

- Georgatsou, E., Bonanou, S., and Simos, G. (2006). Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* *281*, 33095–33106.
- Nakagawachi, T., Soejima, H., Urano, T., Zhao, W., Higashimoto, K., Satoh, Y., Matsukura, S., Kudo, S., Kitajima, Y., Harada, H., et al. (2003). Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene* *22*, 8835–8844.
- Nardella, C., Lunardi, A., Patnaik, A., Cantley, L.C., and Pandolfi, P.P. (2011). The APL paradigm and the “co-clinical trial” project. *Cancer Discov.* *1*, 108–116.
- Neale, G., Su, X., Morton, C.L., Phelps, D., Gorlick, R., Lock, R.B., Reynolds, C.P., Maris, J.M., Friedman, H.S., Dome, J., et al. (2008). Molecular characterization of the pediatric preclinical testing panel. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 4572–4583.
- Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.-P., Tong, F., et al. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* *10*, 515–527.
- Nilsson, H., Jögi, A., Beckman, S., Harris, A.L., Poellinger, L., and Pählman, S. (2005). HIF-2 $\alpha$  expression in human fetal paraganglia and neuroblastoma: relation to sympathetic differentiation, glucose deficiency, and hypoxia. *Exp. Cell Res.* *303*, 447–456.
- Nishi, H., Nakada, T., Kyo, S., Inoue, M., Shay, J.W., and Isaka, K. (2004). Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Mol. Cell. Biol.* *24*, 6076–6083.
- Nizet, V., and Johnson, R.S. (2009). Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 609–617.
- Norden, A.D., Drappatz, J., and Wen, P.Y. (2009). Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nat. Rev. Neurol.* *5*, 610–620.
- Noushmehr, H., Weisenberger, D.J., Diefes, K., Phillips, H.S., Pujara, K., Berman, B.P., Pan, F., Pelloski, C.E., Sulman, E.P., Bhat, K.P., et al. (2010). Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* *17*, 510–522.
- Obermeier, B., Daneman, R., and Ransohoff, R.M. (2013). Development, maintenance and



- disruption of the blood-brain barrier. *Nat. Med.* *19*, 1584–1596.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., Stroup, N.E., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J.S. (2013). CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncol.* *15 Suppl 2*, ii1–ii56.
- Ozawa, T., Brennan, C.W., Wang, L., Squatrito, M., Sasayama, T., Nakada, M., Huse, J.T., Pedraza, A., Utsuki, S., Yasui, Y., et al. (2010). PDGFRA gene rearrangements are frequent genetic events in PDGFRA-amplified glioblastomas. *Genes Dev.* *24*, 2205–2218.
- Packer, R.J. (2012). Temozolomide for pediatric high-grade gliomas. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *12*, 111–113.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G.L., et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* *321*, 1807–1812.
- Paugh, B.S., Qu, C., Jones, C., Liu, Z., Adamowicz-Brice, M., Zhang, J., Bax, D.A., Coyle, B., Barrow, J., Hargrave, D., et al. (2010). Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 3061–3068.
- Paugh, B.S., Broniscer, A., Qu, C., Miller, C.P., Zhang, J., Tatevossian, R.G., Olson, J.M., Geyer, J.R., Chi, S.N., da Silva, N.S., et al. (2011). Genome-wide analyses identify recurrent amplifications of receptor tyrosine kinases and cell-cycle regulatory genes in diffuse intrinsic pontine glioma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 3999–4006.
- Paugh, B.S., Zhu, X., Qu, C., Endersby, R., Diaz, A.K., Zhang, J., Bax, D.A., Carvalho, D., Reis, R.M., Onar-Thomas, A., et al. (2013). Novel oncogenic PDGFRA mutations in pediatric high-grade gliomas. *Cancer Res.* *73*, 6219–6229.
- Pencreach, E., Guérin, E., Nicolet, C., Lelong-Rebel, I., Voegeli, A.-C., Oudet, P., Larsen, A.K., Gaub, M.-P., and Guenot, D. (2009). Marked activity of irinotecan and rapamycin combination toward colon cancer cells in vivo and in vitro is mediated through cooperative modulation of the mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor-1alpha axis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 1297–1307.
- Persano, L., Pistollato, F., Rampazzo, E., Della Puppa, A., Abbadi, S., Frasson, C., Volpin, F.,

- Indraccolo, S., Scienza, R., and Basso, G. (2012). BMP2 sensitizes glioblastoma stem-like cells to Temozolomide by affecting HIF-1 $\alpha$  stability and MGMT expression. *Cell Death Dis.* 3, e412.
- Persano, L., Rampazzo, E., Basso, G., and Viola, G. (2013). Glioblastoma cancer stem cells: Role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochem. Pharmacol.* 85, 612–622.
- Piccirillo, S.G.M., Combi, R., Cajola, L., Patrizi, A., Redaelli, S., Bentivegna, A., Baronchelli, S., Maira, G., Pollo, B., Mangiola, A., et al. (2009). Distinct pools of cancer stem-like cells coexist within human glioblastomas and display different tumorigenicity and independent genomic evolution. *Oncogene* 28, 1807–1811.
- Pistollato, F., Chen, H.-L., Schwartz, P.H., Basso, G., and Panchision, D.M. (2007). Oxygen tension controls the expansion of human CNS precursors and the generation of astrocytes and oligodendrocytes. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 424–435.
- Pistollato, F., Rampazzo, E., Abbadi, S., Della Puppa, A., Scienza, R., D'Avella, D., Denaro, L., Te Kronnie, G., Panchision, D.M., and Basso, G. (2009a). Molecular mechanisms of HIF-1 $\alpha$  modulation induced by oxygen tension and BMP2 in glioblastoma derived cells. *PloS One* 4, e6206.
- Pistollato, F., Chen, H.-L., Rood, B.R., Zhang, H.-Z., D'Avella, D., Denaro, L., Gardiman, M., te Kronnie, G., Schwartz, P.H., Favaro, E., et al. (2009b). Hypoxia and HIF1 $\alpha$  repress the differentiative effects of BMPs in high-grade glioma. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 7–17.
- Pistollato, F., Abbadi, S., Rampazzo, E., Persano, L., Della Puppa, A., Frasson, C., Sarto, E., Scienza, R., D'avella, D., and Basso, G. (2010). Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 851–862.
- Pizem, J., Popovic, M., and Cör, A. (2011). Expression of Gli1 and PARP1 in medulloblastoma: an immunohistochemical study of 65 cases. *J. Neurooncol.* 103, 459–467.
- Poitz, D.M., Augstein, A., Hesse, K., Christoph, M., Ibrahim, K., Braun-Dullaeus, R.C., Strasser, R.H., and Schmeißer, A. (2014). Regulation of the HIF-system in human macrophages--differential regulation of HIF- $\alpha$  subunits under sustained hypoxia. *Mol. Immunol.* 57, 226–235.
- Pollack, I.F., Boyett, J.M., and Finlay, J.L. (1999). Chemotherapy for high-grade gliomas of

- childhood. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* 15, 529–544.
- Pollack, I.F., Hamilton, R.L., Sobol, R.W., Nikiforova, M.N., Nikiforov, Y.E., Lyons-Weiler, M.A., LaFramboise, W.A., Burger, P.C., Brat, D.J., Rosenblum, M.K., et al. (2010). Mismatch repair deficiency is an uncommon mechanism of alkylator resistance in pediatric malignant gliomas: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr. Blood Cancer* 55, 1066–1071.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 6, 789–802.
- Prabhakar, N.R., and Semenza, G.L. (2012). Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol. Rev.* 92, 967–1003.
- Puget, S., Crimmins, D.W., Garnett, M.R., Grill, J., Oliveira, R., Boddaert, N., Wray, A., Lelouch-Tubiana, A., Roujeau, T., Di Rocco, F., et al. (2007). Thalamic tumors in children: a reappraisal. *J. Neurosurg.* 106, 354–362.
- Puget, S., Boddaert, N., Veillard, A.-S., Garnett, M., Miquel, C., Andreiuolo, F., Sainte-Rose, C., Roujeau, T., DiRocco, F., Bourgeois, M., et al. (2011). Neuropathological and neuroradiological spectrum of pediatric malignant gliomas: correlation with outcome. *Neurosurgery* 69, 215–224.
- Puget, S., Philippe, C., Bax, D.A., Job, B., Varlet, P., Junier, M.-P., Andreiuolo, F., Carvalho, D., Reis, R., Guerrini-Rousseau, L., et al. (2012a). Mesenchymal transition and PDGFRA amplification/mutation are key distinct oncogenic events in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *PloS One* 7, e30313.
- Puget, S., Blauwblomme, T., and Grill, J. (2012b). Is biopsy safe in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma? *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book ASCO Am. Soc. Clin. Oncol. Meet.* 629–633.
- Qaddoumi, I., Sultan, I., and Gajjar, A. (2009). Outcome and prognostic features in pediatric gliomas: a review of 6212 cases from the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer* 115, 5761–5770.
- Qing, G., Skuli, N., Mayes, P.A., Pawel, B., Martinez, D., Maris, J.M., and Simon, M.C. (2010). Combinatorial regulation of neuroblastoma tumor progression by N-Myc and hypoxia inducible factor HIF-1alpha. *Cancer Res.* 70, 10351–10361.
- Ramírez, N., Bandrés, E., Navarro, A., Pons, A., Jansa, S., Moreno, I., Martínez-Rodenas, F., Zárata, R., Bitarte, N., Monzó, M., et al. (2008). Epigenetic events in normal colonic

- mucosa surrounding colorectal cancer lesions. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 *44*, 2689–2695.
- Rankin, E.B., Rha, J., Selak, M.A., Unger, T.L., Keith, B., Liu, Q., and Haase, V.H. (2009). Hypoxia-inducible factor 2 regulates hepatic lipid metabolism. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 4527–4538.
- Ratnam, K., and Low, J.A. (2007). Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in oncology. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 1383–1388.
- Raval, R.R., Lau, K.W., Tran, M.G.B., Sowter, H.M., Mandriota, S.J., Li, J.-L., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L., and Ratcliffe, P.J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 5675–5686.
- Rineer, J., Schreiber, D., Choi, K., and Rotman, M. (2010). Characterization and outcomes of infratentorial malignant glioma: a population-based study using the Surveillance Epidemiology and End-Results database. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* *95*, 321–326.
- Rinne, M.L., He, Y., Pachkowski, B.F., Nakamura, J., and Kelley, M.R. (2005). N-methylpurine DNA glycosylase overexpression increases alkylation sensitivity by rapidly removing non-toxic 7-methylguanine adducts. *Nucleic Acids Res.* *33*, 2859–2867.
- Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A.S., Nizet, V., Johnson, R.S., Haddad, G.G., and Karin, M. (2008). NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* *453*, 807–811.
- Roberts, A.M., Watson, I.R., Evans, A.J., Foster, D.A., Irwin, M.S., and Ohh, M. (2009). Suppression of hypoxia-inducible factor 2alpha restores p53 activity via Hdm2 and reverses chemoresistance of renal carcinoma cells. *Cancer Res.* *69*, 9056–9064.
- Robertson, A.B., Klungland, A., Rognes, T., and Leiros, I. (2009). DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *66*, 981–993.
- Rohwer, N., and Cramer, T. (2011). Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* *14*, 191–201.

- Rohwer, N., Dame, C., Haugstetter, A., Wiedenmann, B., Detjen, K., Schmitt, C.A., and Cramer, T. (2010). Hypoxia-inducible factor 1alpha determines gastric cancer chemosensitivity via modulation of p53 and NF-kappaB. *PloS One* 5, e12038.
- Rong, Y., Durden, D.L., Van Meir, E.G., and Brat, D.J. (2006). "Pseudopalisading" necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 529–539.
- Roos, W.P., Batista, L.F.Z., Naumann, S.C., Wick, W., Weller, M., Menck, C.F.M., and Kaina, B. (2007). Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene* 26, 186–197.
- Roos, W.P., Nikolova, T., Quiros, S., Naumann, S.C., Kiedron, O., Zdzienicka, M.Z., and Kaina, B. (2009). Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O(6)-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs. *DNA Repair* 8, 72–86.
- Rosa, S., Fortini, P., Karran, P., Bignami, M., and Dogliotti, E. (1991). Processing in vitro of an abasic site reacted with methoxyamine: a new assay for the detection of abasic sites formed in vivo. *Nucleic Acids Res.* 19, 5569–5574.
- Rutka, J.T., and Kuo, J.S. (2004). Pediatric surgical neuro-oncology: current best care practices and strategies. *J. Neurooncol.* 69, 139–150.
- Sabatini, D.M. (2006). mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat. Rev. Cancer* 6, 729–734.
- Sanai, N., and Berger, M.S. (2008). Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery* 62, 753–764; discussion 264–266.
- Sanai, N., Berger, M.S., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2007). Comment on "Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension." *Science* 318, 393; author reply 393.
- Scherer, H.J. (1938). Structural development in gliomas. *Am. J. Cancer* 34, 333–351.
- Schlosser, S., Wagner, S., Mühlisch, J., Hasselblatt, M., Gerss, J., Wolff, J.E.A., and Frühwald, M.C. (2010). MGMT as a potential stratification marker in relapsed high-grade glioma of children: the HIT-GBM experience. *Pediatr. Blood Cancer* 54, 228–237.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C., and de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 517–528.
- Schuebel, K.E., Chen, W., Cope, L., Glöckner, S.C., Suzuki, H., Yi, J.-M., Chan, T.A., Van

- Neste, L., Van Criekinge, W., van den Bosch, S., et al. (2007). Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer. *PLoS Genet.* *3*, 1709–1723.
- Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.-Y., Jones, D.T.W., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A.M., Quang, D.-A.K., Tönjes, M., et al. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* *482*, 226–231.
- Scrideli, C.A., Carlotti, C.G., Mata, J.F., Neder, L., Machado, H.R., Oba-Sinjo, S.M., Rosemberg, S., Marie, S.K.N., and Tone, L.G. (2007). Prognostic significance of co-overexpression of the EGFR/IGFBP-2/HIF-2A genes in astrocytomas. *J. Neurooncol.* *83*, 233–239.
- Semenza, G.L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *J. Lab. Clin. Med.* *131*, 207–214.
- Semenza, G.L. (2007). Life with oxygen. *Science* *318*, 62–64.
- Semenza, G.L. (2012). Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* *33*, 207–214.
- Semenza, G.L. (2013). Cancer-stromal cell interactions mediated by hypoxia-inducible factors promote angiogenesis, lymphangiogenesis, and metastasis. *Oncogene* *32*, 4057–4063.
- Sermeus, A., Cosse, J.-P., Crespin, M., Mainfroid, V., de Longueville, F., Ninane, N., Raes, M., Remacle, J., and Michiels, C. (2008). Hypoxia induces protection against etoposide-induced apoptosis: molecular profiling of changes in gene expression and transcription factor activity. *Mol. Cancer* *7*, 27.
- Sharma, S., Sharma, M.C., Gupta, D.K., and Sarkar, C. (2006). Angiogenic patterns and their quantitation in high grade astrocytic tumors. *J. Neurooncol.* *79*, 19–30.
- Sharma, S.V., Haber, D.A., and Settleman, J. (2010). Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 241–253.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* *359*, 843–845.
- Simon, M.C. (2006a). Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxic HIF alpha stabilization. *Adv. Exp. Med. Biol.* *588*, 165–170.
- Simon, M.C. (2006b). Coming up for air: HIF-1 and mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* *3*, 150–151.

- Simon, M.C., and Keith, B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 285–296.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63, 5821–5828.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401.
- Smith, M.A., and Anderson, B.D. (2004). Commentary on “European collaboration in trials of new agents for children with cancer” by Ablett et al. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 40, 1893–1895.
- Sos, M.L., Michel, K., Zander, T., Weiss, J., Frommolt, P., Peifer, M., Li, D., Ullrich, R., Koker, M., Fischer, F., et al. (2009). Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *J. Clin. Invest.* 119, 1727–1740.
- Spence, A.M., Muzi, M., Swanson, K.R., O’Sullivan, F., Rockhill, J.K., Rajendran, J.G., Adamsen, T.C.H., Link, J.M., Swanson, P.E., Yagle, K.J., et al. (2008). Regional hypoxia in glioblastoma multiforme quantified with [18F]fluoromisonidazole positron emission tomography before radiotherapy: correlation with time to progression and survival. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 2623–2630.
- Srivastava, A., Jain, A., Jha, P., Suri, V., Sharma, M.C., Mallick, S., Puri, T., Gupta, D.K., Gupta, A., and Sarkar, C. (2010). MGMT gene promoter methylation in pediatric glioblastomas. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* 26, 1613–1618.
- Stiles, J., and Jernigan, T.L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychol. Rev.* 20, 327–348.
- Stupp, R., Hegi, M.E., van den Bent, M.J., Mason, W.P., Weller, M., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, and National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2006). Changing paradigms--an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. *The Oncologist* 11, 165–180.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone

- on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* *10*, 459–466.
- Sturm, D., Witt, H., Hovestadt, V., Khuong-Quang, D.-A., Jones, D.T.W., Konermann, C., Pfaff, E., Tönjes, M., Sill, M., Bender, S., et al. (2012). Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* *22*, 425–437.
- Sturm, D., Bender, S., Jones, D.T.W., Lichter, P., Grill, J., Becher, O., Hawkins, C., Majewski, J., Jones, C., Costello, J.F., et al. (2014). Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 92–107.
- Sullivan, R., Paré, G.C., Frederiksen, L.J., Semenza, G.L., and Graham, C.H. (2008). Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Mol. Cancer Ther.* *7*, 1961–1973.
- Sun, W., Liu, Y., Glazer, C.A., Shao, C., Bhan, S., Demokan, S., Zhao, M., Rudek, M.A., Ha, P.K., and Califano, J.A. (2010). TKTL1 is activated by promoter hypomethylation and contributes to head and neck squamous cell carcinoma carcinogenesis through increased aerobic glycolysis and HIF1 $\alpha$  stabilization. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 857–866.
- Tafari, M., Di Vito, M., Frati, A., Pellegrini, L., De Santis, E., Sette, G., Eramo, A., Sale, P., Mari, E., Santoro, A., et al. (2011). Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. *J. Neuroinflammation* *8*, 32.
- Takano, S. (2012). Glioblastoma angiogenesis: VEGF resistance solutions and new strategies based on molecular mechanisms of tumor vessel formation. *Brain Tumor Pathol.* *29*, 73–86.
- Takeda, N., O’Dea, E.L., Doedens, A., Kim, J., Weidemann, A., Stockmann, C., Asagiri, M., Simon, M.C., Hoffmann, A., and Johnson, R.S. (2010). Differential activation and antagonistic function of HIF- $\alpha$  isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev.* *24*, 491–501.
- Takeshita, I., Takaki, T., Kuramitsu, M., Nagasaka, S., Machi, T., Ogawa, H., Egami, H., Mannoji, H., Fukui, M., and Kitamura, K. (1987). Characteristics of an established human glioma cell line, KNS-42. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* *27*, 581–587.
- Takeuchi, H., Hashimoto, N., Kitai, R., Kubota, T., and Kikuta, K. (2010). Proliferation of



- vascular smooth muscle cells in glioblastoma multiforme. *J. Neurosurg.* *113*, 218–224.
- Tang, J., Svilar, D., Trivedi, R.N., Wang, X., Goellner, E.M., Moore, B., Hamilton, R.L., Banze, L.A., Brown, A.R., and Sobol, R.W. (2011). N-methylpurine DNA glycosylase and DNA polymerase beta modulate BER inhibitor potentiation of glioma cells to temozolomide. *Neuro-Oncol.* *13*, 471–486.
- Taylor, K.R., Mackay, A., Truffaux, N., Butterfield, Y.S., Morozova, O., Philippe, C., Castel, D., Grasso, C.S., Vinci, M., Carvalho, D., et al. (2014). Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Genet.* *46*, 457–461.
- Tentori, L., and Graziani, G. (2005). Chemopotentiation by PARP inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* *52*, 25–33.
- Tentori, L., Leonetti, C., Scarsella, M., d' Amati, G., Portarena, I., Zupi, G., Bonmassar, E., and Graziani, G. (2002). Combined treatment with temozolomide and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor enhances survival of mice bearing hematologic malignancy at the central nervous system site. *Blood* *99*, 2241–2244.
- Thirant, C., Bessette, B., Varlet, P., Puget, S., Cadusseau, J., Tavares, S.D.R., Studler, J.-M., Silvestre, D.C., Susini, A., Villa, C., et al. (2011). Clinical relevance of tumor cells with stem-like properties in pediatric brain tumors. *PloS One* *6*, e16375.
- Thorarinsdottir, H.K., Santi, M., McCarter, R., Rushing, E.J., Cornelison, R., Jales, A., and MacDonald, T.J. (2008). Protein expression of platelet-derived growth factor receptor correlates with malignant histology and PTEN with survival in childhood gliomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 3386–3394.
- To, K.K.-W., Sedelnikova, O.A., Samons, M., Bonner, W.M., and Huang, L.E. (2006). The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1alpha from HIF-2alpha in NBS1 repression. *EMBO J.* *25*, 4784–4794.
- Toschi, A., Lee, E., Gadir, N., Ohh, M., and Foster, D.A. (2008). Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 alpha and 2 alpha on mTORC1 and mTORC2. *J. Biol. Chem.* *283*, 34495–34499.
- Trent, J., Meltzer, P., Rosenblum, M., Harsh, G., Kinzler, K., Mashal, R., Feinberg, A., and Vogelstein, B. (1986). Evidence for rearrangement, amplification, and expression of c-myc in a human glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 470–473.
- Trivedi, R.N., Almeida, K.H., Fornisaglio, J.L., Schamus, S., and Sobol, R.W. (2005). The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death. *Cancer Res.* *65*, 6394–6400.

- Trivedi, R.N., Wang, X., Jelezcova, E., Goellner, E.M., Tang, J., and Sobol, R.W. (2008). Human methyl purine DNA glycosylase and DNA polymerase beta expression collectively predict sensitivity to temozolomide. *Mol. Pharmacol.* *74*, 505–516.
- Turcan, S., Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L.A., Fang, F., Yilmaz, E., Campos, C., Fabius, A.W.M., Lu, C., Ward, P.S., et al. (2012). IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* *483*, 479–483.
- Turner, N.C., and Ashworth, A. (2011). Biomarkers of PARP inhibitor sensitivity. *Breast Cancer Res. Treat.* *127*, 283–286.
- Turner, N., Tutt, A., and Ashworth, A. (2004). Hallmarks of “BRCAness” in sporadic cancers. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 814–819.
- Uchida, T., Rossignol, F., Matthay, M.A., Mounier, R., Couette, S., Clottes, E., and Clerici, C. (2004). Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J. Biol. Chem.* *279*, 14871–14878.
- Vakoc, B.J., Lanning, R.M., Tyrrell, J.A., Padera, T.P., Bartlett, L.A., Stylianopoulos, T., Munn, L.L., Tearney, G.J., Fukumura, D., Jain, R.K., et al. (2009). Three-dimensional microscopy of the tumor microenvironment in vivo using optical frequency domain imaging. *Nat. Med.* *15*, 1219–1223.
- Varlet, P., Soni, D., Miquel, C., Roux, F.-X., Meder, J.-F., Chneiweiss, H., and Daumas-Duport, C. (2004). New variants of malignant glioneuronal tumors: a clinicopathological study of 40 cases. *Neurosurgery* *55*, 1377–1391: discussion 1391–1392.
- Vassal, G., Terrier-Lacombe, M.J., Bissery, M.C., Vénuat, A.M., Gyergyay, F., Bénard, J., Morizet, J., Boland, I., Ardouin, P., Bressac-de-Paillerets, B., et al. (1996). Therapeutic activity of CPT-11, a DNA-topoisomerase I inhibitor, against peripheral primitive neuroectodermal tumour and neuroblastoma xenografts. *Br. J. Cancer* *74*, 537–545.
- Vassal, G., Boland, I., Santos, A., Bissery, M.C., Terrier-Lacombe, M.J., Morizet, J., Sainte-Rose, C., Lellouch-Tubiana, A., Kalifa, C., and Gouyette, A. (1997). Potent therapeutic activity of irinotecan (CPT-11) and its schedule dependency in medulloblastoma xenografts in nude mice. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *73*, 156–163.
- Vaupel, P. (2004). The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *The Oncologist* *9 Suppl 5*, 10–17.

- Vaupel, P., Kelleher, D.K., and Höckel, M. (2001). Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin. Oncol.* 28, 29–35.
- Venere, M., Fine, H.A., Dirks, P.B., and Rich, J.N. (2011). Cancer stem cells in gliomas: identifying and understanding the apex cell in cancer's hierarchy. *Glia* 59, 1148–1154.
- Venneti, S., and Thompson, C.B. (2013). Metabolic modulation of epigenetics in gliomas. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 23, 217–221.
- Verbeek, B., Southgate, T.D., Gilham, D.E., and Margison, G.P. (2008). O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *Br. Med. Bull.* 85, 17–33.
- Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110.
- Verschuur, A.C., Grill, J., Lelouch-Tubiana, A., Couanet, D., Kalifa, C., and Vassal, G. (2004). Temozolomide in paediatric high-grade glioma: a key for combination therapy? *Br. J. Cancer* 91, 425–429.
- Vescovi, A.L., Galli, R., and Reynolds, B.A. (2006). Brain tumour stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 6, 425–436.
- Viana-Pereira, M., Lee, A., Popov, S., Bax, D.A., Al-Sarraj, S., Bridges, L.R., Stávale, J.N., Hargrave, D., Jones, C., and Reis, R.M. (2011). Microsatellite instability in pediatric high grade glioma is associated with genomic profile and differential target gene inactivation. *PloS One* 6, e20588.
- Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer* 8, 755–768.
- Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413–431.
- Van Vuurden, D.G., Hulleman, E., Meijer, O.L.M., Wedekind, L.E., Kool, M., Witt, H., Vandertop, P.W., Würdinger, T., Noske, D.P., Kaspers, G.J.L., et al. (2011). PARP inhibition sensitizes childhood high grade glioma, medulloblastoma and ependymoma to radiation. *Oncotarget* 2, 984–996.
- Wall, M.E., and Wani, M.C. (1995). Camptothecin and taxol: discovery to clinic--thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 55, 753–760.
- Wang, J., Miletic, H., Sakariassen, P.Ø., Huszthy, P.C., Jacobsen, H., Brekkå, N., Li, X., Zhao, P., Mørk, S., Chekenya, M., et al. (2009). A reproducible brain tumour model

- established from human glioblastoma biopsies. *BMC Cancer* 9, 465.
- Warren, K.E., Gururangan, S., Geyer, J.R., McLendon, R.E., Poussaint, T.Y., Wallace, D., Balis, F.M., Berg, S.L., Packer, R.J., Goldman, S., et al. (2012). A phase II study of O6-benzylguanine and temozolomide in pediatric patients with recurrent or progressive high-grade gliomas and brainstem gliomas: a Pediatric Brain Tumor Consortium study. *J. Neurooncol.* 106, 643–649.
- Weiler, M., Blaes, J., Pusch, S., Sahm, F., Czabanka, M., Luger, S., Bunse, L., Solecki, G., Eichwald, V., Jugold, M., et al. (2014). mTOR target NDRG1 confers MGMT-dependent resistance to alkylating chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 409–414.
- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323–330.
- Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Campan, M., Young, J., Long, T.I., Faasse, M.A., Kang, G.H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., et al. (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 38, 787–793.
- Weller, M., and Wick, W. (2014). Neuro-oncology in 2013: improving outcome in newly diagnosed malignant glioma. *Nat. Rev. Neurol.* 10, 68–70.
- Weller, M., Pfister, S.M., Wick, W., Hegi, M.E., Reifenberger, G., and Stupp, R. (2013). Molecular neuro-oncology in clinical practice: a new horizon. *Lancet Oncol.* 14, e370–e379.
- Weller, M., van den Bent, M., Hopkins, K., Tonn, J.C., Stupp, R., Falini, A., Cohen-Jonathan-Moyal, E., Frappaz, D., Henriksson, R., Balana, C., et al. (2014). EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol.* 15, e395–e403.
- Wen, P.Y., and Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* 359, 492–507.
- Westphal, M., and Lamszus, K. (2011). The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 495–508.
- Wick, W., Platten, M., and Weller, M. (2001). Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. *J. Neurooncol.* 53, 177–185.
- Wick, W., Platten, M., Meisner, C., Felsberg, J., Tabatabai, G., Simon, M., Nikkhah, G., Papsdorf, K., Steinbach, J.P., Sabel, M., et al. (2012). Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08

- randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *13*, 707–715.
- Wick, W., Meisner, C., Hentschel, B., Platten, M., Schilling, A., Wiestler, B., Sabel, M.C., Koeppen, S., Ketter, R., Weiler, M., et al. (2013). Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. *Neurology* *81*, 1515–1522.
- Wick, W., Weller, M., van den Bent, M., Sanson, M., Weiler, M., von Deimling, A., Plass, C., Hegi, M., Platten, M., and Reifenberger, G. (2014). MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat. Rev. Neurol.* *10*, 372–385.
- Wiestler, B., Capper, D., Sill, M., Jones, D.T.W., Hovestadt, V., Sturm, D., Koelsche, C., Bertonni, A., Schweizer, L., Korshunov, A., et al. (2014). Integrated DNA methylation and copy-number profiling identify three clinically and biologically relevant groups of anaplastic glioma. *Acta Neuropathol. (Berl.)*.
- Wilson, W.R., and Hay, M.P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 393–410.
- Wirtz, S., Nagel, G., Eshkind, L., Neurath, M.F., Samson, L.D., and Kaina, B. (2010). Both base excision repair and O6-methylguanine-DNA methyltransferase protect against methylation-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* *31*, 2111–2117.
- De Witt Hamer, P.C., Van Tilborg, A.A.G., Eijk, P.P., Sminia, P., Troost, D., Van Noorden, C.J.F., Ylstra, B., and Leenstra, S. (2008). The genomic profile of human malignant glioma is altered early in primary cell culture and preserved in spheroids. *Oncogene* *27*, 2091–2096.
- Wolff, J.E.A., Classen, C.F., Wagner, S., Kortmann, R.-D., Palla, S.L., Pietsch, T., Kühl, J., Gnekow, A., and Kramm, C.M. (2008). Subpopulations of malignant gliomas in pediatric patients: analysis of the HIT-GBM database. *J. Neurooncol.* *87*, 155–164.
- Wong, K.-K., Tsang, Y.T.M., Chang, Y.-M., Su, J., Di Francesco, A.M., Meco, D., Riccardi, R., Perlaky, L., Dauser, R.C., Adesina, A., et al. (2006). Genome-wide allelic imbalance analysis of pediatric gliomas by single nucleotide polymorphic allele array. *Cancer Res.* *66*, 11172–11178.
- Wouters, B.G., and Koritzinsky, M. (2008). Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 851–864.
- Wu, G., Broniscer, A., McEachron, T.A., Lu, C., Paugh, B.S., Becksfors, J., Qu, C., Ding, L., Huether, R., Parker, M., et al. (2012). Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat. Genet.* *44*,

251–253.

- Wu, G., Diaz, A.K., Paugh, B.S., Rankin, S.L., Ju, B., Li, Y., Zhu, X., Qu, C., Chen, X., Zhang, J., et al. (2014). The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat. Genet.* *46*, 444–450.
- Yamada, K.M., and Cukierman, E. (2007). Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* *130*, 601–610.
- Yan, L., Bulgar, A., Miao, Y., Mahajan, V., Donze, J.R., Gerson, S.L., and Liu, L. (2007). Combined treatment with temozolomide and methoxyamine: blocking apurinic/pyrimidinic site repair coupled with targeting topoisomerase II $\alpha$ . *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 1532–1539.
- Yang, H., Rudge, D.G., Koos, J.D., Vaidialingam, B., Yang, H.J., and Pavletich, N.P. (2013). mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* *497*, 217–223.
- Yang, W., Xia, Y., Hawke, D., Li, X., Liang, J., Xing, D., Aldape, K., Hunter, T., Alfred Yung, W.K., and Lu, Z. (2012). PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis. *Cell* *150*, 685–696.
- Yee Koh, M., Spivak-Kroizman, T.R., and Powis, G. (2008). HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem. Sci.* *33*, 526–534.
- Yeung, S.J., Pan, J., and Lee, M.-H. (2008). Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *65*, 3981–3999.
- Yin, D., Xie, D., Hofmann, W.-K., Zhang, W., Asotra, K., Wong, R., Black, K.L., and Koeffler, H.P. (2003). DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase: promoter hypermethylation associated with decreased expression and G:C to A:T mutations of p53 in brain tumors. *Mol. Carcinog.* *36*, 23–31.
- Young, B. (2008). Atlas d'histologie fonctionnelle de Weather (de Boeck).
- Yuan, G., Nanduri, J., Khan, S., Semenza, G.L., and Prabhakar, N.R. (2008). Induction of HIF-1 $\alpha$  expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca<sup>2+</sup> signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J. Cell. Physiol.* *217*, 674–685.
- Zagzag, D., Zhong, H., Scalzitti, J.M., Laughner, E., Simons, J.W., and Semenza, G.L. (2000). Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* *88*, 2606–2618.
- Zagzag, D., Esencay, M., Mendez, O., Yee, H., Smirnova, I., Huang, Y., Chiriboga, L., Lukyanov, E., Liu, M., and Newcomb, E.W. (2008). Hypoxia- and vascular

- endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 expression in glioblastomas: one plausible explanation of Scherer's structures. *Am. J. Pathol.* *173*, 545–560.
- Zaky, W., Wellner, M., Brown, R.J., Blüml, S., Finlay, J.L., and Dhall, G. (2013). Treatment of children with diffuse intrinsic pontine gliomas with chemoradiotherapy followed by a combination of temozolomide, irinotecan, and bevacizumab. *Pediatr. Hematol. Oncol.* *30*, 623–632.
- Zhang, H., Gao, P., Fukuda, R., Kumar, G., Krishnamachary, B., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Semenza, G.L. (2007). HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* *11*, 407–420.
- Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L.A., Tan, Y.S., Baek, J.H., Wesley, J.B., Gonzalez, F.J., and Semenza, G.L. (2008). Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* *283*, 10892–10903.
- Zhao, W., Soejima, H., Higashimoto, K., Nakagawachi, T., Urano, T., Kudo, S., Matsukura, S., Matsuo, S., Joh, K., and Mukai, T. (2005). The essential role of histone H3 Lys9 di-methylation and MeCP2 binding in MGMT silencing with poor DNA methylation of the promoter CpG island. *J. Biochem. (Tokyo)* *137*, 431–440.
- Zheng, S., and Verhaak, R.G.W. (2013). Intragenic breakpoint: a marker of genome instability in glioblastoma. *Cell Cycle Georget. Tex* *12*, 3705–3706.
- Zheng, X., Xie, Q., Li, S., and Zhang, W. (2011). CXCR4-positive subset of glioma is enriched for cancer stem cells. *Oncol. Res.* *19*, 555–561.
- Zhu, H., Chen, X.P., Luo, S.F., Guan, J., Zhang, W.G., and Zhang, B.X. (2005). Involvement of hypoxia-inducible factor-1-alpha in multidrug resistance induced by hypoxia in HepG2 cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* *24*, 565–574.
- Zhu, T.S., Costello, M.A., Talsma, C.E., Flack, C.G., Crowley, J.G., Hamm, L.L., He, X., Hervey-Jumper, S.L., Heth, J.A., Muraszko, K.M., et al. (2011). Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells. *Cancer Res.* *71*, 6061–6072.
- Zlotecki, R.A., Baxter, L.T., Boucher, Y., and Jain, R.K. (1995). Pharmacologic modification of tumor blood flow and interstitial fluid pressure in a human tumor xenograft: network analysis and mechanistic interpretation. *Microvasc. Res.* *50*, 429–443.





## Résumé

Les gliomes malins de l'enfant (GME), de pronostic sombre, se distinguent des gliomes malins de l'adulte (GMA) sur le plan biologique mais aussi clinique, avec des taux de réponse au témozolomide (chimiothérapie alkylante de référence chez l'adulte) moindres. L'efficacité du témozolomide est réduite par l'action de l'enzyme de réparation de l'ADN, l'O6-méthylguanine-DNA-méthyltransferase (MGMT), dont l'expression est fréquemment inhibée par méthylation du promoteur de son gène dans les GMA. En première partie, la mise au point d'une nouvelle technique de PCR spécifique de méthylation a montré une fréquence plus faible dans les GME (15%) vs les GMA (45%,  $p < 0,001$ ). En deuxième partie, l'hypoxie intra-tumorale et la dérégulation en amont de l'axe mTOR-HIF-1 $\alpha$ , connus pour être impliqués dans la chimio-résistance, ont été étudiés dans les GME et ciblés par l'association rapamycin-irinotecan dans une étude in vitro, pour laquelle des lignées dérivées de GME ont été développées.

Mots-clés : gliomes pédiatriques ; témozolomide ; MGMT ; hypoxie ; HIF ; métabolomique ; rapamycine ; irinotecan

## Résumé en anglais

Pediatric malignant glioma (PMGs), are associated with a very dismal prognosis. They are distinct from their adult counterparts (AMGs), biologically but also clinically, with a lower response to temozolomide (the current reference alkylating chemotherapy) compared to AMGs. Temozolomide efficacy is reduced by the activity of the DNA repair enzyme, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT), whose expression is frequently silenced by promoter methylation. First, the development of a new methylation-specific PCR showed a lower frequency of MGMT methylation in PMGs (15%) vs AMGs (45%,  $p < 0,001$ ). Secondly, intra-tumor hypoxia and the upstream deregulation of mTOR-HIF-1 $\alpha$  axis, well-known to be involved in chemo-resistance and the up-regulation of MGMT expression, were studied in a PMG cohort. The targeting of this axis was then studied in vitro using a therapy combining rapamycin and irinotecan. For this, pediatric patient-derived malignant glioma cell lines were developed.

Key words: pediatric glioma; temozolomide ; MGMT ; hypoxia ; HIF ; metabolomics ; rapamycin ; irinotecan