



Traitement du gliome infiltrant du tronc cérébral par un régulateur épigénétique : rôle d'EBP50 et d'IRSp53

Caroline Capdevielle

► To cite this version:

Caroline Capdevielle. Traitement du gliome infiltrant du tronc cérébral par un régulateur épigénétique : rôle d'EBP50 et d'IRSp53. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. ⟨NNT : 2018BORD0405⟩. ⟨tel-02179630⟩

HAL Id: tel-02179630

<https://theses.hal.science/tel-02179630v1>

Submitted on 11 Jul 2019

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.



HAL Authorization

THÈSE PRÉSENTÉE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École Doctorale des Science de la vie et de la santé

Spécialité Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par Caroline CAPDEVIELLE

Traitement du gliome infiltrant du tronc cérébral

par un régulateur épigénétique :

rôle d'EBP50 et d'IRSp53

Sous la direction du Dr. Martin HAGEDORN

Soutenue le 17 décembre 2018 à Bordeaux

Membres du jury :

Mme Sandrine **BOURDOULOUS**
Mme Laura **FOUASSIER**
M. David **CASTEL**
Mme Violaine **MOREAU**
M. Jean-Max **PASQUET**
M. Martin **HAGEDORN**

Directrice de Recherche - Institut Cochin
Chargée de Recherche - Centre de recherche St Antoine
Chargé de Recherche - Institut Gustave Roussy
Directrice de Recherche - Université de Bordeaux
Directeur de Recherche - Université de Bordeaux
Maître de conférence - Université de Bordeaux

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

« Toute certitude est par essence contradictoire avec la philosophie de la recherche. »
Pierre Joliot-Curie

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury de thèse pour leur participation. Je remercie le Dr. Laura Fouassier, le Dr. Sandrine Bourdoulous et le Dr. David Castel pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse ainsi que le Dr. Violaine Moreau et le Dr. Jean-Max Pasquet pour m'avoir aiguillée lors de ma mi-thèse et de bien vouloir prendre part au jury de thèse.

Je remercie mon Directeur de thèse le Dr. Martin Hagedorn qui m'a permis de réaliser cette thèse. Merci de m'avoir fait confiance pendant ces 3 années et pour votre optimisme à toute épreuve.

Je remercie le Directeur de l'équipe MiRCaDe, le Dr. Christophe Grosset pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour ses conseils durant ma thèse et la relecture de ce manuscrit.

Je tiens également à remercier la Fondation Groupama pour m'avoir aussi bien accueillie et les nombreux donateurs de la balade solidaire qui ont permis le financement de ces 3 années de thèse. Je remercie aussi les associations Eva pour la vie, Aidons Marina, E.S.C.A.P.E, Kaëna et les lapinours, les amis de Marius, Cassandra et la Fondation Flavien pour leurs soutiens et leurs aides financières qui ont contribué aux travaux de recherche de notre équipe.

Je remercie mon ancien maître de stage, le Dr. Philippe Lehours qui m'a permis de découvrir le monde de la recherche. J'ai été ravie de faire mes stages de Master dans votre laboratoire, vous m'avez donné la motivation de continuer dans cette voie. Merci aussi à vous les filles du laboratoire de bactériologie, Pauline, Silvia, Christelle, Astrid, Elodie, Alice, Sarah, Lucie et Salah.

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe MiRCaDe. Plus particulièrement le Dr. Véronique Trézeguet-Busquet pour son soutien et la re(re)lecture de ce manuscrit. J'ai été ravie de travailler à tes côtés durant ma dernière année de thèse. Merci au Dr. Patrick Auguste, pour les discussions, les blagues et les nombreux mensonges qui ne passent plus depuis longtemps. Merci à la future Dr. Amani Ghousein avec qui j'ai eu le plaisir de commencer cette thèse.

Je remercie les anciens membres de l'équipe MiRCaDe, le Dr. Véronique Veillat mon ancienne collègue de bureau, le Dr. Francis Sagliocco l'expert en génétique, Hélène Fazli pour ses rigolades, Sarah Lesjean et sa bonne humeur, le Dr. Anne-Aurélien Raymond pour nos discussions et son aide sur la spectrométrie de masse et le Dr. Kasia Hooks pour son expertise en bio-informatique. Un grand merci à Angélique Desplat qui m'a tout appris au début de cette thèse, au Dr. et jeune maman Émilie Indersie qui malgré son caractère peut être sympa en vrai, à Gaëlle Labrunie pour son soutien et les nombreuses conversations qui m'ont beaucoup aidée pendant ma thèse. Un grand merci à Justine Charpentier pour m'avoir aidée pendant cette dernière année de thèse sur les manips, pour ses encouragements et pour les nombreux fous rires ainsi qu'à ma super stagiaire, Mélissa Ménard, pour son soutien dans l'épreuve terrible qu'est l'écriture de la thèse, merci les mich-mich's pour tous les autres bons moments passés au laboratoire et ailleurs.

Je remercie mes autres stagiaires Anne-Sophie, Yasmine et Jefflie avec qui j'ai eu le plaisir de partager mon travail et mes connaissances.

Je remercie les membres de l'unité U1035, le Dr. Pierre Thiébaud, le Dr. Nadine Thézé et Sandrine Fedou pour les discussions et les travaux réalisés chez le modèle xénope. Merci à Catherine Pain de m'avoir aidée à réaliser les manips d'histologie ainsi que Véronique Guyonnet-Dupérat et Alice Bibeyran de la plateforme de vectorologie pour leurs conseils. Merci à Isabelle Lamy et Katia Obama pour leurs aides et à Anthony Cooks pour sa bonne humeur.

Je remercie Benoit Rousseau pour m'avoir aidée sur le projet souris ainsi que Julien Izotte pour les galères et les fous rires à l'animalerie. Un grand merci à Mélina Pétrel de la plateforme de microscopie électronique qui m'a fait découvrir un autre monde et à Jean William Dupuy pour la spectrométrie de masse.

Je remercie les membres de l'unité U1053 qui m'ont très bien accueillie et avec qui j'ai passé de très bons moments. Je ne pense pas retrouver un laboratoire avec autant de joie et de bonne humeur. Merci au Dr. Léo Piquet et Dr. Fabien Binamé, le duo des blagues les plus drôles au monde, au Dr. Joaquim Javary pour les matchs de mini-basket que j'ai toujours perdu, au Dr. Elodie Henriet pour son rire, les sorties McDo et son soutien à distance, au futur Dr. Nestor Pallarés Lupón le dernier survivant du bureau, à la future Dr. Laure Magnan, la bretonne toujours souriante, à la future Dr. Margaux Sala pour sa gentillesse et ses petites phrases toujours bien placées, à Sylvaine Di Tommaso l'aventurière qui écrit toujours des romans, à la future Dr. Capucine Héraud et ses Tupperware de mamie, à Adjanie Tuariihionoa et son accent des îles, à Véronique Neaud pour ses anecdotes, à Nathalie Courtois et un grand merci à tous les autres membres et anciens membres de l'équipe que je n'ai pas cités mais que j'ai eu le plaisir de côtoyer.

Je remercie les futurs docteurs Paoline Laurent et Fabien Rideau avec qui j'ai pu partager l'épreuve de la thèse mais aussi Marie Le Goff, mon ancienne colocataire et squatteuse de piscine, et Juliette Delair, la girafe aventurière. Un réel plaisir de vous connaître depuis le Master.

Je remercie mes amies d'enfance, Elodie, Sophie et Marina qui ont toujours été là et qui sont toujours là pour passer de bons moments.

Merci à ma famille cousins, cousines, oncles et tantes ainsi qu'à ma belle-famille. Merci à Amandine et Jonathan, Julien et Sabine et mes petits monstres de neveux Juliette, Elliot et Alana qui sont des petites bouilles pleines d'amour. Un grand merci à mes parents qui m'ont toujours soutenue dans mes choix et m'ont permis de faire de longues études. Et promis les études, c'est fini !

Pour finir, je tiens à remercier particulièrement Mathieu de me supporter tous les jours, de m'avoir permis de résider dans un petit cocon et de me ramener un peu de bonheur chaque weekend, encore merci.

Cette thèse a été réalisée au laboratoire :

U1035 INSERM - Biothérapies des Maladies Génétiques Inflammatoires et Cancers (BMGIC)



Équipe microARNs, Cancer et Développement
Bâtiment 3B, 1^{ère} étage – Carreire Zone Nord
146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex



Et a été financée par la **Fondation Groupama, Centre Atlantique** en collaboration avec
l'association **Eva pour la vie**



SOMMAIRE

Table des illustrations :	1
Abbréviations	3
Introduction	8
Chapitre I : le gliome infiltrant du tronc cérébral, un cancer pédiatrique	10
I. Bases physiopathologiques de la tumorigenèse	10
II. Épidémiologie des cancers pédiatriques	14
III. Le gliome infiltrant du tronc cérébral	15
1. Prévalence	15
2. Localisation anatomique des DIPG : le tronc cérébral	16
3. Symptômes et signes cliniques du DIPG	18
4. Diagnostic	18
4.1. Imagerie par Résonnance Magnétique (IRM)	19
4.2. Biopsie	19
4.3. Classification	20
4.3.a. Histopathologie	20
4.3.b. Classification moléculaire	22
5. Causes : le développement du tronc cérébral et microenvironnement	23
6. Altérations génétiques associées aux DIPG	25
6.1. L'histone 3	25
6.1.a. Mutation H3K27M	27
6.1.b. Conséquences de la mutation H3K27M	28
6.2. Autres altérations génétiques caractéristiques des DIPG	30
6.3. Gliome adulte vs gliome pédiatrique : les différences génétiques.	32
7. Traitement du gliome infiltrant du tronc cérébral	33
7.1. Radiothérapie	34
7.2. Chimiothérapies	34
7.3. Thérapies ciblées	35
7.4. Immunothérapie	35
7.5. Systèmes de délivrance au niveau de la barrière hémato-encéphalique	39
8. Biomarqueurs	40
9. Modèles expérimentaux	41
9.1. Modèle <i>in vitro</i> : les cellules issues de patients	41
9.2. Cellules modifiées et implantation chez la souris	42
9.3. Xénogreffe orthotopique chez la souris	42
9.4. Souris génétiquement modifiées	44
10. Principales difficultés associées à l'étude des DIPG	45
IV. Conclusion	46
Chapitre II : La régulation épigénétique des histones : rôle dans les DIPG et traitement par le panobinostat.	48
I. Généralités sur les régulateurs épigénétiques	48
II. Régulation épigénétique des histones : méthylation et acétylation	49
1. La méthylation	50
1.1. Mécanisme d'action	50
1.2. Régulation de la méthylation dans les tumeurs DIPG	51
2. L'acétylation	52
2.1. Mécanisme d'action	52
2.2. Les histones acétylases (HAT)	53
2.3. Les histones désacétylases (HDAC)	53

2.4. Les inhibiteurs des histones désacétylases (HDACi)	57
III. Le panobinostat, inhibiteur des histones désacétylases	62
1. Généralités	62
2. Pharmacocinétique.....	63
3. Mécanismes d'action	63
4. Utilisation en cancérologie	65
4.1. Action du PS sur le myélome multiple.....	65
4.2. Action du PS sur les gliomes adultes	67
4.3. Effets du PS sur la différenciation des cellules cancéreuses	67
4.4. Traitement des DIPG par le PS	68
4.4.a. Études précliniques des effets antitumoraux du PS	68
4.4.b. Délivrance du PS au niveau du tronc cérébral	70
4.4.c. Essai clinique dans le traitement des DIPG par le PS.....	72
IV. Conclusion.....	72
Chapitre III : EBP50 et IRSp53, deux protéines adaptatrices	74
I. EBP50.....	74
1. Généralités	74
2. Expression.....	76
3. Structure.....	76
4. Rôle physiologique	77
4.1. Formation des microvillosités	77
4.2. L'homéostasie ionique assurée par EBP50	77
4.2.a. Régulation des ions sodium	78
4.2.b. Régulation de la réabsorption des phosphates	79
4.2.c. Régulation du transport des ions chlorure	79
4.3. Régulation de la voie PI3K-Akt	79
4.3.a. Régulation de PTEN et PHLLP	80
4.3.b. Régulation d'EGFR	80
4.4. Voie de signalisation Wnt et β -caténine.....	80
4.5. EBP50 et motilité cellulaire	82
4.6. Immunité et inflammation.....	82
4.7. Phénotypes après invalidation du gène <i>SLC9A3R1</i> chez la souris.....	83
5. Régulation de la protéine EBP50.....	84
5.1. Régulation de l'expression génétique	84
5.2. Régulation post-traductionnelle	84
6. Mutations	85
7. Rôle en cancérologie.....	86
7.1. Cancer du sein	86
7.2. Cancer colorectal.....	88
7.3. Glioblastome	89
7.4. Autres cancers	89
8. Conclusion	90
II. IRSp53.....	90
1. Généralités	90
2. Expression.....	91
3. Structure.....	91
3.1. Domaine IMD	93
3.2. Domaine CRIB-PR.....	93
3.3. Domaine SH3	93
3.4. Domaine WH2.....	94

3.5. Domaine PDZ-B.....	94
4. Rôle physiologique	95
4.1. Formation des filopodes	95
4.2. Formation des lamellipodes	97
4.3. Formation des synapses et transmission du signal	97
4.3.a. Rôle dans le développement des synapses.....	98
4.3.b. Rôle dans la transmission du signal synaptique.....	99
4.4. Phénotypes après invalidation du gène BAIAP2/IRSp53 chez la souris	101
5. Régulation de IRSp53.....	101
6. Rôle de BAIAP2/IRSp53 dans les pathologies	102
6.1. Troubles psychiatriques et neurologiques	102
6.2. Implication dans la progression tumorale	102
7. Conclusion	103
Objectifs	104
Résultats	112
Discussion	180
Conclusion générale	196
Références	198

Table des illustrations :

Figure 1 : Caractéristiques du cancer.	10
Figure 2 : Nombre moyen de cas annuels de cancers de l'enfant en France.	15
Figure 3 : Coupe sagittale médiane de l'encéphale montrant les structures du tronc cérébral.	16
Figure 4 : Distribution des nerfs crâniens et fonctions.....	17
Figure 5 : Caractéristiques IRM des tumeurs DIPG.	19
Figure 6 : Apparence morphologique des gliomes (coloration à l'hématoxyline et l'éosine)	21
Figure 7 : Classification moléculaire des DIPG.....	22
Figure 8 : Structure d'un nucléosome et acétylation des histones.	25
Figure 9 : Méthylation post-traductionnelle des lysines.	26
Figure 10 : Corrélation de la mutation H3K27M avec l'acétylation de H3K27 et l'exclusion des effecteurs du complexe PRC2.....	29
Figure 11 : PD-L1 dans la fuite immunitaire des gliomes	37
Figure 12 : Schéma explicatif de l'utilisation des ultrasons dans l'induction d'une brèche dans la BHE.	40
Figure 13 : Le système RCAS/tv-a dans les cellules murines.....	44
Figure 14 : Structure du chromosome et modifications épigénétiques.	49
Figure 15 : Classification des familles de HDAC.	54
Figure 16 : Effets de l'inhibition des HDAC sur les cellules cancéreuses.	60
Figure 17 : Structure chimique du panobinostat.	63
Figure 18 : Action du panobinostat sur les différentes HDAC.	65
Figure 19 : Effets de la combinaison du bortezomib avec le PS sur la dégradation des protéines mal repliées.....	66
Figure 20 : Distribution du composé radiomarké ¹⁸ F-panobinostat en temps réel après injection par CED (haut) ou par voie intrapéritonéale (bas).	71
Figure 21 : Structure de la protéine EBP50 et ses partenaires protéiques.....	76
Figure 22 : EBP50, protéine adaptatrice entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine.....	77
Figure 23 : Les récepteurs β 2-AR permettent indirectement l'activation des récepteurs NHE3.	78
Figure 24 : Les différentes voies régulées par EBP50.	81
Figure 25 : Formation des filopodes et des lamellipodes durant la migration cellulaire.	91
Figure 26 : Structure de la protéine IRSp53 et de ses variants.	92

Figure 27 : Dimérisation et auto-inhibition de la protéine IRSp53.....	94
Figure 28: Formation des filopodes.	96
Figure 29 : Schéma récapitulant le rôle d'IRSp53 dans la formation des lamellipodes.	97
Figure 30: Rôle des filopodes dans les cellules neurales.	98
Figure 31 : Modèle du rôle d'IRSp53 dans le développement des épines dendritiques.	99
Figure 32 : Rôle d'IRSp53 dans la relocalisation du récepteur NMDAR.....	100
Figure 33 : Modèle du “BH3 profiling”.	107
Figure 34 : Chronologie du modèle de l’embryon de poulet et principales étapes des expérimentations.	108
Figure 35 : Stades de développement classiques du modèle Xénope.	109
Figure 36 : Représentation des hypothèses pouvant expliquer les rôles d'EBP50 dans les cellules DIPG traitées au panobinostat.....	187
Figure 37 : Représentation des hypothèses pouvant expliquer les rôles d'IRSp53 dans les cellules DIPG traitées au panobinostat.....	190
Figure 38 : Évaluation de l’effet du PS sur les tumeurs DIPG dans un modèle de souris NOD-SCID.....	195

Tableau 1 : Principales caractéristiques des mutations associées aux DIPG.	28
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des mutations les plus importantes dans les DIPG.	30
Tableau 3 : Différences moléculaires entre les gliomes adultes et les gliomes pédiatriques...	33
Tableau 4 : Essais cliniques par immunothérapie pour le traitement des DIPG.	38
Tableau 5 : Caractéristiques cliniques et moléculaires des tumeurs DIPG.....	41
Tableau 6 : Classes et cibles des HDACi.	57
Tableau 7 : Récapitulatif des essais cliniques combinatoires pour le panobinostat.	62

Abbréviations

A

Abi-1	Abelson interactor 1
Ac	Acétylation
ACVR1	Activin A receptor, type I
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	AMP cyclique
APC	Adenomatous polyposis coli protein
AR	Récepteur des androgènes
ARF1	ADP-ribosylation factor 1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARP2/3	Actin-related protein 2/3
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATRX	ATP-dependent helicase ATRX
ATP	Adenosine tri-phosphate

B

β2-AR	Récepteur β2-adrénergique
Bad	Bcl-2-associated death promoter
BAIAP2	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-x _L	B-cell lymphoma-extra large
BH3	BCL2 homology region 3
BHE	Barrière hématoencéphalique
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
Bim	Bcl-2-like protein 11
BMP	Bone morphogenetic protein
BRD	Bromodomain-containing protein

C

CAM	Membrane chorio-allantoïdienne de poulet
CAR-T	Chimeric antigen receptor-T
CCND2	Cyclin D2
CCR	Cancer colorectal
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CDK	Cyclin-dependant kinase
CDKN	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
Cdt1	DNA replication factor 1
CED	Convection-enhanced delivery
CFTR	Cystic fibrosis trans-membrane conductance regulator
CRIB-PR	Cdc42-Rac interactive binding-proline rich
CTCL	Lymphome cutané primitif à cellules T
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte protein 4
CXCR	C-X-C chemokine receptor
CYP	Cytochrome P450

D

DAPK	Tumor suppressor death-associated protein kinase
DIPG	Diffuse Intrinsic Pontine Glioma
DMG	Diffuse midline glioma H3K27M-mutant
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNAJB1	DnaJ homology subfamily member 1
DNMT	DNA (cytosine-5)-methyltransferase

E

EB	ERM Binding domain
EBP50	ERM-Binding Phosphoprotein 50
EED	Embryonic ectoderm development
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor

EMT	Epithelio-Mesenchymal Transition
Ena/VASP	Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein-like
EphA2	Ephrin type-A receptor 2
Eps8	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8
ER	Récepteur à œstrogène
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
ERM	Ezrin Radixin Moesin/Merlin
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
F	
FAK	Focal Adhesion Kinase
FAP	Fibroblast activation protein, alpha
FAS	Fas Cell Surface Death Receptor
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
Fzd	Récepteur Frizzled
G	
GBM	Glioblastome
GD2	Disialoganglioside
GLUT1	Glucose transporter 1
GSK3	Glycogen synthase kinase
GTPase	Guanosine tri-phosphatase
H	
H3	Histone 3
H3K27	Lysine en position 27 de l'histone H3
H3K27Ac	Acétylation de la lysine 27 sur l'histone H3
H3K27M	Mutation de l'histone H3 au niveau de la lysine 27 remplacée par une méthionine
H3K27me3	Triméthylation de la lysine sur l'histone H3
HAT	Histones acétyl-transférases
HDAC	Histone Désacétylase
HDACi	Inhibiteur des histones désacétylases
HDM	Histone Déméthylase
HIF-1 α	Hypoxia Inducible Factors-1 α
HMT	Histone méthyl-transférase
HSP70	Heat shock protein 70
HSP90	Heat shock protein 90
I	
I-BAR	Inverse-Bin-Amphiphysins Rvs
ICCC	International Classification of Childhood Cancer
ID2	DNA-binding protein inhibitor ID-2
IDH1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-13R α 2	Interleukin-13 receptor alpha 2
IMD	IRSp53-Missing in metastasis homology Domain
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IRSp53	Insulin receptor substrate p53
J	
JHDM	JmjC-domain containing histone demethylases
JMJD3	Jumonji Domain-Containing Protein 3 Histone Lysine Demethylase
L	
LKB1	Liver kinase B1
K	
Kank	Kidney ankyrin repeat-containing protein
kDa	Kilodalton
KDM1	Lysine-specific histone demethylase 1
KMT	Lysine méthyl-transférase
KO	Knock out
Ku70	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit KU70
M	
MAPK	Mitogen activated protein kinase

Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia Sequence 1
MEF2	Myocyte enhancer factor-2
mDia	Mammalian Diaphanous-related formin
me1	Monométhylation
me2	Diméthylation
me3	Triméthylation
MM	Myélome multiple
MMP	Métalloprotéase
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MYC	V-myc myelocytomatosis varial oncogene homolog
MYCN	V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog
N	
NF-kB	Nuclear Factor-kappa B
NHE3	Echangeur sodium-hydrogène 3
NHERF-1	Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory factor 1
NK	Natural killer
NLGN3	Neuroigin 3
NMDAR	N-methyl-D-aspartate receptor
NOD-SCID	Non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency-interleukin 2 receptor gamma null mice
Npt2a	Sodium-dependent phosphate transporter 2A
NRP1	Neuropiline 1
N-WASP	Neural-Wiskott-Aldrich syndrome protein
O	
Olig2	Oligodendrocyte transcription factor 2
OMS	Organisation mondiale de la santé
P	
Pax3	Paired box protein Pax-3
PD-1	Programmed death-1
PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor alpha
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1
PDK1	Phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1
PDZ	PSD-95/DlgA/ZO-1-like
PDZ-B	Domaine de liaison au PDZ
PET	Tomographie par émission de positrons
PHLPP	PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform
PIK3R1	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PLC-β2	Phospholipase C Beta 2
PNN	Plynucléaire neutrophile
PPM1D	Protein Phosphatase Magnesium-Dependent 1 Delta
PRAS40	Proline-rich AKT1 substrate 1
PRC2	Polycomb repressive complex 2
PRL-3	Phosphatase regenerating liver-3
PRLR	Récepteur à la prolactine
PS	Panobinostat
PSD-95	Postsynaptic density protein 95
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTHr	Récepteur de l'hormone parathyroïdienne
R	
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RbAp48	Retinoblastoma-binding protein 4
RCAS/tv-a	Replication-competent avian sarcoma-leucosis virus long terminal repeat with splice acceptor/Tumor Virus A
RNCE	Registre National des Cancers de l'Enfant
RNHE	Registre Nationale des Hémopathies malignes

RNTSE	Registre National des Tumeurs Solides de l'Enfant
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
RSK1	p90 ribosomal S6 kinase
S	
SET	Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax
SH3	Src homology
Shank1	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1
ShARN	Petit ARN en épingle à cheveux
siRNA	Small interfering RNA
Skp2	S-phase kinase-E3 ligase
SLC9A3R1	Solute carrier family 9 isoform A3 regulatory factor 1
SMAD3	Mothers against decapentaplegic homolog 3
SNC	Système Nerveux Central
SNS	Système Serveux Sympathique
Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
Sos-1	Son of sevenless homolog 1
Sox2	Sex determining region Y-box 2
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SUV39H1	Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1
SUZ12	Polycomb protein SUZ12
T	
TBP-2	Thioredoxin binding protein-2
TCF/LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer factor
TCR	T cell receptor
Tiam1	Guanine nucleotide exchange factor
TOP3A	DNA topoisomerase 3-alpha
TP53	Tumor protein 53
Trx	Thioredoxin
TWIST	Twist Family BHLH Transcription Factor
U	
ULK1	Unc51 like autophagy activating kinase 1
UTX	Ubiquitously-Transcribed TPR Protein On The X Chromosome
V	
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
W	
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP-Family verprolin homologous proteins
WH2	Wiscott-Aldrich Syndrome Protein homology 2
WNT	Wingless Integration site
WT1	Wilms tumor protein
Y	
YAP	Yes-associated protein

Introduction

Chapitre I : Le gliome infiltrant du tronc cérébral, un cancer pédiatrique

I. Bases physiopathologiques de la tumorigenèse

Une tumeur maligne résulte de la prolifération anarchique de cellules au sein d'un tissu ou d'un organe. Les tumeurs sont capables de détruire le tissu sain et tous les tissus et organes du corps peuvent être atteints. Le développement tumoral est dû à une succession d'altérations génétiques qui confèrent de nouvelles propriétés permettant la conversion progressive des cellules normales vers des cellules cancéreuses. Ces mutations sont à l'origine de l'expression d'oncogènes, par gain de fonction, mais aussi de l'inactivation de l'expression de suppresseurs de tumeurs, par perte de fonction. La croissance cellulaire néoplasique se caractérise par plusieurs phénomènes clés, résumés dans la figure 1 adaptée de Hanahan et Weinberg (2011). La cellule cancéreuse devient insensible aux stimuli extérieurs et génère ses propres signaux de croissance. Elle prolifère de manière incontrôlée et ne répond plus aux signaux antiprolifératifs. De plus, elle échappe au système immunitaire et à la mort cellulaire programmée. Cela conduit à la dissémination de ces cellules dans le corps et à la production de métastases. Afin d'augmenter la croissance tumorale, la cellule dérégule le métabolisme cellulaire et active des processus angiogéniques. Quelques exemples de mécanismes impliquant ces phénomènes clés sont décrits dans les paragraphes suivants.

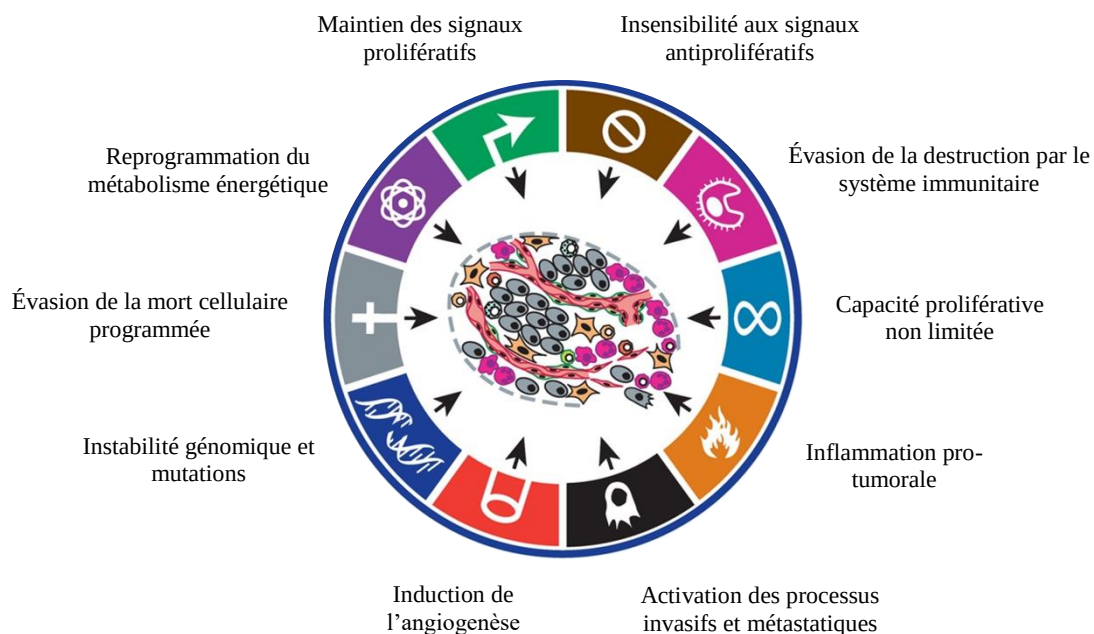


Figure 1 : Caractéristiques du cancer.

Adapté de Hanahan et Weinberg (2011)

- Maintien des signaux prolifératifs

La cellule saine ne peut se diviser qu'après stimulation de récepteurs transmembranaires par des facteurs de croissance, ce qui induit une cascade de signalisation interne. Les cellules cancéreuses sont capables de générer leurs propres signaux de croissance et de diminuer ainsi leur dépendance aux signaux extérieurs. Par exemple, elles peuvent produire des facteurs de croissance pour s'auto-activer ou activer les cellules avoisinantes (Cheng *et al.*, 2008). La surexpression ou l'altération de certains récepteurs est aussi une conséquence de la prolifération accrue des cellules cancéreuses. Enfin, indépendamment de l'activation des récepteurs, les voies de signalisation constitutivement actives peuvent également induire l'"autosuffisance" des cellules (Hanahan et Weinberg, 2011).

- Insensibilité aux signaux antiprolifératifs

Pour maintenir l'homéostasie tissulaire, des signaux antiprolifératifs perçus par certains récepteurs membranaires permettent le maintien des cellules en quiescence. Au contraire, les cellules tumorales peuvent induire la division ou l'inhibition de la différenciation cellulaire. En effet, elles peuvent moduler la régulation du cycle cellulaire par un mécanisme souvent associé à la dérégulation de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans les décisions de prolifération, de sénescence ou d'apoptose. Une des protéines les plus décrites comme mutée dans les cancers est facteur de transcription TP53 ("tumor protein 53"). Elle est mutée dans plus de 50 % des cancers et peut moduler la progression du cycle cellulaire grâce à des "détecteurs" sensibles (senseurs) à la dégradation de l'ADN. Des dommages irréparables ont pour conséquence l'activation de l'apoptose par la protéine TP53. En revanche, la mutation du gène dans les cellules cancéreuses implique la diminution de la régulation du cycle cellulaire et l'augmentation de la prolifération. Les cellules saines ont aussi la propriété d'inhibition de contact induite par l'interaction cellule-cellule, ce qui induit l'arrêt de la prolifération. Cette inhibition est régulée par différentes protéines suppresseurs de tumeurs (Merlin, LKB1). Les cellules cancéreuses perdent cette caractéristique et prolifèrent de façon incontrôlée (Hanahan et Weinberg, 2011).

- Capacité proliférative non limitée

En général les cellules saines ont la capacité de se renouveler plusieurs dizaines de fois avant de rentrer en sénescence ou de mourir. Une des clés de ce mécanisme est la présence de télomères aux extrémités des chromosomes. Durant la réplication, 50 à 100 paires de bases de l'ADN télomérique sont perdues. Or ces régions d'ADN très répétitives permettent de protéger l'extrémité du chromosome et leur altération ou leur perte conduit à la sénescence,

voire la mort de la cellule. Les chromosomes des cellules cancéreuses maintiennent leur extrémité télomérique à l'aide de la surexpression de la télomérase, une enzyme qui n'est pas exprimée dans les cellules saines. Elle ajoute des répétitions hexa-nucléotidiques à l'extrémité de l'ADN chromosomique. La cellule devient alors immortelle et peut croître à l'infini (Blasco, 2005).

- Évasion de la mort cellulaire programmée

La mort cellulaire programmée, ou apoptose, est régulée par des senseurs (récepteurs membranaires, détecteurs de dommage à l'ADN) et des effecteurs qui activent l'apoptose (famille Bcl-2, caspases et relargage de cytochromes c par la mitochondrie). Dans le cancer, les senseurs et les effecteurs sont altérés. La voie PI3K-Akt qui induit des signaux de survie est aussi souvent décrite comme activée dans les cancers. La surexpression de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L) ou au contraire la sous-expression des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bad, Bim, Bid) est également associée à l'échappement de la mort cellulaire (Adams et Cory, 2007).

- Induction de l'angiogenèse

Après la mise en place du système sanguin au cours de l'embryogenèse, l'angiogenèse est très faiblement active, hormis une activation physiologique pendant la grossesse, le cycle menstruel et la cicatrisation. En revanche, durant la progression tumorale, l'activation de l'angiogenèse est continue et permet ainsi l'expansion de la masse tumorale par apport sanguin de nutriments, d'oxygène et l'évacuation des produits toxiques au sein de la tumeur (Hanahan et Folkman, 1996). Les facteurs VEGF ("Vascular endothelial growth factor") et FGF ("fibroblast growth factor") permettent l'initiation de l'angiogenèse directement en activant leurs récepteurs. Ces deux facteurs sont donc surexprimés dans plusieurs types de cancers. De plus, l'expression d'inhibiteurs comme la thrombospondine-1 ou l'interféron- β peut aussi être altérée (Hanahan et Weinberg, 2011).

- Activation des processus invasifs et métastatiques

Ce mécanisme survient plus tardivement dans le développement de la tumeur, qui est alors capable d'envahir le tissu sain et d'aller coloniser d'autres régions. La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, "Epithelio-Mesenchymal Transition") est l'un des processus impliqués dans l'invasion et la dissémination des cellules cancéreuses. L'EMT est caractérisée par la perte de l'adhésion cellulaire, par exemple par l'altération de l'E-cadherine,

l'expression des protéases permettant la dégradation de la matrice, l'invasion et l'augmentation de la motilité cellulaire (Klymkowsky et Savagner, 2009).

- Reprogrammation du métabolisme énergétique

Les cellules normales se développant en aérobie utilisent le glucose qui est dégradé en pyruvate par la glycolyse dans le cytoplasme puis en en dioxyde de carbone dans la mitochondrie au cours du cycle de Krebs. Ce processus permet d'alimenter la chaîne respiratoire pour conduire à la production d'ATP. En revanche, en anaérobie, seule la glycolyse assure la production d'ATP. La cellule cancéreuse favorise la glycolyse en présence ou en absence d'oxygène (effet Warburg). Ce processus est beaucoup moins efficace en apport énergétique par rapport au processus mitochondrial. Pour assurer des taux de glycolyse élevés, la cellule cancéreuse augmente le transport de glucose par le transporteur GLUT1 ou par l'expression de facteurs de transcription hypoxiques (HIF-1 α et HIF-2 α). Cette préférence serait due à la diversité des intermédiaires glycolytiques générés par la glycolyse. Ces intermédiaires, pouvant être utilisés pour d'autres procédés tels que la fabrication des acides aminés ou des nucléosides, facilitent la biosynthèse d'une nouvelle cellule (Hsu et Sabatini, 2008).

- Évasion de la destruction par le système immunitaire et inflammation pro-tumorale

Le système immunitaire est capable de repérer une tumeur et de l'éradiquer. En effet, les souris immunodéficientes développent plus fréquemment et plus rapidement une tumeur que les souris immunocompétentes. Certaines cellules cancéreuses seraient capables de produire des facteurs immunosuppresseurs ou de recruter des cellules immunosuppressives telles que les cellules T régulatrices (Mougiakakos *et al.*, 2010). En revanche, le rôle du système immunitaire peut être à la fois destructeur de la tumeur mais aussi initiateur du développement et de la progression tumorale. En effet, la réponse inflammatoire peut conduire à l'expression de facteurs de survie, ou encore de signaux qui permettent l'EMT dans le microenvironnement tumoral, favorisant ainsi la tumorigenèse. De plus, la présence de certaines cellules immunitaires induit la suppression de l'activité des lymphocytes T cytotoxiques ou des cellules NK ("Natural Killer"), impliqués dans la destruction des cellules cancéreuses. La génération de dérivés réactifs à l'oxygène par l'inflammation peut aussi provoquer des altérations génétiques ce qui accélèrent ainsi le processus de cancérogenèse (Grivennikov *et al.*, 2010).

Ces caractéristiques des cellules cancéreuses ont pour origine des altérations génétiques. Toutefois, on sait que la modification de la chromatine sans altération génétique par régulation épigénétique peut aussi influencer la tumorigenèse (Jones et Baylin, 2007). Toutes ces caractéristiques peuvent être décrites dans différents types de cancers à différents stades. Au sein même de la tumeur, des populations de cellules avec des caractéristiques différentes cohabitent, on parle d'hétérogénéité intratumorale (Patel *et al.*, 2014). Ainsi, de nombreuses tumeurs contiennent une sous-population ayant des propriétés de cellules souches cancéreuses. Le microenvironnement tumoral joue également un rôle important dans la maintenance de la tumeur. La composition de la matrice extracellulaire et les populations cellulaires non transformées (cellules endothéliales, péricytes, fibroblastes, cellules immunes) sont contrôlées par les cellules tumorales pour répondre aux besoins de ces dernières. Ces composants du stroma sont importants dans l'angiogenèse, l'immunité ainsi que dans la dissémination tumorale. Il est donc important de prendre en considération les caractéristiques tumorales mais aussi le microenvironnement (Hanahan et Weinberg, 2000 ; Hanahan et Weinberg, 2011).

II. Épidémiologie des cancers pédiatriques

Les cancers pédiatriques sont rares et représentent 1 à 2 % de l'ensemble des cancers. La surveillance des cancers de l'enfant en France métropolitaine est assurée depuis 2000 par le Registre National des Cancers de l'Enfant (RNCE) qui comprend à la fois le Registre National des Tumeurs Solides de l'Enfant (RNTSE) et le Registre National des Hémopathies malignes de l'Enfant (RNHE). Depuis 2011, l'étude s'est étendue aux adolescents de moins de 18 ans et aux résidents des départements et régions d'outre-mer. Chaque année en France environ 2540 nouveaux cas sont détectés (1750 chez les moins de 15 ans et 800 chez les adolescents entre 15 et 19 ans). Cela représente 1 enfant sur 440 qui peut être atteint d'un cancer avant l'âge de 15 ans, mais 8 enfants sur 10 sont considérés guéris. Le type de cancer diffère selon la tranche d'âge. Chez les moins de 15 ans, les leucémies représentent 29 %, les tumeurs du Système Nerveux Central (SNC) 24 % et les lymphomes 11 % (figure 2). La moitié des cancers chez l'enfant survient avant l'âge de 5 ans. Chez les adolescents, la maladie de Hodgkin, un cancer du système lymphatique est la plus fréquente, avec 22 % de cas, suivie par la leucémie aiguë (12 %), les tumeurs osseuses (8 %) et les lymphomes non hodgkiniens (7 %). Au cours de la période 2000-2011, la survie globale a été estimée à 1 an à

92 % et à 5 ans à 82 % pour tous types de cancers et âges confondus chez les enfants. La survie à 5 ans pour les tumeurs du SNC représentait 72 à 73 % des cas sur cette même période. Pour l'ensemble des cancers, le RNCE note une augmentation significative de la survie à 5 ans, et ce taux est passé de 70 % en 2000 à 75 % en 2011 pour les tumeurs du SNC (Source RNCE et Institut National Du Cancer). Néanmoins, les cancers restent la deuxième cause de mortalité des enfants après les accidents domestiques.

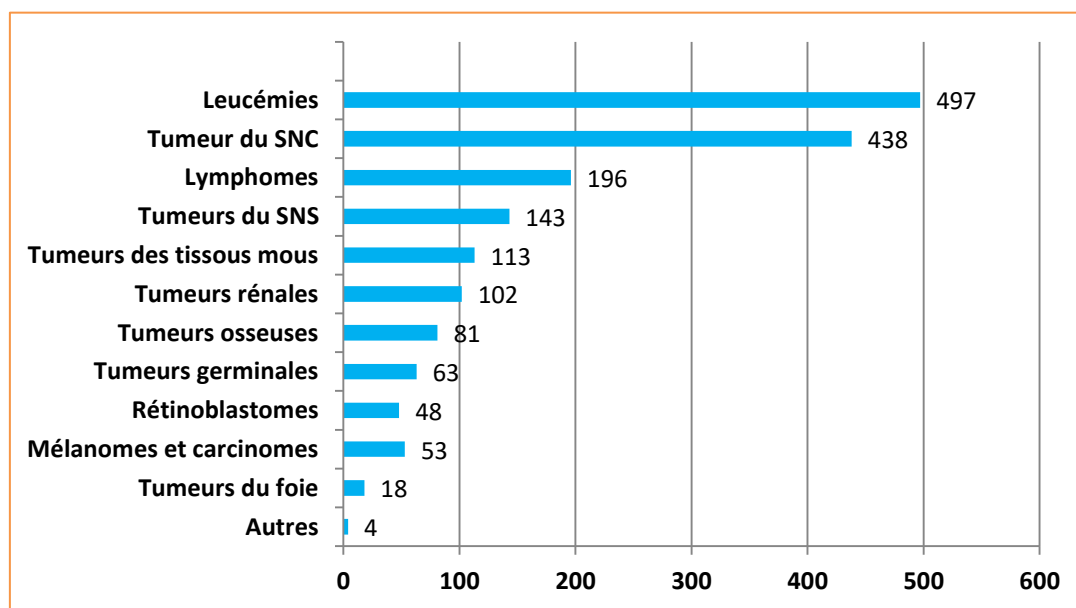


Figure 2 : Nombre moyen de cas annuels de cancers de l'enfant en France.

D'après le RNHE et RNTSE. Étude portant sur la période 2007-2011. Les cancers sont nommés selon la classification ICC (International Classification of Childhood Cancer). SNC: système nerveux central ; SNS : système nerveux sympathique.

III. Le gliome infiltrant du tronc cérébral

1. Prévalence

Les tumeurs pédiatriques du SNC sont les premières causes de mortalité par cancer chez les enfants. Les tumeurs du tronc cérébral représentent à elles seules 10 à 20 % des tumeurs cérébrales pédiatriques et 85 % des cas sont des gliomes infiltrants du tronc cérébral appelés DIPG pour “Diffuse Intrinsic Pontine Glioma”. Cette pathologie a actuellement été renommée “*Diffuse midline glioma H3K27M-mutant*” (Louis *et al.*, 2016). Malheureusement, cette tumeur est la première cause de mortalité chez les enfants atteints d'une tumeur au cerveau. En effet, les DIPG sont des gliomes très agressifs généralement localisés au niveau ventral du pont dans la région du tronc cérébral (figure 3). La tumeur peut envahir et diffuser

à travers les tissus sains environnants (Hoeman *et al.*, 2018). Les DIPG sont diagnostiqués vers l'âge de 6-7 ans et la survie moyenne est inférieure à 1 an après le diagnostic et comprise entre 8 et 12 mois. 90 % des enfants meurent de cette maladie deux ans après le diagnostic et 1 % survivent après 5 ans (Mathew et Rutka, 2018). Les cellules de DIPG peuvent disséminer dans d'autres régions du cerveau (supratentorielle, sous-tentorielle). Ces foyers invasifs sont détectés dans 3 % des patients au moment du diagnostic et environ 13 % quelques mois après. En revanche, la survie moyenne pour ces enfants reste inchangée (Veldhuijzen van Zanten *et al.*, 2017 ; Wagner *et al.*, 2006). Aucune différence entre les sexes n'a été démontrée ni de corrélation avec l'origine géographique des malades. On estime qu'il y a en France entre 40 et 50 nouveaux cas par an (Veldhuijzen van Zanten *et al.*, 2017).

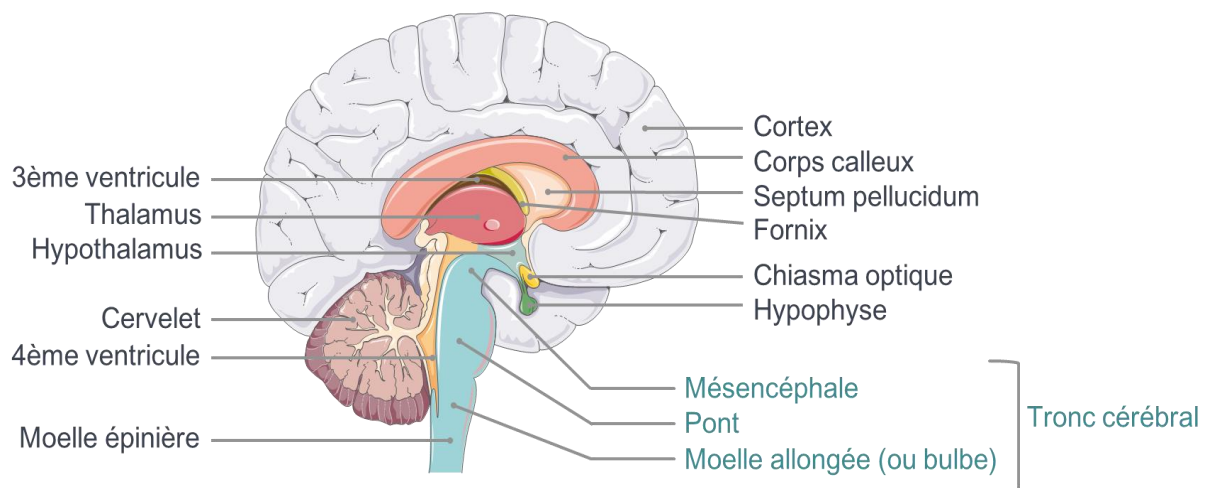


Figure 3 : Coupe sagittale médiane de l'encéphale montrant les structures du tronc cérébral.

Image adaptée de https://smart.servier.com/smart_image/brain-14/

2. Localisation anatomique des DIPG : le tronc cérébral

Les symptômes du DIPG sont en majorité liés à la localisation de la tumeur. Le DIPG est la plupart du temps retrouvé au niveau ventral du pont. Il est donc essentiel de connaître les fonctions vitales que régule le tronc cérébral.

Le tronc cérébral est localisé dans la fosse crânienne postérieure, sous le diencephale, en avant du cervelet et son prolongement caudal est la moelle épinière (figure 3). C'est une région centrale qui permet de faire la liaison entre les différents compartiments du cerveau (Ángeles Fernández-Gil *et al.*, 2010). Le tronc cérébral est une zone d'émergence de la

majorité des nerfs crâniens (10 paires de nerfs crâniens sur 12 au total). C'est donc un centre de passage des voies motrices et sensibles mais aussi de la douleur (figure 4). Il est constitué de 3 parties : le mésencéphale, le pont et la moelle allongée (ou bulbe rachidien) (figure 3). Le tronc cérébral est responsable de plusieurs fonctions vitales telles que la régulation de la respiration et du rythme cardiaque. La moelle allongée est impliquée dans la régulation cardiaque en modulant la fréquence et la force des contractions du cœur. Le pont ainsi que la

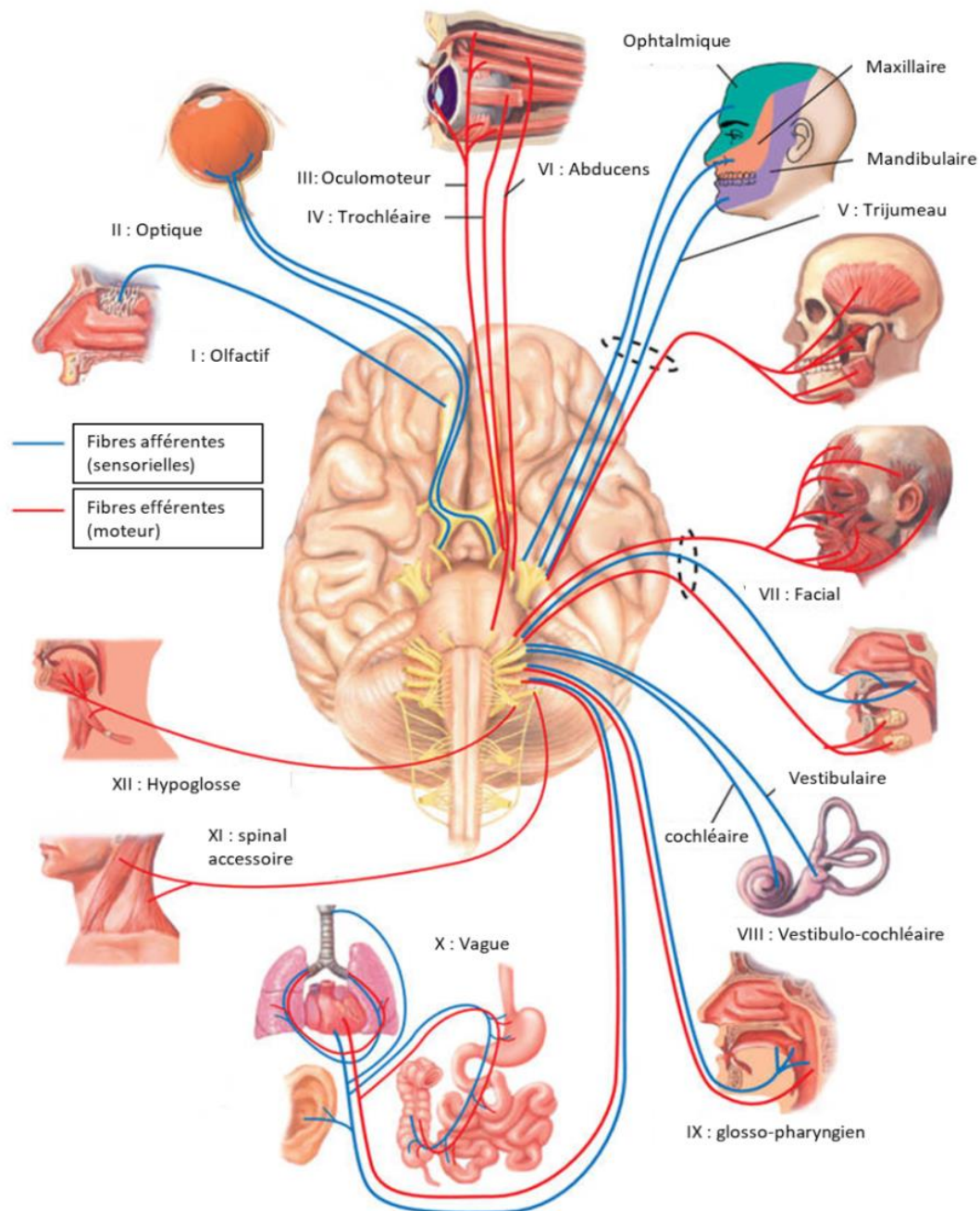


Figure 4 : Distribution des nerfs crâniens et fonctions.

Les paires I et II n'émergent pas du tronc cérébral contrairement aux 10 autres paires de nerfs crâniens. Adapté de <https://medicaldictionary.thefreedictionary.com/seventh+cranial+nerve>

moelle allongée jouent un rôle essentiel dans la respiration en modulant le rythme et l'amplitude respiratoires. Il existe d'autres rôles moteurs dans la sphère oro-faciale tels que la déglutition, la salivation, la mastication, le hoquet, le vomissement, la toux, l'éternuement mais aussi le mouvement des yeux (figure 4) (Hurley *et al.*, 2010).

Le rôle complexe du tronc cérébral est dû à sa localisation au niveau du SNC. Les DIPG sont des tumeurs diffuses, c'est pourquoi l'exérèse de la tumeur est quasi-impossible chez ces patients.

3. Symptômes et signes cliniques du DIPG

Les symptômes peuvent varier d'un individu à un autre selon la localisation et l'infiltration de la tumeur dans le tronc cérébral. Ils sont souvent de courte durée (< 1 mois) avant le diagnostic. Les caractéristiques cliniques les plus classiques sont de trois types : les déficits des nerfs crâniens, les signes cérébelleux et l'atteinte des voies longues (Cohen *et al.*, 2017). Plus précisément, les déficits des nerfs crâniens se caractérisent par une asymétrie faciale et une diplopie (vision double). Les signes cérébelleux sont l'ataxie (trouble de l'équilibre et de la marche), la dissymétrie (mauvaise coordination des mouvements) et la dysarthrie (trouble de la parole et de l'écriture). L'atteinte des voies longues conduit à des réflexes anormaux (Mathew et Rutka, 2018). Du fait de leur localisation, d'autres symptômes liés aux déficits des nerfs crâniens sont détectés tels que des problèmes oculaires, conduisant à des mouvements anormaux des yeux. Des problèmes de mastication ou de déglutition peuvent aussi apparaître. La surpression intracrânienne n'est retrouvée que dans 10 % des cas (Schroeder *et al.*, 2014). D'autres symptômes non spécifiques peuvent aussi survenir comme des maux de têtes et des vomissements, un changement de comportement, des troubles urinaires et des difficultés scolaires.

4. Diagnostic

La combinaison de signes cliniques apparaissant dans les 6 mois ainsi que la validation par IRM permettent de poser le diagnostic (Mathew et Rutka, 2018).

4.1. Imagerie par Résonnance Magnétique (IRM)

Le principe de l'IRM est basé sur la résonance des noyaux d'hydrogène en présence d'un champ électromagnétique. Le retour de ces noyaux à l'état d'équilibre engendre une variation du champ magnétique qui induit la formation d'un courant électrique retransmis sur ordinateur en une image. L'IRM permet de contraster les différents tissus mous et l'intensité du signal diffère souvent entre le tissu normal et le tissu pathologique.

Les caractéristiques de l'IRM classique des tumeurs DIPG se traduisent par une masse localisée dans le pont qui est hyperintense (blanc) dans une image pondérée en T2 et hypointense (noir) dans une image pondérée en T1 (figure 5). Le DIPG provoque un élargissement du pont de manière diffuse de plus de 50 %. Il a un aspect si caractéristique en IRM que des biopsies ne sont pas réalisées lors du diagnostic (Clymer et Kieran, 2018 ; Recinos *et al.*, 2007).

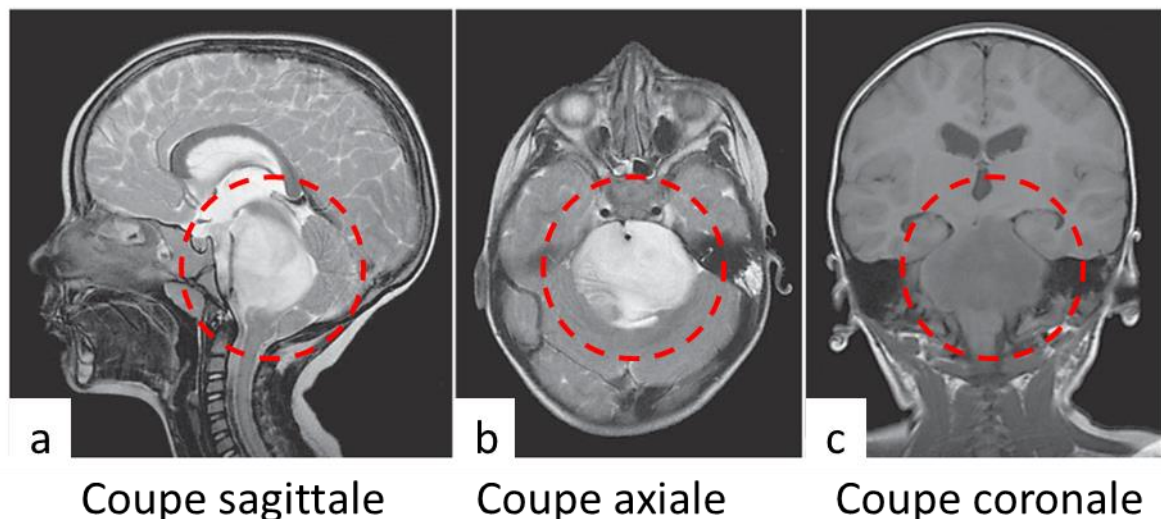


Figure 5 : Caractéristiques IRM des tumeurs DIPG.

a) Image d'une coupe sagittale de la séquence pondérée en T2 montrant un signal hyperintense (blanc) dans le pont associé à une expansion de la tumeur vers les tissus avoisinants. b) Image d'une coupe axiale de la séquence pondérée en T2 montrant une tumeur infiltrante au niveau du pont. c) Image d'une coupe coronale pondérée en T1 confirmant l'infiltration hypointense (noir) dans le tronc cérébral avec une tumeur mal délimitée. Adaptée de Recinos *et al.* (2007).

4.2. Biopsie

L'imagerie si caractéristique des DIPG ainsi que la survenue rapide des symptômes cliniques a écarté la biopsie du diagnostic pendant une trentaine d'années. Il existait donc un

déficit de matériel biologique et un réel manque de connaissances sur la biologie de la tumeur. Des recherches ont été réalisées sur des échantillons post-mortem, mais leur nombre trop limité et les traitements subis ne reflètent pas les caractéristiques biologiques de la tumeur de base. En effet, la pression de sélection engendrée par l'irradiation ou la chimiothérapie a mis en évidence des caractéristiques moléculaires différentes avant et après traitement (Clymer et Kieran, 2018). Aujourd'hui, de plus en plus de biopsies sont réalisées avant traitement afin de comprendre les caractéristiques moléculaires de la tumeur. Plusieurs centres hospitaliers (Cage *et al.*, 2013 ; Gupta *et al.*, 2018 ; Hamisch *et al.*, 2017 ; Puget *et al.*, 2015) ont démontré la faisabilité de la procédure grâce à l'utilisation de la stéréotaxie en chirurgie avant tout traitement thérapeutique (Clymer et Kieran, 2018). Après avoir réalisé plus de 130 biopsies du tronc cérébral, des chirurgiens ont démontré qu'il n'y avait aucun décès dû à la biopsie et une morbidité transitoire chez moins de 4 % des patients (Puget *et al.*, 2015). Depuis 2012, les experts en neurooncologie pédiatrique et en neurochirurgie recommandent donc de pratiquer des biopsies pour l'analyse génomique, cela avant l'irradiation de la tumeur afin d'éviter l'émergence de mutations post-rayons qui pourraient fausser les conclusions ou les résultats des études (Walker *et al.*, 2013).

Grâce à la faisabilité des biopsies, le génome de ces tumeurs a pu être séquencé et on a ainsi mis en évidence des différences génétiques entre le glioblastome adulte et les gliomes pédiatriques de haut-grade. Ces différences seront répertoriées dans la suite du chapitre.

4.3. Classification

Depuis 2016, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a classé les tumeurs du SNC selon l'histologie, le grade de malignité mais aussi selon les paramètres moléculaires spécifiques à chaque tumeur. Le gliome infiltrant du tronc cérébral est maintenant classé dans les tumeurs astrocytaires et oligodendrogiales diffuses sous le nom de "diffuse midline glioma, H3K27M-mutant" ou autrement dit gliome médian diffus muté pour l'histone H3K27M (Louis *et al.*, 2016).

4.3.a. Histopathologie

Dans la nouvelle classification, les gliomes diffus sont inclus dans un seul groupe "diffuse astrocytic and oligodendroglial tumors", dans les grades OMS II (bas grade), III (tumeur anaplasique) et IV (haut-grade) (Louis *et al.*, 2016). Les grades sont basés sur des critères histologiques comme la densité, l'atypie et le pléomorphisme cellulaire ainsi que

l'activité mitotique, la prolifération vasculaire et la nécrose (figure 6) (Huttner, 2017). Les DIPG sont des tumeurs hétérogènes qui n'ont pas de morphologie type en histologie. C'est pourquoi on retrouve en majorité des biopsies DIPG de classification histologique de grade III et 10 % qui sont de grade II. Cependant, après autopsie, on peut retrouver une classification histologique de grade IV. Il est important de noter que le caractère de bas grade ou de haut-grade n'est pas représentatif de la survie des patients. Toutefois, les DIPG ne se caractérisent plus seulement selon leur classification histologique mais également par la mutation de l'histone H3 au niveau de la lysine 27 remplacée par une méthionine (H3K27M). C'est une des caractéristiques moléculaires prise en compte depuis 2016 dans la classification. Elle représente 80 % des cas de DIPG et elle est toujours associée à un mauvais pronostic. Il est donc important de réaliser des biopsies afin de classer la pathologie selon les critères moléculaires, histologiques et pas uniquement sur la morphologie (Buczkowicz et Hawkins, 2015).

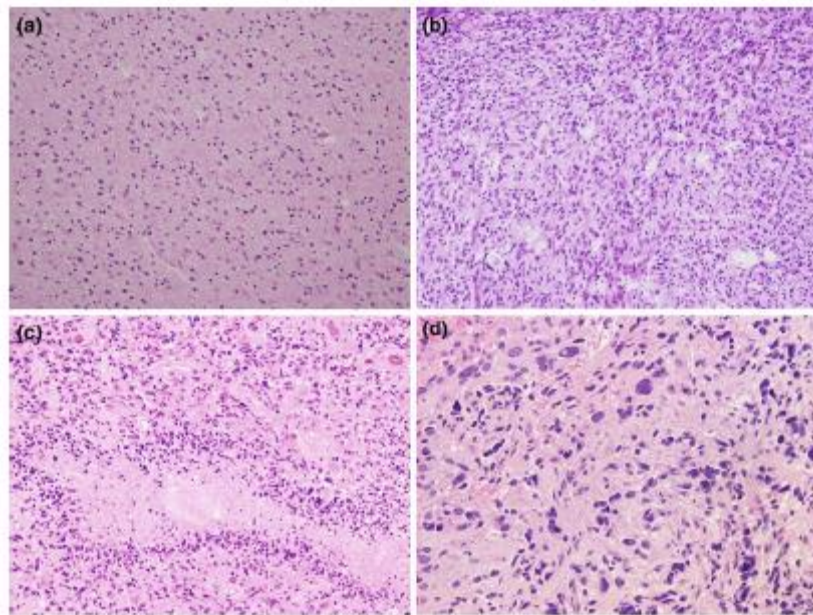


Figure 6 : Apparence morphologique des gliomes (coloration à l'hémaléoxylène et l'éosine)

a) Astrocytome diffus de grade II caractérisé par peu de cellules et un léger polymorphisme nucléaire. b) Astrocytome anaplasique de grade III avec une forte densité cellulaire et la présence de noyaux anaplasiques. c) Glioblastome de grade IV avec des cellules tumorales pléomorphes, mitotiques et un aspect pseudo-palissadique des cellules autour d'un foyer de nécrose. d) Gliome diffus médian ou DIPG avec un haut degré de pléomorphisme (Huttner, 2017).

4.3.b. Classification moléculaire

Une première étude génomique des tumeurs DIPG a permis de classer ces tumeurs selon trois groupes : prolifératif, pro-neural et mésenchymateux qui sont caractéristiques des gliomes pédiatriques de haut-grade et des gliomes adultes (Paugh *et al.*, 2011). En 2012, une nouvelle étude des altérations génétiques a classé les DIPG selon deux groupes. Le premier est défini par un phénotype pro-neural et une différenciation oligodendrogliale associée à l'amplification du gène *PDGFRA*. Ces tumeurs sont plus agressives en comparaison du deuxième groupe qui présente un phénotype mésenchymateux et pro-angiogénique (Puget *et al.*, 2012). Une classification plus précise a permis de définir trois groupes potentiels selon l'analyse du génome, l'histopathologie et les données cliniques. Le premier groupe, *MYCN*, est caractérisé par un grade IV et un ADN hyperméthylé avec un réarrangement de gène important au niveau du chromosome 2p conduisant à une amplification des gènes *MYCN* et *ID2*. Ce groupe ne contient aucune tumeur DIPG mutée pour l'histone H3. Le second groupe, appelé “*Silent*” pour silencieux, est caractérisé par un taux de mutations moins important par rapport aux deux autres groupes et présente un phénotype histologique de bas grade. Ce groupe est plus fréquemment retrouvé chez les jeunes enfants (Buczkowicz *et al.*, 2014). Le dernier groupe, appelé *H3K27M*, est le plus important (44 %) et il est caractérisé par la

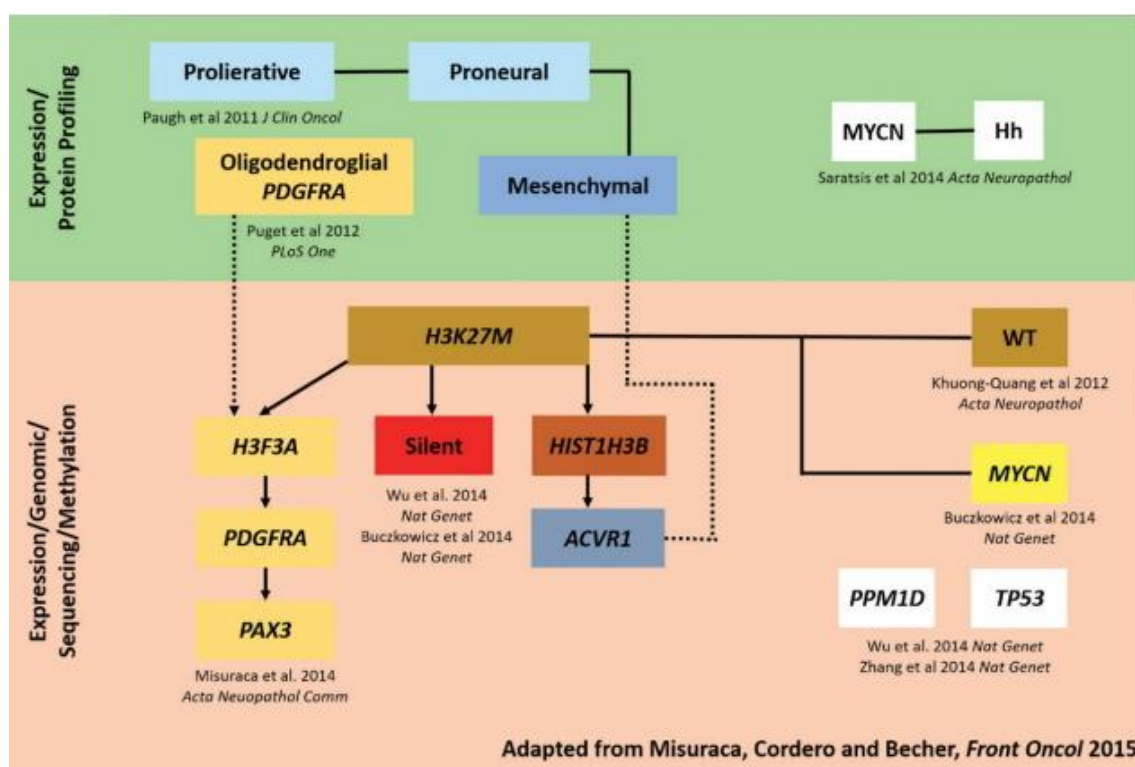


Figure 7 : Classification moléculaire des DIPG.
(Mathew et Rutka, 2018)

mutation de l'histone H3 mais aussi par un génome hypométhylé et des mutations dans de nombreux autres gènes (*ACVR1*, *TP53*, *PAX3*, *PGFRA*, *EGFR*, *ATRX*, *PPM1D*, *PI3KCA*, *PTEN*...) (figure 7) (Buczkowicz et Hawkins, 2015 ; Misuraca *et al.*, 2015).

5. Causes : le développement du tronc cérébral et microenvironnement

Le développement de la tumeur DIPG est restreint à la région du pont et survient durant la première décennie de la vie. Cela suggère la dérégulation d'un processus de développement neural postnatal. Des chercheurs ont examiné la distribution des précurseurs neuraux dans le tronc cérébral humain sain afin de définir une population de cellules qui pourrait être impliquée dans le développement de la tumeur (Monje *et al.*, 2011). Les cellules souches neurales se caractérisent par la présence des marqueurs Nestine et Vimentine. Sur des coupes de tissus du tronc cérébral à différents âges, cette population de cellules est présente au niveau du pont (Monje *et al.*, 2011). La moitié de ces cellules expriment aussi le facteur de transcription Olig2 qui est associé aux précurseurs des cellules oligodendrogiales. La distribution des cellules Nestine⁺, Vimentine⁺ et Olig2⁺ au niveau du tronc cérébral change au cours des années. Elles sont d'abord présentes au niveau ventral du pont avant de décroître vers l'âge de 2 ans et d'augmenter à nouveau aux alentours de l'âge de 6 ans, âge moyen des tumeurs DIPG. Cela conduit à l'hypothèse selon laquelle ces cellules pourraient être à l'origine du développement de la tumeur. Cette même équipe propose l'implication de la voie de signalisation Hedgehog dans la cancérogenèse. En effet, l'expression d'Olig2 est régulée par l'activité de la protéine Sonic Hedgehog. Néanmoins, l'expression de la voie Hedgehog n'est pas suffisante pour induire le phénotype DIPG. D'autres altérations génétiques doivent jouer un rôle dans le développement de la tumeur (Monje *et al.*, 2011 ; Warren *et al.*, 2012).

Une autre étude montre l'implication potentielle des précurseurs des oligodendrocytes (Olig2⁺/Sox2⁺/APC⁻) dans la gliomagenèse. Ces cellules ont été identifiées comme une population très proliférative dans le pont après la naissance, cela en lien avec la myélinisation des fibres nerveuses. En effet, les oligodendrocytes ont pour fonction la formation de la gaine de myéline sur ces fibres. Du fait d'un renouvellement important, elles pourraient être à l'origine de mutations multiples initiant la pathogénicité (Hoeman *et al.*, 2018 ; Lindquist *et al.*, 2016). Une étude de séquençage d'ARN sur cellules uniques réalisée en 2018 sur 6 tumeurs H3K27M montre la présence d'une majorité de précurseurs d'oligodendrocytes et

une minorité de cellules différenciées. Ces précurseurs présentent un potentiel de prolifération et de propagation plus importants que les cellules différenciées (Filbin *et al.*, 2018).

L'utilisation de progéniteurs Nestine⁺ exprimant la mutation H3K27M dans des souris *TP53*^{-/-} n'induit pas de phénotype de haut-grade dans le cerveau postnatal de ces souris. Cela suggère que la mutation est induite durant l'embryogenèse (Lewis *et al.*, 2013). Les cellules souches neurales sont situées dans la zone ventriculaire du tube neural. Ces cellules, multipotentes et capables de s'auto-renouveler, peuvent se différencier en neurones et en cellules de support, appelées également cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes). La neurogenèse ne se déroule pas uniquement pendant le développement embryonnaire mais durant toute la vie. De la naissance jusqu'au milieu de l'enfance, le volume du pont augmente et cela serait dû à la prolifération des précurseurs des oligodendrocytes, Olig2⁺, ainsi qu'à l'augmentation de la myélinisation des gaines de fibres nerveuses (Johung et Monje, 2017a ; Tate *et al.*, 2015). Les neurones, par leur activité électrique, seraient potentiellement impliqués dans la prolifération de ces précurseurs (Johung et Monje, 2017a). Le microenvironnement tumoral est très important et les neurones actifs pourraient jouer un rôle dans la tumorigenèse. Ils expriment la protéine synaptique neuroligin 3 (NLGN3) qui a un effet mitogène dans les cellules de gliome en activant la voie PI3K/mTOR (Venkatesh *et al.*, 2015). En effet, une étude de Venkatesh *et al.* a montré que l'inhibition de NLGN3 par KO ou par ajout d'un inhibiteur chez la souris permettait d'inhiber ou du moins de réduire la croissance cellulaire des tumeurs DIPG (Venkatesh *et al.*, 2017).

Enfin, l'utilisation de souris génétiquement modifiées montre un rôle potentiel des cellules progénitrices exprimant le facteur de transcription Pax3 (fortement exprimé dans les tumeurs DIPG et spécifiquement dans le pont) et/ou Nestine⁺ (Hoeman *et al.*, 2018 ; Misuraca *et al.*, 2016).

En conclusion, l'hypothèse principale est que la gliomagenèse des DIPG serait liée aux précurseurs neuronaux impliqués dans le développement du tronc cérébral. Plus précisément, les précurseurs des oligodendrocytes semblent être à l'origine de la progression tumorale (Nagaraja *et al.*, 2017). De plus, le microenvironnement tumoral est une clé importante dans le développement des gliomes. Il est donc nécessaire d'approfondir les connaissances sur le développement du tronc cérébral ainsi que sur l'origine des cellules tumorales.

6. Altérations génétiques associées aux DIPG

L'une des grandes avancées dans la recherche sur les tumeurs DIPG est l'étude de leurs altérations génétiques grâce à la réalisation de biopsies (Puget *et al.*, 2015). Cela a permis de mettre en évidence la différence génétique qu'il existe entre les gliomes adultes et les DIPG. L'étude de ces altérations est très importante afin d'orienter les traitements vers une thérapie beaucoup plus ciblée. L'une des altérations génétiques les plus caractéristiques des cellules DIPG est la mutation de l'histone 3.

6.1. L'histone 3

L'histone 3 (H3) est l'une des 4 protéines qui forment le nucléosome. Un nucléosome est représenté par 147 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un complexe d'histones contenant 2 copies H2A, H2B, H3 et H4 qui forment ainsi un octamère d'histones (figure 8). Les modifications post-traductionnelles des histones régulent l'expression des gènes grâce à la formation de l'hétérochromatine (chromatine condensée) ou l'euchromatine (chromatine ouverte). En effet, les queues d'histone en N-terminal ne sont pas structurées et sont donc

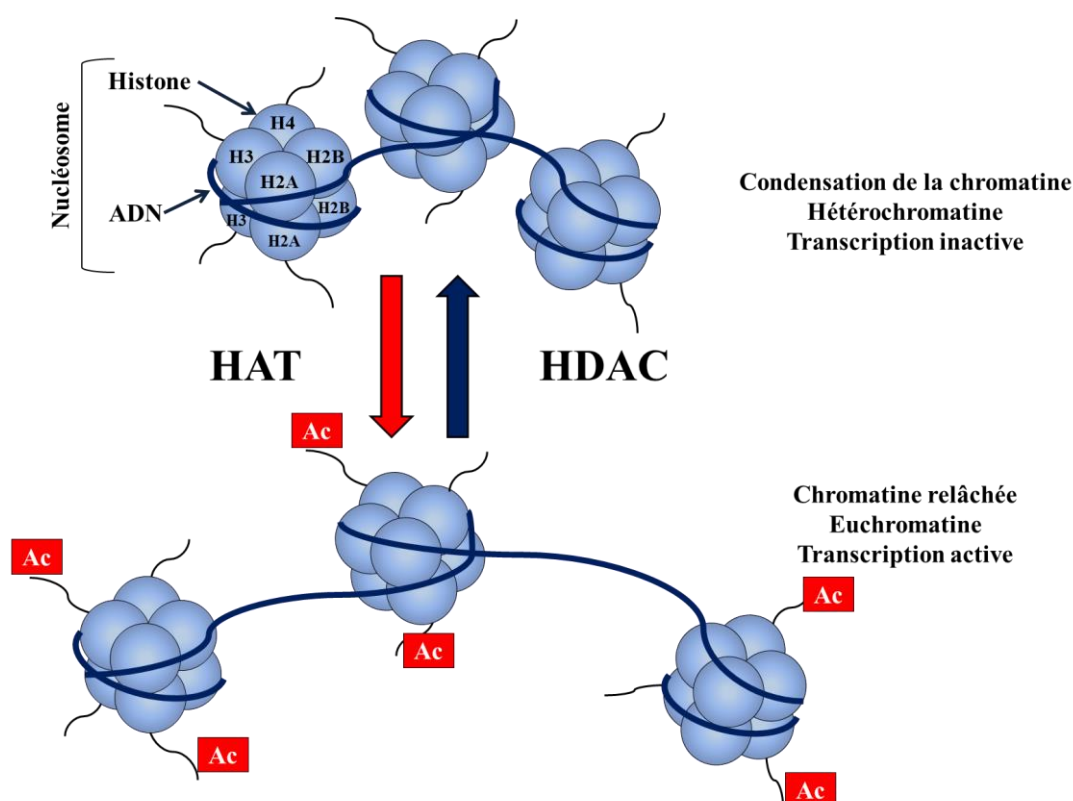


Figure 8 : Structure d'un nucléosome et acétylation des histones.

Un nucléosome représente un octamère de molécules d'histones entouré par environ 150 pb d'ADN. L'acétylation des queues d'histones est réalisée par l'enzyme HAT et permet l'ouverture de la chromatine et la transcription des gènes. Les HDAC inhibent la transcription en enlevant les groupes acétyles permettant ainsi la condensation de la chromatine.

flexibles. Du fait de leur exposition à l'extérieur du nucléosome, ces séquences peuvent subir des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, la sumoylation, l'ubiquitination et l'ADP-ribosylation. Les mécanismes de méthylation et d'acétylation des histones seront décrits plus précisément dans le chapitre II.

Chez l'Homme, le gène *H3* est présent dans le génome en de multiples copies organisées en clusters pour H3.1 (*HIST1HA-J*) et H3.2 (*HIST2H3A, C* ou *D*) ou simplement codées par deux gènes distincts pour le variant H3.3 (*H3F3A* et *H3F3B*). Il existe aussi 4 autres variants, CENP-A, H3t, H3.X et H3.Y mais leur séquence en acides aminés est moins conservée que celles des trois premiers (Nichol *et al.*, 2016). Les histones H3.1 et H3.2 sont dites canoniques car leur expression est couplée à la réplication. Elles sont synthétisées et déposées sur l'ADN durant la phase S du cycle cellulaire. En revanche, la synthèse du variant H3.3 ne dépend pas de la réplication et l'ADN s'y fixe durant tout le cycle cellulaire (Lulla *et al.*, 2016). L'ouverture ou la fermeture de la chromatine est régulée par des modifications épigénétiques de l'ADN ou des histones grâce à la méthylation, l'acétylation ou encore la phosphorylation. La méthylation peut avoir des résultats fonctionnels distincts en fonction du recrutement de protéines de liaison qui présentent une spécificité d'état de méthylation. Une particularité de H3 est qu'elle peut être mono, bi ou triméthylée au niveau de la lysine 27 (H3K27me3) par un complexe nommé "polycomb repressive complex 2" (PRC2) et plus précisément par une enzyme, la méthyl-transférase "enhancer of zeste homolog 2" (EZH2)

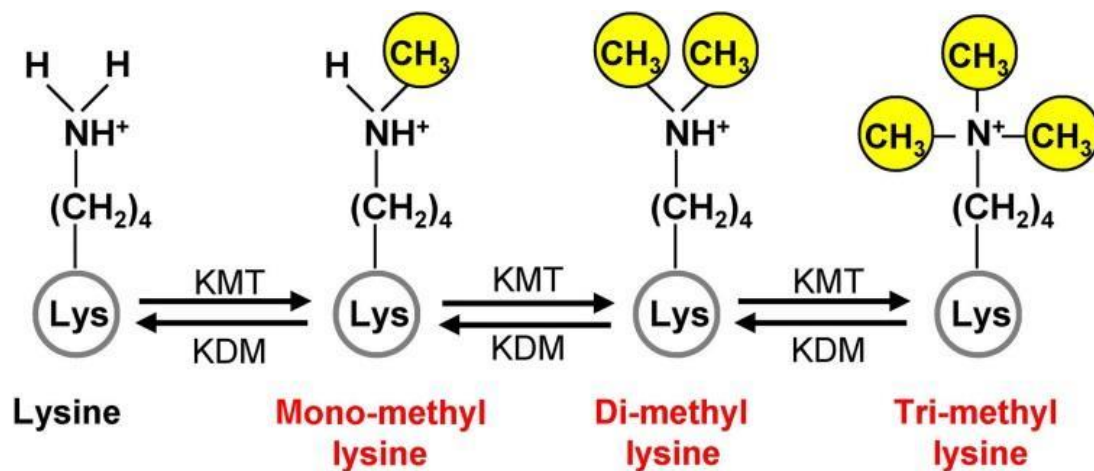


Figure 9 : Méthylation post-traductionnelle des lysines.

Mono, di et triméthylation de la lysine par addition de CH_3 sur le groupement amine en epsilon de la chaîne latérale. La méthylation des lysines est régulée par l'action des lysines méthyl transférases (KMT ou HMT) et des lysines déméthylases (KDM ou HDM) (Wu *et al.*, 2017b).

(figure 9). La triméthylation de H3K27 est associée à une répression de l'expression des gènes (Lulla *et al.*, 2016). La lysine 27 de H3 peut aussi être acétylée (H3K27ac) par des histones acétyl-transférases (HAT) ce qui permet l'expression de gènes en remodelant la chromatine. L'acétylation enlève la charge positive de la lysine ce qui diminue localement l'interaction entre une histone acétylée et l'ADN qui lui est chargé négativement (figure 8) (Maury et Hashizume, 2016).

6.1.a. Mutation H3K27M

La mutation H3K27M est identifiée dans 80 % des DIPG (Hoeman *et al.*, 2018). Cette mutation a été découverte en 2012 par les techniques de séquençage du génome entier (Wu *et al.*, 2012). Des altérations génétiques ont été retrouvées sur le gène *H3F3A* qui code pour l'histone H3.3 (environ 65 % des DIPG), sur le gène *HIST1H3B* qui code pour l'histone H3.1 et sur le gène *HIST2H3C* qui code pour l'histone H3.2 mais cette dernière est très peu répandue (Hennika *et al.*, 2017). Les histones H3.1 et H3.2 mutées sont retrouvées uniquement dans le pont (Mackay *et al.*, 2017). Les patients qui possèdent la mutation sur le gène *H3F3A* répondent significativement moins bien à la radiothérapie et ont plus de risque de rechute par rapport aux patients pour lesquels le gène *HIST1H3* est muté (tableau 1). La mutation de l'histone H3.3, qui conduit à un phénotype plus agressif, est beaucoup plus répandue chez les patients diagnostiqués vers l'âge de 11 ans. Elle est associée à un phénotype pro- neural/oligodendrogial et à la présence de l'amplification du gène *PDGFRA* et de la mutation de *TP53* (Castel *et al.*, 2015). La mutation de l'histone H3.1 est répandue plutôt chez les jeunes enfants et souvent liée à une mutation du gène *ACVR1* ("Activin A receptor, type I") (Lulla *et al.*, 2016 ; Castel *et al.*, 2015). La forme sauvage de chaque variant est néanmoins présente dans les DIPG et associée à la mutation H3K27M. En effet, les mutations sont hétérozygotes et les histones H3.3 et H3.1 sont codées par de multiples gènes. La mutation H3K27M ne concerne donc que moins de 20 % des protéines H3 dans les cellules DIPG (Lewis *et al.*, 2013). Mais, cette mutation a plusieurs conséquences décrites dans le paragraphe suivant Ces mutations ont aussi été retrouvées dans environ 50 % des glioblastomes du thalamus pour la mutation H3.3 (Taylor *et al.*, 2014b) et aussi, à faible fréquence, dans la leucémie myéloïde aigue pour la mutation H3.1 (Lehnertz *et al.*, 2017).

Tableau 1 : Principales caractéristiques des mutations associées aux DIPG.
(Cohen *et al.*, 2017)

	H3.3 K27M mutant	H3.1 K27M mutant	H3 K27 wild-type
Median age	7.5 years	5.5 years	6 years
Response to RT	poor	good	poor
Overall survival	9 months	15 months	10 months
Leptomeningeal metastases	Frequent (50%)	rare	unknown
Mutations	<i>TP53</i> , <i>PPM1D</i> <i>mTOR</i> pathway	<i>ACVR1</i> <i>mTOR</i> pathway	<i>ACVR1</i>
Copy number alterations	<i>PDGFRA</i> amplification	chr. 2 gain	<i>Nmyc</i> and <i>ID2</i> gains
Preferred Histology	Oligodendroglial	Astrocytic	unknown
Gene signatures	Proneural Proliferative	Mesenchymal Hypoxia	Unknown
Frequency	60%	30%	10%

6.1.b. Conséquences de la mutation H3K27M

Dans 95 % des cas, la mutation H3K27M implique des changements épigénétiques. En général, elle induit une diminution globale de la méthylation H3K27 et une augmentation de l'acétylation des histones H3.

Effet de la méthylation :

Tout d'abord, la diminution de la méthylation entraîne l'ouverture de la chromatine et ainsi l'expression de gènes potentiellement impliqués dans la carcinogenèse. La mutation *H3F3A* hétérozygote va induire une réduction globale de la triméthylation sur la population entière des variants de H3K27 incluant l'histone H3 sauvage (Johung et Monje, 2017b). Il a d'abord été suggéré que la mutation H3K27M avait une forte affinité pour la protéine enzymatique méthyl-transférase EZH2 (Bender *et al.*, 2013 ; Lewis *et al.*, 2013). Cette affinité engendrerait la séquestration d'EZH2 au niveau de la mutation et entraînerait donc une hypométhylation des autres histones H3K27. Piunti *et al.* ont récemment démontré que le complexe PRC2 et ses sous-unités EZH2 et SUZ12 ainsi que le produit enzymatique H3K27me3 n'étaient pas localisés au niveau de la chromatine comportant les histones mutées

H3K27M (figure 10) (Piunti *et al.*, 2017). Ils ont donc suggéré que la mutation n’était pas impliquée dans la séquestration ou le recrutement du complexe PRC2. En revanche, ce complexe est tout à fait capable de trimétyler d’autres loci exempts de toute histone mutée pour H3K27M (Piunti *et al.*, 2017). Ainsi, la mutation H3K27M est importante dans la gliomagenèse mais le maintien résiduel de la triméthylation des autres loci par PRC2 est tout aussi important pour la prolifération cellulaire des tumeurs. En effet, la diminution de l’expression des sous-unités de PRC2 (SUZ12 et EED) induit une réduction de la croissance cellulaire des DIPG par rapport aux cellules contrôles (Piunti *et al.*, 2017). L’analyse par “Gene Ontology” suggère que l’activation des gènes réprimés par la méthylation de PRC2 sont impliqués dans la différenciation cellulaire et donc permettraient l’inhibition de la prolifération (Piunti *et al.*, 2017). Néanmoins, les cibles du complexe PRC2 sont exprimées fortement dans les précurseurs d’oligodendrocytes présents au sein de la tumeur DIPG, et elles sont peu exprimées dans les cellules de gliomes différenciés. La différenciation cellulaire dépend potentiellement de l’activité répressive de PRC2 et elle est bloquée par l’inactivation de PRC2 induite par la mutation H3K27M (Filbin *et al.*, 2018).

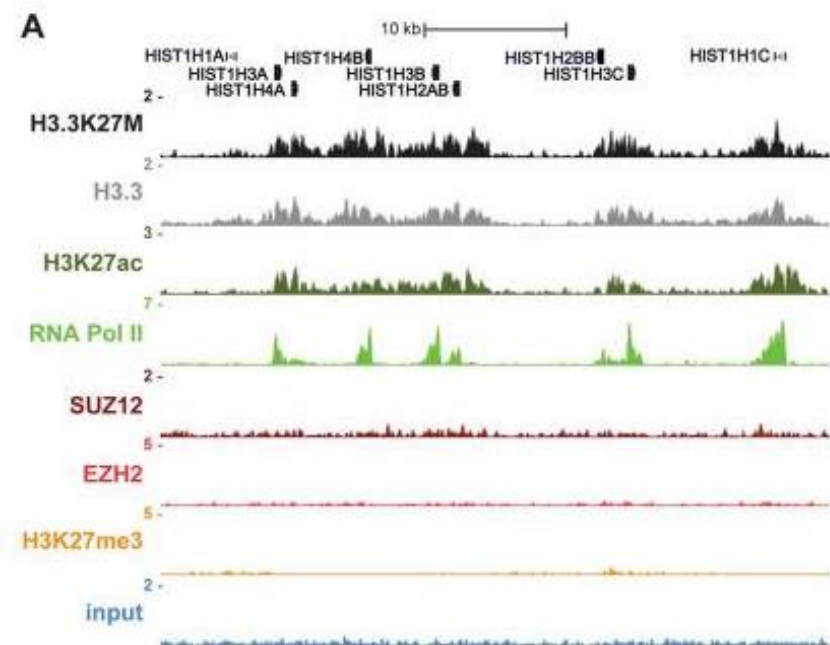


Figure 10 : Corrélation de la mutation H3K27M avec l’acétylation de H3K27 et l’exclusion des effecteurs du complexe PRC2.

Régions génomiques enrichies après immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) pour les histones, les modifications post-traductionnelles des histones et les protéines du complexe PRC2 dans une lignée DIPG SF8628. “input” est un contrôle (Piunti *et al.*, 2017). Chaque pic représente la présence de la protéine associée à la chromatine. Co-localisation de H3K27Ac, de l’ARN polymérase II et de l’histone H3.3.

Effet de l'acétylation :

L'expression des histones mutées H3K27M augmente le niveau global d'acétylation de H3. L'hyperacétylation est souvent associée à la présence de la mutation H3K27M et à une région où la transcription est active (figure 10). Elle est souvent exclue des régions occupées par le complexe PRC2 et H3K27me3 (Piunti *et al.*, 2017). Les mécanismes qui impliquent l'hyperacétylation ou l'hyperméthylation de certains loci ne sont pas encore expliqués (Creasy, 2017 ; Mathew et Rutka, 2018). Cependant, une des hypothèses proposées par Brown *et al.*, est la "détoxification" que peuvent engendrer les modifications post-traductionnelles des histones (Brown *et al.*, 2014). Par exemple, la polyacétylation des lysines 9, 14, 18 et 23 de l'histone H3K27M permet de diminuer significativement l'inhibition de l'activité de PRC2. Cela pourrait expliquer l'intérêt de l'hyperacétylation des H3 qui permettrait ainsi la méthylation résiduelle de certains loci (Brown *et al.*, 2014).

6.2. Autres altérations génétiques caractéristiques des DIPG

D'autres mutations ont été identifiées dans le gliome et les altérations les plus importantes sont présentées dans le tableau 2. Comme il a été vu, la mutation du gène *ACVR1* représente 20 % des cas et est associée à la mutation de l'histone H3.1 dans 80 % des cas (Mathew et Rutka, 2018 ; Taylor *et al.*, 2014a).

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des mutations les plus importantes dans les DIPG.
D'après Lapin *et al.* (2017).

Gènes mutés	Incidence (%)	Conséquences	Résultats cliniques
H3.3 (<i>H3F3A</i>)	60-71	Hypométhylation de l'histone	Survie médiane = 9 mois + métastases
H3.1 (<i>HIST1H3B</i>)	12-18	Inhibition de PRC2	Survie médiane = 15 mois Meilleure réponse à la radiothérapie vs H3.3.
ACVR1	20-32	Activation de voies de signalisation BMP	Mutation associée à H3.1 Meilleure survie
TP53	22-40	Permet l'évasion de la mort cellulaire des cellules tumorales	Mutation associée à H3.3
PDGFRA	32	Activation des voies de signalisation PI3K et MAPK	Mutation associée à H3.3
PIK3R1/PIK3CA	15	Promeut l'angiogenèse et la formation de cellules souches	Mutation associée à H3.3 dans population clonale particulière

ACVR1 est muté dans une malformation congénitale appelée fibrodysplasie ossifiante progressive ce qui induit l'ossification progressive des muscles squelettiques. Plus précisément, la mutation du récepteur de type I de l'activine A induit une activation constitutive du récepteur. Par conséquent, la transcription des gènes cibles entraîne la différenciation des cellules musculaires en cellules osseuses. Ce récepteur a pour ligand la protéine osseuse morphogénétique ou BMP ("bone morphogenetic protein"). BMP joue un rôle important dans le développement du cerveau et est connu pour conduire la différenciation astrocytaire à l'aide des facteurs de transcription SMAD (Johung et Monje, 2017b ; Taylor *et al.*, 2014b). En revanche, peu d'études décrivent le rôle de cette mutation dans les tumeurs DIPG. L'implantation d'astrocytes mutés pour *ACVR1* dans des souris KO pour *TP53*, ne conduit pas au développement d'une tumeur, ce qui suggère que cette mutation n'est pas suffisante pour induire la gliomagenèse (Taylor *et al.*, 2014b).

La mutation perte de fonction du gène suppresseur de tumeur *TP53* est retrouvée dans 22 à 40 % des cas, et est souvent associée à l'amplification du gène *PDGFRA*. Il est à noter que la mutation de *TP53* est autant présente dans les tumeurs présentant la mutation H3.3K27M que dans les tumeurs contenant H3 sauvage. La mutation de *PPM1D* peut aussi être associée à la mutation de *TP53* et à la mutation de H3.3K27M et ainsi favoriser la malignité. Ces associations permettent l'échappement des cellules de DIPG à la mort cellulaire et à la sénescence (Lapin *et al.*, 2017).

L'amplification du gène *PDGFRA* est retrouvée dans approximativement 30 % des DIPG et le gène peut aussi être retrouvé muté. Cette altération augmente fortement la phosphorylation de certaines protéines impliquées dans la voie de signalisation PI3K-Akt, RAS/MAPK et Src kinase. Le produit de ce gène joue donc un rôle dans plusieurs processus cellulaires tels que la migration, la survie et la prolifération mais il est aussi important dans le développement. Son altération est souvent associée à la mutation de H3.3 (Paugh *et al.*, 2013). D'autres mutations de la voie PI3K-Akt ont été décrites comme les délétions de *PTEN* et la mutation de *PIK3CA* et *PIK3R1*. Elles sont surtout retrouvées dans des populations clonales et donc plutôt associées à des événements tardifs dans le développement de la tumeur (Buczakowicz et Hawkins, 2015).

MYC et *MYCN*, qui sont altérés dans les DIPG, sont des régulateurs transcriptionnels qui permettent l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la pathologie.

L'amplification de *MYCN* est associée à l'hyperméthylation du génome, à un haut-grade histologique et à de multiples remaniements du chromosome 2p (Lapin *et al.*, 2017).

La mutation H3.3K27M est associée à la surexpression d'*OLIG1* et d'*OLIG2*, facteurs de transcription des lignées oligodendrocytes (Buczkowicz et Hawkins, 2015).

Une publication de Mackay *et al.* décrit une méta-analyse regroupant plus de 1000 DIPG et gliomes pédiatriques de haut-grade et montre une amplification/mutation du gène *TOP3A* associée à la mutation H3.3K27M (Mackay *et al.*, 2017). Ce gène encode l'ADN topoisomérase III α qui joue un rôle important dans la recombinaison homologue.

D'autres mutations ont été décrites, telles que la mutation des gènes *ATRX* ainsi que l'amplification de gènes du cycle cellulaire (*CCND2*, *CDK4* et *CDK6*) (Hoeman *et al.*, 2018 ; Lapin *et al.*, 2017 ; Lulla *et al.*, 2016 ; Solomon *et al.*, 2015). Mais contrairement à ce qui a été observé pour les gliomes de haut-grade, la mutation du gène *IDH1* n'a jamais été identifiée (Solomon *et al.*, 2015).

Les profils génétiques et épigénétiques des DIPG sont très complexes et ils sembleraient présenter plusieurs sous-groupes moléculaires pour un même patient. En effet, certaines mutations ou amplifications sont uniquement présentes dans des populations sous-clonales (Nikbakht *et al.*, 2016).

6.3. Gliome adulte vs gliome pédiatrique : les différences génétiques

Les DIPG sont caractérisés par des altérations génétiques spécifiques et différentes de celles retrouvées chez l'adulte ou encore dans les gliomes pédiatriques de haut-grade. Le tableau 3 récapitule les principales mutations caractéristiques de chaque gliome.

En bref, les DIPG se définissent par un gain de fonction des protéines codées par les gènes des régions chromosomiques 1q, 8q et 9q et la délétion des régions 14q, 16q, 17p et 20q comparé au gain de fonction 7q plus caractéristique des glioblastomes adultes. Dans les DIPG, l'amplification la plus fréquente est celle du gène *PDGFRA* alors que l'amplification du gène *EGFR* est la plus représentée chez l'adulte (Buczkowicz et Hawkins, 2015). En revanche, on constate une absence de mutation du gène *IDH1* dans les DIPG alors qu'elle est retrouvée dans 42 % des cas chez l'adulte et 14 % des cas dans les gliomes pédiatriques de haut-grade non DIPG (Panditharatna *et al.*, 2015). Par rapport à ces derniers, la perte de la région chromosomique 17p dans les DIPG est plus importante. Les tumeurs DIPG se

caractérisent par un faible taux de délétion des gènes *CDKN2A/B*, contrairement aux gliomes pédiatriques de haut-grade et aux gliomes adultes (Schroeder *et al.*, 2014).

Tableau 3 : Différences moléculaires entre les gliomes adultes et les gliomes pédiatriques.

(Schroeder *et al.*, 2014)

	DIPG (%)	Pediatric high-grade glioma (non-DIPG) (%)	Adult high-grade glioma (%)
ATRX mutation	9	31	14
CDKN2A/B deletion	0–9	8–26	55
EGFR amplification	0–18	0–19	40–55
H3F3A mutation-K27M	60–71	19	<3
H3F3A mutation-G34R/V	0	13–14	<3
Hist1H3B (K27M)	18	3	NA
IDH1/2 mutations	0	10–16.3	42
TP53 mutation	40–77	21–54	33–43
SETD2 mutation	NA	15	8
PDGFR-A amplification	13–36	4–10	11
Loss 10q/PTEN	3–64	20–38	42–80
Gain 1q	23–64	13–43	8–9
Gain 2q	26	8	3
Gain 8q	28	5	5
Gain 9q	28	10	8
Gain 7p/7q	14/9	13/15	70/74
Loss 16q	49	18–26	7
Loss 17p	31–64	4–25	9
Loss 20p	26	3	1
Loss 21q	2	21	3
Loss 3q	0	21	4
Loss 4q	7	21–54	2

7. Traitement du gliome infiltrant du tronc cérébral

Contrairement à d'autres tumeurs du cerveau, le gliome ne peut pas être enlevé chirurgicalement car la tumeur infiltre le tronc cérébral, région du cerveau qui contrôle certaines fonctions vitales. Le seul traitement standard utilisé à ce jour est la radiothérapie.

Historiquement, les DIPG étaient traités comme des gliomes adultes mais avec la facilité croissante du séquençage de l'ADN, l'analyse génétique a permis de mettre en évidence que les altérations génétiques chez l'enfant étaient totalement différentes de celles des adultes (Hoeman *et al.*, 2018). C'est pourquoi plus de 250 essais cliniques sur les tumeurs DIPG, combinant chimiothérapies et/ou thérapies ciblées, n'ont jamais démontré le moindre

bénéfice en terme d'augmentation de la survie par rapport au traitement standard par irradiation (Lapin *et al.*, 2017).

7.1. Radiothérapie

Le traitement standard est typiquement une dose de rayons X entre 54 et 60 grays sur la zone de la tumeur, répartie sur 30 séances pendant 6 semaines (Zaghloul *et al.*, 2014). La radiothérapie est le seul traitement des DIPG qui induit un prolongement de la survie des patients. Il agit aussi transitoirement sur la diminution des symptômes. C'est donc plutôt un traitement palliatif qui permet d'augmenter la survie de plusieurs mois au lieu de plusieurs semaines (Clymer et Kieran, 2018). L'évaluation de l'efficacité des thérapies hyperfractionnées (Edwards *et al.*, 1989), hypofractionnées (Janssens *et al.*, 2013) ou l'utilisation de radio-sensibilisateurs n'a pas démontré d'amélioration de la survie des patients depuis les années 80 (Clymer et Kieran, 2018). Des glucocorticoïdes sont fréquemment administrés en association avec la radiothérapie afin d'éviter ou de réduire des œdèmes développés lors des radiations ou à cause de la tumeur.

7.2. Chimiothérapies

Aucun agent chimiothérapeutique efficace n'est connu à ce jour. Plusieurs stratégies chimiothérapeutiques ont déjà été testées pour traiter les patients, incluant la chimiothérapie combinée avec les radiations. Malheureusement, la survie ou encore la durée de vie sans aggravation reste inchangée (Clymer et Kieran, 2018). Les traitements utilisant des agents alkylants de l'ADN tels que le cisplatine, le temozolomide ou le carboplatine ont échoué, que ce soit seuls ou associés à la radiothérapie. Le temozolomide est un agent utilisé dans le traitement standard des glioblastomes. Or dans les DIPG, ce traitement n'a aucun effet bénéfique sur les patients (Clymer et Kieran, 2018).

La chimiothérapie n'a pas démontré de bénéfice pour plusieurs raisons. La première est que ces chimiothérapies étaient celles utilisées pour le traitement des gliomes adultes de haut-grade. La deuxième est qu'il est nécessaire de prendre en considération la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique qui empêche certains composés d'atteindre la tumeur (Gwak et Park, 2017).

7.3. Thérapies ciblées

Une alternative aux chimiothérapies classiques, qui ne sont pas efficaces, est l'utilisation de la thérapie ciblée selon les caractéristiques moléculaires de la tumeur. La recherche et la connaissance des processus biologiques impliqués dans le développement des DIPG a permis de mettre en place ce type de thérapie.

La mutation de l'histone H3, qui induit l'hypométhylation des histones H3K27, constitue une cible thérapeutique. En effet, de nombreux essais cliniques sont en cours afin d'étudier l'effet de l'utilisation de régulateurs épigénétiques contre les tumeurs DIPG. Certains agents ont déjà démontré leur efficacité *in vitro* sur des cellules issues de biopsies de patients et *in vivo* chez la souris. Cette partie sera détaillée dans le chapitre II.

L'activation aberrante de la voie de signalisation PI3K-Akt a conduit à la recherche d'inhibiteurs de cette voie. Le dasatinib, un inhibiteur des tyrosines kinases, induit une diminution de la prolifération cellulaire *in vitro* grâce à la diminution de l'activité du récepteur à tyrosine kinase "platelet-derived epidermal growth factor", PDGF α . (Truffaux *et al.*, 2014). En revanche, les essais cliniques associés au crizotinib (inhibiteur de c-Met) ou au vandetanib (inhibiteur du VEGFR2) n'ont pas été concluants (Broniscer *et al.*, 2013 ; Broniscer *et al.*, 2018 ; Long *et al.*, 2017). L'utilisation du temsirolimus, inhibiteur de mTOR également impliqué dans la voie PI3K-Akt, est en phase d'essai clinique en association avec la périfosine (inhibiteur d'Akt et de PI3K) ou encore avec du vorinostat (régulateur épigénétique) (Kaye *et al.*, 2014 ; Lapin *et al.*, 2017). Des agents cibles tels que le tamoxifène (cible les récepteurs des œstrogènes), l'erlotinib (inhibiteur de la tyrosine kinase du récepteur "epidermal growth factor", EGFR) ou le bevacizumab (anticorps dirigé contre le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, VEGF) n'ont en revanche pas d'effet (Mathew et Rutka, 2018).

7.4. Immunothérapie

L'objectif de l'immunothérapie est de restaurer une certaine immunité chez les patients afin d'éliminer les tumeurs. Le système immunitaire du cerveau a longtemps été défini comme indépendant de l'immunité du reste du corps du fait de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui empêcherait de transférer l'immunité antitumorale au cerveau. Depuis peu, la recherche a permis la découverte d'un système lymphatique ainsi que la présence de cellules T effectrices dans le cerveau. Ces cellules sont capables de traverser la

BHE au niveau du plexus choroïde (Deczkowska *et al.*, 2016 ; Platten *et al.*, 2016 ; Strazielle *et al.*, 2016). L'immunothérapie est donc potentiellement une approche candidate pour le traitement des tumeurs DIPG.

La caractérisation de néo-antigènes qui sont formés après mutation des cellules DIPG est une piste prometteuse. Dans une publication récente, la mutation H3.3K27M induit la production d'un néo-antigène sous forme d'un peptide dérivant de la mutation H3.3K27M, englobant les résidus 26 à 35 de la séquence H3.3 et incluant donc la mutation H3K27M. Ce peptide est présenté par le HLA-A*02 : 01, CMH de classe I dans les cellules DIPG et reconnu par le TCR des lymphocytes T cytotoxiques qui induisent la dégradation des cellules cancéreuses. La réponse est spécifique pour la mutation H3.3K27M (Chheda *et al.*, 2018). Ce traitement est en phase d'essai clinique (NCT02960230) et il consiste en une vaccination des patients avec le peptide correspondant à la mutation H3.3K27M (Scutti, 2018). Ochs *et al.* ont aussi validé l'effet de la vaccination avec un néo-antigène (27 résidus) englobant la mutation H3.3K27M qui induit une augmentation de l'interféron γ et l'activation des cellules T (Ochs *et al.*, 2017).

D'autres recherches utilisent la vaccination sous-cutanée par des antigènes spécifiques du gliome (EphA2, IL-13R α 2 et survivin). Les patients ont bien toléré la vaccination et le vaccin s'est avéré non toxique. Cependant la réponse au traitement n'était significative que pour une minorité de patients (Goodwin *et al.*, 2016 ; Pollack *et al.*, 2014).

Le microenvironnement immunitaire des tumeurs DIPG se caractérise par une inflammation inférieure à celle observée chez les adultes atteints de glioblastomes (Lin *et al.*, 2018). L'étude de la microglie associés aux DIPG montre une infiltration lymphocytaire faible avec une absence de cellules CD3⁺ (lymphocyte T) et peu de cytokines et de chimiokines inflammatoires exprimées dans le microenvironnement. Cette étude a été menée à la fois sur des biopsies et sur des prélèvements post-mortem. Cela suggère que les DIPG n'induisent pas de réaction du système immunitaire. L'utilisation de traitement permettant le recrutement ou basé sur l'introduction de cellules T au niveau de la tumeur pourrait donc être un bon outil thérapeutique. L'immunothérapie a permis le développement d'une thérapie utilisant les CAR-T ("Chimeric Antigen Receptor-T") qui sont des lymphocytes autologues porteurs d'un récepteur chimérique pouvant reconnaître les antigènes tumoraux. La protéine disialoganglioside, GD2, est surexprimée à la surface des cellules DIPG et associée à la mutation H3K27M. Les CAR-T générés ciblant ce récepteur ont inhibé *in vitro* et *in vivo* la

croissance tumorale des DIPG (Mount *et al.*, 2018). De plus, l'injection de cellules T transduites avec un TCR immunoréactif pour le complexe peptide H3.3K27M/HLA-A*02 : 01 chez des souris ayant reçu une injection de cellules de gliomes humain H3.3K27M au niveau du cerveau conduit à une réduction de la tumeur (Chheda *et al.*, 2018). Des essais cliniques sont en cours pour le développement de thérapies basées sur des lymphocytes T ciblant des néo-antigènes dans les DIPG.

Les cellules cancéreuses sont capables d'échapper au système immunitaire par "l'immuno-editing" des cellules. Dans les cellules de mélanome ou dans le cancer des poumons, les cellules cancéreuses expriment des ligands particuliers, la famille B7 (CD80 et CD86) et le ligand PD-L1 qui se lient aux récepteurs CTLA-4 ou PD-1, respectivement. La liaison des récepteurs des lymphocytes T avec ces ligands induit l'endormissement du système immunitaire et donc l'échappement des cellules tumorales à la dégradation (Scutti, 2018). Des études précliniques ont permis de montrer que PD-L1 est exprimé dans 80 % des glioblastomes (figure 11). Le traitement de ces patients avec des agents ciblant CTLA-4 et PD-1 permet d'augmenter le taux de survie. En revanche, dans les DIPG, le ligand PD-L1 et PD-1 ne sont pas surexprimés (Lin *et al.*, 2018). La recherche de l' "immunoediting" dans les cellules DIPG pourrait permettre de comprendre comment ces cellules tumorales échappent au système immunitaire (Scutti, 2018).

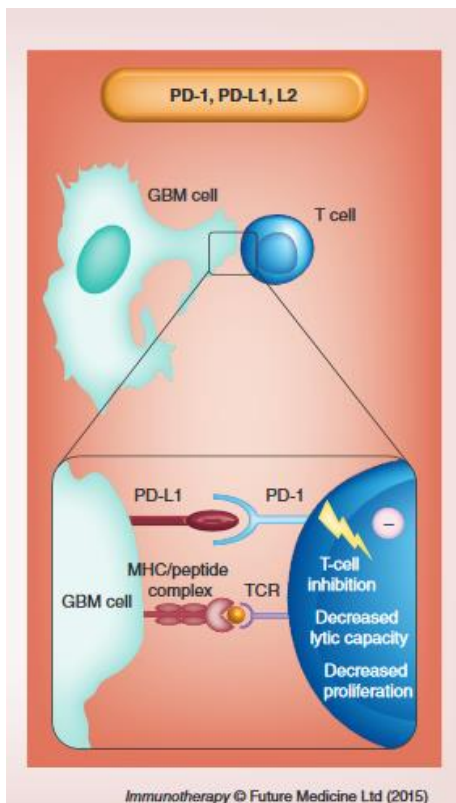


Figure 11 : PD-L1 dans la fuite immunitaire des gliomes

Le récepteur PD-1 présent à la surface des cellules T interagit avec le ligand qui est exprimé à la surface des cellules tumorales (PD-L1 ou PD-L2). Cette interaction, couplée à la liaison du TCR avec l'antigène présenté par le CMH de classe I, inhibe la lyse cellulaire induite par la cellule T ainsi que son activité (Calinescu *et al.*, 2015).

Plusieurs essais cliniques d'immunothérapie ont été menés pour le traitement des DIPG et sont décrits dans le tableau 4.

Tableau 4 : Essais cliniques par immunothérapie pour le traitement des DIPG.

Traitement	Description	Identifiant "Clinical Trials"
Peptide K27M	Vaccination avec le peptide H3.3K27M	NCT02960230
Vaccination DSP-7888	Injection de peptides dérivés de la protéine WT1 (induction des cellules T)	NCT02750891
Vaccination	Injection de lysat tumoral	NCT01400672
Pomalidomide	Utilisation d'un immuno-modulateur (accentuer la réponse immunitaire)	NCT03257631
Cellules NK autologues	Injection de cellules NK	NCT02840123
PegIntron®	Conjugué covalent de l'interféron α -2 β recombinant	NCT00036569
Ad-RTS-hIL-12	Vecteur de type adénovirus produisant de l'interleukine 12 humaine (activation des cellules NK et des lymphocytes T cytotoxiques)	NCT03330197
APX005M	Anticorps monoclonal qui se lie à CD40 (activation des cellules présentatrices de l'antigène et activation des lymphocytes T)	NCT03389802
MDV9300 (pidilizumab)	Anticorps monoclonal anti-PD1	NCT01952769
Pembrolizumab	Anticorps monoclonal anti-PD1	NCT02359565

Les premiers résultats publiés sont l'étude du PegIntron® après traitement par radiation. La survie au bout de 2 ans ne change pas en comparaison des patients traités seulement par irradiation. En revanche, la progression sans symptôme est augmentée de presque 3 mois. Les premiers essais cliniques menés avec le MDV9300 (pidilizumab), anticorps dirigé contre PD-1, montre que le traitement est bien toléré par les patients DIPG et pourrait être efficace mais cela doit être confirmé car trop peu de patients ont été traités (Fried *et al.*, 2017).

L'apport de l'immunothérapie dans le traitement pourrait permettre d'augmenter l'effet d'une drogue grâce à l'activation du système immunitaire. Il reste encore à étudier la tolérance des patients pour identifier les effets secondaires. Néanmoins, l'immunothérapie reste un espoir dans le traitement des DIPG.

7.5. Systèmes de délivrance au niveau de la barrière hémato-encéphalique

La principale cause de résistance aux chimiothérapies est la délivrance des composés à travers la BHE qui est peu perméable (Clymer et Kieran, 2018). C'est pourquoi diverses stratégies ont été développées. L'une d'elles est l'administration améliorée par convection locale (CED en anglais pour "convection-enhanced delivery"). Cela consiste en l'implantation stéréotaxique d'un cathéter au niveau de la tumeur afin de pouvoir administrer directement le traitement à travers le cathéter. Elle a été testée à partir des années 1990 sur des modèles animaux, dans lesquels elle a été validée pour l'administration dans la région du tronc cérébral. Plus récemment, des essais cliniques ont montré la difficulté à mettre en place la technique car il faut à la fois jouer sur la quantité de produit à injecter mais aussi sur le débit et le temps de perfusion (Gwak et Park, 2017). La CED a déjà été testé sur des patients DIPG après l'injection d'interleukine 13 combinée à une toxine bactérienne (Chittiboina *et al.*, 2014 ; Lonser *et al.*, 2007), l'injection de carboplatine à l'aide d'un robot dans un cas clinique (Barua *et al.*, 2013) et l'injection de topotecan dans deux cas cliniques (Anderson *et al.*, 2013). Le seul essai de phase I publié à ce jour compte 28 enfants atteints de DIPG traités par irradiation combinée avec un anticorps ciblant un antigène B7-H3. Cet antigène est une glycoprotéine surexprimée dans les DIPG (Zhou *et al.*, 2013). Cette étude démontre la faisabilité ainsi que la sûreté de la procédure (Souweidane *et al.*, 2018).

Une étude a répertorié les propriétés physicochimiques des différents traitements utilisés pour les patients atteints de DIPG. Ils ont ainsi pu classer les drogues selon leur niveau de pénétration théorique à travers la BHE ou selon l'administration locale, la CED. La distribution d'une drogue par CED dépend du gradient de pression régulé par un système de perfusion et de la charge moléculaire du traitement. Les composés chargés positivement ont tendance à moins bien diffuser que les composés neutres car ils se fixent aux composés de la membrane cellulaire chargés négativement (El-Khouly *et al.*, 2017).

Une autre méthode étudiée est l'utilisation d'ultrasons focalisés de haute intensité guidés par IRM pour permettre la perméabilisation de la BHE. L'injection de microbulles par intraveineuse et l'utilisation d'ultrasons induit la vibration et le gonflement des bulles et ainsi permet la formation d'une brèche localisée dans la BHE (figure 12). Le processus dure 4 à 6 heures laissant le temps au traitement de diffuser (Mathew et Rutka, 2018).

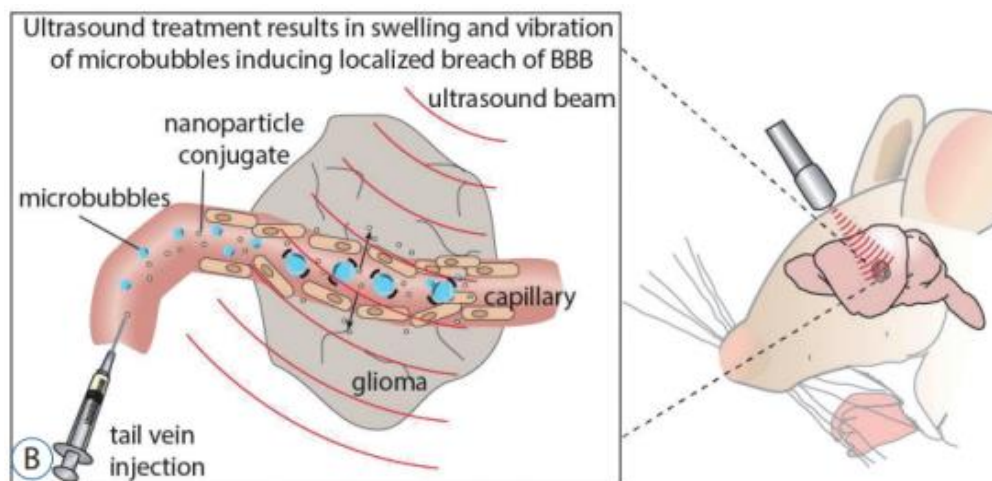


Figure 12 : Schéma explicatif de l'utilisation des ultrasons dans l'induction d'une brèche dans la BHE.

(Mathew et Rutka, 2018)

La recherche et l'utilisation de méthodes qui permettent le contournement de la BHE est importante voire nécessaire dans le traitement des DIPG. En effet, beaucoup de composés thérapeutiques ne sont pas capables de traverser la BHE pour rejoindre le site tumoral, conduisant à un échec thérapeutique. D'autres méthodes, qui ne seront pas décrites, sont étudiées dans l'administration des drogues au niveau du tronc cérébral. Ces techniques sont l'inhibition des transporteurs d'efflux, l'administration intra-artérielle, l'utilisation de nanoparticules et l'injection de drogues à forte dose. Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients (Warren, 2018 ; Bredlau *et al.*, 2017).

8. Biomarqueurs

La recherche de biomarqueurs est peu développée. La survenue des symptômes et le diagnostic sont souvent très rapprochés et cette recherche n'est pas forcément utile d'un point de vue médical. En revanche, la détection dans le liquide cérébro-spinal de la mutation d'histone H3 permettrait de valider sa présence avec une technique beaucoup moins invasive. La faisabilité de la procédure et la présence de la mutation ont été démontrées par Huang *et al.* en 2017. D'autres protéines ont été retrouvées dérégulées. L'augmentation de l'expression des protéines cyclophiline A et diméthylarginase 1 dans le fluide cérébro-spinal mais aussi dans le sérum et l'urine pourraient être des biomarqueurs chez les patients DIPG (Mathew et Rutka, 2018 ; Saratsis *et al.*, 2012).

9. Modèles expérimentaux

9.1. Modèle *in vitro* : les cellules issues de patients

La mise en place de cultures cellulaires à partir de biopsies ou d'autopsies de tumeurs DIPG s'est développée. Ces cellules cultivées dans des milieux spécifiques permettent le maintien des propriétés de cellules souches (Caretto *et al.*, 2014 ; Gunther *et al.*, 2008 ; Hashizume *et al.*, 2012 ; Monje *et al.*, 2011 ; Thirant *et al.*, 2011 ; Truffaux *et al.*, 2014 ; Xu *et al.*, 2017). L'élaboration de ces cultures *in vitro* a permis l'étude génétique des cellules mais surtout le criblage de différents agents thérapeutiques (Grasso *et al.*, 2015 ; Hashizume *et al.*, 2014 ; Mohammad *et al.*, 2017 ; Truffaux *et al.*, 2014 ; Wu *et al.*, 2017a). La liste des cellules utilisées dans notre laboratoire et leurs caractéristiques sont décrites dans le tableau 5. Afin d'éviter l'entrée en sénescence des cellules obtenues par biopsie, Hashizume *et al.* les ont immortalisées à l'aide de la transcriptase inverse de la télomérase humaine ou hTERT (cellules SF7761) (Hashizume *et al.*, 2012).

Tableau 5 : Caractéristiques cliniques et moléculaires des tumeurs DIPG.

Ces cellules ont gracieusement été données par le laboratoire du Dr Michelle Monje (Université de Stanford) et le laboratoire du Dr Jacques Grill (Hôpital Necker Enfant Malade).

Nom des cellules	Histologie	Age au diagnostic (ans)/sexe	Histone H3	Grade OMS	Traitement	Survie globale (mois)	Collecte des tissus
NEM 157	Oligo-astrocytome	5/F	H3.3K27M	II	RT + erlotinib	11	Diagnostic
NEM 163	Astrocytome Diffus	5/H	H3.3K27M	II	RT + elertonib	10	Diagnostic
NEM 168	Astrocytome Diffus	9/F	H3.3K27M	III	Chimiothérapie puis RT + erlotinib	8	Diagnostic
SU-DIPG IV	Glioblastome	2/F	H3.1K27M	IV	RT + cetuximab/irinotecan	8	Autopsie
SU-DIPG VI	Gliome de haut grade	7/F	H3.3K27M	III	RT + vorinostat	6	Autopsie
SU-DIPG XIII	Glioblastome	6/F	H3.3K27M	IV	RT	4	Autopsie

Le développement de nouvelles thérapies ainsi que le criblage de nouveaux traitements doivent être validés par un modèle animal préclinique. Pour le criblage de molécules, des xénogreffes orthotopiques et des modèles de souris génétiquement modifiées ont été développés et seront décrits dans les paragraphes suivants.

9.2. Cellules modifiées et implantation chez la souris

La recherche des facteurs moléculaires qui entraînent la tumorigenèse est primordiale pour comprendre le développement de la maladie. C'est pourquoi des chercheurs ont développé des cellules modifiées afin de déterminer les mutations impliquées dans le développement des cellules malignes.

Pour cela, Funato *et al.* ont utilisé de progéniteurs neuraux co-transduits *in vitro* avec les gènes mutés les plus importants dans les DIPG et conduisant à l'activation constitutive de *PDGFRA*, l'inhibition de l'expression de *TP53* par shARN et l'induction de la mutation *H3F3A* (Funato *et al.*, 2014). Ces cellules sont capables de se développer en cellules néoplasiques après plusieurs mois uniquement *in vitro*. En effet, l'implantation chez la souris immunodéficiente induit uniquement des gliomes de bas-grade et non de haut-grade, caractéristiques des DIPG.

Une autre expérience réalisée en 2017 consiste en une électroporation de vecteurs comportant la mutation H3.3K27M et l'induction de souris KO pour *TP53* par la technique de CRISPR/Cas9. Ces vecteurs sont injectés *in utero* au stade embryonnaire dans les cellules progénitrices neurales de la souris. Ces souris développent des tumeurs prolifératives et diffuses qui ressemblent histologiquement à des tumeurs de haut-grade. Une diminution concomitante de l'expression du gène *ATRX* *in utero* dans ces souris induit le développement de gliomes au bout de 4 mois. La surexpression du récepteur *PDGFRA* augmente significativement la survenue de la tumeur et l'invasion des cellules quand elle est co-exprimée avec le gène muté H3.3K27M. Ces cellules modifiées ont aussi été injectées chez la souris adulte et utilisées pour un criblage de drogues (Pathania *et al.*, 2017). L'injection *in utero* de gènes mutés permet d'étudier les mécanismes du développement modifiés par la mutation H3K27M et son implication dans la transformation oncogénique après la naissance (Mathew et Rutka, 2018 ; Pathania *et al.*, 2017).

9.3. Xénogreffe orthotopique chez la souris

Le premier modèle orthotopique a été l'utilisation de cellules dérivées de patient après autopsie. Ces cellules sont dissociées et mises en culture avant d'être implantées chez la souris (Carette *et al.*, 2014 ; Grasso *et al.*, 2015 ; Monje *et al.*, 2011). Elles ont l'avantage de pouvoir être modifiées pour un meilleur suivi à travers le crâne (luciférase ou rapporteur fluorescent). Il est aussi possible d'injecter directement les cellules obtenues post-mortem.

L'avantage de ce type de technique est d'éviter la pression de sélection de certains clones par la culture *in vitro*. En revanche, Caretti *et al.* ont découvert que l'implantation de ces cellules induisait le développement de tumeurs d'origine murine mais pas humaine. Ce mécanisme n'est pas expliqué (Caretti *et al.*, 2014). Le désavantage de ces 2 types de technique est l'injection de cellules qui ont déjà subi un traitement et donc qui sont potentiellement mutées. Avant autopsie, le taux de mutation est de 0.76 mutation par méga-base alors qu'il est 4 fois plus élevé après autopsie (Buczkwicz *et al.*, 2014 ; Taylor *et al.*, 2014a). Le bénéfice de ce type d'implantation est l'étude potentielle des résistances engendrées par les traitements (Mathew et Rutka, 2018). Il est bien sûr possible d'injecter à des souris immunodéficientes des cellules à partir de biopsies de patients n'ayant subi aucun traitement (Hashizume *et al.*, 2012 ; Truffaux *et al.*, 2014 ; Xu *et al.*, 2017). Ces études ont démontré un phénotype invasif typique et des symptômes neurologiques similaires chez la souris par rapport aux patients atteints de DIPG (Mathew et Rutka, 2018 ; Misuraca *et al.*, 2016). Ce modèle de souris permet de tester de nouveaux traitements ou encore différents mécanismes de délivrance des traitements. C'est un outil préclinique mieux adapté que les cellules obtenues après autopsie. Dans une publication de 2017, il a été montré qu'il est possible de réaliser plusieurs passages chez la souris de cellules obtenues par biopsies *in vivo* pour les amplifier puis les réimplanter chez la souris. Aucune différence dans la croissance cellulaire n'a été détectée entre la xénogreffe directe ou indirecte. A contrario, l'origine humaine des cellules a été gardée malgré les différents passages chez la souris, contrairement à ce qui a été observé dans l'étude de Caretti *et al.* (Plessier *et al.*, 2017).

Ces modèles orthotopiques ont le bénéfice de respecter le microenvironnement tumoral contrairement à l'étude *in vitro*. En revanche, l'implantation se limite à seulement une partie de la tumeur, qui ne représente pas la globalité du tissu tumoral et les différents sous-clones cellulaires présents dans les tumeurs DIPG qui sont très hétérogènes. Un autre désavantage est l'absence de système immunitaire chez ces souris, ce qui favorise considérablement le développement de la tumeur.

9.4. Souris génétiquement modifiées

Une des premières souris génétiquement modifiées pour l'induction de tumeurs DIPG a été créée par l'utilisation du système RCAS/tv-a ("replication-competent avian sarcoma-leucosis virus long terminal repeat with splice acceptor/Tumor Virus A"). Ce système permet la formation d'une tumeur spontanée à une localisation et dans un type cellulaire précis. Le virus RCAS ne peut être utilisé que dans des souris génétiquement modifiées qui expriment le récepteur tv-a. Les cellules des souris qui n'expriment pas ce récepteur ne sont pas infectées. En injectant le vecteur RCAS contenant le gène d'intérêt, les cellules exprimant spécifiquement le récepteur tv-a pourront ainsi exprimer ce gène (figure 13). Par exemple, Becher *et al.* ont obtenu l'expression de *PDGFB* dans les cellules de souris exprimant la Nestine (Becher *et al.*, 2010). Pour cela, des souris génétiquement modifiées "promoteur nestin/tv-a" ont reçu une injection du vecteur RCAS-*PDGF* au niveau du tronc cérébral. Cela

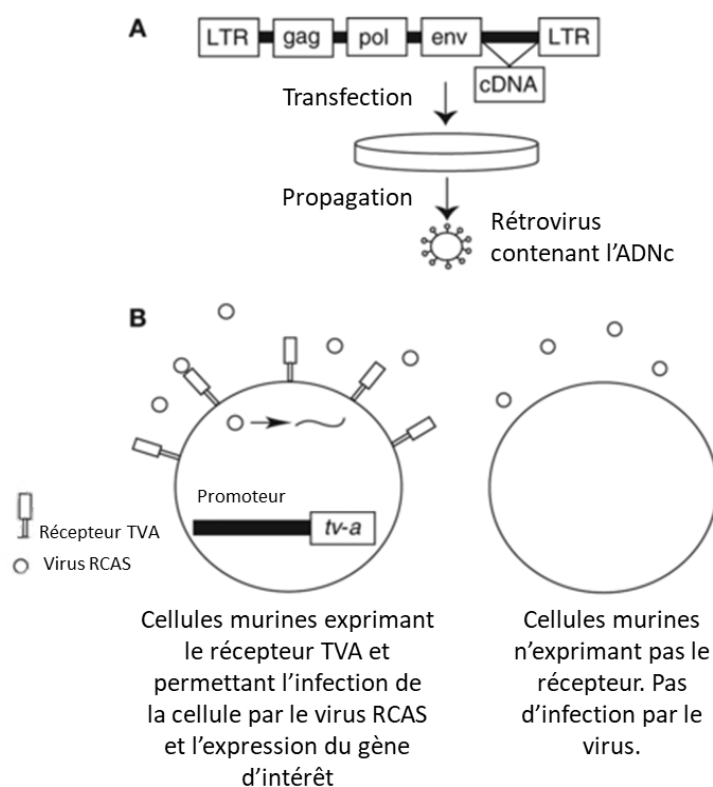


Figure 13 : Le système RCAS/tv-a dans les cellules murines.

a) Représentation schématique de la construction du rétrovirus RCAS. Le gène d'intérêt est inséré dans la construction. Cette construction est transfectée dans des cellules où elle est capable de se répliquer. b) Les rétrovirus sont injectés à la souris et pénètrent uniquement les cellules qui expriment le récepteur TVA. Le gène tv-a est associé au promoteur d'un gène spécifique d'un type cellulaire (exemple de la Nestine). L'ADN du gène d'intérêt s'intègre dans la cellule et est exprimé. Les cellules qui ne possèdent pas le récepteur TVA ne sont pas infectées (Ahronian et Lewis, 2014).

a induit la formation d'une tumeur infiltrante dans le pont (Gwak et Park, 2017). A contrario, l'expression du gène muté H3K27M dans des souris KO pour la protéine TP53 n'est pas suffisante pour induire une tumeur chez la souris (Lewis *et al.*, 2013). En 2016, la même équipe a ajouté la mutation H3K27M dans ces souris génétiquement modifiées, associée ou non à la mutation de TP53. En revanche, le récepteur tv-a était associé à la population de cellules Pax3⁺ et 50 % des souris ont développé des gliomes de haut-grade au niveau du tronc cérébral. Pax3, qui est un facteur de transcription, est une protéine sur-réglée dans les gliomes du tronc cérébral (Misuraca *et al.*, 2016). Cette étude décrit un nouveau modèle d'étude qui ressemble phénotypiquement aux tumeurs DIPG et qui peut être utilisé pour comprendre la gliomagenèse ou pour évaluer de nouveaux traitements potentiels.

L'utilisation de souris génétiquement modifiées permet de répondre aux questions concernant l'origine des cellules tumorales mais aussi de savoir quels sont les gènes impliqués dans le développement ou la maintenance de la tumeur (Hoeman *et al.*, 2018). En effet, ce système permet le développement de tumeurs du tronc cérébral qui ont les mêmes altérations génétiques que les DIPG (H3K27M, TP53 et PDGFR). Ce type de modèle permet également de maintenir l'environnement naturel de la tumeur et de garder un système immunitaire intact. En revanche, le nombre d'altérations introduites dans les cellules est l'un des inconvénients à l'utilisation des souris génétiquement modifiées car il est limité. Ce faible nombre ne peut pas être représentatif de la diversité des altérations rencontrées dans une tumeur.

10. Principales difficultés associées à l'étude des DIPG

Le principal problème pour l'étude des DIPG est leur localisation critique au niveau du tronc cérébral. Il faut aussi ajouter que les DIPG sont typiquement des tumeurs infiltrantes qui colonisent le tissu sain. On ne peut donc pas retirer la tumeur en toute sécurité et sans complications associées. À cause du manque de matériel biologique, la recherche sur cette pathologie a stagné pendant environ 30 ans. Maintenant, grâce à l'avancée de la médecine, des biopsies peuvent être réalisées sans risque pour le patient et aident à leur étude génétique. De plus, les modèles précliniques commencent à être mis en place afin d'étudier le développement ainsi que la génétique de la tumeur (Mathew et Rutka, 2018).

L'un des problèmes majeurs du DIPG est l'inefficacité des chimiothérapies. Cela est justifié par une méconnaissance de la biologie de la tumeur mais aussi par l'imperméabilité de

la BHE. En effet, le traitement *in vitro* de lignées de cellules DIPG par des agents chimiothérapeutiques permet de démontrer leur sensibilité. Ces lignées ne sont donc pas nécessairement résistantes aux traitements.

Enfin, l'hétérogénéité intratumorale est aussi un frein au développement de traitements efficaces. En effet, une étude histologique et des analyses génomiques sur 9 autopsies de DIPG, prélevées dans différentes régions du tronc cérébral et aux alentours, ont permis de démontrer une certaine hétérogénéité tumorale (Bugiani *et al.*, 2017). Il semblerait que la présence de clones cellulaires multiples coexistant serait importante dans la capacité de prolifération mais aussi de migration et d'invasion de la tumeur (Vinci *et al.*, 2018).

IV. Conclusion

Les DIPG sont des tumeurs pédiatriques rares et agressives. À ce jour, aucun traitement ne permet de guérir les patients atteints. Les études menées après séquençage du génome entier ont permis de mettre en évidence une mutation récurrente dans les DIPG, la mutation de l'histone H3, H3K27M. Elle serait l'une des principales mutations à l'origine du développement du gliome. La thérapie ciblée semble donc être un bon moyen de lutte contre le développement des DIPG. Les thérapies les plus prometteuses sont les régulateurs épigénétiques qui pourraient permettre de restaurer un équilibre dans l'expression des gènes.

Chapitre II : La régulation épigénétique des histones : rôle dans les

DIPG et traitement par le panobinostat

Comment une seule cellule peut-elle se différencier en différents types cellulaires dans un organisme multicellulaire ? La régulation épigénétique y joue un rôle très important. Elle est non seulement essentielle pour générer la diversité des types cellulaires lors du développement mais également pour maintenir la stabilité et l'intégrité du génome des différentes cellules. Ces changements épigénétiques sont héréditaires et réversibles.

Ce chapitre s'intéresse aux différentes régulations épigénétiques des histones et leurs effets sur l'expression du génome. Le mode d'action des inhibiteurs de cette régulation sera décrit à la lumière des dernières données obtenues sur les tumeurs DIPG. Le rôle des inhibiteurs des histones désacétylases et plus particulièrement du panobinostat sera détaillé.

I. Généralités sur les régulateurs épigénétiques

En 1942 le généticien Conrad Hal Waddington a inventé le mot épigénétique pour définir les changements de phénotypes sans changement de génotype afin d'expliquer les mécanismes du développement (Waddington, 2012). De nos jours, les mécanismes épigénétiques sont décrits comme étant la régulation de l'expression des gènes par l'intermédiaire de l'altération de la chromatine sans changement dans la séquence d'ADN. Ces mécanismes, en majorité réversibles, sont la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et la régulation par des ARN non codants (figure 14). Ils stabilisent l'expression des gènes et régulent ainsi l'identité de la cellule (Allis et Jenuwein, 2016). De ce fait, le développement d'un cancer n'est pas seulement lié aux changements génétiques par la translocation, l'amplification, la délétion ou la mutation de gènes, mais il est maintenant prouvé que l'altération de la régulation épigénétique est impliquée dans la cancérogenèse (Jones et Baylin, 2007). Dans les DIPG, la mutation H3K27M induit l'altération de la régulation épigénétique. C'est pourquoi il est important de connaître les mécanismes de régulation impliqués dans les modifications post-traductionnelles des histones et plus particulièrement de la lysine en position 27 de l'histone H3. L'acétylation et la

méthylation sont les modifications les plus importantes de l'histone H3K27 et seront plus précisément décrites dans les paragraphes suivants.

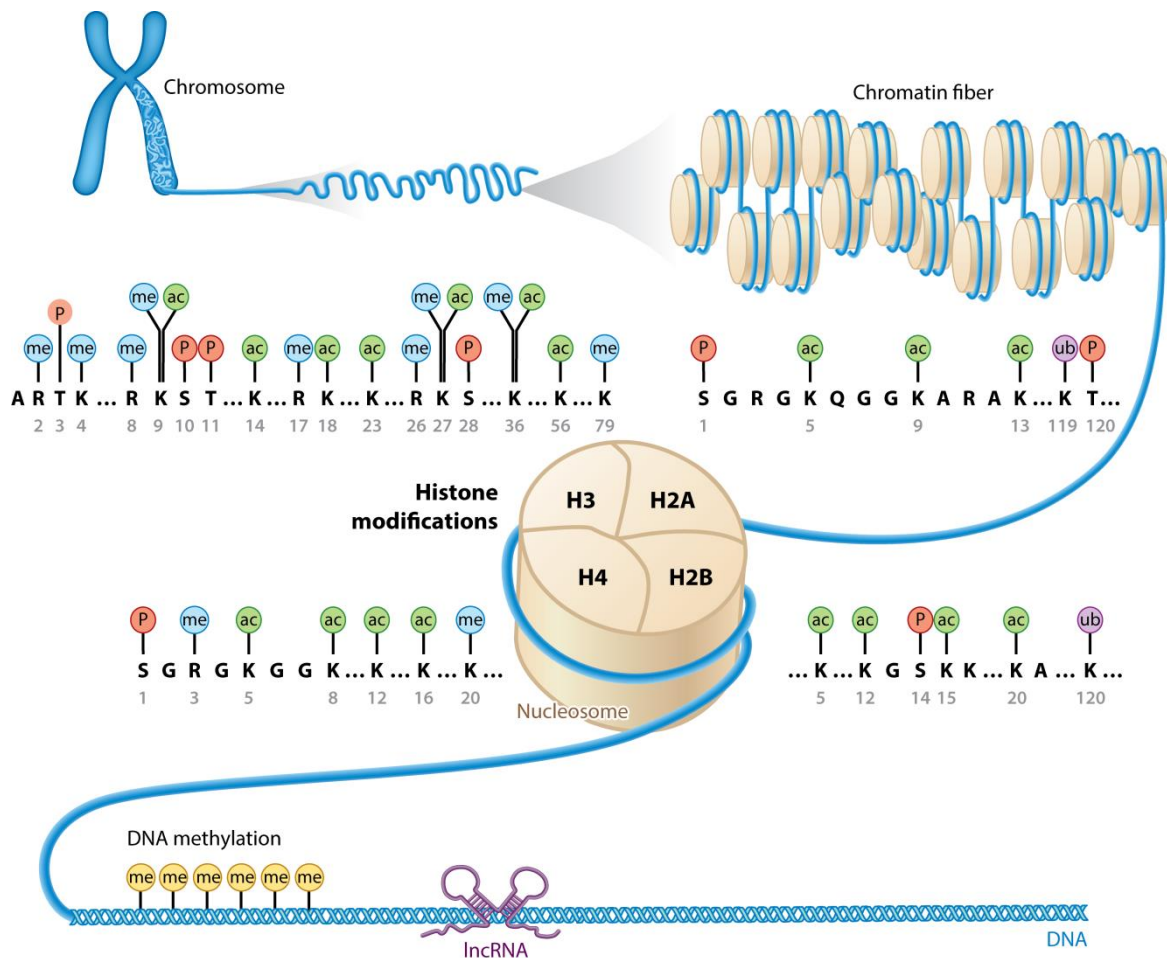


Figure 14 : Structure du chromosome et modifications épigénétiques.

L'ADN se lie aux octamères d'histones ce qui forme un nucléosome qui se compacte pour former des fibres de chromatine et ainsi un chromosome. La régulation épigénétique de la chromatine dépend de la méthylation de l'ADN et des modifications post-traductionnelles des histones. (Ac : Acétylation, Me : Méthylation, P : Phosphorylation et Ub : ubiquitination). Les ARN longs non codants (lncRNA) sont aussi des régulateurs épigénétiques par leur interaction avec l'ADN (Chen *et al.* , 2017).

II. Régulation épigénétique des histones : méthylation et acétylation

La régulation épigénétique des histones permet l'ouverture ou la fermeture de la chromatine. L'acétylation des queues d'histone en N-terminal est associée à un processus qui permet l'expression des gènes alors que la méthylation peut avoir des effets contraires selon l'acide aminé méthylé.

Les modifications apportées aux histones sont nommées “writers” et induisent l’addition d’un groupement méthyle par le biais des histones méthyl-transférases (HMT) ou l’addition d’un groupement acétyle par le biais des enzymes nommées histones acétyltransférases (HAT) (Jones *et al.*, 2016). Ces modifications sont réversibles par l’action d’enzymes appelées “erasers” qui sont les histones déméthylases (HDM) et les histones désacétylases (HDAC) (figure 8 et 9).

1. La méthylation

1.1. Mécanisme d’action

La première HMT découverte est la protéine SUV39H1. C’est une enzyme possédant un domaine catalytique de méthyl-transférase appelé SET (“Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax”) qui triméthyle spécifiquement l’histone H3 sur la lysine 9 (Rea *et al.*, 2000). La méthylation intervient sur des résidus lysines qui peuvent être mono (me1), di (me2) ou triméthylés (me3) et sur des résidus arginines qui seront mono ou diméthylés, grâce au transfert d’un groupement méthyle du co-substrat S-adénosylméthionine. Il existe plus de 60 HMT connues à ce jour qui sont classées selon le résidu méthylé et la présence ou non du site catalytique SET (Jubierre *et al.*, 2018). Chaque HMT est spécifique d’un résidu présent sur les queues d’histones H3 et H4. Selon les résidus des histones ciblées et le degré de méthylation (me1, me2 ou me3), les gènes sont exprimés ou réprimés. La méthylation des résidus K4, K36 ou K79 de l’histone H3 est associée à une transcription active alors que la méthylation de K9, K27 de H3 ou de K20 de H4 permet la formation de l’hétérochromatine. Ce phénomène est réversible à l’aide des HDM. Il existe deux familles, la famille KDM1 dont les protéines déméthylent les lysines me1 ou me2 et la famille JHDM dont les protéines déméthylent les lysines me3 (Jubierre *et al.*, 2018). Les plus décrites sont les enzymes UTX et JMJD3 qui jouent le rôle de déméthylases sur H3K27.

Contrairement à l’acétylation des histones, la méthylation n’intervient pas directement sur le changement de la structure de l’ADN. Un modèle suggère que les histones méthylées sont reconnues par des effecteurs nommés “readers”, conduisant au recrutement de complexes qui agissent directement sur la chromatine ou la transcription. Ces “readers” possèdent des domaines de liaison aux résidus méthyle présents sur les histones (chromodomaine, domaine Tudor, domaine MBT et autres) (Greer et Shi, 2012).

La dynamique de la méthylation des histones est connue pour avoir des rôles biologiques importants et très diversifiés : régulation du cycle cellulaire, réparation des dommages à l'ADN, réponse au stress, vieillissement, développement et différenciation cellulaire (Greer et Shi, 2012). Notamment, le complexe “polycomb repressive complex 2” (PRC2) a différents rôles. Il est composé de plusieurs sous-unités, la protéine catalytique EZH2 et les protéines EED, SUZ12 et RbAp48, et il méthyle la lysine 27 de l'histone H3 (Kuzmichev *et al.*, 2004). La triméthylation de la lysine induit l'inactivation des promoteurs durant la différenciation cellulaire. En effet, la triméthylation de H3K27 inactive le chromosome X chez la femme (Plath *et al.*, 2003). La diméthylation protège les régions intergéniques contre l'acétylation, alors que la monométhylation facilite la transcription des gènes dans des régions actives (Pan *et al.*, 2018).

Les enzymes qui régulent la méthylation de H3K27 sont altérées dans certains cancers (cancer de la prostate, du sein et lymphomes) (Nichol *et al.*, 2016). Par exemple, la surexpression d'EZH2 dans les cancers solides est associée à une tumeur agressive, métastatique et à un mauvais pronostic. Toutefois, la méthylation de H3K27 et son rôle dans la cancérogenèse semblent dépendre du type cellulaire (Greer et Shi, 2012 ; Simon et Lange, 2008).

L'ADN est aussi méthylé au niveau des régions riches en cytosines (di-nucléotides CpG) et permet l'inhibition de la transcription. Cela est régulée par des ADN méthyltransférase, DNMT (Jones et Baylin, 2007). La balance de la méthylation des histones est très importante dans la maintenance de la croissance des cellules normales (Piunti *et al.*, 2017). Les protéines impliquées dans la méthylation des histones et les protéines se liant aux histones méthylées sont donc des candidats dans le ciblage thérapeutique des cancers.

1.2. Régulation de la méthylation dans les tumeurs DIPG

Dans les cellules DIPG, on constate une réduction de la triméthylation de H3K27 à la suite de la mutation H3K37M (Lewis *et al.*, 2013). La restauration du niveau de méthylation est un enjeu dans le traitement des DIPG. Le complexe PRC2 et les enzymes déméthylases HDM sont donc des cibles thérapeutiques potentielles.

Afin de limiter la déméthylation et par conséquent la transcription des gènes, il existe un inhibiteur des HDM JMJD3 et UTX nommé GSK-J4 (Kruidenier *et al.*, 2012). Ce composé permet de maintenir la triméthylation de H3K27 et donc de maintenir la répression

de l'expression des gènes. Le traitement des cellules DIPG par cet inhibiteur conduit à l'inhibition de la croissance cellulaire des lignées H3K27M mais pas des lignées sauvages. De plus, GSK-J4 induit l'apoptose uniquement des cellules mutées possédant H3K27M. L'association des effets de GSK-J4 avec la mutation H3K27M confère une réponse spécifique à la perte de la méthylation H3K27, montrant le rôle majeur de cette mutation dans la cancérogenèse (Grasso *et al.*, 2015 ; Hashizume *et al.*, 2014).

Il a aussi été démontré que l'inhibition par EPZ6438 de l'activité résiduelle d'EZH2, enzyme catalytique du complexe de méthylation PRC2, induit l'expression d'un suppresseur de tumeur, p16-INKa (codé par *CDKN2a*, inhibiteur du cycle cellulaire) et la diminution de la prolifération des cellules cancéreuses DIPG (Mohammad *et al.*, 2017). Cela a été réalisé à partir de cellules souches neurales murines *trp 53^{-/-}* ou exprimant *PDGFB* en association avec la mutation H3K27M. De façon surprenante, la présence d'EZH2 est requise pour l'initiation de la tumorigenèse, mais aussi pour le maintien de la prolifération des tumeurs *in vivo*. En effet, certains loci, restant hyperméthylés par PRC2 dans les DIPG, sont associés à la répression de suppresseur de tumeurs comme pour p16-INKa (Bender *et al.*, 2013 ; Chan *et al.*, 2013). Le traitement par EPZ6438 des cellules humaines DIPG conduit au même effet que les cellules murines mutées (Mohammad *et al.*, 2017).

2. L'acétylation

La mutation H3K27M retrouvée dans les DIPG a pour conséquence l'hypométhylation K27 des histones H3, mais elle est aussi associée à une hyperacétylation des H3. Il est donc tout à fait judicieux de rétablir le niveau d'acétylation des cellules DIPG en inhibant les HDAC. C'est pourquoi, ce paragraphe se consacrera plus particulièrement aux HDAC ainsi qu'à leurs inhibiteurs, les HDACi.

2.1. Mécanisme d'action

L'acétylation des lysines est un processus réversible à l'aide des HAT et des HDAC au niveau N-terminal des queues d'histones. La lysine, qui est chargée positivement, est neutralisée par l'ajout d'un groupe acétyle sur son groupement ϵ -amino en utilisant l'acétylcoenzyme A (Losson *et al.*, 2016). L'acétylation affaiblit l'interaction avec l'ADN et cela conduit à l'ouverture de la chromatine pour la transcription des gènes. Elle est enrichie dans les régions actives du génome et permet de faciliter la liaison avec les facteurs de transcription. La désacétylation des histones engendre la condensation de la chromatine et la

diminution de l'expression des gènes (figure 8). Ce phénomène ne se réalise pas uniquement sur les histones mais aussi sur les protéines cytoplasmiques, les facteurs de transcription et d'autres protéines impliquées dans des processus cellulaires. En effet, l'acétylation de facteurs de transcription tels que NF- κ B permet sa localisation au niveau du noyau et sa liaison à l'ADN (Huang *et al.*, 2010). Alors que l'expression de *TP53* est régulée positivement par l'acétylation, la protéine TP53 peut aussi être directement acétylée et évite ainsi l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome. L'acétylation des protéines a pour conséquence la modification de l'interaction protéine-ADN et protéine-protéine ainsi que leur stabilisation dans le cytoplasme (Losson *et al.*, 2016).

2.2. Les histones acétylases (HAT)

Il existe 17 HAT humaines qui sont regroupées en 5 familles distinctes selon leur conservation structurale : la famille GNAT (Gcn5-related N-acétyl transférase), le groupe MYST (MOZ, YBF2/SAS3, SASS2 et TIP60), le groupe SRC (nuclear receptor coactivators), la famille p300/CBP et un groupe non défini (Haery *et al.*, 2015). La mutation qui implique l'inactivation des HAT augmente le risque de développer un cancer, ainsi que la translocation et l'amplification des gènes HAT (Mai *et al.*, 2005). Ces altérations génétiques sont retrouvées dans le glioblastome, le cancer colorectal, le carcinome hépatocellulaire et les tumeurs gastriques (Wood *et al.*, 2018). L'acétylation des histones induit le recrutement des protéines contenant un bromodomaine. Par exemple, la protéine BRD4 a un rôle dans la reconnaissance des histones acétylées. Elle permet l'initiation de la transcription en attirant des cofacteurs et en activant l'ARN polymérase II (Hashizume *et al.*, 2014). Des régulateurs de protéines à bromodomaine ont été développés. Ils ont une activité antitumorale dans les cancers solides mais aussi hématologiques. JQ1 est un inhibiteur dont l'efficacité antitumorale a été testée pour le traitement des cellules DIPG. Cette molécule est capable de se lier aux bromodomains par compétition. La présence de BRD2 et BRD4 est associée à l'hyperacétylation des histones mutées H3K27M ce qui suggère une implication de ces protéines dans la pathogénicité. Le traitement de cellules DIPG par JQ1 induit une diminution de la prolifération *in vitro* et *in vivo*, et un niveau de H3K27 acétylée plus faible (Nagaraja *et al.*, 2017 ; Piunti *et al.*, 2017).

2.3. Les histones désacétylases (HDAC)

Les HDAC induisent la condensation de la chromatine et par conséquent la diminution de l'expression des gènes. L'Homme possède 18 HDAC regroupées en 2 familles et classées

en 4 groupes basés sur l'homologie de séquence avec la levure *Saccharomyces cerevisiae* (figure 15) (Singh *et al.*, 2018). La première famille, qui rassemble le plus de sous-classes (I, II-A, II-B et IV) est une voie dépendante du zinc. Elle nécessite la présence du cofacteur Zn^{++} pour son activité désacétylase. La deuxième famille dépend du NAD^+ et représente la classe III (SIRT1-7) (Marks et Xu, 2009). Ces HDAC régulent plus de 1750 protéines qui sont impliquées dans divers processus biologiques : la réplication et la réparation de l'ADN, le remodelage de la chromatine, la transcription des gènes, la progression du cycle cellulaire, la dégradation des protéines et la réorganisation du cytosquelette (Laubach *et al.*, 2015).

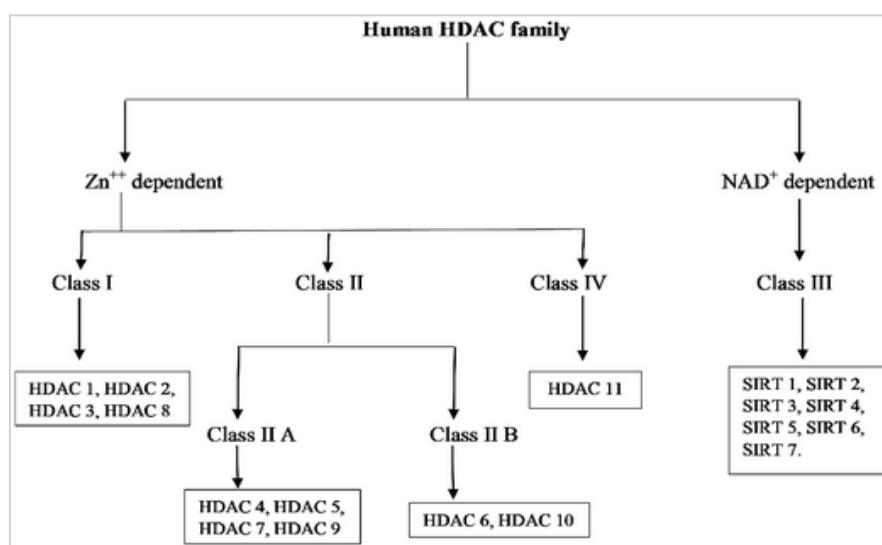


Figure 15 : Classification des familles de HDAC.

(Singh *et al.*, 2018)

En règle générale, les HDAC de classe I sont localisées dans le noyau et permettent d'éliminer un groupe acétyle sur la lysine des histones ce qui conduit à la condensation de la chromatine. Elles jouent aussi un rôle dans la survie cellulaire et la prolifération par l'interaction avec TP53. Les HDAC de classe II sont localisées dans le noyau et dans le cytoplasme où elles agissent sur les protéines non histones. HDAC 6, membre de la classe II-B, est en majorité localisée dans le cytoplasme et permet la désacétylation de la protéine "heat shock protein 90" (HSP90), protéine chaperonne importante dans la stabilisation des protéines. Cela induit le transport des protéines mal repliées vers l'agrésome pour leur dégradation dans les lysosomes (Anne *et al.*, 2013). HDAC 11, le seul membre de la classe IV, régule l'expression de l'interleukine-10, l'expression d'OX40L à la surface des cellules T et l'expression du facteur "DNA replication factor 1" Cdt1, facteur important dans la réplication. Elle est localisée en majorité dans le noyau (Mottamal *et al.*, 2015).

- Rôle des HDAC dans le développement embryonnaire et l'organogenèse :

Ce paragraphe démontre l'importance des HDAC de chaque classe dans le développement et dans l'organogenèse après invalidation génétique chez la souris.

Classe I :

L'invalidation génétique des membres de la classe I des HDAC conduit à la mort des souris (Haberland *et al.*, 2009). L'inhibition de l'expression de HDAC 1 induit la surexpression des protéines p21 et p27 et l'hyperacétylation modérée des histones H3 et H4. HDAC 1 ne joue pas seulement un rôle de répresseur mais aussi d'activateur car environ 5 % des gènes sont surexprimés après délétion du gène (Zupkovitz *et al.*, 2006). Les souris KO pour HDAC2 ont des malformations cardiaques sévères liées à une prolifération excessive des cardiomyocytes (Trivedi *et al.*, 2007). En revanche, la délétion conditionnelle (dans des organes précis) de l'une ou l'autre des HDAC n'induit pas de phénotype. Il existe une certaine redondance des gènes qui explique les phénotypes sévères obtenus après la co-délétion des deux HDAC (Haberland *et al.*, 2009). Ces deux protéines ont aussi un rôle redondant dans la différenciation des précurseurs neuraux et conduisent à des altérations sévères du cerveau après inhibition de l'expression chez la souris. En outre, HDAC 2 inhibe la différenciation des astrocytes, alors que HDAC 1 est requise pour la différenciation neuronale. De plus, HDAC 1, 2 et 3 inhibent la différenciation des oligodendrocytes. L'inhibition des gènes de HDAC 1 et 2 induit l'activation de la voie de signalisation Wnt et inhibe ainsi le développement des oligodendrocytes par la répression de l'expression d'Olig2 (Kretsovali *et al.*, 2012). Les progéniteurs neuronaux ne peuvent pas se différencier en neurones matures en l'absence d'HDAC 1 et 2. Cela conduit donc à la mort des cellules. Ces HDAC sont impliquées dans le développement neural embryonnaire mais aussi de l'adulte. Chacune des protéines a un rôle différent selon le stade du développement. Par exemple, HDAC 1 et 2 sont exprimées dans les progéniteurs neuraux durant le développement alors que dans les souris adultes, HDAC 1 est exprimée en majorité dans les cellules gliales et HDAC 2 dans les neurones et très faiblement dans les cellules gliales. En effet, l'expression de HDAC 2 dans les cellules matures permet d'inhiber les protéines exprimées uniquement par les cellules non différenciées (Jawerka *et al.*, 2010). De plus, les histones de classe I et II ont un rôle dans l'apprentissage et les fonctions synaptiques. Le traitement par des HDACi peut augmenter les fonctions cognitives comme l'apprentissage et la mémoire (Morris et Monteggia, 2013). La délétion de HDAC 3 est aussi létale chez la souris et semble être associée à un défaut de réparation de l'ADN après

cassure double brin (Haberland *et al.*, 2009). Dans les organes tels que le foie ou le cœur, sa délétion entraîne un déséquilibre des lipides et du cholestérol. Cela conduit à une accumulation de lipides dans le foie au lieu de glycogène, ou encore à une hypertrophie du cœur par accumulation de ces lipides (Haberland *et al.*, 2009).

Classe II-A :

L'invalidation génétique des membres de la classe II-A semble être spécifique du tissu. HDAC 4 a un rôle central dans la formation du squelette. L'inhibition de son gène conduit à l'ossification du cartilage et empêche la formation de la cage thoracique normale ce qui provoque la mort des embryons (Vega *et al.*, 2004). L'inhibition de l'expression des HDAC 5 et 9 est associée à un défaut de croissance et de maturation des cardiomyocytes (Chang *et al.*, 2004). HDAC 7 est exprimée dans les cellules endothéliales et régule MEF2 (régulation des protéines de la matrice extracellulaire et du VEGF). L'inhibition de son expression induit la mort des embryons suite à la rupture des vaisseaux sanguins et à une hémorragie. En effet, elle conduit à la surexpression de la métalloprotéase 10 (MMP10) et à la dégradation de l'interaction cellule-cellule importante dans la formation et le maintien de la structure des vaisseaux (Chang *et al.*, 2006).

Classe II-B :

L'altération du gène de HDAC 6 n'induit aucun phénotype délétère chez l'animal, et cela est sûrement dû à la redondance avec HDAC 10. HDAC 6 induit néanmoins à une hyperacétylation de la tubuline et a d'importantes fonctions dans la régulation du repliement des protéines (Haberland *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2008).

Classe IV :

La fonction de HDAC 11 dans le développement embryonnaire a été très peu étudiée. Elle est uniquement présente dans le cerveau, le cœur, le muscle et le rein suggérant un rôle essentiel dans ces tissus (Gao *et al.*, 2002). Une publication a décrit sa présence au cours du développement postnatal du cerveau chez la souris. HDAC 11 augmente au cours du développement et cette augmentation est corrélée avec la maturation des cellules neurales (oligodendrocytes et neurones mais pas dans les astrocytes) (Liu *et al.*, 2008).

2.4. Les inhibiteurs des histones désacétylases (HDACi)

Les HDACi sont des molécules très diversifiées, selon qu'ils inhibent une classe HDAC ou plusieurs à la fois. Certaines classes peuvent être spécifiquement inhibées comme la classe I avec l'inhibiteur erinostat (tableau 6) (Anne *et al.*, 2013 ; Dickinson *et al.*, 2010). On retrouve ces inhibiteurs dans la nature (arbres, plantes, champignons ou encore bactéries) ou sous forme synthétique. Ils sont classés en 4 groupes : acide hydroxamique, benzamide, peptide cyclique et les acides gras à chaînes courtes. Ils ont été découverts en 1977 par Riggs *et al.* avec le composé nommé n-butyrate (Singh *et al.*, 2018). Il existe 4 composés qui ont été approuvés aux États Unis par la FDA ("Food and Drug Administration"). En 2006, le vorinostat appelé également SAHA, a été le premier validé pour le traitement des lymphomes cutanés primitifs à cellules T (CTCL). En 2009, le FK228 ou romidepsin a été validé dans le traitement de seconde intention des CTCL. Le belinostat (PXD101) et le panobinostat (LBH-589 ou Farydak®) ont été introduits entre 2015 et 2016 pour le traitement des lymphomes périphériques à cellules T et des myélomes multiples, respectivement (Suraweera *et al.*, 2018). Les composées du groupe des acides hydroxamiques, qui sont le vorinostat, le berlinostat et le panobinostat, inhibent directement le site actif des enzymes HDAC. Ils sont capables de se loger dans la poche enzymatique des HDAC pour en chélater les ions Zn^{++} (Bayat *et al.*, 2018).

Tableau 6 : Classes et cibles des HDACi.
(Dickinson *et al.*, 2010)

HDACi Class		HDAC specificity										
		Nuclear				Nuclear, Cytoplasmic				Cytoplasmic		Nuclear
		I				IIa				IIb		IV
HDAC Class		1	2	3	8	4	5	7	9	6	10	11
Short chain fatty acids	Butyrate											
	Valproate											
Hydroxamic acid derivative	Trichostatin A											
	Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA)											
	Panobinostat (LBH589)											
	Belinostat (PXD101)											
Benzamide	Tubacin											
	Entinostat (MS-275)											
	Mocetinostat (MGCD0103)											
Cyclic tetrapeptide	Romidepsin (depsipeptide)											

Les HDACi restaurent le niveau d'acétylation dans la cellule et induisent ainsi l'expression des gènes qui étaient réprimés dans les cellules cancéreuses. Ce sont potentiellement des gènes suppresseurs de tumeurs anormalement réprimés dans les cellules malignes (Wood *et al.*, 2018). Pour éviter le développement et la progression d'un cancer, il existe un certain équilibre entre les protéines HAT et HDAC. En inhibant la désacétylation, ces inhibiteurs sont responsables de l'activation des mécanismes d'apoptose, d'arrêt du cycle cellulaire et de l'inhibition de l'angiogenèse ou des processus métastatiques.

Il est important de préciser que les cellules cancéreuses sont beaucoup plus sensibles aux HDACi que les cellules normales. Halsall et Turner ont émis l'hypothèse que les cellules ont la possibilité de calibrer leur réponse face aux HDACi (Halsall et Turner, 2016). De façon étonnante, les cellules normales traitées avec ces inhibiteurs diminuent l'expression des protéines HAT afin d'éviter l'acétylation aberrante du génome. En parallèle, les cellules augmentent leur niveau de triméthylation au niveau de H3K27 afin de maintenir l'équilibre. L'hypothèse est que les cellules ont été exposées progressivement aux HDACi qui existent à l'état naturel (bactéries par exemple) et ont donc développé une résistance naturelle au cours de l'évolution.

Plusieurs mécanismes d'action des HDACi ont été décrits dans les processus cellulaires et dans le traitement des cancers. En revanche, chaque mécanisme d'action est différent selon le type de cancer étudié, le type d'inhibiteur et la dose utilisée. Les mécanismes décrits ci-après ne sont donc pas représentatifs de tous les HDACi (Eckschlager *et al.*, 2017 ; Singh *et al.*, 2018). Ces mécanismes sont décrit ci-dessous (figure 16) (Choudhary *et al.*, 2009 ; Hrabeta *et al.*, 2014 ; New *et al.*, 2012) :

- Régulation du cycle cellulaire

Certaines HDACi induisent l'expression du gène *CDKN1A* (p21) indépendamment de *TP53* et par conséquent l'arrêt du cycle cellulaire. Cette protéine inhibe les kinases impliquées dans le processus du cycle cellulaire. HDAC 1 et 2 sont importantes pour la progression G1/S (Yamaguchi *et al.*, 2010) alors que HDAC 4 inhibe la protéine p21 (Wilson *et al.*, 2008). L'inhibition de HDAC 3 permet aussi de réduire la formation de mitoses aberrantes (Wilson *et al.*, 2006).

- Inhibition de la réparation suite aux dommages à l'ADN

HDAC 9 et 10 sont requises pour la recombinaison homologue (Kotian *et al.*, 2011). L'expression de certaines protéines impliquées dans la réparation sont alors inhibée (exemple : E2F1, Ku70) (Eot-Houllier *et al.*, 2009).

- Inhibition de la dégradation des protéines

La protéine HDAC 6 est importante dans la formation et la dégradation des agrésomes par les lysosomes (voir chapitre II, V.4.1) (Boyault *et al.*, 2007). Alors que la protéine chaperonne HSP90 est importante pour la stabilité des protéines, son acétylation induit une sensibilisation plus importante des protéines à l'ubiquitination et à la dégradation par le protéasome (Bali *et al.*, 2005).

- Régulation des gènes pro et anti-apoptotiques

L'activation des deux voies apoptotiques, intrinsèque et extrinsèque, par les HDACi permet d'enclencher l'apoptose des cellules. Par exemple, les gènes des protéines pro-apoptotiques Bim, Bid et Bad seront surexprimés, contrairement aux protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Rosato *et al.*, 2003). De plus, l'augmentation des dérivés réactifs à l'oxygène (ROS) par les HDACi conduit à l'apoptose des cellules cancéreuses (Hrabeta *et al.*, 2014).

- Effet antiangiogénique

Les HDACi modulent l'expression de certains gènes comme le *VEGFA* ou le *FGF2*. L'hyperacétylation du facteur de transcription pro-angiogénique HIF-1 α conduit à sa dégradation. (Kim *et al.*, 2001). Certains HDACi permettent l'expression de facteurs antiangiogéniques tels que la thrombospondine 1 (Eckschlager *et al.*, 2017).

- Modulation de l'immunité et de l'inflammation

Les HDAC modulent l'expression des cytokines et des chimiokines mais agissent aussi sur l'immunité adaptative par le développement et la différenciation des cellules T et B (New *et al.*, 2012).

- Altération de l'expression des ARN non codants

L'expression de la protéine DICER impliquée dans la synthèse des microARNs peut être augmentée après traitement par HDACi (Eckschlager *et al.*, 2017).

- Augmentation du stress oxydatif

L'expression de la protéine TBP2 ("thioredoxin binding protein") par les HDACi active la kinase impliquée dans l'apoptose, ASK1. Cela entraîne l'entrée en apoptose de la cellule

cancéreuse. De plus, les HDACi inhibent l'expression de la thioredoxine Trx, protéine anti-oxydante, qui régule négativement l'activité de la protéine ASK1 (Butler *et al.*, 2002).

- Induction de la mort cellulaire mitotique

À cause d'un remodelage trop important de la chromatine, les cellules traitées par HDACi ont une mitose anormale, ce qui conduit à la mort cellulaire mitotique (Cimini *et al.*, 2003).

- Induction de l'autophagie

La diminution de la voie Akt-mTOR par l'HDACi SAHA induit l'inhibition de la croissance des glioblastomes *in vivo* en activant l'autophagie. En effet, mTOR est un inhibiteur de l'autophagie car il inhibe le complexe ULK1 ("Unc51 like autophagy activating kinase 1") (Chiao *et al.*, 2013).

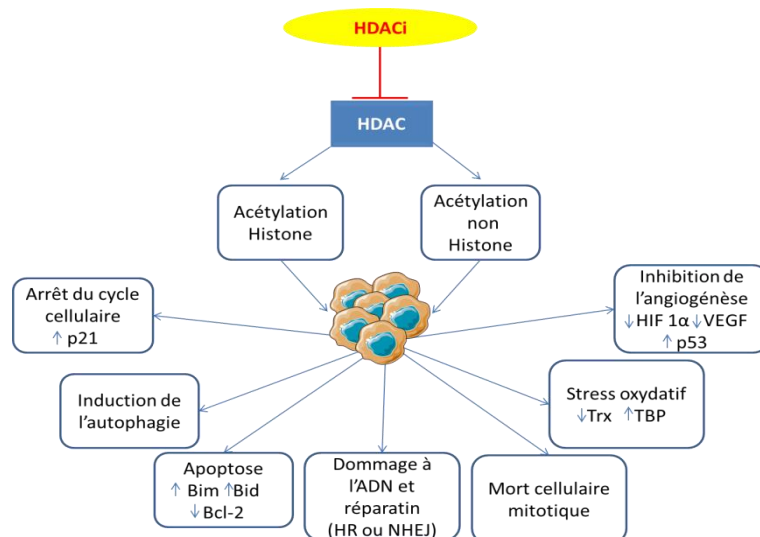


Figure 16 : Effets de l'inhibition des HDAC sur les cellules cancéreuses.

D'après Singh *et al.* (2018).

Tous ces mécanismes d'action permettent de lutter contre le maintien et la prolifération des cellules cancéreuses. Mais il existe aussi des effets néfastes du traitement des tumeurs par ces inhibiteurs. Les HDACi ont la capacité de reprogrammer les cellules somatiques en cellules pluripotentes. Par exemple, ces inhibiteurs induisent l'expression de CD133 (marqueur de cellules souches cancéreuses) dans des cellules de gliomes humains mais aussi augmentent l'EMT dans les cancers colorectaux et du sein (Eckschlager *et al.*, 2017). De plus, le traitement par HDACi augmente la migration et la formation de métastases dans différentes lignées de cancers (foie, sein, poumon, estomac) à cause de l'augmentation de l'expression des métalloprotéases (Lin *et al.*, 2012a).

D'autre part, des mécanismes de résistance aux HDACi se sont mis en place dans les cellules cancéreuses. Des recherches sur des cellules cancéreuses du colon ou de leucémies déficientes pour la protéine p21 ont permis de prouver que ces cellules étaient plus sensibles aux traitements romidepsin et vorinostat respectivement, que les cellules non déficientes. En effet, certaines cellules augmentent le niveau de la protéine p21 mais au lieu d'induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et la mort de la cellule, cela induit la survie cellulaire. L'augmentation de la thioredoxine par les HDACi permet une diminution des ROS et protège ainsi les cellules des dommages à l'ADN (Robey *et al.*, 2011 ; Suraweera *et al.*, 2018). La surexpression des protéines anti-apoptotiques est aussi une cause de la résistance aux HDACi, de même que la surexpression de certaines voies de signalisation (PI3K, MAPK, NF- κ B) (Marks et Xu, 2009 ; Robey *et al.*, 2011).

Pour éviter l'émergence de résistances face aux traitements par HDACi, ils sont souvent associés à d'autres thérapies et cela augmente ainsi les effets antitumoraux (Marks et Xu, 2009 ; Thurn *et al.*, 2011). Par exemple, le tableau 7 représente les différents essais cliniques combinatoires pour le panobinostat. Il existe 15 HDACi différents en essais cliniques utilisés en monothérapie ou combinés pour les cancers solides ou hématologiques. Les principaux effets secondaires des traitements sont la fatigue, les nausées, la déshydratation, la diarrhée et une thrombocytopénie. Ces effets sont, la plupart du temps, réversibles après l'arrêt de l'administration du traitement. Les essais cliniques pour les HDACi incluant les DIPG sont actuellement au nombre de 7 : le vorinostat seul (NCT01189266) ou en combinaison avec le temsirolimus (inhibiteur de la voie mTOR) (NCT02420613), l'acide valproïque en association avec le temozolomide (NCT0242061) ou avec le bevacizumab (Anticorps anti-VEGF) (NCT00879437) et le panobinostat seul (NCT02717455) ou associé avec l'évérolimus (inhibiteur de la voie mTOR). Le traitement par le panobinostat est aussi testé en association avec des nanoparticules délivré par CED (NCT03566199).

Tableau 7 : Récapitulatif des essais cliniques combinatoires pour le panobinostat.

Nom	Combinaison	Cibles	cancers	Phase
Panobinostat	Radiothérapie	Provoque des dommages à l'ADN	Prostate, œsophage, tête et cou, DIPG	I
	Carfilzomib	Inhibiteur du protéasome	Myélome multiple récidivant	I/II
	Bortezomib	Inhibiteur du protéasome	Lymphome cellules T ou NK récidivant	II
	Bicalutamide	Anti-androgène (bloque les récepteurs des androgènes)	Prostate	I/II
	Sorafenib	Inhibiteur multi-kinase	Carcinome hépatocellulaire, rein et carcinome des tissus mous	I
	Everolimus	Inhibiteur de mTOR et immunosuppresseurs	Myélome multiple, lymphome Hodgkinien ou non, DIPG	I/II
	Ipilimumab	Anticorps monoclonal ciblant la protéine CTLA-4, récepteur des lymphocytes T cytotoxiques	Mélanome	I

III. Le panobinostat, inhibiteur des histones désacétylases

Le criblage de 83 drogues sur 14 lignées de DIPG a démontré une sensibilité accrue à un inhibiteur des HDAC, le panobinostat (PS). Cet inhibiteur est efficace sur les cellules DIPG mutées ou non mutées pour H3 (H3K27M). Dans cette même publication, des thérapies prometteuses ou des chimiothérapies utilisées pour les gliomes de haut-grade ont été testées ainsi que d'autres HDACi (vorinostat, acide valproïque, trichostatin A, entinostat), mais le PS reste l'inhibiteur de la prolifération cellulaire le plus efficace (Grasso *et al.*, 2015).

1. Généralités

Le PS, commercialisé sous le nom de Farydak® (Novartis) ou LBH-589, est un pan-HDACi. Il induit l'hyperacétylation des histones et des protéines, ce qui permet l'expression de certains gènes réprimés, l'inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose. La formule chimique du PS est $C_{21}H_{23}N_3O_2$ (figure 17) avec un poids moléculaire de 350 g/mol (Anne *et al.*, 2013). Il fait partie des acides hydroxamiques de la famille des HDACi. Le panobinostat est très peu soluble dans l'eau, c'est pourquoi la voie orale est le mode d'administration le plus courant. Il est en phase d'essai clinique pour le traitement des leucémies, des lymphomes, des cancers rénaux, des cancers du sein et des DIPG (Hennika et Becher, 2015). De plus, le PS a été approuvé par la FDA en 2015 ainsi que par la commission européenne pour le traitement du myélome multiple en rechute ou réfractaire. Il est utilisé en

3^{ème} ligne d'intention en association avec le bortézomib et la dexaméthasone (Cavenagh et Popat, 2018).

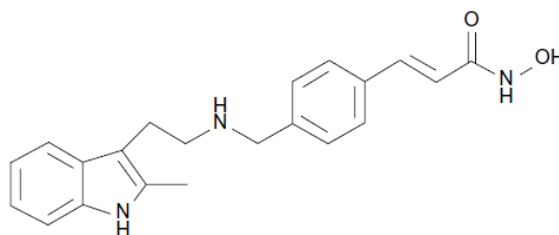


Figure 17 : Structure chimique du panobinostat.

(2E)-N-hydroxy-3-[4-({[2-(2-methyl-1H-indol-3-yl)ethyl]amino}methyl)phenyl]acrylamide.
(Anne *et al.*, 2013)

2. Pharmacocinétique

Le PS est rapidement absorbé après traitement par voie orale. La concentration maximale dans le sang est atteinte au bout de 2 heures. La substance est métabolisée en plus de 77 métabolites. L'élimination du composé se fait par les reins et le foie. Seulement 3 % du PS non modifié est retrouvé dans les urines et dans les fèces. Il est métabolisé par les enzymes cytochrome P450 (CYP) et non-CYP. Le PS peut être oxydé, réduit, hydrolysé ou conjugué à l'acide glucuronique mais les métabolites en découlant semblent être inactifs. La demi-vie biologique est estimée à 37 heures (Laubach *et al.*, 2015).

3. Mécanismes d'action

Le PS est un inhibiteur des HDAC de la classe I, II et IV. Il interfère avec les histones et les protéines non-histones comme : H3, H4, HIF- α , la β -caténine, la tubuline α , la protéine chaperonne HSP90, le récepteur œstrogène (ER), le récepteur des androgènes (AR), le récepteur EGFR, STAT3, Smad et les protéines de réparation à l'ADN (Ku70) (Singh *et al.*, 2016 ; Singh *et al.*, 2010). Les effets du PS les plus décrits dans les cancers solides sont surtout l'inhibition de HSP90 par l'acétylation. Les protéines chaperonnes HSP90 acétylées se lient moins bien à l'ATP, ce qui conduit à la diminution de leur activité. HSP90 stabilise les récepteurs AR, ER et EGFR qui sont impliqués dans les cancers du sein, de la prostate et des poumons. Dans ces cancers, les lignées cellulaires exprimant ces récepteurs sont beaucoup plus sensibles au PS par rapport à des lignées déficientes pour ces récepteurs. Dans le cancer

du poumon dépendant d'EGFR, le PS induit l'acétylation de HSP90, ce qui conduit à la diminution des protéines c-Src, STAT3, Akt ainsi qu'à la diminution des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl ou Mcl-1) (Atadja, 2009). L'inhibition par le PS des HDAC de classe I, qui sont impliquées dans la régulation des histones et des facteurs de transcription comme TP53, permet de réactiver les gènes suppresseurs de tumeur mais aussi de modifier l'expression des gènes en inhibant les protéines STAT3, Akt et HIF-1 α (figure 18). L'inhibition des HDAC 6 conduit à l'arrêt de la dégradation des agrésomes impliquant l'accumulation des protéines mal repliées dans la cellule et par conséquent conduisant à la mort cellulaire (figure 19) (Laubach *et al.*, 2015). Le PS active aussi la génération de ROS provoquant l'apoptose des cellules (Singh *et al.*, 2018 ; Wasim et Chopra, 2018). Il est aussi capable d'induire l'autophagie grâce à l'expression de DAPK ("tumor suppressor death-associated protein kinase") dans des cellules tumorales du colon (Gandesiri *et al.*, 2012). Les effets antiangiogéniques du PS sont dus à une inhibition de l'expression des protéines HIF-1 α , de CXCR4 (récepteur de chimiokines) et du VEGF (Qian *et al.*, 2006). C'est aussi un immunomodulateur qui augmente l'activité des cellules T cytotoxiques et la sécrétion de cytokines antitumorales (Lisiero *et al.*, 2014 ; Singh *et al.*, 2016). Une autre caractéristique moins décrite du PS est sa capacité à augmenter l'expression de DICER, impliqué dans la synthèse des microARNs. Toutefois, malgré l'augmentation du taux de protéines DICER, la synthèse des microARNs est diminuée après traitement par le PS (Hoffend *et al.*, 2017).

L'expression de transporteur MRP1/ABCC1, MDR1/P-glycoprotein/ABCB, et BCRP/ABCG2, est souvent associée à la résistance des traitements. Le PS augmente l'expression de MDR1 mais diminue l'expression des transporteurs MRP1 et BCRP (Valdez *et al.*, 2016). Néanmoins, le PS est un substrat des P-glycoprotéines qui permet l'efflux des drogues au niveau de la BHE. (Singleton *et al.*, 2018 ; Veringa *et al.*, 2013). Les inhibiteurs de P-glycoprotéine entraînent l'augmentation de la concentration en PS (Van Veggel *et al.*, 2018).

La concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) des HDAC par le PS est de l'ordre du nanomolaire pour toutes les classes d'HDAC. Cette concentration est 10 fois plus faible que pour le vorinostat. Les tumeurs solides telles que le cancer du sein ou encore du pancréas ont besoin d'une dose plus importante de PS pour induire une cytotoxicité des cellules malignes (environ 400 nM) en comparaison des lignées hématologiques (environ 35 nM) (Anne *et al.*, 2013). Il est à noter que les cellules saines traitées par le PS ont un IC₅₀ supérieur à 5 μ M (test dans les cellules rénales et mammaires) (Atadja, 2009). Le traitement par le PS à une

concentration faible pourrait donc être un traitement spécifique des cellules tumorales avec des effets néfastes limités sur les cellules saines.

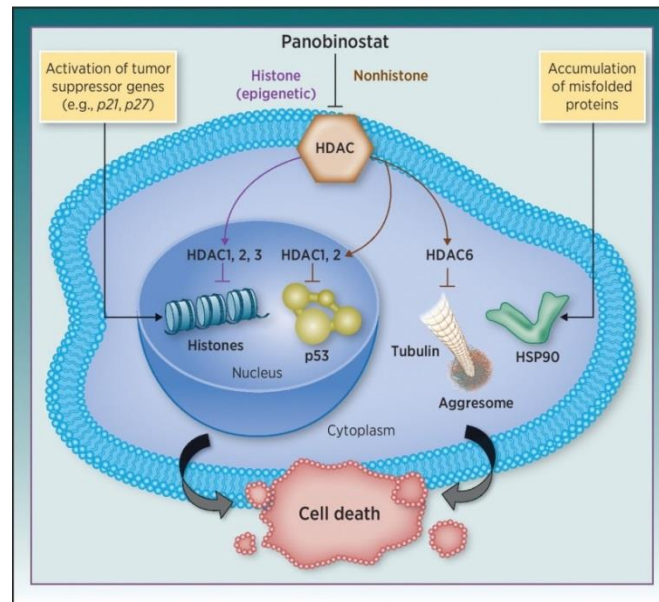


Figure 18 : Action du panobinostat sur les différentes HDAC.
(Laubach *et al.*, 2015)

4. Utilisation en cancérologie

Les essais cliniques montrent que le PS a des effets antitumoraux dans différentes pathologies hématologiques incluant la leucémie myéloïde aigue, la leucémie myéloïde chronique, le lymphome hodgkinien et les lymphomes non-hodgkiniens. Le traitement par le PS du myélome multiple (MM) récidivant ou récalcitrant a été approuvé en 2015 par la FDA.

4.1. Action du PS sur le myélome multiple

Le MM se caractérise par une prolifération accrue d'un clone de plasmocyte au niveau de la moelle osseuse qui secrète des anticorps monoclonaux en excès. Une des caractéristiques du MM est la surexpression de certaines HDAC. Le PS en monothérapie est beaucoup moins actif que la combinaison PS et bortézomib qui est un inhibiteur du protéasome. Le protéasome est un complexe protéique qui permet de dégrader les protéines mal repliées par coupure des liaisons peptidiques à l'aide de protéases. Les protéines sont marquées par l'ubiquitine avant d'être dégradées par le protéasome. La combinaison du PS

avec le bortezomib et la dexaméthasone, un corticostéroïde, augmentent la survie sans progression de 4 mois chez les patients atteints de MM. L'une des raisons principales est que les deux drogues sont capables d'agir en synergie sur la voie de dégradation des protéines. Dans le MM, les cellules renouvellent très rapidement leurs protéines (surtout les immunoglobulines). C'est pourquoi elles sont sensibles aux inhibiteurs de protéasomes comme le bortezomib qui va induire un signal pro-apoptotique après accumulation des protéines dans le cytoplasme. Cependant, il existe un autre processus qui permet le maintien de la cellule en vie appelé agrésome (figure 19). Les protéines mal repliées vont être prises en charge par les agrésomes pour leur transport et leur dégradation par les lysosomes. Les agrésomes sont des structures de microtubules qui permettent le transport des agrégats protéiques à l'aide de la dynéine. Ce transport se fait par l'intermédiaire de HDAC 6 qui se fixe sur les microtubules, ce qui induit le recrutement des agrégats protéiques au niveau de la dynéine. L'inhibition de HDAC 6 par le PS empêche la formation des agrésomes et provoque ainsi l'arrêt de la dégradation des protéines mal repliées. L'accumulation dans le cytoplasme de ces protéines conduit à la mort des cellules cancéreuses (Imai *et al.*, 2016 ; Laubach *et al.*, 2015 ; Yee et Raje, 2018).

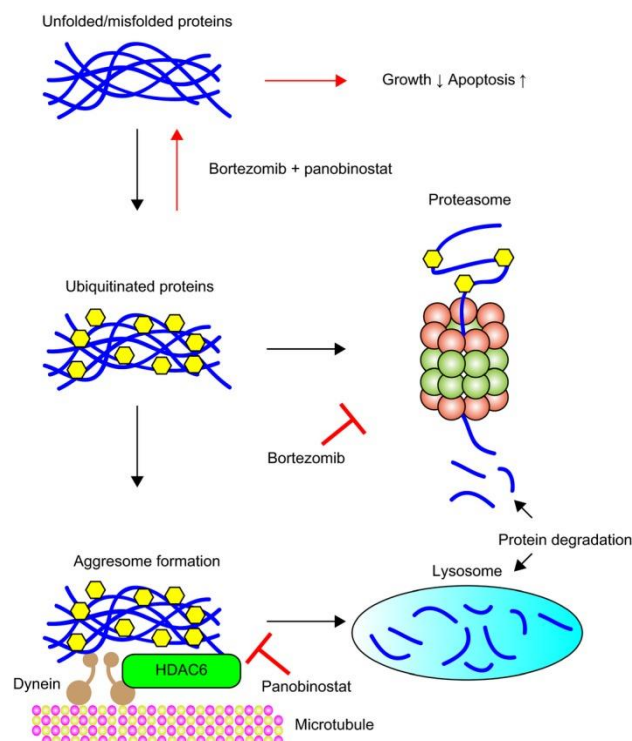


Figure 19 : Effets de la combinaison du bortezomib avec le PS sur la dégradation des protéines mal repliées.

(Imai *et al.*, 2016)

4.2. Action du PS sur les gliomes adultes

Le glioblastome est caractérisé, entre autres, par une altération majeure du récepteur EGFR. Les HDACi sont connus pour acétyler et inhiber l'action des chaperonnes HSP90 qui stabilisent EGFR et Akt. Cette inhibition conduit donc à la diminution de la phosphorylation de p-EGFR ou de p-Akt modifiant ainsi la voie EGFR-PI3K-Akt-mTOR qui est dérégulée dans les glioblastomes. De plus, le PS est capable d'inhiber la migration et l'invasion des cellules du glioblastome (Choi *et al.*, 2014). Dans une autre publication, le traitement par le PS induit la diminution de la densité des microvaisseaux dans des xénogreffes de glioblastomes sous-cutanés. Le PS a donc un effet anti-angiogénique en perturbant le complexe HSP90/HDAC6, conduisant ainsi à la dégradation de HIF-1 α et à la diminution de l'expression du facteur VEGF (Yao *et al.*, 2017). En revanche, un essai clinique démontre que l'association du PS avec le bevacizumab (anticorps contre le VEGF) pour le traitement des glioblastomes récurrents ou dans les gliomes anaplasiques, n'a aucun effet sur l'amélioration de la survie (Lee *et al.*, 2015). Des études précliniques ont montré une radio-sensibilisation après traitement par le PS dans d'autres cancers tels que le gliome, le carcinome colorectal, le cancer du col de l'utérus, de la prostate et le mélanome. L'altération de l'ADN par l'irradiation induit des mécanismes de réparation de l'ADN par recombinaison homologue ou non homologue. Les HDACi sont connus pour inhiber des facteurs impliqués dans les voies de réparation. Ainsi, le PS est capable d'inhiber la réparation de l'ADN et induit la mort de la cellule. Dans un essai clinique de phase I pour les gliomes adultes de haut-grade, le traitement par le PS associé aux rayons X est très bien toléré et augmente la capacité du PS à traverser la BHE (Shi *et al.*, 2016).

De manière générale dans les tumeurs du SNC, le PS a des effets antitumoraux et des effets antiangiogéniques. En effet, il dérégule la stabilité des protéines par l'inhibition de HSP90 et induit l'expression de protéines pro-apoptotiques.

4.3. Effets du PS sur la différenciation des cellules cancéreuses

Il a été démontré que le traitement à faible dose de PS pouvait être une alternative à l'induction de l'apoptose. Par exemple, le traitement des ostéosarcomes à faible dose permet la différenciation des ostéoblastes associée à une sénescence irréversible de ces cellules sans induire la mort cellulaire (Cain *et al.*, 2013). Les tumeurs rhabdoïdes malignes touchent les nourrissons et les jeunes enfants et affectent le rein et le SNC. Muscat *et al.* ont démontré que le traitement régulier à faible dose de PS induisait un changement morphologique des cellules

associé à l'augmentation des marqueurs de différenciation neurale et rénale (Muscat *et al.*, 2016). Dans le carcinome hépatocellulaire, le traitement induit la différenciation et permet ainsi d'éviter l'EMT impliquée dans la migration cellulaire et les processus métastatiques (DI Fazio *et al.*, 2013 ; Wood *et al.*, 2018).

4.4. Traitement des DIPG par le PS

4.4.a. Études précliniques des effets antitumoraux du PS

La première étude à avoir apporté des informations concernant le traitement des DIPG par le PS est l'étude de Grasso *et al.* qui a mis en avant l'efficacité du PS comparée à plus de 80 traitements (Grasso *et al.*, 2015). Le PS diminue la viabilité et la prolifération cellulaire et induit la mort de cellules isolées de patients atteints d'un DIPG. Une des conséquences du traitement est l'augmentation de l'acétylation des histones H3 et de la triméthylation des H3K27 qui dépendent de la dose de PS. L'augmentation de la triméthylation est une conséquence inattendue mais elle permet de restaurer la méthylation globale qui est anormalement diminuée dans les DIPG mutées H3K27M. L'hypothèse de cette hyperméthylation décrite par Grasso *et al.* (2015) est basée sur les travaux de "détoxification" par l'acétylation (Brown *et al.*, 2014). L'addition de groupes acétyles sur la queue d'histone H3 permet de lever l'inhibition de PRC2, complexe qui catalyse la triméthylation K27, induite par la mutation H3K27M (travaux de Brown *et al.* qui sont également décrits dans le Chapitre I, paragraphe III-6.1.b). Ces travaux ont ensuite été validés après implantation orthotopique d'une lignée de DIPG mutée H3K27M dans des souris immunodéficientes NOD-SCID. Après traitement par voie intrapéritonéale (20 mg/kg, une fois par semaine pendant 4 semaines), la croissance de la tumeur est significativement diminuée contrairement aux tumeurs non traitées. Un nouveau protocole de traitement, après implantation d'une lignée DIPG non mutée sur H3 et qui est issue d'une xénogreffe dérivée du patient (10 mg/kg, 5 jours de traitement puis 5 jours sans, pendant 2 cycles), met en évidence une augmentation du taux de survie dans les souris traitées. Dans cette étude, le PS diminue la croissance cellulaire des tumeurs DIPG *in vitro* et *in vivo*, mutées ou non pour H3K27M (Grasso *et al.*, 2015).

Une deuxième étude a été développée afin de répliquer, confirmer et étendre les résultats établis précédemment. Malheureusement, les résultats *in vivo* s'avèrent être beaucoup moins significatifs dans le rôle antitumoral du PS que les études de Grasso *et al.*, (2015) (Hennika *et al.*, 2017). Dans un premier temps, Hennika *et al.* ont utilisé des cellules issues de souris génétiquement modifiées caractérisées par une amplification du gène *PDGF-*

B, la présence de la mutation H3.3K27M et l'absence de *trp53* dans les cellules murines positives pour la Nestine (système RCAS/tv-a décrit dans le chapitre I paragraphe III-9.4) (Hennika *et al.*, 2017). Ces souris développent des symptômes à partir de 3-5 semaines. Après l'isolement et la dissociation des tumeurs, les cellules ont été traitées pendant 48 heures par du PS. L'étude *in vitro* de leurs cellules montre une diminution de la prolifération tumorale, de la viabilité et une augmentation de l'apoptose après traitement. Cela suggère un rôle antitumoral sur les gliomes murins du tronc cérébral. Les auteurs concluent également, après comparaison du traitement de cellules portant H3.3K27M ou H3 sauvage, que la mutation n'a pas d'impact sur l'effet du PS *in vitro* à la fois dans les cellules murines et dans les cellules humaines DIPG. En revanche, les résultats obtenus *in vivo* diffèrent par rapport à ceux de Grasso *et al.* Un traitement à court terme des souris génétiquement modifiées (20 mg/kg pendant 5 jours puis sacrifice) induit une diminution de la prolifération et une augmentation de l'acétylation de l'histone H3. Mais dans ces tumeurs il n'y a pas d'induction de l'apoptose après analyse sur coupe histologique. De plus, le traitement à cette concentration est trop toxique. En effet, il conduit à la mort de 2 souris sur 7. Afin d'étudier le bénéfice sur la survie moyenne, les souris génétiquement modifiées ou les souris NOD-SCID implantées avec des cellules de gliomes humains ont été traitées selon un protocole fixe. L'un des premiers obstacles rencontrés par l'équipe a été de trouver une concentration efficace mais non toxique pour les souris. Malgré une administration de 20 mg/kg 2 fois par semaine (arrêt du traitement quand les souris ont atteint un point limite), aucun bénéfice sur la survie des souris génétiquement modifiées n'a été observé. De plus, l'implantation orthotopique des cellules DIPG humaines et le traitement par le PS (10 mg/kg 3 fois/semaine pendant 4 semaines ou 5 jours de traitement puis 2 jours sans traitement pendant 2 cycles), ne démontrent pas de prolongement de la survie (Hennika *et al.*, 2017), contrairement à ce qui a été décrit dans la publication de Grasso *et al.* La toxicité trop importante du PS dans cette étude est l'une des conséquences de l'absence d'effets chez ces souris. L'hypothèse est que l'utilisation de faibles doses de PS, du fait de sa toxicité, induirait une résistance au traitement. En effet, la publication de Grasso *et al.* montre que les cellules développent une résistance au PS *in vitro* après seulement 3 semaines de traitement à une dose correspondant à l'IC₅₀ de ces cellules. Il faut noter que les cellules DIPG implantées ne sont pas les mêmes que dans la publication de Grasso *et al.* et le passage cellulaire pourrait induire des différences de réponse aux traitements (sélection de clones plus agressifs) (Hennika *et al.*, 2017). Une des leçons à retenir de cet article est la toxicité trop importante du PS. Cela conduit à envisager un traitement combinatoire pour utiliser des concentrations moindres de PS.

La publication de Nagaraja *et al.* fait ressortir l'intérêt de combiner le PS avec des inhibiteurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle (Nagaraja *et al.*, 2017). Le traitement des cellules *in vitro* par la combinaison du PS avec un inhibiteur de BRD4 (JQ-1) ou de CDK7 (THZ1) a un effet synergique sur la viabilité des cellules. JQ-1 est un inhibiteur des bromodomains (voir chapitre II paragraphe II-2.2) et THZ1 est un inhibiteur de CDK7 impliqué dans la régulation de la phosphorylation de l'ARN polymérase II contrôlant l'initiation et l'élongation de la transcription. Alors que les cellules résistantes au traitement par le PS sont aussi résistantes au traitement par JQ-1, les cellules demeurent sensibles au THZ1. Cela indique que le PS et JQ-1 agissent sur l'altération des mêmes voies de signalisation. Il est donc préférable d'utiliser la combinaison PS/THZ1 par rapport à la combinaison PS/JQ-1 qui pourrait engendrer une résistance au traitement des cellules (Nagaraja *et al.*, 2017). Enfin, Grasso *et al.* ont montré que l'association de l'inhibiteur des histones déméthylases GSK-J4 avec le PS a un effet synergique sur la diminution de la viabilité cellulaire sur des lignées DIPG H3.3K27M (Grasso *et al.*, 2015). L'association du PS avec d'autres agents thérapeutiques est une alternative pour éviter la toxicité et la résistance.

Ces études montrent que le PS peut être efficace *in vitro* mais les résultats obtenus *in vivo* sont controversés. De plus, la publication de Hennika *et al.* montre une forte toxicité de cet agent (Hennika *et al.*, 2017). Néanmoins, la combinaison du PS avec d'autres thérapies ciblées est une alternative pour l'utilisation du PS à plus faible dose et pour limiter l'émergence de résistance.

4.4.b. Délivrance du PS au niveau du tronc cérébral

Dans le modèle orthotopique de souris développé par Grasso *et al.*, la concentration du PS dans le tronc cérébral après administration intrapéritonéale était de 200 nM 30 min après injection (Grasso *et al.*, 2015). Sachant que l'IC₅₀ *in vitro* est de 100 nM pour la plupart des lignées DIPG, la présence du PS à 200 nM dans le tronc cérébral (>IC₅₀) permet de penser qu'il pourrait être effectif. D'autre part, sa présence dans le tronc cérébral permet de supposer qu'il a pu passer la BHE après injection par voie intrapéritonéale d'une concentration de 20mg/kg. Dans le modèle de souris génétiquement modifiées décrit plus haut, l'étude pharmacocinétique montre que la drogue atteint le tronc cérébral après injection par voie intrapéritonéale (concentration d'environ 500 nM). Pour cette étude, ils ont traité les souris à 20 mg/kg pendant 3 jours et les ont sacrifiées 4 heures après le dernier traitement (Hennika *et al.*, 2017). La BHE pourrait être altérée dans ces deux modèles murins de DIPG.

En revanche, chez les patients atteints de DIPG la BHE est relativement intact (Schroeder *et al.*, 2014)

La synthèse d'un composé PS radio-marqué permet de suivre la distribution de la drogue en utilisant la tomographie par émission de positons (PET). Le PS radiomarké avec le fluoride-18 est similaire au PS non modifié : il induit la diminution de la viabilité cellulaire, acétyle les histones H3 sur des lignées de DIPG et est très peu soluble dans l'eau tout comme le PS non modifié. L'injection de ce composé dans des souris, dont la BHE est intact, montre de très bonnes diffusion et localisation dans le cerveau après injection par CED. Au contraire, très peu de ^{18}F -panobinostat est retrouvé au niveau du cerveau après injection intrapéritonéale ou intraveineuse (figure 20). Cela montre que le PS ne passe pas la BHE chez ces souris. En revanche, l'injection par CED focalise le traitement dans le cerveau (Kommidi *et al.*, 2018).

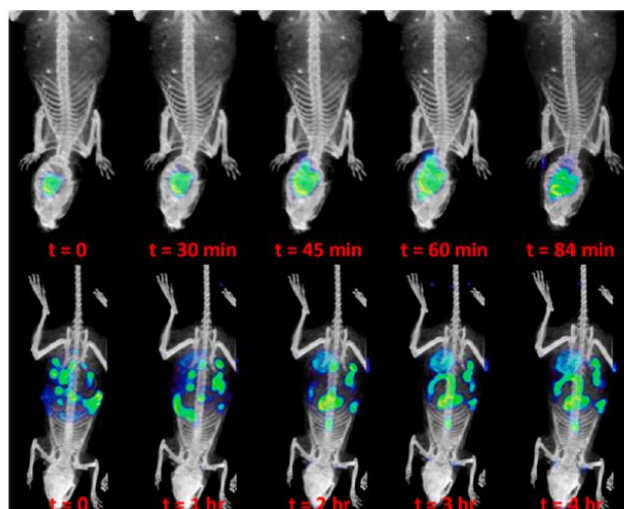


Figure 20 : Distribution du composé radiomarké ^{18}F -panobinostat en temps réel après injection par CED (haut) ou par voie intrapéritonéale (bas).
(Kommidi *et al.*, 2018)

Le PS est très peu soluble dans l'eau. Cette propriété physico chimique indique qu'il est un mauvais candidat pour l'administration par CED (El-Khouly *et al.*, 2017). C'est pourquoi une équipe a développé des nano-micelles solubles, capables de transporter et de diffuser le PS dans le cerveau. La formule, nommée P407, mélangée à un liquide cérébro-spinal artificiel n'est pas toxique pour les neurones et les cellules gliales *in vitro* et *in vivo* chez le rat. L'injection des nano-micelles directement dans le cerveau par CED n'est pas mortelle et 100 % des rats survivent 50 jours après l'injection. Un modèle de gliome de rat

démontre 100 % de survie chez les rats traités par une seule injection de nano-micelles associées au PS et 0 % de survie chez les rats non traités (Singleton *et al.*, 2017). Une alternative à l'utilisation du PS par injection en CED est de rendre la molécule soluble dans l'eau. Cette formule, testée chez le porc et le rat juvénile, ne montre pas de neuro-toxicité après 14 jours (concentration en excès). Ce procédé est en essai clinique pour le traitement des DIPG (NCT03566199) (Singleton *et al.*, 2018).

4.4.c. Essai clinique dans le traitement des DIPG par le PS

Deux cas cliniques ont été présentés suite au traitement par PS en combinaison avec l'irradiation au cours d'un essai clinique. Les deux cas ont pris un traitement oral 3 fois par semaine, pendant 2 semaines suivies d'une semaine sans traitement. Le cas 1 présentait une dégradation physique importante mais l'augmentation de la dose ainsi que la ré-irradiation a permis de diminuer les symptômes pendant 4 mois. Le second cas présentait les mêmes signes cliniques avec une amélioration des symptômes après le co-traitement. Chez ces deux patients, le traitement par le PS augmente l'acétylation de l'histone H4 dans les cellules mononucléaires du sang périphérique. Le traitement a été bien toléré malgré une thrombocytopénie pour le premier cas mais qui n'a pas nécessité de traitement supplémentaire. La survie globale de ces patients a été de 13 et 14 mois. Cette étude suggère un effet radio-sensibilisant du PS après radiation des patients (Wang *et al.*, 2017b).

IV. Conclusion

La dérégulation de l'épigénétique pourrait expliquer l'altération de certaines voies de signalisation impliquées dans de nombreux cancers. En effet, l'épigénétique est au cœur de la régulation des processus cellulaires. Les inhibiteurs de la régulation épigénétique comme les HDACi montrent des effets antitumoraux sur différentes lignées cancéreuses. L'un des inhibiteurs épigénétiques les plus efficaces dans le traitement des DIPG est le panobinostat, un inhibiteur des histones désacétylases. En effet, des études précliniques montrent une inhibition de la croissance cellulaire dans des lignées DIPG, malgré des contradictions sur le bénéfice de survie. Il est important de noter que la voie d'injection est primordiale dans le traitement par le PS. Cette drogue non soluble est potentiellement incapable de traverser la BHE. C'est pourquoi, des études ont développé des mécanismes de délivrance au niveau du tronc cérébral par technique de CED. L'utilisation du PS associée à d'autres molécules est la

plupart du temps beaucoup plus efficace et permet d'éviter l'émergence de mécanismes de résistance. La toxicité du PS est un facteur majeur à prendre en compte dans l'élaboration de thérapies combinées.

Chapitre III : EBP50 et IRSp53, deux protéines adaptatrices

Ces deux protéines sont dites adaptatrices ou d'échafaudage du fait de leurs multiples interactions avec d'autres protéines ce qui permet leur organisation spatiale en complexes cellulaires afin de coordonner leurs activités (Good *et al.*, 2011). Ces protéines jouent un rôle important dans la régulation des voies de signalisations cellulaires, ce qui suggère qu'elles jouent un rôle dans les processus tumoraux (Garbett et Bretscher, 2014).

I. EBP50

1. Généralités

Identifiée il y a 20 ans, EBP50 a été découverte comme un corégulateur de l'échangeur sodium-hydrogène 3 (NHE3) localisé dans la membrane de la bordure en brosse de l'épithélium rénal de lapin (Weinman *et al.*, 1995). Elle a également été découverte dans le placenta humain au niveau des microvillosités (Reczek *et al.*, 1997). Elle a d'abord été nommée « Na^+/H^+ exchanger regulatory factor 1 » (NHERF-1). Sa grande affinité pour la protéine ezrin, appartenant à la famille Ezrin Radixin Moesin/Merlin (ERM), lui a donné son deuxième nom, EBP50 pour « ERM-Binding Phosphoprotein 50 » (Vaquero *et al.*, 2017).

Par définition, EBP50 est une protéine d'échafaudage ou autrement dite adaptatrice, c'est-à-dire qu'elle va induire la liaison entre deux protéines (ou plus) par l'intermédiaire de ses domaines nommés PDZ (« post-synaptic density protein / Drosophila disc large tumor suppressor / zonula occludens1 protein ») (Vondriska *et al.*, 2004). Le nom PDZ est un acronyme des 3 premières protéines découvertes contenant ce domaine. C'est le domaine le plus communément rencontré lors du séquençage du génome (440 PDZ pour 259 protéines chez l'Homme) (Hung et Sheng, 2002). Les protéines contenant ce domaine sont classées en trois familles. La première, à laquelle appartient EBP50, comporte des protéines contenant 2 à 10 domaines PDZ. Les membres de la famille MAGUKS (« membrane-associated guanylate kinases, including PSD-95, Dlg, et ZO-1 ») possèdent un à 3 domaines PDZ, un domaine SH3 et un domaine kinase guanylate. La troisième famille comprend d'autres domaines non classés en plus de domaines PDZ (Nourry *et al.*, 2003).

Les PDZ peuvent se lier aux séquences en C-terminal des protéines cibles et plus rarement sur des séquences internes. Les premières interactions décrites sont celles entre les deux domaines PDZ de la protéine PSD-95 et le canal « Shaker-type K⁺ » (Kim *et al.*, 1995) ou le récepteur NMDAR (N-méthyl-D-aspartate) (Kornau *et al.*, 1995). En parallèle, la protéine tyrosine phosphatase FAP a été décrite comme étant capable d'interagir avec le récepteur de mort cellulaire Fas et d'inhiber son activité à l'aide de son domaine PDZ (Hung et Sheng, 2002 ; Sato *et al.*, 1995). Les PDZ ont une structure commune composée de six feuillets β et de deux hélices α (Hung et Sheng, 2002). Les domaines de liaison au PDZ sont multiples et varient selon la spécificité des PDZ. En effet, ces derniers sont classés en 25 groupes différents selon la nature des résidus du PDZ où se lie le ligand (Nourry *et al.*, 2003). Grâce à la capacité des PDZ à se lier à de courtes séquences, la structure et la fonction générale des protéines cibles ne sont pas perturbées (Hung et Sheng, 2002). Certaines de ces protéines PDZ agissent en tandem ou encore par dimérisation interdomaine ou intradomaine (Subbaiah *et al.*, 2011). La phosphorylation régule les interactions PDZ-protéine en augmentant ou diminuant leur affinité (Subbaiah *et al.*, 2011). En conclusion, la formation de ces complexes protéiques régule l'activité membranaire (transporteur ou récepteur) et les voies de signalisation qui en découlent. En effet, ces protéines à domaine PDZ agissent sur l'activité des protéines, leur stabilité ainsi que leur localisation cellulaire (Good *et al.*, 2011 ; Vaquero *et al.*, 2017).

EBP50 appartient à la famille des protéines à domaine PDZ, NHERF. Cette famille contient 4 membres : NHERF-1/EBP50, NHERF-2/E3KARP, NHERF-3/PDZK1 et NHERF-4/IKEPP. L'analyse des séquences génétiques indique que ces protéines sont phylogénétiquement proches (Vaquero *et al.*, 2017). Les protéines NHERF-3 et 4 comportent 4 domaines PDZ, alors que les deux autres n'en contiennent que 2. Ce domaine interagit avec les 4 derniers résidus de la chaîne carboxy-terminale des protéines cibles grâce à sa séquence en acides aminés très conservée. La protéine EBP50 peut interagir avec plus de 30 protéines (voir figure 21). Son rôle dans la cellule est donc très complexe qui s'ajoutent aux mécanismes d'action qu'elle contrôle selon sa localisation cellulaire (Georgescu *et al.*, 2016).

2. Expression

EBP50 est une protéine ubiquitaire, plus ou moins exprimée dans les tissus. Elle est la plus abondante dans le foie, les glandes salivaires, l'intestin grêle et le rein chez l'Homme (Vaquero *et al.*, 2017 ; Yun *et al.*, 1997). Physiologiquement, la protéine EBP50 est localisée au niveau de la membrane plasmique des cellules et plus précisément au niveau apical des cellules épithéliales. Elle a aussi été retrouvée dans le noyau des cellules épithéliales durant la division cellulaire (Boratkó *et al.*, 2012). L'expression de la protéine n'est pas restreinte aux cellules épithéliales car elle est aussi présente dans les cellules vasculaires, les cellules gliales (cellules épendymaires et astrocytes), les ostéoblastes, les cellules hématologiques et les cellules immunitaires (lymphocytes, neutrophiles et macrophages) (Vaquero *et al.*, 2017).

3. Structure

Elle est codée par le gène “*Solute carrier family 9 isoform A3 regulatory factor 1*” (SLC9A3R1) qui est localisé sur le chromosome humain 17q25.1 contenant 6 exons. C'est une protéine de 358 acides aminés qui se caractérise par la présence de 2 domaines PDZ (PDZ1 des acides aminés 11 à 97 et PDZ2 des acides aminés 150 à 237) et une région de liaison aux ERM (EB) au niveau C-terminal (figure 21). Ces domaines PDZ partagent 74 % d'identité (Centonze *et al.*, 2018).

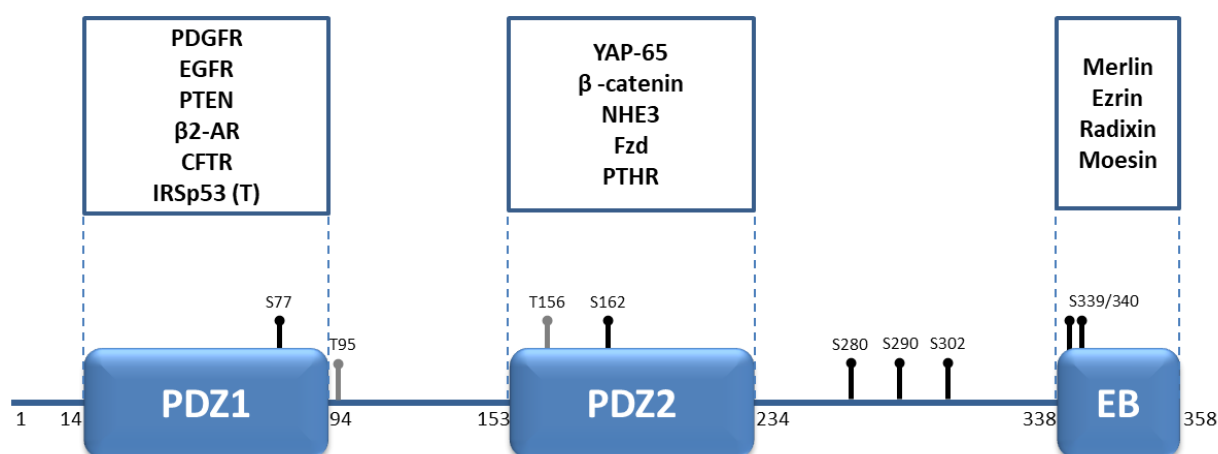


Figure 21 : Structure de la protéine EBP50 et ses partenaires protéiques.

Les sites de phosphorylation de la protéine ont été annotés (S= sérine et T=Thréonine). PDGFR : Platelet-derived growth factor receptor, EGFR : Epidermal growth factor receptor, PTEN : Phosphatase and tensin homolog, β2-AR : récepteur β2-adrénergique, CFTR : cystic fibrosis trans-membrane conductance regulator, IRSp53 : insulín receptor substrate p53, YAP : Yes-associated protein, NHE3 : échangeur sodium-hydrogène 3, Fzd : récepteur Frizzled, PTHR : récepteur de l'hormone parathyroïdienne.

4. Rôle physiologique

4.1. Formation des microvillosités

EBP50 est enrichie au niveau apical des microvillosités et permet ainsi la polarisation des cellules épithéliales de nombreux tissus (reins, intestin, foie et placenta). Ces microvillosités sont souvent retrouvées dans les cellules riches en protéines ERM (Reczek *et al.*, 1997). Ces dernières permettent la formation de complexes protéiques pour se lier à la membrane plasmique ainsi qu'au cytosquelette d'actine. Plus précisément, Ezrin fait le lien entre EBP50, par l'intermédiaire de son domaine EB et le cytosquelette d'actine (Garbett *et al.*, 2010). EBP50 relie le complexe à la membrane grâce à des sites de liaison du cholestérol par son domaine PDZ1 (figure 22) (Centonze *et al.*, 2018 ; Sheng *et al.*, 2012). Les souris EBP50^{-/-} ont des défauts de structure de la membrane de la bordure en brosse des cellules intestinales similaires aux souris Ezrin^{-/-} (Morales *et al.*, 2004b ; Saotome *et al.*, 2004). Cette publication montre l'importance d'EBP50 et d'Ezrin dans la formation des microvillosités et la maintenance de la polarité des cellules épithéliales (Morales *et al.*, 2004a).

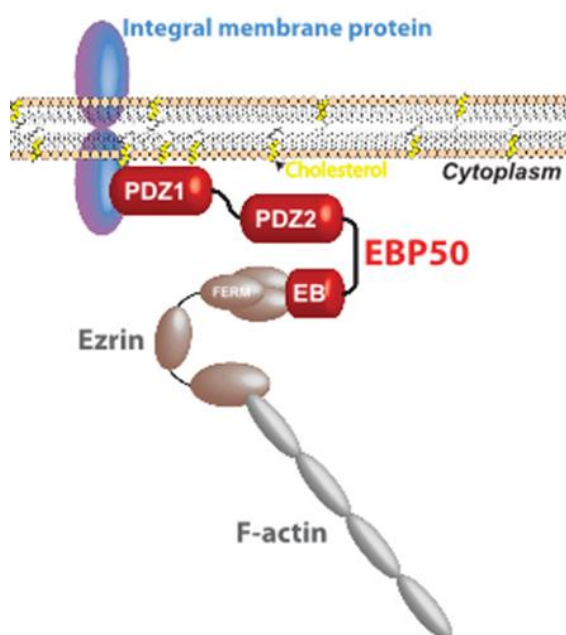


Figure 22 : EBP50, protéine adaptatrice entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine.
(Vaquero *et al.*, 2017)

4.2. L'homéostasie ionique assurée par EBP50

Cette protéine joue un rôle très important dans l'homéostasie ionique. Elle interagit avec plusieurs transporteurs qui sont importants dans la régulation de l'absorption et de la sécrétion des ions par les cellules épithéliales. Elle permet leur localisation à la membrane apicale tout comme la régulation de leurs activités (Broadbent *et al.*, 2017). Son rôle n'est pas

limité et elle est capable de réguler plusieurs voies de signalisation. Certains mécanismes sont décrits ci-dessous.

4.2.a. Régulation des ions sodium

La première fonction qui a été décrite est la régulation de l'absorption du sodium au niveau de la membrane de la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'intestin et des reins. EBP50 forme des complexes protéiques qui induisent la phosphorylation de l'échangeur sodium-hydrogène 3 (NHE3). Cette phosphorylation est catalysée par la protéine kinase A (PKA) qui, elle-même, est activée par l'AMP cyclique (AMPc). Cela entraîne l'inhibition de l'activité de NHE3 au niveau du tubule proximal du rein et des entérocytes et donc la diminution de l'absorption du sodium par NHE3 (figure 23) (Weinman *et al.*, 2005).

Le récepteur β 2-adrénergique (β 2-AR), présent aussi à la membrane apicale, se lie à EBP50 par le biais du domaine PDZ1. Cette liaison est importante pour sa stabilisation. En effet, il est recyclé à la membrane et n'est pas dégradé par les lysosomes. Ce récepteur active la production d'AMPc ce qui conduit à l'activation de PKA et en parallèle à l'augmentation du transport du sodium par NHE3 (figure 23). Malgré l'accumulation d'AMPc, qui normalement inhibe l'activité de NHE3, le récepteur peut capter EBP50 à ses côtés et permet ainsi l'activation de NHE3. Il est à noter que la mutation du récepteur β 2-AR qui ne peut plus se lier à la protéine EBP50 induit la diminution de l'activité de la protéine NHE3 (Broadbent *et al.*, 2017).

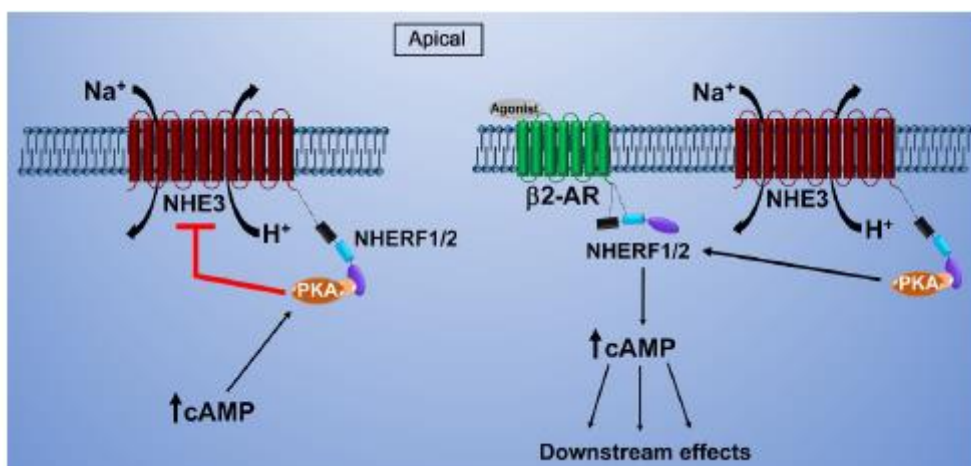


Figure 23 : Les récepteurs β 2-AR permettent indirectement l'activation des échangeurs NHE3.

EBP50/NHERF-1 se lie au canal NHE3 par son domaine PDZ. L'augmentation de l'AMP cyclique (cAMP) permet l'activation de la kinase PKA, la phosphorylation de NHE3 et son inactivation. En revanche, l'expression du récepteur β 2-AR permet de recruter EBP50 à son niveau et ainsi d'inhiber la régulation induite sur NHE3 malgré l'accumulation d'AMP cyclique (Broadbent *et al.*, 2017).

4.2.b. Régulation de la réabsorption des phosphates

L'homéostasie du phosphate est régulée par la réabsorption au niveau du tubule proximal rénal au travers de la membrane apicale grâce à un transporteur sodium-phosphate de type II (Npt2a). Npt2a possède en C-terminal un domaine de liaison au domaine PDZ1 d'EBP50. Cette interaction permet la localisation du co-transporteur au pôle apical des cellules épithéliales du tubule proximal et l'augmentation de la réabsorption des phosphates. En revanche, la phosphorylation de EBP50 au niveau de S77 induit la dissociation du complexe et la dégradation de la protéine Npt2a par les lysosomes. Ce processus serait régulé indirectement par le récepteur de l'hormone parathyroïdienne (PTHrP). La PTHrP régule négativement l'activité de Npt2a, ce qui conduit à inhiber le transport du phosphate (sécrétion dans les urines). PTHrP est lui-même capable d'interagir avec la protéine EBP50 (Broadbent *et al.*, 2017 ; Weinman *et al.*, 2010).

4.2.c. Régulation du transport des ions chlorure

EBP50 joue un rôle important dans la sécrétion et l'absorption d'ions par le rein, l'intestin mais aussi les poumons. Elle interagit au niveau membranaire en se liant aux récepteurs couplés aux protéines G. CFTR ("cystic fibrosis trans-membrane conductance regulator") est un canal qui permet le transport des ions chlorure et bicarbonate. EBP50 régule sa localisation au niveau de la membrane plasmique et module son activité (Short *et al.*, 1998). En effet, EBP50 permet la liaison indirecte de CFTR à PKA par le biais de son domaine EB. Ainsi, CFTR est activé par phosphorylation et induit la sécrétion des ions Cl⁻ (Broadbent *et al.*, 2017 ; Lamprecht et Seidler, 2006 ; Weinman *et al.*, 2005).

4.3. Régulation de la voie PI3K-Akt

La voie de signalisation PI3K-Akt est impliquée dans différents processus tels que la croissance, la survie et la prolifération cellulaires ainsi que l'angiogenèse. La plupart des protéines de cette voie sont des gènes suppresseurs de tumeurs ou des proto-oncogènes qui, une fois mutés, engendrent le développement d'un processus tumoral. La voie PI3K-Akt est induite par l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase (ex : PDGF, EGFR) par fixation de leur ligand. À la suite de cette activation, la protéine kinase PI3K se lie au récepteur et permet de phosphoryler le composé PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate). Ce composé recrute Akt à proximité de la membrane plasmique où elle est alors phosphorylée et activée par la protéine PDK1

(“phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1”). Les membres de cette voie de signalisation interagissent avec EBP50 et sont décrits ci-après :

4.3.a. Régulation de PTEN et PHLPP

EBP50 interagit avec le récepteur PDGFR (Maudsley *et al.*, 2000), Akt (Wang *et al.*, 2008), PTEN (suppresseur de tumeur) (Takahashi et Suzuki, 2010) et PHLPP (suppresseur de tumeur) (Molina *et al.*, 2012). EBP50 se lie au récepteur PDGFR et recrute PTEN à la membrane plasmique. Cette dernière supprime l’activation d’Akt en dé-phosphorylant le composé PIP3. PTEN est aussi stabilisée grâce à son interaction avec EBP50 et n’est donc pas dégradée par le protéasome. En revanche, si la protéine PTEN est phosphorylée, elle perd son affinité pour EBP50 et ne se retrouve plus au niveau membranaire (Centonze *et al.*, 2018). EBP50 se lie à PTEN mais aussi à PHLPP, protéine qui compense la perte de PTEN dans les cellules et qui permet l’inactivation d’Akt (Gao *et al.*, 2005). L’interaction EBP50-PHLPP induit la localisation du complexe au niveau de la membrane et PHLPP peut ainsi déphosphoryler Akt (Vaquero *et al.*, 2017).

4.3.b. Régulation d’EGFR

EGFR est un membre de la famille des récepteurs à tyrosine kinase et sa surexpression est impliquée dans différents types de cancers car il permet d’activer la croissance cellulaire, la survie et la migration. Le domaine PDZ1 d’EBP50 se lie au récepteur d’EGFR et stabilise la protéine à la membrane (figure 24) (Lazar *et al.*, 2004). En revanche, d’autres publications démontrent que la surexpression d’EBP50 inhibe l’autophosphorylation du récepteur et supprime la prolifération des cellules cancéreuses en inhibant l’activation des protéines en aval, ERK1/2 et Akt (Clapéron *et al.*, 2012 ; Vaquero *et al.*, 2017 ; Yao *et al.*, 2012).

4.4. Voie de signalisation Wnt et β -caténine

En l’absence de Wnt, la β -caténine cytoplasmique est dégradée par le protéasome après sa phosphorylation. La liaison de Wnt à son récepteur Frizzled (Fzd) conduit à l’inhibition de la phosphorylation de la β -caténine et à sa translocation dans le noyau. La translocation de la β -caténine et l’interaction avec les facteurs de transcription TCF/LEF au niveau de l’ADN permet l’activation de l’expression de gènes souvent oncogéniques (figure 24) (MacDonald *et al.*, 2009).

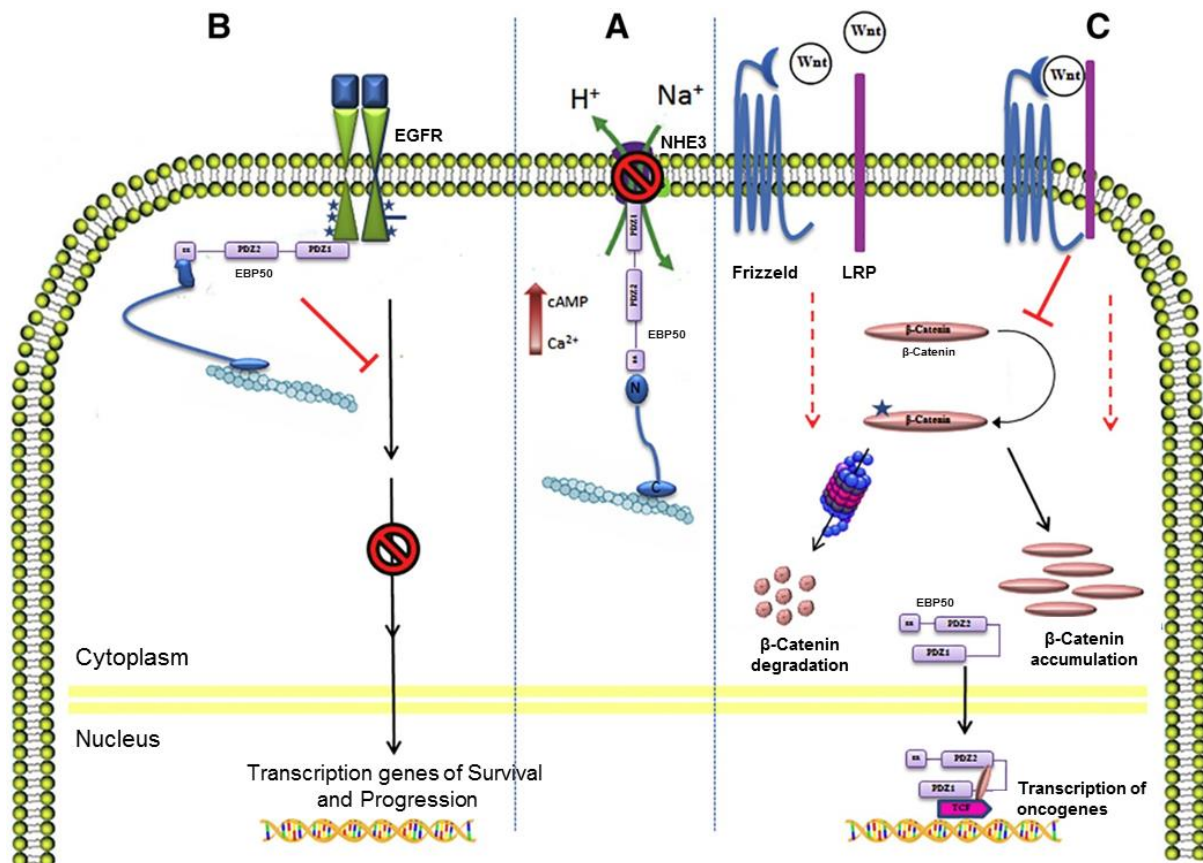


Figure 24 : Les différentes voies régulées par EBP50.

A) Inhibition du canal NHE3 par l'interaction avec EBP50 et la phosphorylation de NHE3. B) Rôle de suppresseur de tumeur au niveau cytoplasmique en régulant négativement le récepteur EGFR impliqué dans la prolifération cellulaire. C) Rôle oncogénique d'EBP50 par importation de la β -caténine et de lui-même dans le noyau. La formation d'un complexe EBP50/ β -caténine/TCF permet la transcription de gènes oncogéniques. Adaptée de Centonze *et al.*, 2018.

La majorité des récepteurs Fzd sont capables d'interagir avec la protéine EBP50 puisqu'elles contiennent un domaine de liaison au PDZ2. Cette interaction inhibe l'activation de la voie Wnt (Wheeler *et al.*, 2011).

La β -caténine, qui est une protéine importante dans les jonctions cellulaires, se lie au domaine PDZ2 d'EBP50 (Vaquero *et al.*, 2017). EBP50, proche de la membrane, maintient les jonctions intercellulaires par stabilisation du complexe E-cadhérine/ β -caténine. En effet, l'inhibition de l'expression d'EBP50 dans des fibroblastes embryonnaires murins conduit à la délocalisation de la β -caténine de la membrane vers le cytoplasme et à une diminution de l'interaction β -caténine/E-cadhérine (Kreimann *et al.*, 2007). Toutefois, la β -caténine agit aussi comme un "facteur de transcription" dans la voie de signalisation Wnt. La protéine EBP50 nucléaire, en se liant avec la β -caténine, induit la régulation positive de la voie de signalisation Wnt (Centonze *et al.*, 2018 ; Shibata *et al.*, 2003). Selon sa localisation dans les

compartiments cellulaires, il semble qu'EBP50 puisse à la fois activer la voie de signalisation Wnt par la β -caténine mais aussi l'inactiver. Quand EBP50 est présente au niveau de la membrane plasmique, elle permet de maintenir les jonctions cellulaires et inhibe l'activité des récepteurs Fzd (figure 24) (Lin *et al.*, 2012b ; Wheeler *et al.*, 2011).

4.5. EBP50 et motilité cellulaire

Les cellules musculaires lisses vasculaires ont un phénotype contractile. Elles ne prolifèrent pas et elles ne migrent pas. En revanche, après stimulation par un stress mécanique ou une inflammation, ces cellules ont un phénotype proliférant et migrant. La diminution d'EBP50 par ARN interférence, après un test de blessure, montre une fermeture de la blessure plus rapide que dans les cellules contrôles. Les cellules migrent plus vite après diminution du niveau de la protéine. La déplétion d'EBP50 dans ces cellules induit un changement dans leur architecture avec un profil plutôt migratoire et une perte des adhésions focales, une augmentation des microtubules au niveau de projections de la membrane et la formation de lamellipodes. L'interaction d'EBP50 permet de maintenir les fibres de myosine IIa qui sont importantes dans le contrôle de la migration. Dans une publication de 2011, Baeyens *et al.* concluent qu'EBP50 se lie à l'acto-myosine et au réseau de microtubules pour contrôler leur distribution dans la cellule (Baeyens *et al.*, 2011). De plus, dans les cellules HeLa, EBP50 se lie à l' α -actinine-4, ce qui entraîne la régulation de l'assemblage des filaments d'actine. La surexpression de l' α -actinine-4 est impliquée dans l'invasion des cellules cancéreuses (Honda *et al.*, 2005). EBP50 augmente l'ubiquitination de l'actinine et sa dégradation, ce qui a pour conséquence le désassemblage du cytosquelette d'actine. Les auteurs en concluent qu'EBP50 pourrait réguler l'invasion et les métastases des cellules tumorales en se liant à l' α -actinine-4 (Sun *et al.*, 2016).

4.6. Immunité et inflammation

EBP50 est exprimée dans les cellules de l'immunité. Le complexe Ezrin-EBP50 ainsi que d'autres protéines au niveau du TCR des lymphocytes T seraient impliquées dans l'inhibition de ces cellules (diminution de la production de l'interleukine 2) (Stokka *et al.*, 2010). De plus, EBP50 est impliquée dans la dégranulation des mastocytes (cellules immunitaires impliquées dans les réactions allergiques et les chocs anaphylactiques). L'inhibition d'EBP50 dans les mastocytes conduit à une diminution de la dégranulation de ces cellules (Subramanian *et al.*, 2012). Enfin, EBP50 agit sur l'inflammation. En effet, NF- κ B augmente l'expression d'EBP50 dans des conditions inflammatoires et à son tour, EBP50

permet la propagation du signal NF- κ B. EBP50 est capable de promouvoir le recrutement des macrophages et l'expression de molécules d'adhésion après blessure d'un vaisseau (Leslie *et al.*, 2013). Elle interagit aussi avec le récepteur de chimiokines CXCR2 présent sur les polynucléaires neutrophiles (PNN) et permet de faire la liaison avec son substrat PLC- β 2. Ce complexe protéique induit la migration trans-épithéliale des PNN associés à l'inflammation (Wu *et al.*, 2012).

4.7. Phénotypes après invalidation du gène *SLC9A3R1* chez la souris

Après déplétion d'EBP50, l'étude histologique des différents organes de souris mâles (100 % des cas) ou de souris femelles (25 % des cas) ne met pas en évidence de différences morphologiques par rapport aux souris contrôles (Shenolikar *et al.*, 2002). La réabsorption des phosphates au niveau du tubule rénal est diminuée chez les souris EBP50^{-/-} à cause de la diminution de Npt2. Ces souris présentent aussi un défaut de l'échangeur NHE3 par une altération d'expression de l'AMPc. La quantité de récepteur CTFR est aussi diminuée dans l'intestin de ces souris (Broere *et al.*, 2007). De plus, l'élimination du calcium et de l'acide urique dans les urines est plus importante chez ces souris et la minéralisation des os est beaucoup plus faible (Cunningham *et al.*, 2007 ; Seidler *et al.*, 2009 ; Shenolikar *et al.*, 2002 ; Weinman *et al.*, 2003). Contrairement à ce qui est décrit dans cette publication Morales *et al.* n'ont pas retrouvé d'anomalies chez les souris femelles après déplétion de EBP50 (Morales *et al.*, 2004a). En revanche, ils confirment la diminution des phosphates chez ces souris. Les protéines ERM sont diminuées dans les membranes du rein et de l'intestin. Toutefois, l'altération de l'organisation des microvillosités n'est retrouvée qu'au niveau intestinal (Morales *et al.*, 2004a). L'intestin et le côlon de ces souris sont significativement plus longs et ce phénomène est associé à une hyperplasie lymphoïde (Georgescu *et al.*, 2016). L'expression de la β -caténine est diminuée au niveau apical dans les cellules épithéliales intestinales de ces mêmes souris (Kreimann *et al.*, 2007).

En plus d'une altération de la réabsorption du phosphate et de la membrane en brosse de l'intestin, les souris développent une hydrocéphalie non obstructive par la dilatation des 3^{ème} et 4^{ème} ventricules cérébraux. EBP50 est exprimée au niveau apical des épendymocytes (cellules ciliées, barrière entre le liquide céphalo-rachidien et le système nerveux). L'altération du mouvement des cils de ces cellules explique le développement de l'hydrocéphalie chez ces souris (Georgescu *et al.*, 2015).

Ces souris déficientes pour la protéine EBP50 présentent une hyperplasie dans les glandes mammaires associée à une augmentation de l'activation d'Akt et de la β -caténine dans le noyau (Wheeler *et al.*, 2011). Une autre étude montre une absence de développement des cellules de la glande mammaire chez les souris KO en lactation. EBP50 stabilise le récepteur à la prolactine PRLR au niveau basal des cellules alvéolaires mammaires et permet ainsi la production de lait (Morales *et al.*, 2012).

Enfin, ces souris développent des anomalies des faisceaux des cils cochléaires conduisant à des troubles de l'audition (Kamiya *et al.*, 2014).

Ces résultats montrent l'importance de EBP50 dans la sécrétion et la réabsorption des ions mais aussi le rôle primordial qu'elle joue dans la polarité cellulaire dont la perte est souvent associée au développement de pathologies.

5. Régulation de la protéine EBP50

5.1. Régulation de l'expression génétique

Au niveau du promoteur du gène *SLC9A3R1*, il existe plusieurs éléments de réponse aux œstrogènes, qui eux-mêmes se lient aux récepteurs des œstrogènes (ER) pour initier la transcription du gène. EBP50 est donc soumise à une régulation hormonale par les œstrogènes et il est l'un des gènes répondant au récepteur des œstrogènes (Ediger *et al.*, 1999 ; Ediger *et al.*, 2002)

La régulation épigénétique d'EBP50 par les HDACi a été peu étudiée. Le traitement de précurseurs d'ostéoblastes MC3T3 par le SAHA, la trichostatin A, l'acide valproïque, la molécule MS-275 ou le PS induit l'expression d'EBP50. L'augmentation de l'expression a été validée par RT-qPCR et analyse western blot (Dudakovic *et al.*, 2013 ; Kremer *et al.*, 2015 ; Schroeder *et al.*, 2007). Les HDAC sont donc des régulateurs négatifs de l'expression du gène *SLC9A3R1*.

5.2. Régulation post-traductionnelle

La protéine peut s'auto-associer avec son domaine PDZ1 lui permettant ainsi d'accroître sa capacité à former des complexes protéiques (Fouassier *et al.*, 2000 ; Shenolikar *et al.*, 2001). De plus, elle peut s'autoinhiber par changement de conformation. En effet, elle

peut se replier sur elle-même grâce à l'interaction intramoléculaire entre le domaine PDZ2 et le domaine C-terminal EB. Cette conformation inhibe la liaison avec les ligands des domaines PDZ2 et EB mais aussi des domaines PDZ1. C'est donc une forme dormante de la protéine qui est retrouvée dans le cytoplasme. L'autoinhibition est levée à la suite de la fixation des protéines ERM sur le domaine EB (Centonze *et al.*, 2018 ; Morales *et al.*, 2007).

EBP50 et ses ligands peuvent aussi être régulés par la phosphorylation des thréonines ou des sérines de la protéine (figure 21). La phosphorylation par PKC des S339 et S340 (Li *et al.*, 2007) ou la phosphorylation par Akt de T156 (Song *et al.*, 2015) inhibe l'interaction des domaines PDZ2 et EB d'EBP50. Ces phosphorylations rendent ainsi les domaines accessibles à leurs cibles. La phosphorylation varie selon le cycle cellulaire. En effet, Cdc2 phosphoryle EBP50 sur des S280 et S302 pendant la mitose (He *et al.*, 2001). La phosphorylation par Akt de T156 permet aussi la fixation et la stabilisation de la protéine "S-phase kinase-E3 ligase" (Skp2) dans le cytoplasme. Skp2 est importante dans le maintien de l'activité du cycle cellulaire car elle inhibe les protéines p21 et p27, protéines régulatrices du cycle cellulaire (Song *et al.*, 2010).

La phosphorylation joue aussi un rôle dans la localisation cellulaire de EBP50. Quand S162, S339 et S340 sont phosphorylées par PKC, EBP50 est délocalisée au niveau du cytoplasme (Vaquero *et al.*, 2017). La protéine ne contient pas de signal de localisation nucléaire or elle est également retrouvée dans le noyau des cellules. La phosphorylation de T156 par la "p90 ribosomal S6 kinase" (RSK1) serait impliquée dans sa relocalisation dans le noyau (Lim et Jou, 2016). Alors que la déphosphorylation par la phosphatase PRL-3, la "phosphatase regenerating liver-3", induit l'export du noyau vers le cytoplasme (Fang *et al.*, 2015), la mutation ponctuelle de T156 d'EBP50 induit une diminution de la croissance tumorale après implantation en sous cutanée de cellules HeLa dans des souris NOD-SCID. RSK1 est une protéine impliquée dans la voie de signalisation pro-tumorale RAS/ERK et elle est elle-même activée par ERK. Cela explique pourquoi la translocation dans le noyau d'EBP50 est souvent associée à la prolifération et à la transformation tumorale (Lim et Jou, 2016).

6. Mutations

Le gène *SLC9A3R1* peut être muté et certaines mutations sont retrouvées par exemple dans le cancer du sein. Les mutations K172N et D301V induisent une affinité moins

importante pour le suppresseur de tumeurs PTEN et donc altèrent la formation du complexe PTEN/EBP50/PDGFR β impliqué dans la régulation de la voie PI3K/AKT (Centonze *et al.*, 2018 ; Cheng *et al.*, 2013). La mutation E43G inhibe la liaison entre le récepteur EGFR et EBP50 et induit l'activation d'ERK1/2 et d'Akt (Du *et al.*, 2016a). La mutation A190D induit la localisation nucléaire de la protéine (Yang *et al.*, 2017).

7. Rôle en cancérologie

EBP50 est impliquée dans plusieurs interactions protéine-protéine qui sont liées à des processus cancéreux. Le rôle joué par EBP50 dans le cancer est déterminé par sa localisation cellulaire et par la fonction des protéines qui interagissent avec elle. Physiologiquement, la protéine EBP50 est localisée au niveau de la membrane plasmique et associée avec le cytosquelette d'actine mais elle est aussi retrouvée au niveau nucléaire ou cytoplasmique dans certains cancers. La protéine est de plus en plus étudiée dans la formation des cancers et ces études explorent en majorité le rôle d'EBP50 dans le cancer du sein, le cancer colorectal et les tumeurs du SNC.

7.1. Cancer du sein

Durant la progression tumorale du cancer du sein, l'expression d'EBP50 au niveau cytoplasmique est augmentée dans les grades les plus invasifs et les tissus métastatiques (Cardone *et al.*, 2007 ; Malfettone *et al.*, 2012 ; Mangia *et al.*, 2009 ; Stemmer-Rachamimov *et al.*, 2001). Cela suggère un rôle important d'EBP50 dans le développement et la progression tumorale (Mangia *et al.*, 2009). Dans la publication de Du *et al.* les auteurs montrent qu'EBP50 est plus fortement exprimée dans les tissus du cancer du sein invasif par rapport au tissu sain d'un même patient et cette expression est associée à des caractéristiques cliniques agressives et un pronostic défavorable (Du *et al.*, 2016b). Une mutation ponctuelle retrouvée chez un patient, Y24S, repositionne la protéine du cytoplasme vers le noyau et confère des propriétés oncogéniques à la protéine (Du *et al.*, 2016b). Une autre mutation de la protéine EBP50, A190D, a été découverte qui induit aussi la relocalisation de la protéine dans le noyau. Cela entraîne l'augmentation de la prolifération cellulaire et de la migration des cellules tumorales. EBP50 mutée diminue la phosphorylation de la protéine "Yes-associated protein", YAP augmente la localisation nucléaire de cette dernière et ainsi permet l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération des cellules du cancer

du sein agressif (Yang *et al.*, 2017). EBP50 étant régulée par les œstrogènes, sa présence est donc liée au niveau d'expression des ER (Ediger *et al.*, 1999 ; Karn *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2007 ; Stemmer-Rachamimov *et al.*, 2001). EBP50 n'est pas seulement exprimée dans les cancers du sein positifs pour ER, mais également dans le cytoplasme des cellules négatives pour ER (Mangia *et al.*, 2011). Il existe donc un autre mécanisme qui induit l'expression et la délocalisation de la protéine dans les cancers négatifs pour ER.

La localisation subcellulaire de la protéine est un facteur de pronostic important dans le cancer du sein. EBP50 agit comme un oncogène dans le cytoplasme ou le noyau et comme un suppresseur de tumeur lorsqu'il est présent au niveau membranaire. Les cancers du sein non invasifs sont corrélés à un faible taux d'expression d'EBP50 (Li *et al.*, 2014 ; Pan *et al.*, 2006 ; Pan *et al.*, 2008 ; Song *et al.*, 2007 ; Wheeler *et al.*, 2011). L'induction de la surexpression d'EBP50 membranaire dans les cellules du cancer du sein non invasif diminue la prolifération des cellules. Elle agit sur l'inhibition de l'autophosphorylation du récepteur EGFR par interaction directe. L'hypothèse est que cette interaction pourrait masquer le site de phosphorylation d'EGFR et inhiber l'activation d'ERK1/2 et d'Akt (Yao *et al.*, 2012). Pan *et al.* ont mis en évidence une augmentation de la dégradation de p-Akt après augmentation de l'expression d'EBP50. La voie PI3K-Akt semble donc être aussi importante dans le cancer du sein (Pan *et al.*, 2008). De plus, la xénogreffe de cellules T47D KO pour EBP50 chez la souris induit une augmentation de la croissance tumorale (Pan *et al.*, 2006). La surexpression d'EBP50 dans les cellules du cancer du sein diminue l'adhérence des cellules à la fibronectine et inhibe ainsi la migration et l'invasion des cellules. Les métastases qui se développent ont besoin que la matrice soit dégradée par des enzymes protéolytiques telles que la métalloprotéase matricielle 2, MMP-2. L'inhibition de l'expression d'EBP50 augmente l'activité de MMP-2, ce qui suggère qu'EBP50 inhibe le développement des métastases en supprimant l'activité de la métalloprotéase MMP-2 (Li *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2017a).

Comme décrit précédemment, EBP50 est capable d'inhiber la voie de signalisation Wnt et d'inhiber la translocation dans le noyau de la β -caténine. Dans des souris EBP50^{-/-}, les chercheurs ont noté une augmentation de la prolifération et de la densité du canal mammaire corrélées à une augmentation de l'activation de la β -caténine. Dans cette étude, l'expression d'EBP50 est négativement corrélée à l'activation de la β -caténine dans la voie Wnt (Wheeler *et al.*, 2011).

7.2. Cancer colorectal

La voie Wnt/ β -caténine est activée dans 90 % des cancers colorectaux (CCR). L'expression apicale d'EBP50 est perdue dans les adénomes et est remplacée par une surexpression de la protéine au niveau cytoplasmique dans les carcinomes du CCR. L'inhibition d'EBP50 membranaire dans des cellules épithéliales intestinales conduit à l'expression nucléaire de la β -caténine qui contribue à l'EMT, et à l'augmentation de la migration et de l'invasion. L'expression cytoplasmique d'EBP50 est associée à une augmentation de la prolifération cellulaire (Hayashi *et al.*, 2010). Mais une localisation cytoplasmique et nucléaire plus précoces ont également été observées au cours du développement de la tumeur (Mangia *et al.*, 2012). La localisation nucléaire d'EBP50 est associée à l'expression de HIF-1 α dans les métastases lymphatiques et de TWIST 1 (impliqué dans l'EMT) dans les tumeurs invasives. Ils font l'hypothèse qu'EBP50 serait impliquée dans un changement du phénotype invasive vers un phénotype métastatique (Georgescu *et al.*, 2014 ; Mangia *et al.*, 2012 ; Opinto *et al.*, 2017). Dans le CCR, la β -caténine est retrouvée dans le noyau. Elle est impliquée dans l'activation aberrante des facteurs de transcription TCF/LEF. EBP50 se lie au facteur de transcription TCF et permet ainsi de faciliter l'interaction entre la β -caténine et le TCF (Lin *et al.*, 2012b). Saponaro *et al.* ont montré récemment que l'inhibition de la β -caténine par shARN induit la surexpression d'EBP50 qui, à son tour, induit la phosphorylation d'ERK1/2, de p27 (inhibiteur du cycle cellulaire) et des marqueurs d'autophagies (Saponaro *et al.*, 2018). Il semblerait que cette surexpression permettrait la survie des cellules après déplétion de la β -caténine par un phénotype cytotatique. La double inhibition β -caténine/EBP50 induit un switch des cellules de l'autophagie vers l'apoptose. L'utilisation d'un composé nommé RS5517 (3-benzyl-5-chloro-N-(4-(hydroxyméthyl) phenyl)-1H-indole-2-carbox-amide) permet de délocaliser la protéine EBP50 du noyau vers le cytoplasme, sans changer la concentration protéique. Cette molécule se lie au niveau du PDZ1 d'EBP50. Le traitement des cellules de CCR KO pour la β -caténine avec RS5517, induit une cytotoxicité. Ce résultat montre l'importance de la localisation d'EBP50 dans ces cellules (Saponaro *et al.*, 2018).

Une étude récente décrit une augmentation du niveau de méthylation du promoteur *SLC9A3R1* dans le CCR. La voie de signalisation Wnt augmente le niveau de DNMT1 (ADN méthyl-transférase) qui à son tour inhibe l'expression du gène *SLC9A3R1* par l'hyperméthylation. Dans cet article, la diminution de l'expression d'EBP50 est associée au développement du CCR (Guo *et al.*, 2018).

En conclusion, la localisation nucléaire de la protéine dans le CCR est associée à un haut-grade histologique et à un pronostic défavorable (Vaquero *et al.*, 2017).

7.3. Glioblastome

La protéine PTEN est mutée dans 20 à 40 % des glioblastomes multiformes (GBM). EBP50 est normalement présente dans les astrocytes au niveau membranaire. Dans le GBM, EBP50 perd sa localisation membranaire et entraîne la phosphorylation et l'activation d'Akt. L'utilisation d'ARN interférents contre EBP50 induit une inhibition de la prolifération. L'inactivation de PTEN a peu d'effet sur l'activité d'Akt (Kislin *et al.*, 2009). En revanche, la diminution à la fois de PTEN/EBP50 et de PTEN/PHLLP induit l'augmentation de l'activité d'Akt et de la tumorigénicité. La protéine EBP50 joue un rôle important dans la régulation de la voie de signalisation PI3K-Akt dans le GBM (Molina *et al.*, 2012 ; Molina *et al.*, 2010).

L'expression d'EBP50 est augmentée dans les cellules de GBM mais sa surexpression est la plus importante dans les bords invasifs de la tumeur (Kislin *et al.*, 2009). La diminution de l'expression par ARN interférence provoque la diminution de la migration des cellules et l'augmentation de l'adhésion cellulaire. L'effet pro-invasif d'EBP50 est caractérisé par la présence des fibres de stress et d'adhésions focales, caractéristiques des cellules migratoires. Dans la publication, l'atténuation de l'expression d'EBP50 permet de sensibiliser les cellules au témozolomide (interfère avec la réplication de l'ADN) (Kislin *et al.*, 2009).

7.4. Autres cancers

EBP50 est relocalisée au niveau du cytoplasme dans le cancer de la prostate (Bartholow *et al.*, 2011). Son inhibition par sh-ARN induit la diminution de la prolifération, de la migration et l'augmentation du nombre de cellules en apoptose grâce à la diminution de la quantité de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Dans ce type de cancer, la surexpression de EBP50 est associée à un processus oncogénique (Ma *et al.*, 2016).

L'induction de la surexpression de EBP50 dans le cancer du pancréas inhibe la croissance cellulaire et augmente l'apoptose des cellules en diminuant la quantité de Bcl-2 *in vitro* et *in vivo*. EBP50 a donc un effet antitumoral dans le cancer du pancréas (Ji *et al.*, 2014).

EBP50 est exprimée au niveau apical des hépatocytes et des cholangiocytes (Fouassier *et al.*, 2009). En revanche, dans le carcinome hépatocellulaire, sa quantité est augmentée et elle est localisée dans le cytoplasme et/ou le noyau (Shibata *et al.*, 2003). Elle joue un rôle

dans la prolifération des cholangiocytes grâce à sa relocalisation dans le cytoplasme et le noyau, processus régulé positivement par les œstrogènes (Fouassier *et al.*, 2009). Dans le cholangiocarcinome, il a été montré que la perte de la localisation membranaire de EBP50 active EGFR et induit la prolifération cellulaire et l'EMT. La perte de la localisation membranaire modifierait la voie Wnt et la localisation nucléaire de la β -caténine (Centonze *et al.*, 2018 ; Clapéron *et al.*, 2012).

8. Conclusion

En conclusion, les divers rôles de EBP50 reflètent des mécanismes d'action complexes. Ses fonctions ne dépendent pas uniquement des interactions avec les autres protéines, mais également de sa localisation et des sites de phosphorylation qui engendrent soit sa relocalisation soit un changement d'affinité pour certaines protéines. EBP50 étant une protéine adaptatrice, elle peut se lier à différents types de protéines et induire des effets aussi bien suppresseurs de tumeurs qu'oncogéniques. La relocalisation de EBP50 au niveau cytoplasmique ou nucléaire est toujours associée à un phénotype cancéreux.

II. IRSp53

1. Généralités

IRSp53 pour "insulin receptor substrate p53" est une protéine adaptatrice qui a été découverte en tant que substrat du récepteur à l'insuline (Yeh *et al.*, 1996). Elle possède de multiples domaines qui permettent l'interaction entre protéines membranaires et cytosquelette d'actine. En effet, elle est capable d'interagir avec les filaments d'actine, les petites GTPases telles que Cdc42 ("cell division control protein 42 homolog"), des protéines de régulation de l'actine et des protéines à domaine PDZ. C'est pourquoi, IRSp53 est une protéine régulatrice de la formation des filopodes et des lamellipodes qui sont des structures de déformation de la membrane plasmique impliquées dans la motilité cellulaire (figure 25). Elle joue aussi un rôle dans la régulation de la dynamique de l'actine au niveau des synapses excitatrices et des épines dendritiques (Kang *et al.*, 2016).

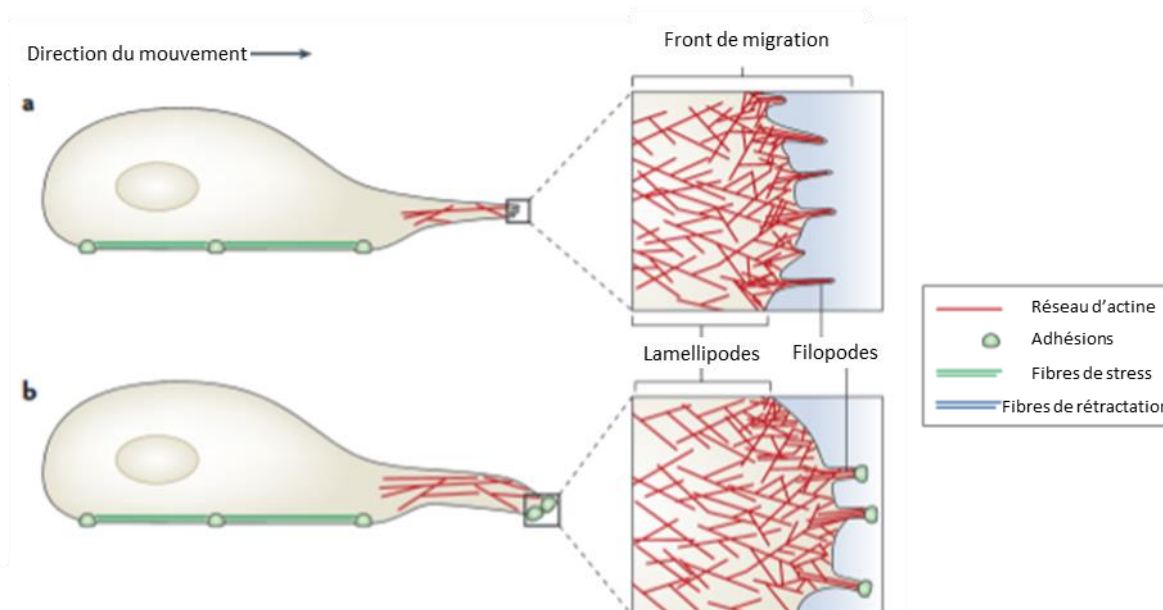


Figure 25 : Formation des filopodes et des lamellipodes durant la migration cellulaire. (Mattila et Lappalainen, 2008)

2. Expression

Le plus haut niveau d'expression d'IRSp53 est dans le cerveau et plus précisément le cortex, le striatum, le cervelet et l'hippocampe (Bockmann *et al.*, 2002). Mais la protéine est aussi exprimée dans d'autres tissus tels que les poumons, le foie, la rate et les testicules. Au niveau subcellulaire, la protéine est localisée sous la membrane plasmique (Kang *et al.*, 2016).

3. Structure

IRSp53 est codée par le gène *BAIAP2* ("brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2") qui se situe sur le chromosome 17q25 et est constitué de 17 exons. La protéine contient de multiples domaines d'interaction (figure 26) :

- Un domaine IMD ("IRSp53-Missing in metastasis homology Domain") ou I-BAR ("Inverse-Bin-Amphiphysins Rvs")
- Un domaine CRIB-PR ("Cdc42-Rac interactive binding-proline rich")
- Un domaine SH3 ("Src homology")
- Un domaine de liaison potentiel au domaine WW riche en tryptophane
- Un domaine WH2 ("Wiscott-Aldrich Syndrome Protein homology 2")
- Un domaine de liaison au PDZ (PDZ-B)

Il existe au total 4 variants chez l'Homme, les formes S, L, M et T, qui diffèrent uniquement au niveau de leur C-terminal (figure 26). L'isoforme S contient un domaine PDZ-B alors que l'isoforme L contient un domaine WH2. Ces deux isoformes sont exprimées en majorité dans le cerveau. L'isoforme M contient un domaine WH2 tronqué. La forme T, la plus courte, contient un domaine PDZ-B potentiel et n'est exprimée que dans les cellules cancéreuses du sein (Okamura-Oho *et al.*, 2001 ; Scita *et al.*, 2008). Comme tous les variants ont en commun les 511 premiers acides aminés du côté N-terminal, on peut en conclure que la spécificité de fonction de chacun est portée par la région C-terminale.

La protéine a une structure similaire à celle d'autres protéines de la même famille qui contiennent un domaine I-BAR. Ces protéines sont IRTKS (Insulin Receptor Tyrosine Kinase ou BAIAP2L1) et BAIAP2L2 (Kang *et al.*, 2016).

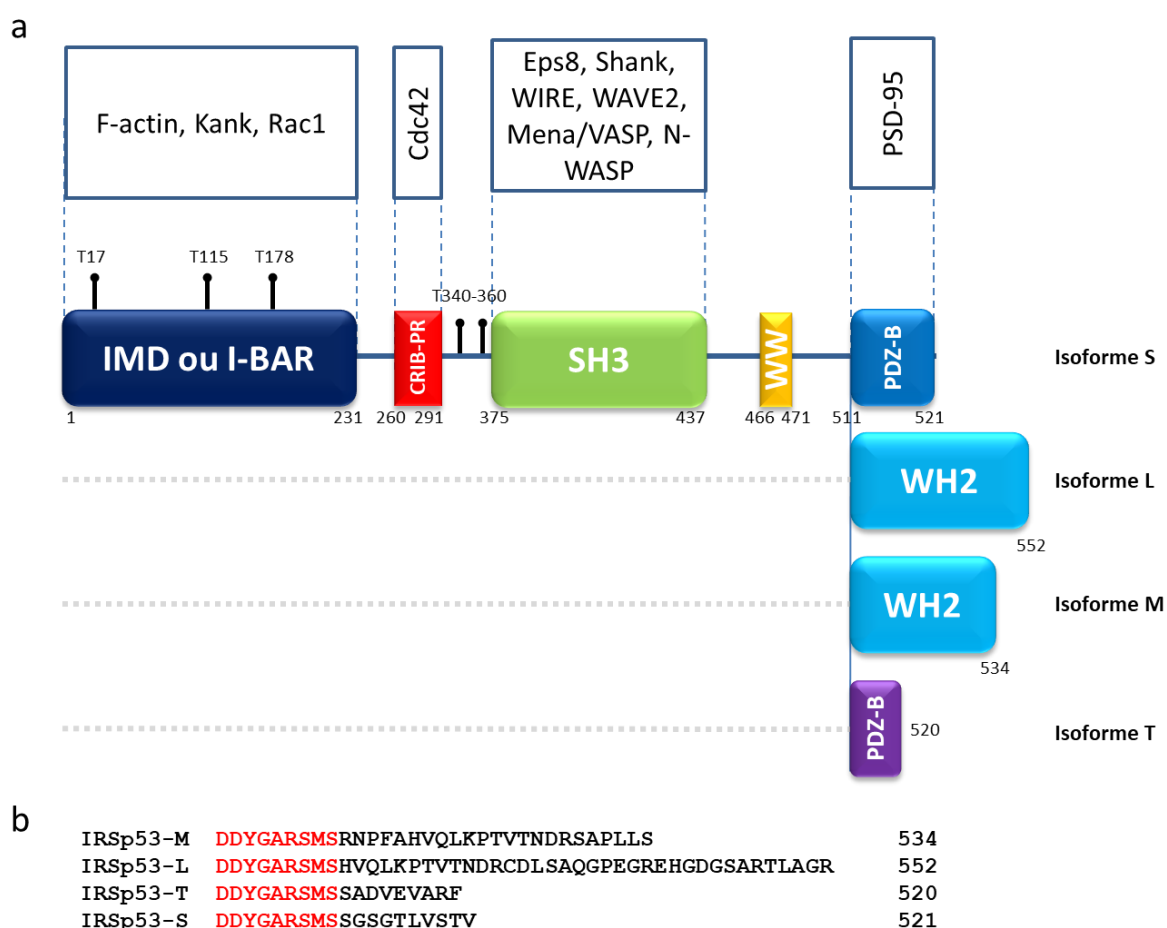


Figure 26 : Structure de la protéine IRSp53 et de ses variants.

a) Schéma représentatif de la structure d'IRSp53 et de ses différentes isoformes. b) Séquence en acide aminés en C-terminal des différentes isoformes. La séquence en rouge est conservée entre les 4 isoformes (Millard *et al.*, 2007).

3.1. Domaine IMD

La séquence du domaine IMD ainsi que sa structure sont proches du domaine BAR. En effet, le domaine IMD, appelé également Inverse-BAR (I-BAR), comporte 6 hélices courbées mais inversées comparées aux domaines BAR (Zhao *et al.*, 2011). Ce domaine est le plus conservé entre les différentes isoformes. Il se lie à la membrane plasmique riche en PIP2 ou PIP3 et permet ainsi la déformation de la membrane. De plus, il se lie aux filaments d'actine et participe à la formation des faisceaux. Par conséquent, le domaine IMD a donc un rôle prédominant dans les structures mobiles du cytosquelette d'actine et dans la motilité cellulaire. Ce domaine est capable d'interagir avec lui-même pour conduire à la dimérisation de la protéine (figure 27). La forme active ou inactive de la protéine Rac1 a une affinité pour ce domaine IMD (Kang *et al.*, 2016 ; Scita *et al.*, 2008). Rac ("Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate") fait partie de la famille des Rho GTPases et elle entraîne la formation des lamellipodes par le remodelage de la chromatine. Elle est souvent impliquée dans la formation des métastases (Benitah *et al.*, 2004).

3.2. Domaine CRIB-PR

C'est un domaine non conventionnel qui se lie à la protéine Cdc42 et à la protéine Rac, deux membres de la famille des Rho GTPases. Cdc42 et Rac permettent de réguler la morphologie cellulaire, la migration, l'endocytose et la progression du cycle cellulaire (Kang *et al.*, 2016 ; Scita *et al.*, 2008). Ce domaine contient une région riche en proline côté C-terminal qui est un site de liaison pour les domaines SH3.

3.3. Domaine SH3

IRSp53 peut s'auto-inhiber par homodimérisation au niveau du domaine IMR mais aussi par l'interaction des domaines SH3 et CRIB-PR (figure 27). La fixation de Cdc42 sur IRSp53 est donc indispensable pour permettre l'interaction des protéines avec le domaine SH3. La plupart des protéines qui interagissent avec ce domaine sont des protéines régulatrices de la polymérisation de l'actine (Kang *et al.*, 2016) :

- WAVE-2 ("WASP-Family verprolin homologous proteins") et N-WASP ("neural-Wiskott-Aldrich syndrome protein") sont des protéines impliquées dans l'activation du complexe de nucléation de l'actine Arp2/3.

- Eps8 (“Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8”) est une protéine de coiffe qui stoppe la polymérisation de l’actine. De plus, elle interagit avec le récepteur EGFR pour activer Rac (Lanzetti *et al.*, 2000).
- Ena/VASP (“Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein-like”) est une protéine anti-coiffe qui active la polymérisation de l’actine.
- mDia1 (“mammalian Diaphanous-related formin-1”) est une protéine de la famille des formines impliquée dans la nucléation de l’actine linéaire et non ramifiée, au contraire d’Arp2/3 (Goh *et al.*, 2012).

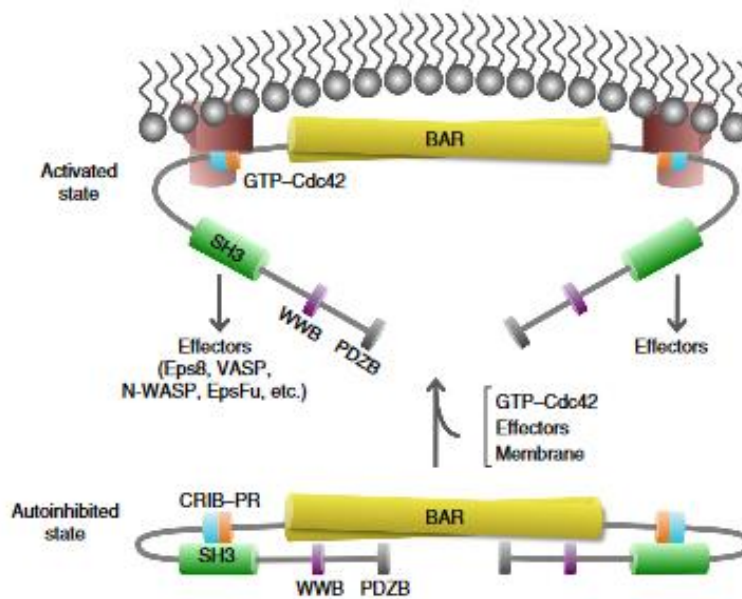


Figure 27 : Dimérisation et auto-inhibition de la protéine IRSp53
(Kast *et al.*, 2014)

3.4. Domaine WH2

En général, le domaine WH2 lie l’actine G au niveau de son N-terminal. En revanche, ce domaine n’est pas identique aux domaines WH2 connus et sa fonction n’est pas encore élucidée (Kang *et al.*, 2016 ; Lee *et al.*, 2007).

3.5. Domaine PDZ-B

PDZ-B est un domaine de liaison aux PDZ qui se lie aux protéines PSD-95 et -93 et permet la localisation synaptique de la protéine IRSp53. Ce domaine se lie aussi avec MALS/LIN-7, jouant un rôle dans la fonction et le développement des synapses, et il est

important dans l'adhésion des cellules entre elles (Kang *et al.*, 2016 ; Kast *et al.*, 2014 ; Scita *et al.*, 2008).

L'isoforme T de IRSp53 se lie au domaine PDZ1 de la protéine EBP50 grâce à son C-terminal. Elle est localisée au niveau des microvillosités et co-localise avec la protéine ezrin. En revanche, l'isoforme S qui possède un domaine PDZ-B ne peut pas se lier à EBP50 (Garbett *et al.*, 2013).

4. Rôle physiologique

IRSp53 a la capacité de déformer la membrane plasmique par l'interaction de son domaine I-BAR avec les régions de la membrane riches en PIP. Son rôle principal est l'interaction avec des protéines de régulation de l'actine afin de former des protrusions de la membrane et d'induire la motilité cellulaire. En effet, la surexpression de la protéine résulte dans l'augmentation de la formation des filopodes (Scita *et al.*, 2008). L'expression de la protéine dans des cultures de neurones régule positivement la formation des neurites, des dendrites et des épines dendritiques. En revanche, les résultats divergent selon la région du cerveau étudiée. IRSp53 a aussi un rôle dans l'endocytose indépendante de la clathrine et de la dynamine mais qui ne sera pas décrit ici (Sathe *et al.*, 2018).

4.1. Formation des filopodes

Les filopodes se caractérisent par une déformation de la membrane due à des faisceaux parallèles de filaments d'actine (figure 28). Ils ont un rôle de "reconnaissance" qui permet à la cellule l'exploration de son microenvironnement dans le but de se déplacer par les lamellipodes. La surexpression d'IRSp53 entraîne la formation de filopodes (Krugmann *et al.*, 2001 ; Nakagawa *et al.*, 2003) alors que la diminution de son expression inhibe la création de protrusions de la membrane (Disanza *et al.*, 2006 ; Scita *et al.*, 2008). La formation des filopodes est régulée par interaction directe avec la protéine Cdc42. Deux modèles ont été suggérés pour rendre compte du mécanisme de formation des filopodes car il existe des différences selon le type cellulaire étudié (Mattila et Lappalainen, 2008). En effet, dans les cellules de mélanome murin, la formation des filopodes se fait par la dérivation du réseau d'actine des lamellipodes (Svitkina *et al.*, 2003) alors que dans des fibroblastes humains, l'inhibition de la protéine Arp2/3, importante dans la formation des lamellipodes, n'empêche pas la formation de filopodes (Steffen *et al.*, 2006). Le premier modèle proposé est basé sur la

dérivation des filaments d'actine appartenant aux lamellipodes. Il serait plus spécifique des cellules en migration et dépendrait du complexe Arp2/3. Les faisceaux déjà existant seraient protégés des protéines de la coiffe par Ena/VASP et les faisceaux seraient allongés par les formines mDia (Ahmed *et al.*, 2010 ; Mattila et Lappalainen, 2008). Le second modèle s'appuie sur l'idée que les filopodes sont formés par les formines, protéines de nucléation autres qu'Arp2/3. Ce modèle décrit par Ahmed *et al.* serait plus spécifique de la formation des épines dendritiques dans les neurones (figure 28) (Ahmed *et al.*, 2010). L'activation de Cdc42 dans une région précise sous la membrane plasmique entraîne le recrutement d'IRSp53. Cette liaison permettra l'ouverture des dimères IRSp53 et la libération du domaine SH3. IRSp53 déforme la membrane plasmique à l'aide de son domaine I-BAR et interagit en parallèle avec les régulateurs de l'actine, Ena/VASP, N-WASP, WAVE, Eps8 et mDia (nucléation et élongation de l'actine) au niveau du domaine SH3. De plus, le domaine I-BAR, contenant un site de liaison à l'actine, focalise les filaments d'actine dans la protrusion (Ahmed *et al.*, 2010). Ces complexes protéiques permettent l'élongation de faisceaux d'actine et la formation du filopode.

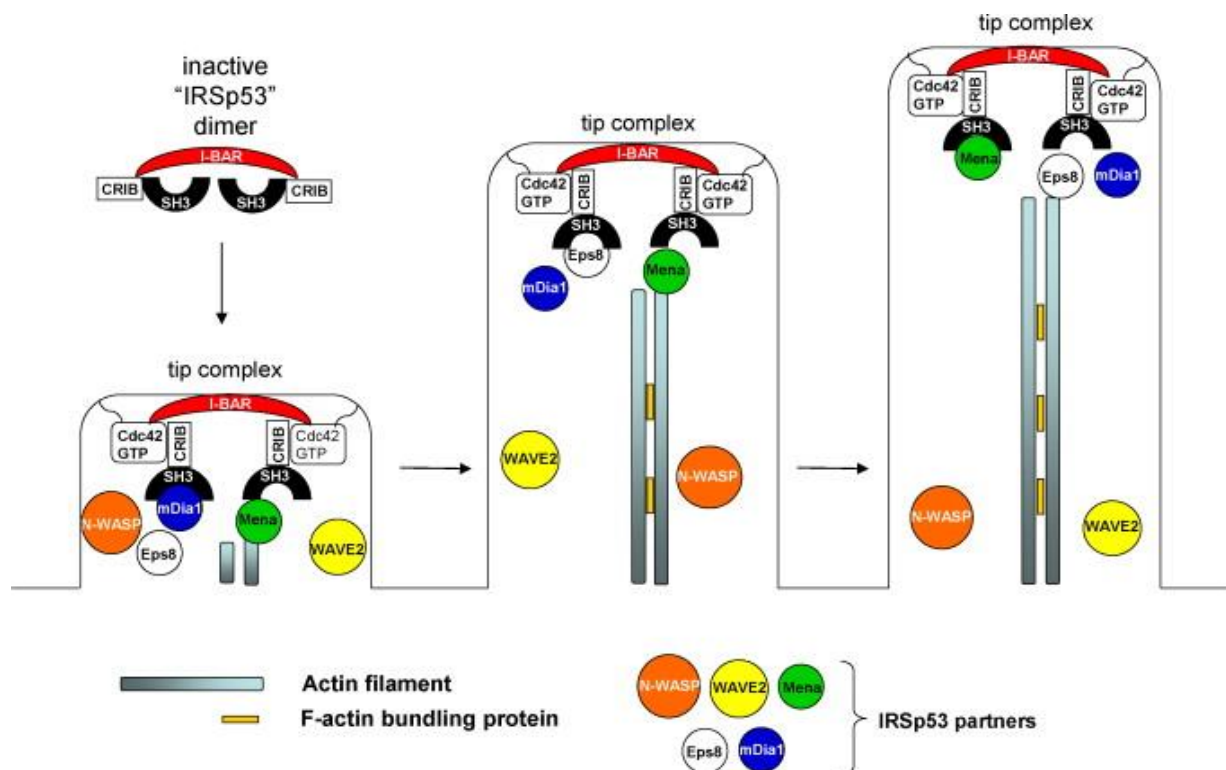


Figure 28: Formation des filopodes.
(Ahmed *et al.*, 2010)

4.2. Formation des lamellipodes

Les lamellipodes sont des structures typiques des cellules en migration. Ce sont des protrusions plates et larges de la membrane dont la structure d'actine est un réseau de mailles branchés et denses formé par le complexe Arp2/3 (figure 29). Au niveau du front de migration, les protéines doivent se coordonner pour maintenir la polymérisation de l'actine dirigée dans la direction du mouvement. La formation des lamellipodes est contrôlée par Rac, et plus précisément par l'interaction Rac-WAVE2-Arp2/3. IRSp53 se lie à la fois à Rac et à WAVE2 et permet ainsi de les recruter au niveau de la membrane plasmique. Ainsi WAVE2 induit la nucléation de l'actine par le complexe Arp2/3 et la formation des lamellipodes. IRSp53 peut aussi être un régulateur positif de Rac en s'associant avec Tiam1 ou avec le complexe Eps8-Sos1-ABi1. Tiam1 et ce complexe sont des activateurs de Rac (Scita *et al.*, 2008).

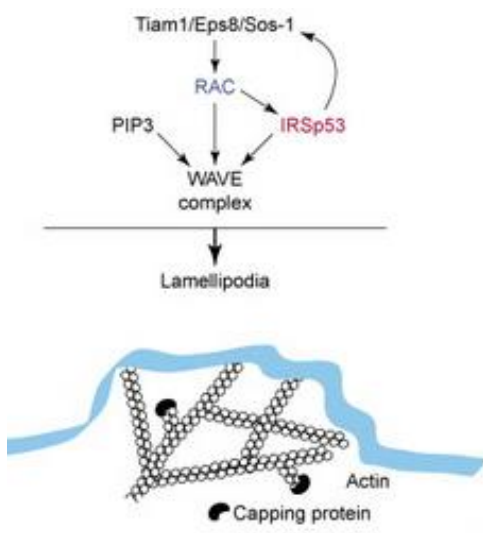


Figure 29 : Schéma récapitulant le rôle d'IRSp53 dans la formation des lamellipodes.

WAVE permet l'activation du complexe Arp2/3 et la polymérisation de l'actine sous forme d'un réseau de maille. La liaison de Rac, IRSp53 et PIP3 au complexe WAVE active la formation des lamellipodes. IRSp53 régule également la formation des lamellipodes en interagissant avec Tiam1, Eps8 et Sos-1) (Scita *et al.*, 2008).

4.3. Formation des synapses et transmission du signal

Les neurones sont caractérisés par des expansions cytoplasmiques à partir du corps cellulaire. Ces expansions, appelées neurites, peuvent former l'axone ou les dendrites. Durant la formation de ces prolongements, elles sont munies à leur extrémité d'un cône de croissance qui est une structure mobile très riche en actine. La formation des filopodes et des lamellipodes à partir de cette structure permet de guider le neurite vers sa cible (figure 30) (Mattila et Lappalainen, 2008). Les filopodes permettent aussi la création des épines dendritiques, région postsynaptique importante dans l'apprentissage et la mémoire (Mattila et

Lappalainen, 2008). Le remaniement de l'actine pour la formation des filopodes et des lamellipodes dans les neurites est dépendant de la présence d'IRSp53.

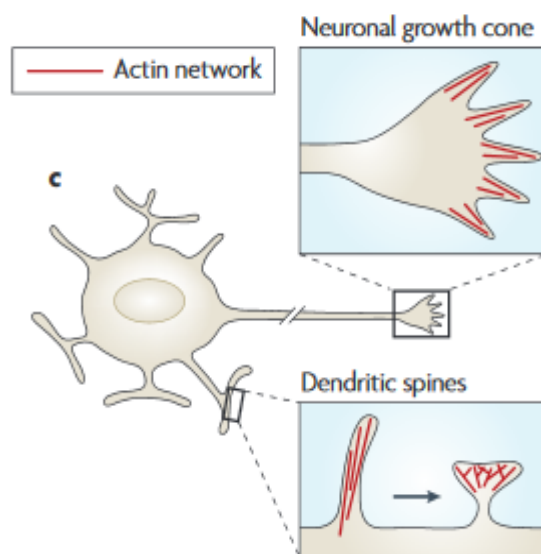


Figure 30: Rôle des filopodes dans les cellules neurales.

Les filopodes participent à la migration et à la distribution des cônes de croissance vers leur cible. Ils sont aussi les précurseurs des épines dendritiques, régions postsynaptiques. La maturation des épines dendritiques conduit à la formation de structures en forme de champignon (Mattila et Lappalainen, 2008).

4.3.a. Rôle dans le développement des synapses

La synapse est une zone de jonction caractérisée par la terminaison d'un neurone (élément présynaptique) qui entre en contact avec un autre neurone (élément postsynaptique). Les éléments postsynaptiques de la plupart des synapses sont des protrusions qui émanent d'une dendrite, nommées les épines dendritiques (Chua *et al.*, 2010). La protéine IRSp53 est le composant principal situé au niveau des éléments postsynaptiques mais aussi au niveau de la synapse excitatrice qui sont des structures riches en actine. La distribution de la protéine au niveau synaptique diffère selon la région du cerveau (Kang *et al.*, 2016). Dans l'hippocampe des souris IRSp53^{-/-}, il n'y a aucun changement morphologique des neurones alors que dans le cortex préfrontal, la présence d'épines dendritiques est diminuée. Le niveau d'IRSp53 est augmenté pendant les 3 premières semaines du développement post-natal chez le rat durant laquelle se déroule la synaptogenèse. Pendant la maturation des synapses les protéines s'accumulent au niveau postsynaptique (exemple : PSD-95). PSD-95 est une protéine importante pour l'ancrage des récepteurs à la membrane postsynaptique et elle interagit avec IRSp53 par son domaine PDZ. Cela permet l'interaction indirecte des récepteurs postsynaptiques avec le cytosquelette d'actine (figure 31) (Scita *et al.*, 2008). Shank-1, qui est

une protéine adaptatrice impliquée dans la morphogenèse des épines dendritiques, interagit avec le domaine SH3 de la protéine IRSp53. Ces interactions permettent la formation d'un pont entre la PSD-95 et Shank-1 (figure 30) (Choi *et al.*, 2005). L'interaction avec Tiam1 et Eps8, au niveau du domaine SH3 d'IRSp53, permet l'activation de Rac1, lui-même capable de se lier au domaine IMD de la protéine. IRSp53 est à la fois en dessous et au-dessus de la cascade de signalisation dépendant de Rac1 (Kang *et al.*, 2016). Cela induit la restructuration du faisceau d'actine permettant la formation des épines dendritiques (figure 30).

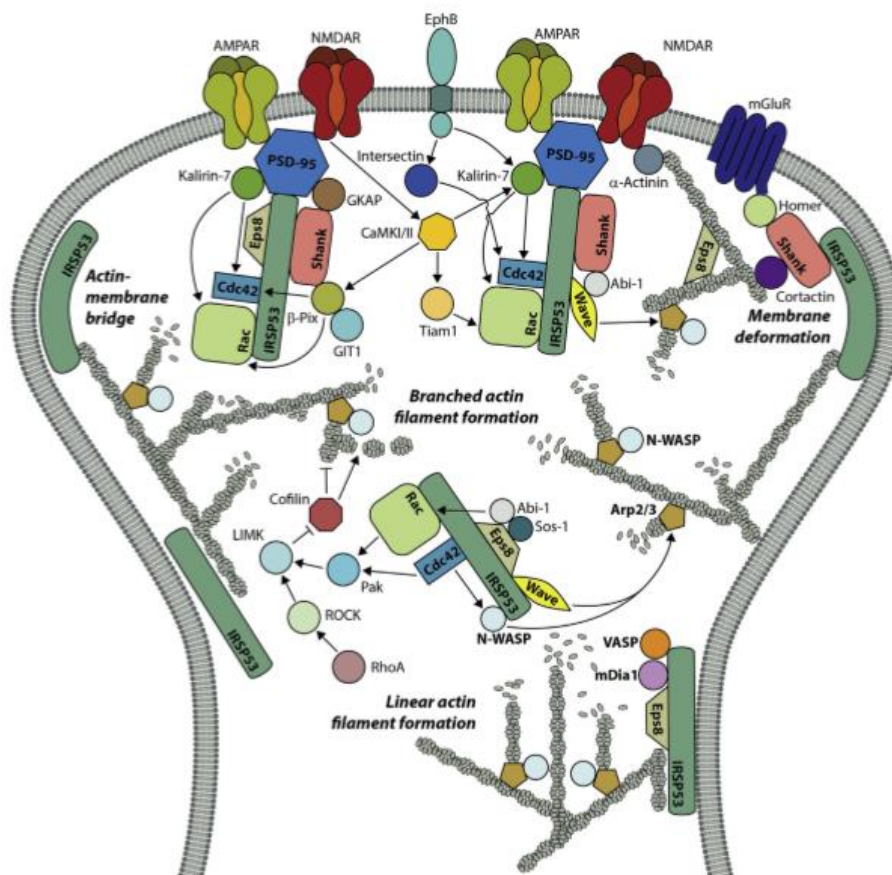


Figure 31 : Modèle du rôle d'IRSp53 dans le développement des épines dendritiques. (Kang *et al.*, 2016)

4.3.b. Rôle dans la transmission du signal synaptique

La protéine IRSp53 active la transmission synaptique *in vitro*. En revanche, le résultat est beaucoup plus contrasté dans l'étude de souris KO pour IRSp53. Selon la région du cerveau, l'inhibition de l'expression d'IRSp53 n'a pas les mêmes effets. Au niveau de l'hippocampe, le nombre de synapses ne varie pas mais il y a une diminution des fonctions des récepteurs NMDAR alors qu'au niveau de la région préfrontale du cortex, le nombre de

synapses est diminué avec une fonction normale de NMDAR. Les récepteurs NMDAR sont activés par le glutamate et la glycine au niveau postsynaptique et sont essentiels à la mémoire et à la plasticité synaptique. Dans l'hippocampe, l'inhibition d'IRSp53 augmente le nombre de NMDAR au niveau de la membrane synaptique en stabilisant et en ancrant le récepteur à la membrane (Kang *et al.*, 2016). Cela induit des problèmes d'apprentissage ainsi que des difficultés d'interaction sociale chez les souris IRSp53^{-/-}. Le traitement par des antagonistes de NMDAR permet de retrouver un comportement normal chez ces souris. IRSp53 est donc important dans la régulation du récepteur NMDAR au niveau postsynaptique et dans la transmission du signal. L'activité neuronale permet de réguler la distribution d'IRSp53 dans le neurone. En effet, l'activation du récepteur NMDAR est suffisante pour transférer IRSp53 au niveau postsynaptique après phosphorylation du domaine IMD par la protéine PKC (Dosemeci *et al.*, 2017 ; Kang *et al.*, 2016). La localisation au niveau de la membrane plasmique permet la dépolymérisation de l'actine et la relocalisation du récepteur NMDAR hors région postsynaptique (figure 32). Les souris IRSp53^{-/-} présentent des réseaux d'actine stables dans les synapses qui empêchent la relocalisation du récepteur (Kang *et al.*, 2016).

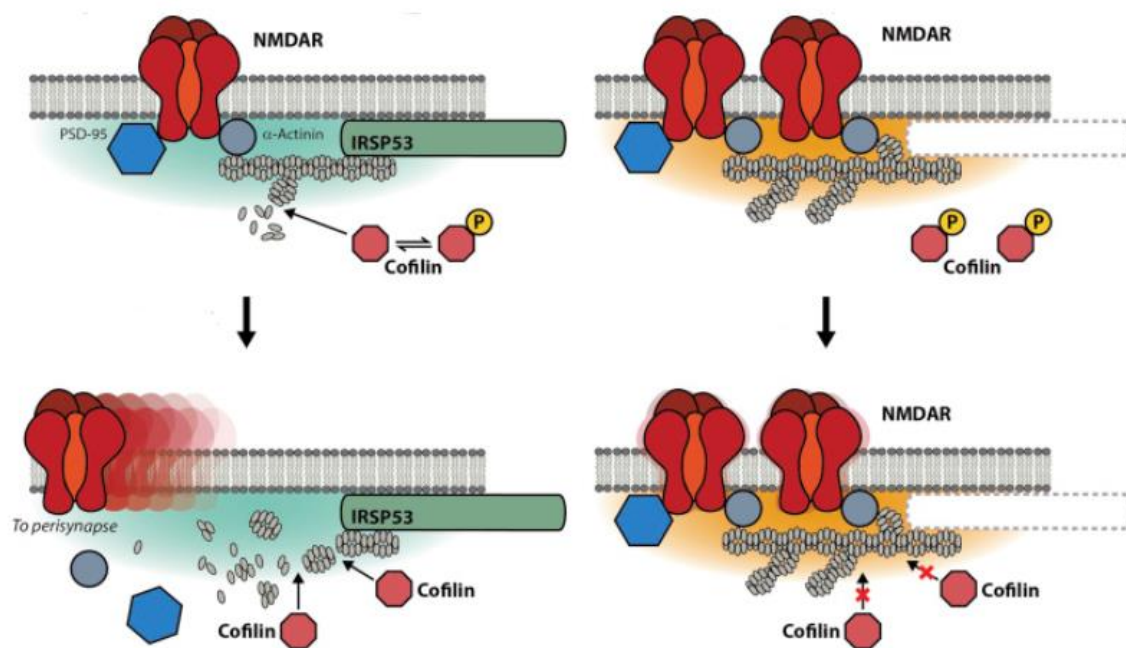


Figure 32 : Rôle d'IRSp53 dans la relocalisation du récepteur NMDAR.

Dans des conditions normales, les NMDAR sont ancrés à la membrane par PSD-95 et aux filaments d'actine par l' α -actinin. L'activation de la cofiline (régulateur négatif de l'actine) par déphosphorylation provoque la dépolymérisation de l'actine et conduit à l'élimination des NMDAR au niveau de la synapse par diffusion latérale. En l'absence d'IRSp53, les filaments d'actine sont anormalement stabilisés et ne sont plus régulés par la cofiline. Cela entraîne la rétention synaptique du récepteur (Kang *et al.*, 2016).

4.4. Phénotypes après invalidation du gène BAIAP2/IRSp53 chez la souris

BAIAP2/IRSp53 est importante pour la survie des embryons au cours de leur développement. En effet, seulement un tiers survient jusqu'à l'âge adulte après invalidation du gène. Au cours des différents stades embryonnaires, on note un retard de développement, des anomalies cardiaques avec un cœur peu développé, des œdèmes ou des hémorragies sous-cutanées, des malformations osseuses et des anomalies dans le développement du placenta (Chou *et al.*, 2017). Ces souris présentent des problèmes de comportement social avec une hyperactivité dans un environnement familial ou totalement nouveau. Elles ont aussi des problèmes de mémoire. L'une des hypothèses est la présence élevée de la fonction du récepteur NMDAR. Le traitement direct ou indirect qui atténue l'activité de NMDAR permet de retrouver une cognition et une sociabilité normale mais en revanche, cela n'enlève pas l'hyperactivité chez ces souris (Bobsin et Kreienkamp, 2016 ; Kang *et al.*, 2016).

5. Régulation de IRSp53

L'auto-inhibition de IRSp53 au niveau du domaine IMD permet de réguler l'interaction avec ses différents partenaires protéiques. Elle peut aussi lier son domaine CRIB-PR avec le domaine SH3, limitant ainsi les liaisons. La libération du domaine SH3 est possible grâce à l'interaction de la protéine Cdc42 avec le domaine CRIB-PR.

IRSp53 se lie à la protéine Kank ("kidney ankyrin repeat-containing protein"). Cette protéine est un régulateur négatif de la formation des lamellipodes. L'expression de Kank dans les cellules HEK293, cellules embryonnaires de rein, diminue l'interaction entre Rac1 et IRSp53 responsable de la formation des lamellipodes. Au contraire, la sous-expression de Kank induit une augmentation de la formation de ce complexe et des lamellipodes. De plus, l'expression de Kank dans des cellules neurales NIE115, cellules issues d'un neuroblastome, inhibe le développement des neurites par interaction avec IRSp53. Cela est potentiellement dû à l'inhibition de l'interaction avec l'actine (Roy *et al.*, 2009).

La protéine 14-3-3 se localise entre les domaines CRIB-PR et SH3 et inhibe ainsi l'interaction avec Cdc42 et les protéines se liant au domaine SH3. Cela est dû à la phosphorylation de la protéine au niveau des T340 et T360 (Robens *et al.*, 2010).

6. Rôle de BAIAP2/IRSp53 dans les pathologies

6.1. Troubles psychiatriques et neurologiques

Les mutations associées au gène BAIAP2 sont très souvent liées à des troubles psychiatriques : autisme, schizophrénie, trouble du déficit de l'attention et hyperactivité (Kang *et al.*, 2016).

Le défaut d'expression d'IRSp53 est en lien avec la maladie d'Alzheimer. En effet, IRSp53 est diminuée de près de 50% dans l'élément post-synaptique chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Bobsin et Kreienkamp, 2016).

6.2. Implication dans la progression tumorale

IRSp53 est capable d'interagir avec la protéine oncogénique Eps8. Cette protéine est activée par le récepteur EGFR. La protéine Eps8 est surexprimée dans des tumeurs (cancer colorectal, col de l'utérus, de l'hypophyse et oral) et est associée à des processus cancéreux. Le complexe Eps8/Sos-1/Abi-1, qui est facteur d'échange de nucléotide guanine, active Rac et induit l'activation de la voie PI3K (Funato *et al.*, 2004). L'interaction de Eps8 avec IRSp53 permet de renforcer la formation du complexe ainsi que l'activation de Rac et ainsi d'induire la migration cellulaire dans des cellules de fibrosarcomes humains (Funato *et al.*, 2004).

La quantité d'IRSp53 est augmentée dans les lignées de fibroblastes de souris exprimant v-Src, ce qui signifie qu'elle a un rôle potentiel dans la transformation qui dépend de v-Src. L'utilisation d'ARN interférant contre Eps8 induit la diminution d'IRSp53 dans ces cellules. En revanche, l'ARN interférant contre IRSp53 n'induit pas de diminution d'expression d'Eps8 mais elle induit une diminution de la prolifération cellulaire. Cela marque l'importance d'IRSp53 dans la transformation des cellules par v-Src. La diminution d'expression d'IRSp53 est aussi associée à la diminution des formes phosphorylées d'Akt et de STAT3 et à la diminution d'expression de la cycline D1 et de FAK ("Focal Adhesion Kinase"). Dans les cellules HeLa stimulées par l'EGF, l'activation de Src augmente ainsi que le complexe Eps8/IRSp53. Ces données suggèrent un rôle oncogénique potentiel d'IRSp53 associée à Eps8 dans la transformation liée à Src (Liu *et al.*, 2010).

La diminution de l'expression de la protéine ARF1 dans une lignée du cancer du sein compromet le recrutement à la membrane d'IRSp53. ARF1 favorise l'interaction Rac1/IRSp53 et le recrutement à la membrane pour la formation des lamellipodes et la

migration des cellules cancéreuses (Lewis-Saravalli *et al.*, 2013). IRSp53 localisée à la membrane en présence de Rac1 est donc potentiellement impliquée dans la migration des cellules cancéreuses.

L'interaction d'IRSp53 avec les protéines oncogéniques Eps8 et Rac1 souligne le rôle important de cette protéine adaptatrice dans la migration des cellules cancéreuses. En effet, elle permet de localiser les protéines oncogéniques à la membrane et d'induire la formation des lamellipodes.

7. Conclusion

La protéine IRSp53 est importante dans le remodelage de l'actine à la fois dans la formation des lamellipodes et des filopodes pour la motilité cellulaire et dans la transmission du signal synaptique. La dérégulation de l'expression de la protéine est associée à des pathologies diverses, telles que des problèmes psychiatriques, mais aussi à la migration des cellules cancéreuses. En revanche, aucune publication à ce jour n'a mis en évidence une régulation épigénétique d'IRSp53, contrairement à ce qui a été décrit pour la protéine EBP50.

Objectifs

Le gliome infiltrant du tronc cérébral est une tumeur pédiatrique rare et agressive pour lequel il n'existe aucun traitement curatif. Le panobinostat (PS) est un inhibiteur des histones désacétylases qui présente une activité antitumorale efficace *in vitro* sur les lignées DIPG. En effet, cet inhibiteur contrebalance la mutation K27M de l'histone H3 en augmentant l'acétylation des histones mais également en restaurant la méthylation globale de H3K27. L'hyperacétylation des histones conduit à l'ouverture de la chromatine et à la transcription de certains gènes.

Ce projet a été initié à partir de l'étude de l'induction de l'apoptose précoce des cellules DIPG traitées au PS. La voie intrinsèque de l'apoptose est associée à la mitochondrie et est régulée par des protéines appartenant à la famille Bcl-2 ("B cell leukemia/lymphoma-2"). Cette famille se compose de 4 types de protéines :

- les effecteurs BAX et BAK s'oligomérisent à la membrane mitochondriale, entraînent sa dépolarisation et le relargage de cytochromes c qui conduit à l'apoptose des cellules.
- les protéines activatrices pro-apoptotiques (BIM, BID et Puma) activent l'oligomérisation de BAX et BAK.
- les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L, MCL-1 et autres) séquestrent les activateurs (BIM, BID et Puma) et empêchent donc la liaison avec BAX et BAK.
- les protéines dites "sensitizers" (BAD, Noxa, Bmf et autres) suppriment l'inhibition de l'activation de l'apoptose en se liant aux protéines anti-apoptotiques.

L'interaction de ces protéines entre elles se fait par un domaine commun appelé BH3. Il existe un certain équilibre entre les protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques pendant le maintien de la survie cellulaire. Le "BH3 profiling", développé par le laboratoire d'Anthony Letai, est une technique qui détecte l'apoptose précoce des cellules après une courte exposition à une drogue (Montero *et al.*, 2015). Cette technique utilise des peptides dérivés du domaine BH3 mimant un signal pro-apoptotique. Ces peptides vont venir se lier aux protéines anti-apoptotiques afin de libérer les protéines pro-apoptotiques et ainsi activer l'oligomérisation des effecteurs BAX et BAK dans la membrane mitochondriale. Cela induit la dépolarisation de la membrane et le relargage de cytochromes c qui conduit à l'engagement

apoptotique des cellules (figure 33). Seules les cellules ayant subi un stress seront engagées dans l'apoptose.

Le **premier objectif** de ma thèse a été de valider l'engagement précoce des cellules DIPG dans l'apoptose après 16 heures de traitement par le PS par rapport aux cellules non traitées. Suite au traitement par le PS, plus la cellule sera engagée vers l'apoptose, plus la membrane mitochondriale sera dépolarisée. L'ajout du peptide ainsi que la mesure de cette dépolarisation indirecte permet de déterminer le niveau d'engagement de la cellule dans l'apoptose avec la technique du "BH3 profiling".

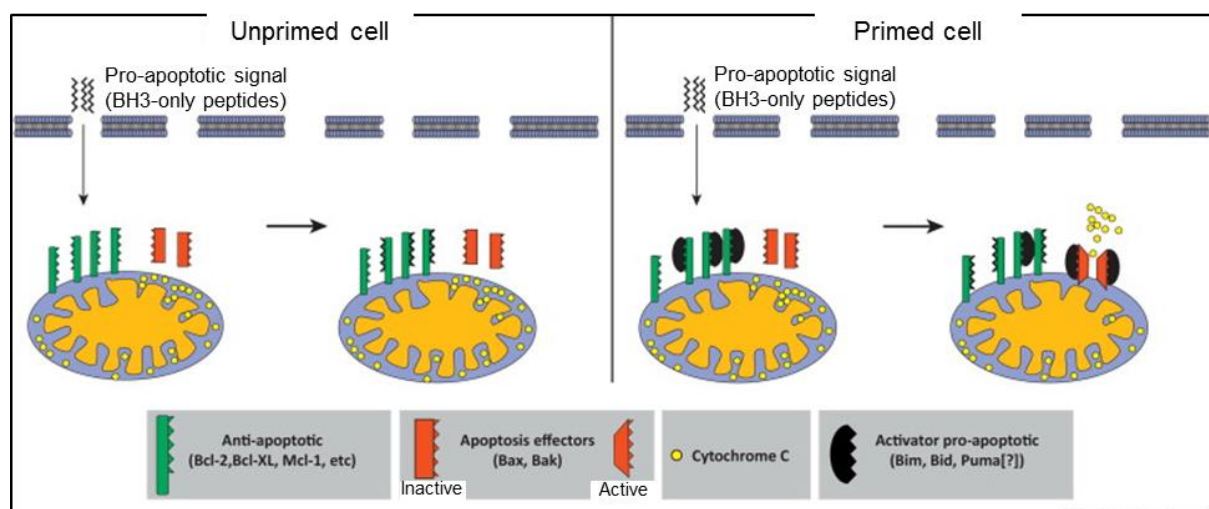


Figure 33 : Modèle du "BH3 profiling".

Dans les cellules dites "Unprimed Cell" pour cellules non engagées vers l'apoptose, l'ajout du peptide signal pro-apoptotique ne permet pas d'inhiber toutes les protéines anti-apoptotiques et les effecteurs BAX et BAK restent inactifs. Dans les cellules dites "Primed Cell" pour cellules engagées vers l'apoptose, le peptide signal ajouté permet d'inhiber toutes les protéines anti-apoptotiques par liaison directe et de libérer ainsi les protéines pro-apoptotiques. Ces protéines pro-apoptotiques activent l'oligomérisation de BAX et BAK dans la membrane mitochondriale et induit le relargage de cytochromes c après dépolarisation de la membrane mitochondriale. Adaptée de Sarosiek *et al.*, 2013.

Après validation de l'induction de l'apoptose, nous avons souhaité caractériser les protéines dérégulées après 16 heures de traitement par le PS. L'analyse protéomique de lignées DIPG traitées ou non par le PS, réalisée au début de ma thèse, a mis en évidence une augmentation d'expression de deux protéines : EBP50 et IRSp53. Le **second objectif** de ma thèse a été de caractériser le rôle de ces deux protéines dans la tumorigenèse des cellules DIPG et leur implication potentielle dans la résistance au PS. Ces travaux ont nécessité des analyses cellulaires *in vitro* à l'aide de lignées DIPG afin d'étudier leur prolifération, leur mort par apoptose, leur migration et leur capacité d'invasion d'un stroma après diminution de

l'expression d'EBP50 ou d'IRSp53. Par ailleurs, étant donné que le rôle d'EBP50 est en grande partie lié à sa localisation cellulaire, nous avons étudié la distribution de cette protéine dans les lignées DIPG.

Après la validation du rôle oncogénique d'EBP50 et d'IRSp53, le **troisième objectif** de ma thèse a été d'étudier le bénéfice d'un traitement combinant un inhibiteur de ces protéines avec le PS dans les lignées DIPG.

Afin de compléter les résultats obtenus *in vitro*, le **quatrième objectif** de ma thèse a été d'établir un nouveau modèle préclinique du DIPG à l'aide de la membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poulet (CAM). La CAM est une membrane très vascularisée qui entoure l'embryon de poulet et qui assure les échanges gazeux entre l'embryon et le milieu extérieur. Ce modèle présente l'avantage d'être peu coûteux, plus facile à mettre en place et d'avoir une durée d'expérimentation courte en comparaison au modèle souris. En effet, le temps d'observation après implantation n'est que de 7 jours contre un mois ou plus pour les souris. Ce modèle est génétiquement proche de l'Homme et peut donc reproduire le microenvironnement tumoral que nécessite la tumeur pour se développer. Un schéma explicatif du modèle d'implantation de la CAM est représenté figure 34. L'implantation de la tumeur est suivie par stéréomicroscopie pendant 7 jours afin de confirmer la croissance tumorale ainsi que la vascularisation de la tumeur. Ce modèle est utilisé en cancérologie pour l'étude de la vascularisation, de l'invasion, de la croissance tumorale et de l'efficacité ou la toxicité des traitements (Balke *et al.*, 2010 ; Quemener *et al.*, 2016 ; Saidi *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2007)

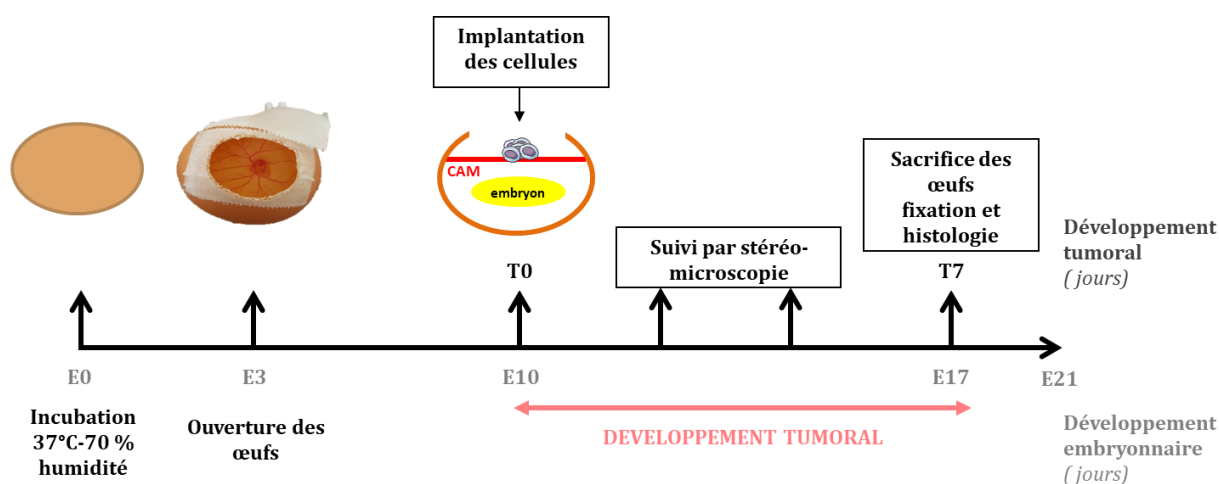


Figure 34 : Chronologie du modèle de l'embryon de poulet et principales étapes des expérimentations.

À partir de ce modèle, le **cinquième objectif** de ma thèse a été de valider l'efficacité du PS à différentes doses par combinaison avec un inhibiteur d'EBP50 sur la croissance tumorale. L'analyse de la prolifération des cellules tumorales après sacrifice ont été réalisé à partir de coupes histologiques et par un marquage Ki-67.

Un **objectif complémentaire** de ma thèse a été de montrer la toxicité du PS sur le développement embryonnaire. Ces expérimentations ont été réalisées en collaboration avec le Dr Pierre Thiébaud de notre unité. Le modèle "xénope" permet d'étudier l'embryologie, le développement et la toxicologie. Génétiquement proche de l'Homme, ce modèle présente l'avantage de pouvoir étudier la toxicité de drogues sur un organisme entier et sur le développement de ce dernier simplement en ajoutant la drogue dans le milieu. Les différents stades de développement sont présentés en figure 35. Contrairement au modèle souris, les résultats peuvent être répliqués sur un plus grand nombre d'échantillons. En effet, *Xenopus laevis* est capable de pondre toute l'année de nombreux œufs. Le développement embryonnaire externe facilite l'analyse phénotypique et ce modèle est facile à entretenir comparé au modèle murin (Wheeler et Brandli, 2009).

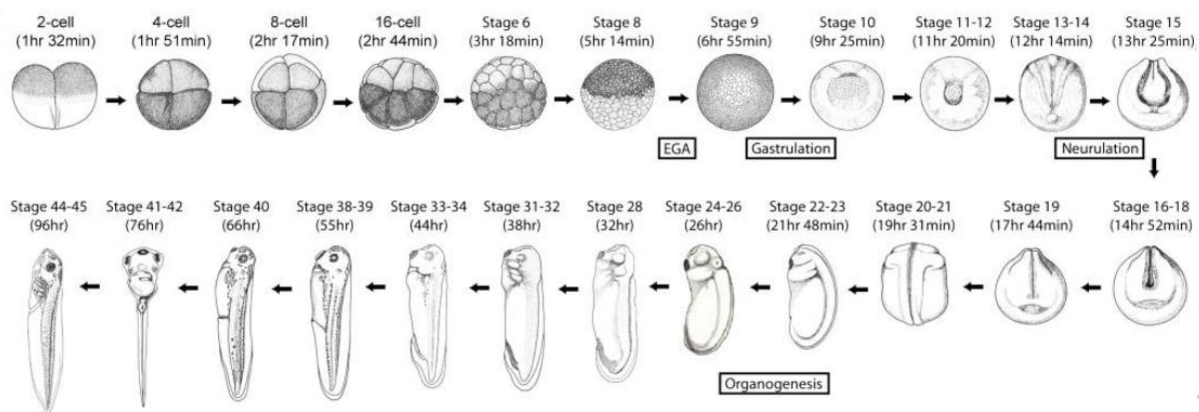


Figure 35 : Stades de développement classiques du modèle Xénope.

EGA : "Embryonic genome activation" (Tan *et al.*, 2013).

Mes travaux de recherches *in vitro* sur des lignées DIPG ont permis de :

- déterminer et valider l'apoptose précoce par la technique de "BH3 profiling".
- déterminer et valider le rôle oncogénique d'EBP50 et d'IRSp53 dans des lignées DIPG.
- valider l'effet de la combinaison du PS avec des inhibiteurs d'EBP50 ou d'IRSp53.

De plus, les études *in vivo* ont permis de :

- mettre en place un nouveau modèle d'étude *in vivo* sur la membrane chorioallantoïdienne.
- valider les effets du PS sur ce nouveau modèle ainsi que la combinaison PS plus inhibiteur d'EBP50.
- étudier les effets du PS sur le développement de *Xenopus laevis* avec l'espoir de mieux comprendre ses effets sur l'Homme.

Résultats

HDAC inhibition induces expression of scaffolding proteins critical for tumor progression in pediatric glioma

Caroline Capdevielle^{1,3}, Angélique Desplat¹, Justine Charpentier^{1,3}, Anne-Aurélie Raymond¹, Francis Saggiocco^{1,3}, Pierre Thiebaud^{2,3}, Nadine Thézé^{2,3}, Sandrine Fédou^{2,3}, Katarzyna B. Hooks^{1,3}, Veronique Guyonnet-Duperat^{3,5}, Mélina Petrel⁶, Jean-William Dupuy^{3,4}, Christophe F. Grosset^{1,3} and Martin Hagedorn^{1,3}

Affiliations

¹ INSERM U1035, Mircade team, BMGIC, F-33000 Bordeaux, France.

² INSERM U1035, Dermatology team, BMGIC, F-33000 Bordeaux, France.

³ Univ. Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France.

⁴ Plateforme Protéome - CGFB, Univ. Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

⁵ Vect'UB, INSERM U1035, Univ. Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

⁶ Bordeaux Imaging Center, Univ. Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

Corresponding author : Martin Hagedorn, U1035 INSERM, 146, rue Léo Saignat, F-33000 Bordeaux, France. E-mail : martin.hagedorn@u-bordeaux.fr, Tel : 33-(0)5 57 57 48 98 ; Fax : +33 556 514 077

Abbreviations:

CAM, chick chorio-allantoic membrane; EBP50, ezrin-radixin-moesin binding phosphoprotein 50 ; IRSp53, Insulin Receptor Substrate of 53 KDa ; DMG, diffuse midline glioma

Abstract

Diffuse midline glioma (DMG) is a pediatric malignancy with a very poor prognosis. Most children die less than one year after diagnosis. In the past, DMG has been considered as a pediatric form of adult glioblastoma. Recently, mutations in histone H3 have been identified and are believed to be oncogenic drivers. Targeting this epigenetic abnormality using HDAC inhibitors such as panobinostat (PS) is therefore a novel therapeutic option currently evaluated in clinical trials. Short-term exposure of glioma cells to PS engaged cancer cells in an irreversible apoptotic process revealed by BH3 profiling and Annexin-V / PI staining. Proteomic analysis of three different DMG cell lines identified only two proteins upregulated consistently by PS treatment, PDZ-domain containing proteins EBP50 and IRSp53. Reduction of these proteins in DMG cell lines leads to significant reduction of proliferation and migration, invasion and to increase of apoptosis. siRNA mediated knock-down of SLC9A3R1, encoding EBP50, is accompanied by a decrease of phosphorylation of AKT and ERK as well as β -catenin protein. EBP50 was found to be expressed in cytoplasm and nucleus in DMG cells by immunogold electron microscopy, confirming known oncogenic locations of the protein. Combinatorial treatment of tumor cells with PS and genetic or chemical inhibition of EBP50 leads to more effective reduction of DMG cell growth *in vitro* and *in vivo* using a chick embryo DMG model. Our data reveal a specific relation between HDACi and scaffolding protein deregulation which might have a potential for therapeutic intervention for cancer treatment.

Introduction

During cancer growth, changes in gene expression by alteration of epigenetic events including histone modifications are thought to have major impact on prognosis and therapeutic outcome. Controlling histone function by histone deacetylase inhibitors (HDAC inhibitors, HDACi) such as panobinostat (Farydak[®]/LBH-589) is a promising new therapeutic option for hematological and solid malignancies. Diffuse Midline Glioma (DMG, formerly called Diffuse Intrinsic Pontine Glioma, DIPG [1]) is an incurable pediatric glioma localized in the brainstem. Survival time is less than one year for most patients. These tumors show little sensitivity to classical chemotherapeutical agents and radiotherapy only has limited impact on disease progression. More than 80% of DMGs carry specific mutations in histone H3 which causes a substitution of lysine 27 to methionine (H3K27M), initiating an oncogenic signaling cascade. This discovery suggests that drugs targeting epigenetic abnormalities might be beneficial as anti-cancer strategy for DMG. Indeed, recent studies provided evidence that HDACi using panobinostat (PS) can significantly reduce DMG growth *in vitro* as well as in preclinical animal models [2, 3]. Panobinostat is actually being studied in numerous clinical trials against various malignancies, including DMG [4].

It is therefore of importance to understand which biological processes are affected by panobinostat treatment in DMG cells and how this drug achieves its anti-tumor effects. Previous studies using the BH3 profiling technique have shown that commitment to programmed cell death is initiated early after exposure to efficient cytotoxic drugs [5, 6]. We therefore used BH3 profiling to determine PS effects on DMG cells 16h after treatment. BH3 profiling clearly showed that mitochondrial membrane depolarization was initiated, leading to significant induction of apoptosis three days later. To gain insight into the molecular changes induced by panobinostat treatment in DMG cells, we performed a proteomic study using three different DMG cell lines isolated from patient tissue [3, 7]. Even though HDACi treatment deregulated expression of many proteins, only two proteins were consistently upregulated in all three cell lines. Interestingly, both proteins are PDZ-domain containing scaffolding proteins.

The first, EBP50, encoded by the SLC9A3R1 gene (Solute Carrier Family 9 Isoform A3 Regulatory Factor 1 or NHERF1; Na⁺/H⁺ Exchange Regulatory Co-Factor) [8] plays critical roles in basic cellular functions by modulating signaling molecules such as β -catenin, PDGFR, EGFR and PTEN. As a result, its functions are highly context- and cellular

compartment-dependent and vary between different tissues and cancer types (for review see [9]).

The second protein, IRSp53 (encoded by the gene BAIAP2, BAI1 Associated Protein 2) [10], is implicated in fundamental cellular processes such as migration and invasion by controlling actin formation [11]. It is expressed in filopodia, interacts with CDC42 and Rac and is thought to be critical for axon guidance and neurite outgrowth [12].

In this study, we provide evidence that EBP50 and IRSp53 play important roles in DMG progression *in vitro* and *in vivo* and suggest that efficacy of anti-cancer therapy using HDACi could be enhanced by additional inhibition of pro-tumoral proteins consistently induced by the treatment.

Material and methods

Cell lines and reagents

Primary pediatric human glioma cells SU-DIPG-IV, SU-DIPG-VI and SU-DIPG-XIII cells were a gift from M. Monje (Stanford University). SU-DIPG cells were grown in stem cell media, subsequently cultured as tumor neurospheres and passaged every one to two weeks as previously described [3].

NEM163, NEM157, and NEM168 DMG primary cells (J. Grill, Gustave Roussy) were seeded in AmnioMAX™ C-100 basal medium complemented with AmnioMAX™ C100 Supplement (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) as described [7]. The cells were passaged two times per week.

All primary cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and have been tested routinely for presence of mycoplasma by PCR and always have been tested negative. The genetic identity of the cell lines was verified by Short Tandem Repeat (STR) profiling (LGC Standards) and was found to be identical to originally reported markers.

Chemical inhibitors

Panobinostat was purchased from Selleckchem (Euromedex, Souffelweyersheim, France), aliquoted in DMSO according to manufacturer's recommendations and stored at -80°C. EBP50 inhibitor RS5517 was a gift from Prof. R. Silvestri (Sapienza University of Roma, Institut Pasteur, Italy) aliquoted in DMSO and stored at -20°C [13].

siRNA transfection

Small interfering RNAs targeting SLC9A3R1 (5'-CGGCGAAAACGTGGAGAAG[dTdT]-3') and BAIAP2 (5'-TTCCAGCTGATTCTGGATCTGCCTG[dTdT]-3') were purchased from Eurofins (Genomics, Belgium). AllStars negative control siRNA was purchased from Qiagen (Courtaboeuf, France). Briefly, 12 nM of siRNA was transfected with RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions for reverse and forward transfections.

DMG cell immortalization

LoxP containing human immunodeficiency virus (HIV)-derived lentiviral constructs expressed the SV40 T-Ag (pLOX-Ttag iresTK) or human Telomerase (pLOX-TERT-iresTK) from an internal human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter [14]. Lentiviral vectors were produced by a triple transient transfection as previously described [15]. Human kidney 293T cells (5×10^6) were plated on 10 cm² plates and transfected the following day with the packaging construct psPAX2 (10 µg), VSV-G pMD.G (4 µg), and the lentivector construct (10 µg) using calcium phosphate DNA precipitation. Thirty-six hours after transfection, viral supernatants were collected and filtered through 0.22 µm filters and immediately cryopreserved at -80 °C. Plasmids psPAX2 (Addgene plasmid #12260), pLOX-Ttag iresTK (Addgene plasmid #12246) and pLOX-TERT-iresTK (Addgene plasmid #12245) were a gift from Didier Trono [14]. All six DMG cells were immortalized and subsequently identified by adding an “-i” at the end. (NEM157, NEM163, NEM168, SU-DIPG-IV, SU-DIPG-VI, SU-DIPG-XIII).

Production of VEGF₁₆₅ over expressing NEM157-i cells

Vector and lentivirus production

The BamHI fragment, isolated from the plasmid PCCL.sin_PPT.SV40polyA.RFP.minhCMV.hPGK.hVEGF₁₆₅.WPRE (gift from Nicholas D. Mazarkis), containing the coding sequence of the codon optimized human VEGF₁₆₅ [16] was cloned in the BamHI site of a bicistronic self-inactivating (SIN) lentiviral vector [17]. The expression of the VEGF₁₆₅ was under the control of the myeloproliferative sarcoma virus enhancer, upstream of an internal ribosomal entry site (IRES2) followed by the ZsGreen fluorescent protein coding sequence. As a control, the same lentiviral vector without the coding sequence of VEGF₁₆₅ was used. Lentiviral vectors were produced by triple-transient transfection of 293T cells, the viral titer was determined and cell lines were transduced at a multiplicity of infection (MOI) of 10 viral particles per cell.

VEGF ELISA

To verify amounts of VEGF secretion, cells were seeded at a density of 1×10^5 cells in 6-well plates and supernatant were harvested six hours or 24 hours later. According to manufacturer's protocol, VEGF concentration was measured with DuoSet[®] ELISA

development system Human VEGF (R&D systems, Minneapolis, USA). Optical densities of each well were determined using a CLARIOstar multiplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Wavelength reading at 540 nm was subtracted from the readings at 450 nm for optical imperfections in the plate. Standard curve was created by using a four-parameter logistic curve-fit.

p197- SLC9A3R1/ p197-BAIAP2 plasmids construction and lentivirus production

GFP-NHER1 vector was digested with BamH1 and Bgl2 that containing the NHERF-1 coding sequence and the sequence was cloned to the p197 plasmid after BamHI digestion. IRSp53 vector was digested with BsrGI and EcoRI and cloned into the p197 plasmid after BamHI digestion. Lentiviral vector production was performed by the service platform Vect'UB (TMB-Core facility, Bordeaux University). Lentiviral vector (p197- SLC9A3R1 or p197-BAIAP2) was produced by transient transfection of 293T cells according to standard protocols [18]. In brief, subconfluent 293T cells were transfected with lentiviral vector (psPAX2) [19], with an envelope coding plasmid (pMD2G-VSVG) and with vector constructs by calcium phosphate precipitation. Viruses were harvested 48 hours post-transfection and concentrated by ultracentrifugation. NEM157-i and SU-DIPG-IV-i were transduced with MOIs of 5, 10 and 20.

Cell growth and viability assays

Cell growth was measured with the *In vitro* Toxicology Assay kit (Sulforhodamine B, Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) according to manufacturer's instructions. Cells were plated at a density of 5000 cells per well in 96-well plates in quadruplicates. Absorbance was measured at 565 nm using the CLARIOstar multiplate reader (BMG Labtech) at different time points.

Cell death assays

BH3 profiling

BH3 profiling was performed as described by Montero *et al.* [5]. 10 000 cells were used for all DMG cells. Briefly, 15 µl of Bim peptide (0.01 or 0.03 µM; synthesized by Celtek

Peptides, Franklin, USA), FCCP (positive control for mitochondrial depolarization) or DMSO (negative control) were diluted in DTEB buffer (135 mM Trehalose, 10 mM HEPES-KOH pH 7.5, 50 mM KCl, 0.02 mM EGTA, 0.02 mM EDTA, 0.1% BSA and 5 mM succinate) and were deposited in 384-well plates. In parallel, 4x staining solution was prepared (4 μ M JC-1, 40 μ g/ml oligomycin, 0.02% digitonin, 20 mM 2-mercaptoethanol in DTEB) and mixed with cells during 10 minutes to permeabilize cells. Staining solution and cells were added to each treatment well. Fluorescence at 590 nm was revealed by the CLARIOstar multiplate reader (BMG Labtech) at 30°C. Fluorescence was determined at 90 minutes for analysis. The percentage of polarization was normalized with control DMSO and % of depolarization was calculated by the inverse of % polarization (adapted from [5]).

Annexin V / PI

After cell dissociation, cells are washed with cold PBS and centrifuged. Cell pellets were resuspended in 200 μ l of 1x Annexin V Binding Buffer (10X: 0.1M HEPES/NaOH, pH 7.4, 1.4M NaCl, 25mM CaCl₂), 5 μ l of Annexin V-FITC (Exbio, Vestec, Czech Republic) and 5 μ l Propidium iodide (Exbio) were added. Suspension was incubated for 15 minutes in the dark at room temperature before flow cytometry analysis on a FACS CANTO I (BD biosciences, San Jose, California, USA). Percentage of cell death was calculated by removing the number of living cells (100%-Q3). The data were analyzed using FlowJo software (FlowJo, LLC, OR, USA).

Wound healing migration/invasion assays

Migration and invasion assays were performed with or without Matrigel® matrix (growth factor reduced, Corning Life Sciences, New York, USA). Plates were pre-coated with Matrigel® at 100 μ g/ml for invasion assays. After reaching confluence, the cellular layer was scratched using a plastic pipette tip and 50 μ l of Matrigel® at 8 mg/mL was added for invasion assay. The images were taken using ZOETM Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, Hercules, California, USA) at 0h, 6h or 16h (migration) and 48h (invasion) and closure of the scratch was quantified using ImageJ software (National Institutes of Health, PMID 22930834) and a Wound healing macro (http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Wound_Healing_Tool).

Chemical inhibitor / siRNA combination assays

For apoptosis assays, a reverse transfection was made with 12 nM of siRNA and PS was added 24h after transfection. Assay was stopped for FACS analysis 24 hours after PS treatment. After adherence of cells in 96 plates wells, forward transfection was used for proliferation assays. Briefly, 0.5µl of siRNA (1µM) was diluted in 25 µl of Opti-MEM Medium and 25 µl of diluted siRNA was added to 25 µl of diluted lipofectamine RNAiMAX Reagent (1.5 µl of lipofectamine mixed with 25 µl of Opti-MEM Medium). After incubation during 5 minutes, 10 µl of siRNA-lipid complex was added per well. One day after transfection, medium was removed and replaced by medium containing PS at different concentration. Assay was stopped after 48h of PS incubation and cell proliferation was evaluated. For RS5517 treatment, cells were mixed at the same time with PS at different concentrations and proliferation was measured after 72 hours.

Proteomic analysis

Sample preparation

Analysis was performed by the Proteomics Core Facility at University of Bordeaux (<https://proteome.cgfb.u-bordeaux.fr/en>). Sample preparation, protein digestion and nano-liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis were performed as previously described [20].

Label-Free Quantitative Data Analysis

For protein identification, Mascot 2.5 algorithm through Proteome Discoverer 1.4 Software (Thermo Fisher Scientific Inc.) was used in batch mode by searching against the Homo sapiens database (70371 entries, Reference Proteome Set, release 2016_06; <http://www.uniprot.org>). Two missed enzyme cleavages were allowed. Mass tolerances in MS and MS/MS were set to 10 ppm and 0.02 Da. Oxidation of methionine, acetylation of lysine and deamidation of asparagine and glutamine were searched as dynamic modifications. Carbamidomethylation on cysteine was searched as static modification. Raw LC-MS/MS data were imported in Proline Web (<http://proline.profiroteomics.fr/>) for feature detection, alignment, and quantification. Protein identification was only accepted with at least 2 specific peptides with a pretty rank=1 and with a protein FDR value less than 1.0% calculated using the “decoy” option in Mascot. For EBP50 protein in the SU-DIPG-IV line criteria were

different as only 2/3 replicates are significantly deregulated and only 1 specific peptide was present. Label-free quantification of MS1 level by extracted ion chromatograms (XIC) was carried out as previously described [20]. Protein abundances were normalized using the “median ratio” option of Proline Web. The mass spectrometry proteomics data have been deposited at the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [21] partner repository with the dataset identifier PXD009666 (<https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/>).

Western blots

Cell lysates were prepared by scraping cells using RIPA buffer (Sigma Aldrich) plus proteinase inhibitors (Sigma Aldrich) and centrifuged at 13000g for 15 min at 4°C. Protein concentrations were measured using PierceTM BCATM Protein Assays (Thermo Fisher Scientific) and equal amounts of cell extracts were loaded for western blot analysis in 4-15 % precasted polyacrylamide gel (Bio-Rad). Proteins were blotted on a nitrocellulose membrane (Transblot[®] Turbo midi-size, Bio Rad), blocked with the Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences, ScienceTec, Les Ulis, France) or with 5% milk or BSA diluted in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) and probed with primary antibodies overnight at 4°C. Primary antibodies used were: rabbit polyclonal anti-EBP50 (1:2000 dilution, ab3452, Abcam, Paris, France), rabbit polyclonal anti-IRSp53 (1:500, ab37542, Abcam), goat polyclonal anti-IRSp53 isoform T (1:250, #EB05175, Everest Biotch, Oxfordshire, UK), rabbit polyclonal anti-Erk1/2 (1:1000, #9102, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), mouse monoclonal anti-phospho Erk1/2 (Thr202/Tyr204) (1:2000, #9106, Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-Akt (1:1000, #9272 Cell Signaling), rabbit monoclonal anti-phospho-Akt (Ser473) (1:1000, #4058, Cell Signaling), mouse monoclonal anti- β -catenin (1:1000, #610154, BD Biosciences), mouse monoclonal anti-GAPDH (1:3000, sc-166545, Santa Cruz, Dallas, Texas, USA), rabbit monoclonal anti-GAPDH (1:2000, sc-25778, Santa Cruz) diluted in blocking buffer. After washing with TBST, the membranes were incubated for 45 minutes with corresponding fluorescent secondary antibodies: goat anti-rabbit IRDye 800CW (1:5000, #926-32211, LI-COR Biosciences), goat anti-rabbit IRDye 680RD (1:5000, #926-68071, LI-COR Biosciences), goat anti-mouse IRDye 680RD (1:5000, #926-68070, LI-COR Biosciences), donkey anti-goat IRDye 680LT (1:5000, #925-68074, LI-COR Biosciences), Fluoprobes 488 Donkey IGG anti-mouse (1:5000, #FP-SB5110, Interchim, Montluçon, France). After washing with TBST (twice for 10minutes), membranes were scanned on the OdysseyFC (LI-COR Biosciences) or with Fusion FX (Vilber Lourmat, Marne la Vallée,

France). Quantification was performed using Odyssey software (LI-COR Biosciences) or ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Immunofluorescence staining

Cells were seeded at 30000 cells/well in 24 wells on a glass slide. After adherence, cells were fixed with PFA 4% during 10 minutes and wash with PBS. Permeabilization was made with 0.2% triton X-100 for 10 minutes. After washing with PBS, cells were blocked with 4% bovine serum albumin (BSA) diluted in PBS for 10 minutes and probed with EBP50 primary antibody diluted at 1:200 in 5% BSA/PBS during 40 minutes. Secondary antibodies fluoprobes 488 Donkey IgG anti-Rabbit (1:200, #FP-SA5110, Interchim) or fluoprobes 547 Donkey IgG anti-Rabbit (1:200, #FP-SA4110, Interchim) were diluted in blocking solution in presence of DAPI (1:20000, #FP-99963A, Interchim) and with or without red phalloïdin (1:200, #FP-BV4620, Interchim) and incubated for 30 minutes. Coverslips were washed and mounted on slides with fluoromount G (Interchim). PS treatment or DMSO was added during 24 hours before fixation with 4% PFA.

Electron microscopy

Cell preparation

Cells were cultivated at a density of 150000 cells for NEM157-i and 550000 cells for SU-DIPG-VI-i on 200 µm aclar film (Electron Microscopy Sciences, EMS). After treatment with 1 µM PS or 0.1% DMSO during 24 hours, cells were fixed for 1 hour at room temperature with 4% PFA (EMS) and 0.2% Glutaraldehyde (EMS) in PB 0.1M pH7.4. Cells were rinsed in PBS, transferred in Leica EM-AFS2 and dehydrated gradually with free water ethanol during a decreased temperature from 0° to -30°C. Samples were embedded with HM20 resin, and polymerized under UV at -30°C for 48h with gelatin capsule (size 3 – EMS). Ultrathin sections were then collected on formvar film nickel grids (EMS).

Immunogold labelling

Sections were first incubated on top of a drop of glycine 50mM (Sigma Aldrich) in PBS. After a step of saturation with BSA 1% (Sigma Aldrich) in PBS, sections were incubated rabbit polyclonal anti-EBP50 (1:50 dilution, ab3452, Abcam) for 1 hour and then secondary

IgG antibodies coupled with 10 nm gold (Aurion) for 1 hour. After a short fixation in 1% Glutaraldehyde, samples were dried and contrasted with uranyless (Delta Microscopies France). Images were collected with a TEM Hitachi H7650 and a Gatan Orius Camera.

In vivo models

Chicken CAM assays

Animal procedures were carried out in agreement with the European (directive 2010/63/UE) and French (decree 2013-118) guidelines. Embryos were received at the stage of segmentation and then incubated at 37.4°C at 70% humidity. At day 3 of development, the eggshell was opened on the top and the opening sealed with medical-grade Durapore tape. At day 10 of development, 5.10^5 NEM157-i plus 5.10^5 NEM157-i-VEGF cells were mixed with Matrigel® and 40 µl were put directly on the CAM. Tumor growth was monitored under a stereomicroscope (DS-Fi2, Nikon /SMZ745T) every two or three days. Tumors were fixed with PFA 4% or collected for protein extraction after 6 or 7 days of implantation. Fixed tumors were embedded in paraffin after dehydration and cut in 3 µm-thick sections for staining with Hematoxylin-Eosin or immunostaining with mouse monoclonal anti-Ki-67 (1:100, clone MIB-1, #M7240, Dako, Les Ulis, France), polyclonal goat anti-mouse HRP secondary antibody (1:100, #P0447, Dako) and visualized with DAB imPACT™ DAB EqV HRP (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Reverse siRNA transfection was realized 24 hours before implantation. Briefly, cells were harvested and mixed with 15 µl of siRNA EBP50 or control (20 µM), 50 µl of lipofectamine and 5 mL of Opti-MEM Medium in a T250 cm³ flask. PS was added before mixing with Matrigel® at different concentrations.

Xenopus laevis embryo model

Plasmid construction

Xenopus laevis *Slc9a3r1* (EBP50) cDNA (BC086464.1) was obtained from Source Bioscience and the open reading frame was subcloned into pBluescript and pCS2+FLAG vectors by PCR using the following primers: 5'-CGCGAATTCATGGCTCCGGAACGGCTGTGCG-3'; 5'-CGCGTCTAGACAGACTGCTGAACACTTCTTTC-3'. Subclones were verified by sequencing.

Xenopus embryo treatment and injections

Xenopus laevis embryos were obtained and staged as previously described [22]. For PS treatment, batches of 2-cell stage or gastrula stage embryos (10 embryos per batch) were incubated in 24-well plates containing 0.1-1-10-100 μ M PS. Embryos were left in solution until control embryos (untreated embryos) reached stage 37-38 and then fixed in MEMFA for histological section and in situ hybridization.

For mRNA injection, *Xenopus laevis* *Slc9a3r1* mRNA was synthesized *in vitro* from pCS2-FLAG linearized vector by using the Message Machine kit (Ambion) and injected (250pg to 4ng) into the animal pole of two blastomeres at the two-cell stage.

Whole mount in situ hybridization and histological analysis

Whole-mount *in situ* hybridization was carried out with digoxigenin-labelled (Roche) as previously described [22]. RNA probes were prepared from pBluescript linearized plasmid using T3 or T7 RNA polymerase (Promega) and visualized with BM purple staining (Roche). For serial sections, embryos were post-fixed in MEMFA for 1h at RT and embedded in paraffin before sectioning.

Antibody array

NEM168-i cells were transfected with SLC9A3R1/EBP50 or control siRNA at a concentration of 12 nM. Cells were lysed and total proteins were extracted 48 hours after transfection. According to manufacturer's protocol, 400 μ g cell lysate was incubated with each human phospho-kinase array (R&D Systems, Minneapolis, USA). Cell lysates were incubated overnight at 4°C with nitrocellulose membranes in which capture and control antibodies against 43 kinase phosphorylation sites have been spotted in duplicate. The arrays were washed to remove unbound proteins followed by incubation with a cocktail of biotinylated detection antibodies. Streptavidin-HRP and chemiluminescence detection reagents were applied and a signal is produced at each capture spot corresponding to the amount of phosphorylated protein bound. Chemiluminescence was detected by using Fusi FX (Vilber Lourmat) and pixel densities were determined using ImageJ software (National Institutes of Health).

Bioinformatic analysis

Oncomine database (www.oncomine.com) was queried for expression data of NHERF1/SLC9A3R1 and BAIAP2 in cancer vs. normal and selected invasive cancer types. Proteinatlas database (www.proteinatlas.org) was used for retrieval of survival data and protein presence in invasive cancers.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). ANOVA test were performed followed by the Dunnett's multiple-comparison post-test when all data were compared to control or by the Tukey's multiple-comparison post-test when all data were compared. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test was used for experiment at different time points when containing three groups or more. When comparing experiments with two groups of categorical variable (e.g. bleeding versus no bleeding), the two-sided Fisher's exact test was used. Experimental data reported was mean $\pm$ SEM of a minimum of 3 samples, n = independent experiments. A P-value of <0.05 was considered to be statistically significant. For all data in figures, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

Results

Early induction of apoptosis after panobinostat treatment in DMG cell lines

Panobinostat has been shown to have cytotoxic activity on DMG cell lines [3]. To gain insight into the way PS exerts its anti-tumor activity, we analyzed DMG cells by BH3 profiling after PS exposure. BH3 profiling provides a powerful method of early detection of cell commitment to apoptosis based on quantification of the degree of depolarization of the mitochondrial membrane [6]. Even short-term exposure (16 hours) to PS engaged DMG cells to cell death as revealed by BH3 profiling. At 1 μ M, we could evidence a significant depolarization of NEM157 cells compared to controls (Figure 1a). Similar results were obtained in a second DMG cell line, NEM168 (Supplemental Figure 1a). Completion of apoptosis was then confirmed using Annexin-V and PI staining by FACS analysis after 72 hours of treatment at the same drug concentrations (Figure 1b). In addition, we found a significant increase of cell death for PS at 0.1 μ M compared to solvent. Equivalent results were obtained in two other cell lines, NEM168 and the immortalized NEM157-i (Supplemental Figure 1b). Occurrence of cell death was paralleled by inhibition of proliferation. Treatment of NEM157 cells with PS at 0.1 or 1 μ M reduced cell proliferation after 72 hours of treatment compared to controls (Figure 1c). Comparable results were also obtained in NEM168 and the immortalized NEM157-i cell line (Supplemental Figure 1c).

EBP50 and IRSp53 induction after panobinostat treatment

A proteomic approach was chosen to identify proteins deregulated by PS treatment using three different DMG cell lines (SU-DIPG-IV, NEM157 and NEM168). We focused on proteins that are deregulated after 16 hours of PS treatment compared to controls. Following criteria of selection ($0.7 < \text{ratio} > 1.5$, $p\text{-value} < 0.05$), we found a total of 227 proteins (Figure 1d and Supplemental Table S1) deregulated in either of the cell line, but only two proteins were upregulated in all three cell lines (Figure 1d). EBP50 protein was found to be induced 2-3 times in treated DMG cell lines and IRSp53 protein was induced 2-4 times, dependent on the cell line (Supplemental Table S1).

EBP50 and IRSp53 protein induction after PS treatment was validated by Western blot analysis in NEM157 cells (Figure 1e) as well as NEM168, SU-DIPG-IV and SU-DIPG-VI

cells (Supplemental Figure 2a, b). EBP50 protein in NEM157 cells increased by 5-fold after 16 hours and expression maintained to 24 h of treatment compared to control cells. For IRSp53 protein, we evidenced a 2-fold peak of expression at 16 hours, then expression decreased to pre-treatment levels. PS induced EBP50 and IRSp53 protein in a dose-dependent manner, with first visible induction at concentrations around 0.05 μ M (Supplemental Figure 2c).

IRSp53 isoform T has been shown to be expressed in MCF7 breast cancer cells [23]. This isoform can interact directly with the PDZ1 domain of EBP50 via its C-terminal PDZ-binding motif [24]. Using an isoform specific antibody against isoform T, we could evidence a weak but clear expression of IRSp53 isoform T in all six DMG cell lines (Supplemental Figure 3a). However, this isoform is not induced by PS treatment (Supplemental Figure 3b).

As many genes, SLC9A3R1 shows heterogeneous expression in different kind of cancers (Supplemental Figure 4a) but is significantly over expressed in invasive cancers such as infiltrative bladder carcinoma, invasive ductal liver cancer and invasive ductal breast cancer (Supplemental Figure 4b). In both, urothelial and liver cancers, high levels of SLC9A3R1, but also BAIAP2, are significantly associated with an unfavorable survival outcome (Supplemental Figure 4c) and proteins are strongly expressed in the tumor tissue (Supplemental Figure 4d).

We therefore undertook a systemic study on the role of these two molecules in DMG progression, with a special focus on EBP50.

Localization studies of EBP50 in DMG cells

Localization of EBP50 protein within a cell determines with which proteins it can physically interact. Depending on the cell type, these interactions can produce pro- or anti-tumoral effects, cytoplasmic and nuclear expression are associated with an oncogenic role of the protein [9]. Using immunofluorescence, we detected EBP50 in all cellular structures in untreated or solvent-treated conditions. PS treatment did not delocalize EBP50 to a specific compartment but, as expected, increased its expression, notably in the nucleus and cytoplasm compared to controls (Figure 2a). Similar results were also obtained in a second DMG cell lines (Supplemental Figure 5a).

Electron microscopy using immunogold labelling clearly showed that EBP50 was over expressed in nucleus and cytoplasm but some signal was also evidenced in the membrane after PS treatment compared to control cells (Figure 2b and Supplemental Figure 5b). We did not notice any differences in EBP50 localization in function of cell density (10000 to 50000 cells per slide). These localization data suggest an oncogenic function of EBP50 in DMG pathology.

Functional studies

Overexpression of EBP50 has no effect on viability *in vitro* and *in vivo*

In order to study the role of EBP50 protein in DMG cells, we generated NEM157-i and SU-DIPG-VI-i cell lines stably over expressing SLC9A3R1 using a lentiviral system. Over expression was validated by Western blot and was MOI-dependent (Supplemental Figure 6a). Immunocytological analysis of NEM157-i cells showed that lentivirus-induced over expression of EBP50 was present in the same cellular compartments. Subcellular localization of EBP50 is similar to cells treated with PS (Supplemental Figure 6b).

Cell proliferation of EBP50 over expressing cells was monitored over three days at different MOIs. No significant effect on cell growth was observed in NEM157-i or SU-DIPG-VI-i cell lines at MOIs ranging from 2 to 20 (Supplemental Figure 6c).

To confirm this result in an *in vivo* setting, we microinjected EBP50 mRNA in 2-cell stage *xenopus* embryos and analyzed development until tadpole stages. EBP50 over expression did not have any visual effect on morphology of embryos from neurula to stage 36 (Supplemental Figure 6d).

Downregulation of EBP50 or IRSp53 protein level affects cellular growth and motility of DMG cell lines

siRNA silencing

To assess the effect of EBP50 or IRSp53 down regulation in DMG cell lines, we transfected cells with siRNA targeting SLC9A3R1 or BAIAP2. EBP50 level decreased around 80 percent compared to controls and IRSp53 protein was reduced by 35 percent after 48 hours of transfection (Figure 3a). We then examined proliferation of NEM157-i cells 96 hours after

transfection. EBP50 and IRSp53 siRNA knock-down showed a significantly reduction of proliferation compared to controls (Figure 3b). Low levels of the two proteins were associated with a strong increase in programmed cell death after 72 hours of transfection (Figure 3c). Induction of cell death was significantly stronger for siEBP50 than for siIRSp53. Similar results were obtained using the NEM168 cell line (Supplemental Figure 7a-c).

EBP50 and IRSp53 are scaffolding proteins implicated in the interaction between membrane proteins and the cytoskeleton network. We therefore investigated whether EBP50 or IRSp53 affect cell migration or invasion of NEM157-i cells. In particular IRSp53 is important for filopodia or lamellipodia formation. During migration assay the wound width after 6h was significantly reduced in the control group while width reduction was significantly inhibited by EBP50 or IRSp53 siRNAs (Figure 3d). Invasion was measured after 48 hours and we found similar results (Figure 3e). EBP50 or IRSp53 down regulation also reduced significantly cell motility in a second DMG cell line, NEM168 (Supplemental Figure 7d, e).

Combination of EBP50 or IRSp53 inhibition with PS treatment in vitro

Given the fact that both proteins induced by PS play roles in cell growth and survival, we reasoned that combined inhibition could increase efficacy of PS. Cells were first transfected with siRNA and 24 hours after, cells were treated with PS at different concentration during 48 hours. Proliferation was significantly decreased in cells treated with siEBP50 in combination with PS at from 0.01 μ M to 0.05 μ M compared to controls (siCtrl+PS), resulting in 20-50% greater inhibition (Figure 4a). Similar results have been observed for siIRSp53, except at the highest dose of PS tested, where differences were observed but not significant (Figure 4a). This reduction of cell growth in the combination siRNA/PS was accompanied by a 30% (siEBP50) or 50% (siIRSp53) increase in apoptotic cell number compared to controls (siCtrl/PS; Figure 4b)

RS5517 is a new PDZ1-domain antagonist of EBP50. In colorectal cancer cells (CRC), this inhibitor has growth inhibitory effects by preventing nuclear import of EBP50, thereby restoring its physiological membranous localization [13]. To evaluate the effects of RS5517 on DMG cell lines, NEM157-i were exposed to 1 μ M, 10 μ M and 15 μ M of the inhibitor. Viability of cells was decreased about 50% at all doses of RS5517 tested compared to solvent control (Figure 4c). Importantly, we observed that treatment with a low dose of PS (0.01 μ M) in association with RS5517 at 15 μ M significantly reduced tumor cell growth in comparison

to either treatments alone, an effect that was not observed at higher doses of PS (Figure 4c). These results further underline benefits of the combinatorial EBP50/PS inhibition strategy.

Antibody array

In order to shed light on the molecular alterations occurring in cells after siEBP50 treatment, we performed a phospho kinase assay. We obtained 77% reduction of EBP50 protein 48h after siRNA transfection (Figure 5a). Proteins from these cells were spotted on the kinase array. Out of 43 human kinases presented on the array, only 7 were affected by reduction of EBP50 protein (Figure 5b). We validated 46% reduction of phosphorylation at S473 of AKT, 60% reduction of P-ERK and 15% decrease of β -catenin (Figure 5c).

Development of an *in vivo* DMG model in the chick embryo

To access the role of EBP50 in an *in vivo* setting, we developed a new DMG tumor model *in* on the chick chorio-allantoic membrane (CAM), adapted from our previous experimental glioma model [25]. The initial DMG cell line NEM157-i did not implant reliably on the CAM due to slow growth and insufficient angiogenic response. We therefore generated a NEM157-i cell line stably overexpressing VEGF₁₆₅ (NEM157-i-VEGF), a growth factor which favors implantation of human tumor cells in this model [25]. NEM157-i-VEGF (20ng/ml) express 10-fold more VEGF than the parental NEM157-I (2ng/ml) cell as measured by ELISA. A 1:1 mixture of NEM157-i-VEGF with NEM157-i cells was found to consistently generate experimental DMG tumors on the CAM (Figure 6a).

To validate the model and to evaluate inhibitory effect of PS *in vivo*, tumor cell mixture was implanted on the CAM in Matrigel® containing PS. PS-treated tumors had a whitish appearance, commonly observed in experimental tumors with impaired angiogenesis [26] (Figure 6a), whereas blood vessels were present in control tumors. Seven days after implantation, tumor growth was evaluated by weighting. PS-treated tumors had significant 4-5-fold reduction of tumor growth compared to controls (Figure 6b, left graph). Control tumors often show bleeding associated with tumor growth, a phenomenon that was significantly less observed in PS-treated tumors (Figure 6b, right graph). Histological analysis of tumor sections confirmed presence of chick blood vessels inside the tumor graft in control, but not in PS treated tumors (Figure 6c, arrows). Ki-67 immunostaining, was strongly reduced in PS

tumors while compared to controls (Figure 6b, right panels). This model confirmed the growth inhibitory effects of PS on DMG development but also points to novel anti-angiogenic effects of the drug.

***In vivo* effects of EBP50/PS inhibition (CAM assay)**

Given the encouraging *in vitro* results showing an improved anti-tumor activity of a combined PS/anti-EBP50 approach, we sought to validate this effect in the DMG-CAM model. Tumors were transfected with siCtrl or siEBP50 in association or not with PS at 10 μ M before implantation on CAM. Tumors were photographed by stereomicroscopy and analyzed by standard histology and Ki-67 staining (Figure 7a). As expected, treatment with siEBP50 or PS alone did decrease tumor weight by approximately 50%. SiCtrl plus PS and siEBP50 plus PS even decreased tumor weight slightly more. There was no significant difference between these two groups (Figure 7b). Immunostaining with Ki-67 revealed lower proliferation indexes in siEBP50 tumors compared to SiCtrl. However, cell proliferation was nearly abolished in siEBP50/PS treated tumors compared to PS alone or SiCtrl/PS treatments (Figure 7a, lower three panels from the right, b). These results suggest a beneficial effect of combined anti-EBP50/PS treatment and are in line with the *in vitro* results.

Discussion

In this study, we analyzed biological effects of the HDACi panobinostat on cell lines derived from pediatric glioma patients. Using the BH3 profiling technique, we could evidence that engagement to apoptosis occurs as early as 16h after exposure to the drug. Proteomic analysis was carried out to determine drug action on cells.

Only two proteins, IRSp53 and EBP50, were commonly induced by the treatment in three different DMG cell lines, we therefore studied their role in diffuse midline glioma pathology.

IRSP53 encoded by the BAIAP2 gene has originally be identified as a protein phosphorylated by the insulin receptor [27]. It is a scaffolding protein that bundles actin filaments and interacts with the small GTPase Rac [28]. It plays a role in filopodium dynamics by coupling actin elongation to membrane protrusions and is an important effector of Cdc42 that orchestrates events required for filopodium formation [29]. Recent analysis have shown that more than half of IRSp53 knock out mice die of developmental defects touching placenta and heart [30]. Little is known about the role of IRSp53 in cancer, but its pivotal role in the formation of lamellipodia via Rac activation suggests participation in the invasive behavior of cancer cells [31]. Our *in vitro* results strongly confirm an important function of IRSp53 in the invasion but also proliferation of pediatric glioma cell lines.

We have chosen to study EBP50 protein more in detail. EBP50 was first described as a binding partner of members of the ezrin-radixin-moesin (ERM) membrane-cytoskeletal linking proteins [8]. It is a scaffolding protein with two PDZ domains which links together proteins to the actin cytoskeleton, thereby modifying cell signaling. Depending on the subcellular location of the protein, EBP50 binding partners change and therefore the net outcome of the interaction for cell behavior. It is generally accepted that membrane-bound EBP50 has tumor suppressive functions, whereas cytoplasmic and nuclear localization is associated with oncogenic growth-promoting behavior [9]. Our results clearly show that in DMG cells, EBP50 is expressed in the cytoplasm, nucleus and membrane as evidenced by immunocytochemistry and immunogold electron microscopy (Figure 2 and Supplemental Figure 5). Nuclear presence of β -catenin protein seems not to be common in DMG tumors [32], it is therefore possible that the oncogenic potential of EBP50 in DMG cells is mediated by other nuclear factors such as YAP1 which are known to interact with EBP50 [33] and which are known to be over expressed in central nervous system tumours, including pediatric glioma [34]. In DMG, depletion of EBP50 leads to blockage of cell proliferation and increase

of apoptosis, as reflected by a decrease of ERK and AKT phosphorylation. Further studies need to address the question with which proteins EBP50 specifically interacts in DMG cells.

In breast cancer, EBP50 can stabilize estrogen receptors thereby promoting tumor progression [35], and over expression is found in invasive breast cancers (Supplemental Figure 4b). However, tumor suppressive functions of the protein are also described in this pathology, notably by negatively regulating MMP-2 activity [36].

In the developing brain, EBP50 physically interacts with the neuronal adhesion-controlling protein podocalyxin [37], which also promotes glioma invasiveness through β -catenin signaling [38]. It might well be possible that perturbing EBP50 levels in some brain regions - and subsequently podocalyxin activity - promotes tumor cell invasion, as has been shown in renal cell carcinoma [39].

In adult glioma, EBP50 is associated with an invasive phenotype and highly expressed in cells at the invading front of tumors. Reducing its expression inhibited glioma cell migration and sensitized tumor cells to temozolomide treatment [40].

Induction of NHERF1/EBP50 after HDACi seems to be a conserved mechanism, since several microarray studies carried out after short-term treatment in normal human cell lines such as mesenchymal stromal cells and osteoblasts found consistent upregulation [41-44]. Interestingly, in the list of genes highly induced by HDACi published by Dudakovic et al. [42] we also found BAIAP2 encoding IRSp53. It is tempting to speculate that these two proteins participate in a signaling network initiated by HDACi. Even more intriguing, Garbett et al. have shown that EBP50 and the T-isoform of IRSp53 physically interact in a human choriocarcinoma cell line [24]. The very strong binding occurs via the C-terminal PDZ-binding domain of IRSp53-T directly to the PDZ1 domain of EBP50. Using an isoform specific antibody against IRSp53-T, we could evidence expression of this isoform in NEM157 or SU-DIPG-IV glioma cell lines (Supplemental Figure 3a), suggesting that physical interaction of these two proteins occurs in DMG cells.

Our data suggest that EBP50 protein has oncogenic functions in pediatric glioma progression. Several studies also show tumor suppressor roles for this protein. It is therefore important to determine for each cancer type for which HDACi will be proposed, where EBP50 is localized and which biological role it plays.

Inhibition of protein-protein interaction via small molecules targeting PDZ domains is a promising novel therapeutic approach [45]. This might in result in novel anticancer drugs which block specific binding of oncogenic signaling partners of EBP50. Saponaro et al. have designed RS5517, which achieves cytotoxicity by blocking protein interactions with the

PDZ1 domain of EBP50 [13]. Others have successfully blocked EBP50 interaction with parathyroid hormone 1 receptor (PTH1R) [46], β 2-adrenergic receptor (β 2AR) and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) [47]. In addition, efforts to restore EBP50 to its physiological anti-tumoral plasma membrane location deserves thorough consideration as a novel strategy for cancer treatment [48]. Wrong localization of scaffolding proteins seems to play critical roles in other solid tumors in general, as has been shown for plectin in pancreatic adenocarcinoma [49].

Toxicity of panobinostat remains a major concern [2]. Our study using the *xenopus* embryo model revealed unexpected developmental defects in the central nervous system, leading to complete absence of eye development at high doses (Supplemental Figure 8). Even though it is difficult to translate this finding into clinical application of the drug, this information underlines the necessity to evaluate alternative delivery methods such as Convection-Enhanced Delivery (CED) [50], thereby limiting exposure to normal tissue.

Taken together, our results have several implications for the treatment of DMG and for anti-cancer therapy using HDACi in general. First, determination of EBP50 or IRSp53 protein levels could serve as a biomarker for successful HDACi treatment. Induction of these proteins occurs after a short time of drug exposure, which could serve as read-out to confirm that tumor cells have been exposed to cytotoxic HDACi levels. Second, even though augmentation of EBP50 protein does not affect tumor cell viability, reduction significantly affects important pro-tumoral features of cancer cells. It is therefore possible that we have uncovered a novel mechanism of indirect HDAC resistance in cancer cells, which is mediated by maintaining a critical level of EBP50 or IRSp53 protein in tumor cells. And last, inhibition of EBP50 protein induced by HDACi significantly improves cytotoxicity of HDACi, at lower doses, both *in vitro* and *in vivo*. This novel combinatory therapy concept warrants further investigation in other solid tumors with poor prognosis.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) in the frame of the "Investments for the future" program, IdEx program Univ Bordeaux (Reference ANR-10-IDEX-03-02) and the following charity associations: Eva Pour La Vie, Aïdons Marina, Fondation Flavien, E.S.C.A.P.E., Les Amis de Marius, Kaëna et les lapinours foundation and the Cassandra Contre la Leucémie association. CC was supported by « Fondation Groupama pour la santé » and Eva Pour La Vie. The authors like to thank M. Monje, Stanford University and J. Grill, Institut Gustave Roussy, Paris, for providing DMG cell lines. The following colleagues provided material and help for immortalization of DMG cells: E. Richard, INSERM U1035, Univ Bordeaux, D. Trono, EPF, Lausanne; N.D. Mazarakis, University College London and L. Naldini, Univ Milan provided plasmids for construction of VEGF over expressing cells, and H. J. Kreienkamp, Univ Hamburg provided BAIAP2 and NHERF1 plasmid constructions. EBP50 inhibitor RS5517 was a gift from Prof. R. Silvestri (Sapienza University of Roma, Institut Pasteur Italy). S. Dabernat, Univ. Bordeaux provided luciferase expressing lentivirus. Electron microscopy work was done in collaboration with Méline Petrel at the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the National Infrastructure France BioImaging. The authors thank the staff, especially Alice Bibeyran and Veronique Guyonnet-Duperat of Vect'UB, the vectorology platform (INSERM US 005 – CNRS UMS 3427 - TBM-Core, Université de Bordeaux, France) for technical assistance, Catherine Pain (INSERM U1035) for help with histological sections and staining, Vincent Pitard for help with flow cytometry, Jean William Dupuy and Anne-Aurélien Raymond for proteomic analysis. Francis Saggiocco performed cloning of VEGF, BAIAP2 and NHERF lentivirus constructions and Mélissa Ménard (Master 2 student) helped with cell culture and proliferation assays.

References

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016; 131: 803-20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
2. Hennika T, Hu G, Olaciregui NG, Barton KL, Ehteda A, Chitranjan A, Chang C, Gifford AJ, Tsoli M, Ziegler DS, Carcaboso AM, Becher OJ. Pre-Clinical Study of Panobinostat in Xenograft and Genetically Engineered Murine Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Models. *PLoS One.* 2017; 12: e0169485. doi: 10.1371/journal.pone.0169485.
3. Grasso CS, Tang Y, Truffaux N, Berlow NE, Liu L, Debily MA, Quist MJ, Davis LE, Huang EC, Woo PJ, Ponnuswami A, Chen S, Johung TB, et al. Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Med.* 2015; 21: 555-9. doi: 10.1038/nm.3855.
4. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=DIPG&term=LBH-589>.
5. Montero J, Sarosiek KA, DeAngelo JD, Maertens O, Ryan J, Ercan D, Piao H, Horowitz NS, Berkowitz RS, Matulonis U, Janne PA, Amrein PC, Cichowski K, et al. Drug-induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy. *Cell.* 2015; 160: 977-89. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.042.
6. Deng J, Carlson N, Takeyama K, Dal Cin P, Shipp M, Letai A. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell.* 2007; 12: 171-85. doi: 10.1016/j.ccr.2007.07.001.
7. Truffaux N, Philippe C, Paulsson J, Andreiuolo F, Guerrini-Rousseau L, Cornilleau G, Le Dret L, Richon C, Lacroix L, Puget S, Geoerger B, Vassal G, Ostman A, et al. Preclinical evaluation of dasatinib alone and in combination with cabozantinib for the treatment of diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro Oncol.* 2014. doi: 10.1093/neuonc/nou330.
8. Reczek D, Berryman M, Bretscher A. Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J Cell Biol.* 1997; 139: 169-79.
9. Vaquero J, Nguyen Ho-Bouldoires TH, Claperon A, Fouassier L. Role of the PDZ-scaffold protein NHERF1/EBP50 in cancer biology: from signaling regulation to clinical relevance. *Oncogene.* 2017; 36: 3067-79. doi: 10.1038/onc.2016.462.
10. Shiratsuchi T, Futamura M, Oda K, Nishimori H, Nakamura Y, Tokino T. Cloning and characterization of BAI-associated protein 1: a PDZ domain-containing protein that interacts with BAI1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 247: 597-604.
11. Scita G, Confalonieri S, Lappalainen P, Suetsugu S. IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends Cell Biol.* 2008; 18: 52-60. doi: 10.1016/j.tcb.2007.12.002.
12. Ahmed S, Goh WI, Bu W. I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation. *Semin Cell Dev Biol.* 2010; 21: 350-6. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.11.008.
13. Saponaro C, Sergio S, Coluccia A, De Luca M, La Regina G, Mologni L, Famiglioni V, Naccarato V, Bonetti D, Gautier C, Gianni S, Vergara D, Salzet M, et al. beta-catenin knockdown promotes NHERF1-mediated survival of colorectal cancer cells: implications for a double-targeted therapy. *Oncogene.* 2018; 37: 3301-16. doi: 10.1038/s41388-018-0170-y.
14. Salmon P, Oberholzer J, Occhiodoro T, Morel P, Lou J, Trono D. Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes. *Mol Ther.* 2000; 2: 404-14. doi: 10.1006/mthe.2000.0141.
15. Richard E, Mendez M, Mazurier F, Morel C, Costet P, Xia P, Fontanellas A, Geronimi F, Cario-Andre M, Taine L, Ged C, Malik P, de Verneuil H, et al. Gene therapy of a mouse

model of protoporphyria with a self-inactivating erythroid-specific lentiviral vector without preselection. *Mol Ther*. 2001; 4: 331-8. doi: 10.1006/mthe.2001.0467.

16. Ellison SM, Trabalza A, Tisato V, Pazarentzos E, Lee S, Papadaki V, Goniotaki D, Morgan S, Mirzaei N, Mazarakis ND. Dose-dependent neuroprotection of VEGF(1)(6)(5) in Huntington's disease striatum. *Mol Ther*. 2013; 21: 1862-75. doi: 10.1038/mt.2013.132.

17. Melard P, Idrissi Y, Andrique L, Poglio S, Prochazkova-Carlotti M, Berhouet S, Boucher C, Laharanne E, Chevret E, Pham-Ledard A, De Souza Goes AC, Guyonnet-Duperat V, Bibeyran A, et al. Molecular alterations and tumor suppressive function of the DUSP22 (Dual Specificity Phosphatase 22) gene in peripheral T-cell lymphoma subtypes. *Oncotarget*. 2016. doi: 10.18632/oncotarget.11930.

18. Sena-Esteves M, Tebbets JC, Steffens S, Crombleholme T, Flake AW. Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes. *J Virol Methods*. 2004; 122: 131-9. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.08.017.

19. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*. 1998; 72: 8463-71. doi:

20. Henriët E, Abou Hammoud A, Dupuy JW, Dartigues B, Ezzoukry Z, Dugot-Senant N, Leste-Lasserre T, Pallares-Lupon N, Nikolski M, Le Bail B, Blanc JF, Balabaud C, Bioulac-Sage P, et al. Argininosuccinate synthase 1 (ASS1): A marker of unclassified hepatocellular adenoma and high bleeding risk. *Hepatology*. 2017; 66: 2016-28. doi: 10.1002/hep.29336.

21. Deutsch EW, Csordas A, Sun Z, Jarnuczak A, Perez-Riverol Y, Ternent T, Campbell DS, Bernal-Llinares M, Okuda S, Kawano S, Moritz RL, Carver JJ, Wang M, et al. The ProteomeXchange consortium in 2017: supporting the cultural change in proteomics public data deposition. *Nucleic Acids Res*. 2017; 45: D1100-D6. doi: 10.1093/nar/gkw936.

22. Simon E, Theze N, Fedou S, Thiebaud P, Faucheux C. Vestigial-like 3 is a novel Ets1 interacting partner and regulates trigeminal nerve formation and cranial neural crest migration. *Biol Open*. 2017; 6: 1528-40. doi: 10.1242/bio.026153.

23. Okamura-Oho Y, Miyashita T, Yamada M. Distinctive tissue distribution and phosphorylation of IRSp53 isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 289: 957-60. doi: 10.1006/bbrc.2001.6102.

24. Garbett D, Sauvanet C, Viswanatha R, Bretscher A. The tails of apical scaffolding proteins EBP50 and E3KARP regulate their localization and dynamics. *Mol Biol Cell*. 2013; 24: 3381-92. doi: 10.1091/mbc.E13-06-0330.

25. Hagedorn M, Javerzat S, Gilges D, Meyre A, de Lafarge B, Eichmann A, Bikfalvi A. Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 1643-8.

26. Saidi A, Javerzat S, Bellahcene A, De Vos J, Bello L, Castronovo V, Deprez M, Loiseau H, Bikfalvi A, Hagedorn M. Experimental anti-angiogenesis causes upregulation of genes associated with poor survival in glioblastoma. *Int J Cancer*. 2008; 122: 2187-98.

27. Yeh TC, Ogawa W, Danielsen AG, Roth RA. Characterization and cloning of a 58/53-kDa substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 1996; 271: 2921-8.

28. Millard TH, Dawson J, Machesky LM. Characterisation of IRTKS, a novel IRSp53/MIM family actin regulator with distinct filament bundling properties. *J Cell Sci*. 2007; 120: 1663-72. doi: 10.1242/jcs.001776.

29. Goh WI, Lim KB, Sudhaharan T, Sem KP, Bu W, Chou AM, Ahmed S. mDia1 and WAVE2 proteins interact directly with IRSp53 in filopodia and are involved in filopodium formation. *J Biol Chem*. 2012; 287: 4702-14. doi: 10.1074/jbc.M111.305102.

30. Chou AM, Sem KP, Lam WJ, Ahmed S, Lim CY. Redundant functions of I-BAR family members, IRSp53 and IRTKS, are essential for embryonic development. *Sci Rep*. 2017; 7: 40485. doi: 10.1038/srep40485.

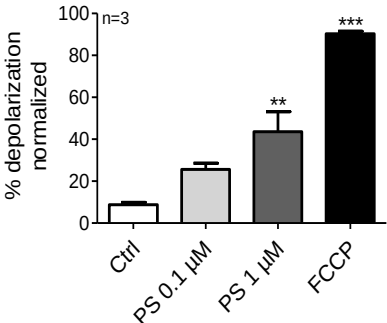
31. Funato Y, Terabayashi T, Suenaga N, Seiki M, Takenawa T, Miki H. IRSp53/Eps8 complex is important for positive regulation of Rac and cancer cell motility/invasiveness. *Cancer Res.* 2004; 64: 5237-44. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0327.
32. Ballester LY, Wang Z, Shandilya S, Miettinen M, Burger PC, Eberhart CG, Rodriguez FJ, Raabe E, Nazarian J, Warren K, Quezado MM. Morphologic characteristics and immunohistochemical profile of diffuse intrinsic pontine gliomas. *Am J Surg Pathol.* 2013; 37: 1357-64. doi: 10.1097/PAS.0b013e318294e817.
33. Mohler PJ, Kreda SM, Boucher RC, Sudol M, Stutts MJ, Milgram SL. Yes-associated protein 65 localizes p62(c-Yes) to the apical compartment of airway epithelia by association with EBP50. *J Cell Biol.* 1999; 147: 879-90.
34. Orr BA, Bai H, Odia Y, Jain D, Anders RA, Eberhart CG. Yes-associated protein 1 is widely expressed in human brain tumors and promotes glioblastoma growth. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011; 70: 568-77. doi: 10.1097/NEN.0b013e31821ff8d8.
35. Meng R, Qin Q, Xiong Y, Wang Y, Zheng J, Zhao Y, Tao T, Wang Q, Liu H, Wang S, Jiang WG, He J. NHERF1, a novel GPER associated protein, increases stability and activation of GPER in ER-positive breast cancer. *Oncotarget.* 2016; 7: 54983-97. doi: 10.18632/oncotarget.10713.
36. Wang L, Qi Y, Xiong Y, Peng Z, Ma Q, Zhang Y, Song J, Zheng J. Ezrin-Radixin-Moesin Binding Phosphoprotein 50 (EBP50) Suppresses the Metastasis of Breast Cancer and HeLa Cells by Inhibiting Matrix Metalloproteinase-2 Activity. *Anticancer Res.* 2017; 37: 4353-60. doi: 10.21873/anticancer.11829.
37. Vitureira N, Andres R, Perez-Martinez E, Martinez A, Bribian A, Blasi J, Chelliah S, Lopez-Domenech G, De Castro F, Burgaya F, McNagny K, Soriano E. Podocalyxin is a novel polysialylated neural adhesion protein with multiple roles in neural development and synapse formation. *PLoS One.* 2010; 5: e12003. doi: 10.1371/journal.pone.0012003.
38. Liu Y, Yang L, Liu B, Jiang YG. Podocalyxin promotes glioblastoma multiforme cell invasion and proliferation via beta-catenin signaling. *PLoS One.* 2014; 9: e111343. doi: 10.1371/journal.pone.0111343.
39. Hsu YH, Lin WL, Hou YT, Pu YS, Shun CT, Chen CL, Wu YY, Chen JY, Chen TH, Jou TS. Podocalyxin EBP50 ezrin molecular complex enhances the metastatic potential of renal cell carcinoma through recruiting Rac1 guanine nucleotide exchange factor ARHGEF7. *Am J Pathol.* 2010; 176: 3050-61. doi: 10.2353/ajpath.2010.090539.
40. Kislin KL, McDonough WS, Eschbacher JM, Armstrong BA, Berens ME. NHERF-1: modulator of glioblastoma cell migration and invasion. *Neoplasia.* 2009; 11: 377-87.
41. Schroeder TM, Nair AK, Staggs R, Lamblin AF, Westendorf JJ. Gene profile analysis of osteoblast genes differentially regulated by histone deacetylase inhibitors. *BMC Genomics.* 2007; 8: 362. doi: 10.1186/1471-2164-8-362.
42. Dudakovic A, Evans JM, Li Y, Middha S, McGee-Lawrence ME, van Wijnen AJ, Westendorf JJ. Histone deacetylase inhibition promotes osteoblast maturation by altering the histone H4 epigenome and reduces Akt phosphorylation. *J Biol Chem.* 2013; 288: 28783-91. doi: 10.1074/jbc.M113.489732.
43. Kremer KN, Dudakovic A, Hess AD, Smith BD, Karp JE, Kaufmann SH, Westendorf JJ, van Wijnen AJ, Hedin KE. Histone Deacetylase Inhibitors Target the Leukemic Microenvironment by Enhancing a Nherf1-Protein Phosphatase 1alpha-TAZ Signaling Pathway in Osteoblasts. *J Biol Chem.* 2015; 290: 29478-92. doi: 10.1074/jbc.M115.668160.
44. Dudakovic A, Camilleri ET, Lewallen EA, McGee-Lawrence ME, Riester SM, Kakar S, Montecino M, Stein GS, Ryoo HM, Dietz AB, Westendorf JJ, van Wijnen AJ. Histone deacetylase inhibition destabilizes the multi-potent state of uncommitted adipose-derived mesenchymal stromal cells. *J Cell Physiol.* 2015; 230: 52-62. doi: 10.1002/jcp.24680.

45. Grillo-Bosch D, Choquet D, Sainlos M. Inhibition of PDZ domain-mediated interactions. *Drug Discov Today Technol.* 2013; 10: e531-40. doi: 10.1016/j.ddtec.2012.10.003.
46. Fitzpatrick JM, Pellegrini M, Cushing PR, Mierke DF. Small molecule inhibition of the Na(+)/H(+) exchange regulatory factor 1 and parathyroid hormone 1 receptor interaction. *Biochemistry.* 2014; 53: 5916-22. doi: 10.1021/bi500368k.
47. Fujii N, Haresco JJ, Novak KA, Gage RM, Pedemonte N, Stokoe D, Kuntz ID, Guy RK. Rational design of a nonpeptide general chemical scaffold for reversible inhibition of PDZ domain interactions. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007; 17: 549-52. doi: 10.1016/j.bmcl.2006.10.006.
48. Hayashi Y, Molina JR, Hamilton SR, Georgescu MM. NHERF1/EBP50 is a new marker in colorectal cancer. *Neoplasia.* 2010; 12: 1013-22.
49. Shin SJ, Smith JA, Rezniczek GA, Pan S, Chen R, Brentnall TA, Wiche G, Kelly KA. Unexpected gain of function for the scaffolding protein plectin due to mislocalization in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110: 19414-9. doi: 10.1073/pnas.1309720110.
50. Zhou Z, Singh R, Souweidane MM. Convection-Enhanced Delivery for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Treatment. *Curr Neuropharmacol.* 2017; 15: 116-28.

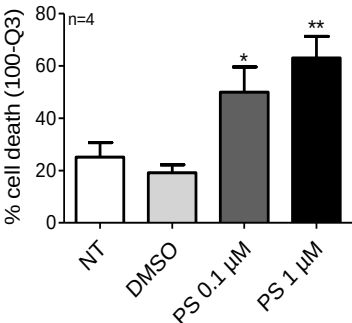
Figures and legends

Figure 1

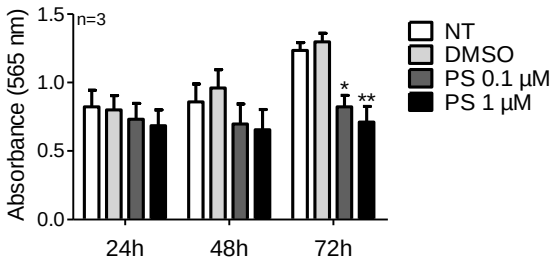
a



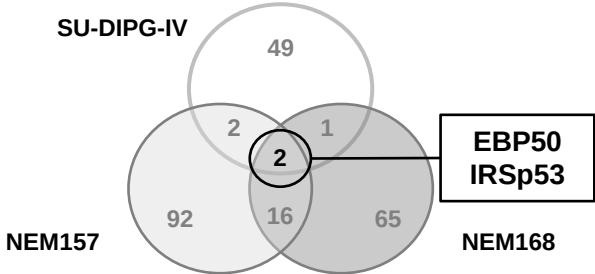
b



c



d



e

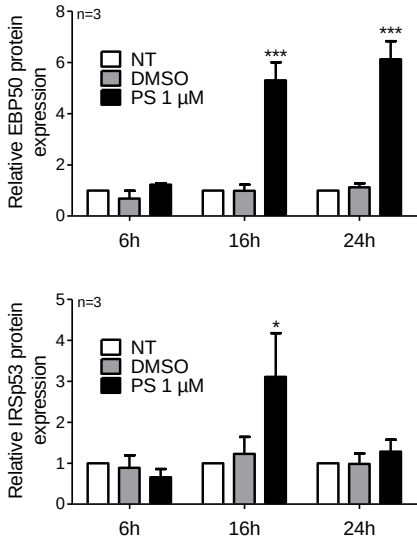
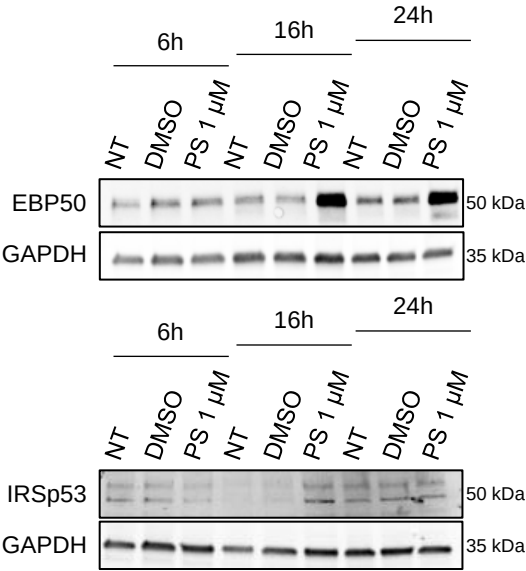
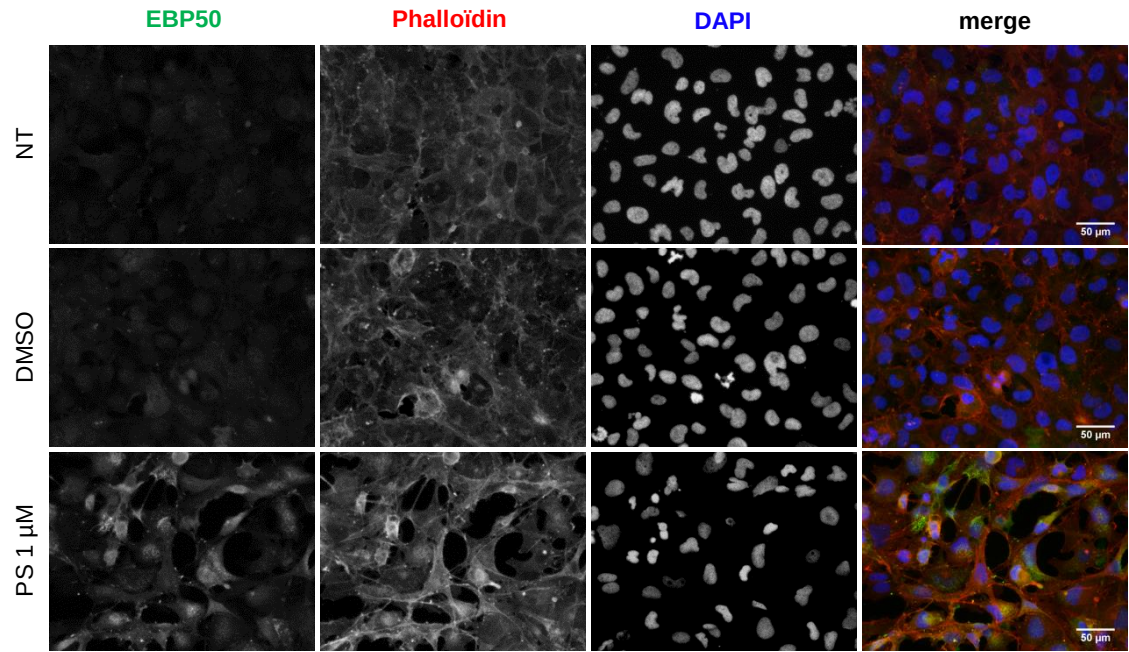


Figure 1: Panobinostat treatment effects in DMG cell lines

a) BH3 profiling at 90 minutes. NEM157 mitochondrial depolarization was measured with fluorescent dye JC-1, 16 hours after DMSO (solvent) or PS treatment. Data were normalized to DMSO. b) Cell death was measured by FACS using Annexin V-FITC / propidium iodide (PI) staining 72 hours after treatment in NEM157. c) Cell growth of NEM157 was measured at different time points (24h, 48h and 72h) using Sulforhodamine B colorimetric assay. d) Venn diagram resuming number of deregulated proteins (p-value <0.05; fold-change >1.5 or <0.7) after panobinostat treatment on indicated cell lines. e) Western blot validation of EBP50 and IRSp53 protein expression at different time points in NEM157 cells. Graphs were normalized to GAPDH. Ctrl: DMSO, NT: Not treated, Q3: number of living cells.

Figure 2

a



b

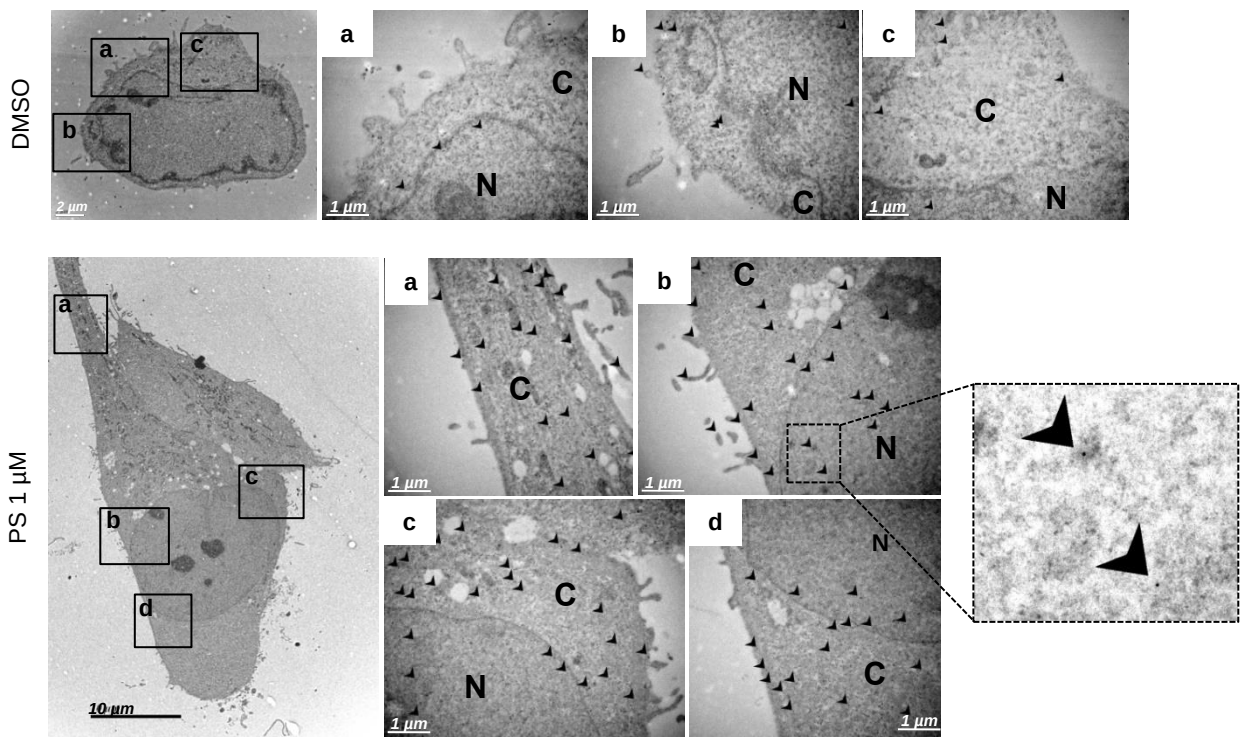


Figure 2: EBP50 immunocytochemistry and immunogold labeling

NEM157-i cells were treated with DMSO or PS during 24 hours before fixation. a) Immunofluorescence with EBP50 antibody (green), phalloïdin (red) and nuclei (blue) staining. Objective x40. b) Immunogold electron microscopy localization of EBP50 proteins. Arrows indicate the localization of EBP50 detected by 10 nm gold particles in different cellular compartments. Box on the right represents a zoom to visualize gold particles. N: nuclei, C: cytoplasm. Scale bars are indicated on pictures.

Figure 3

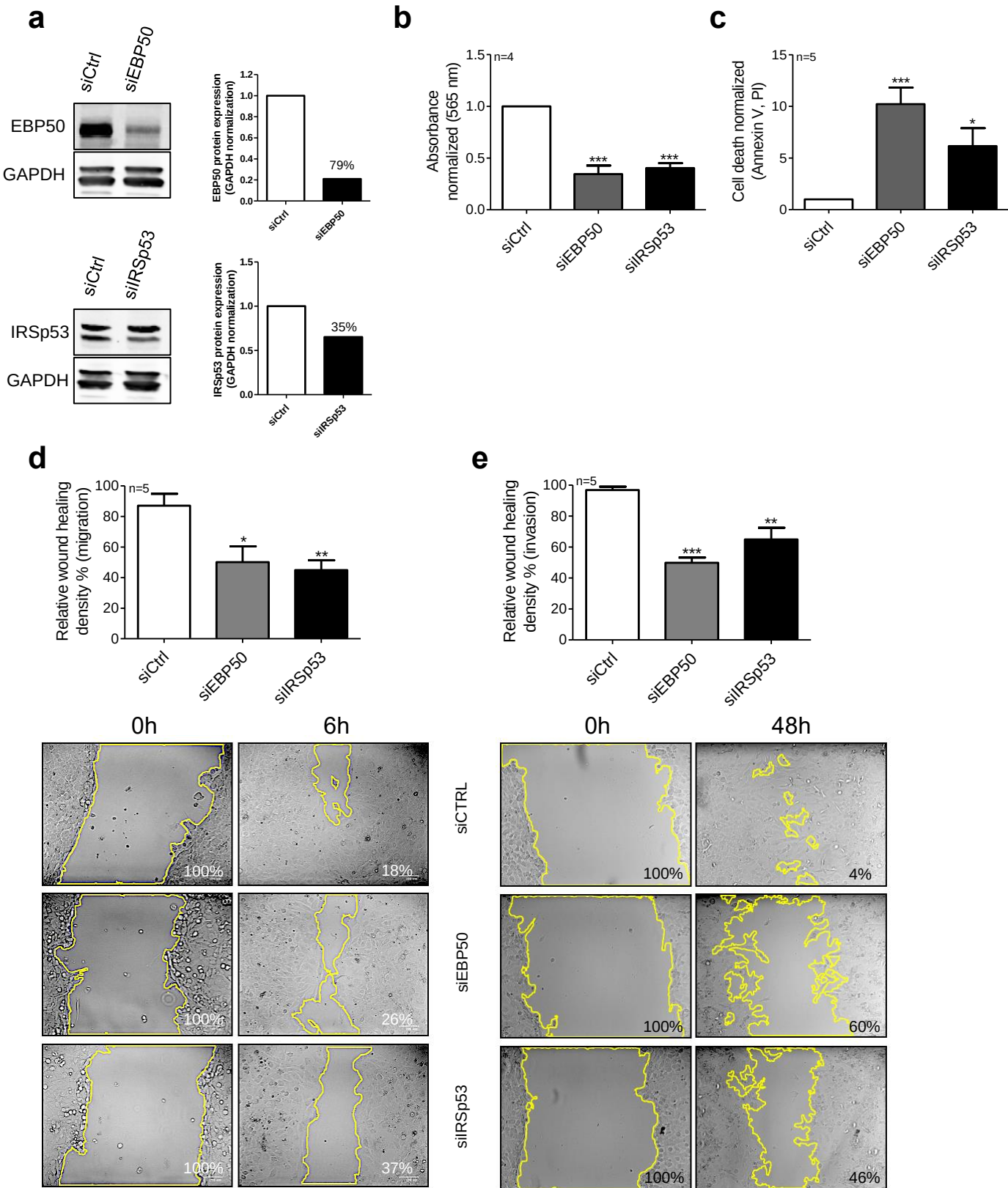
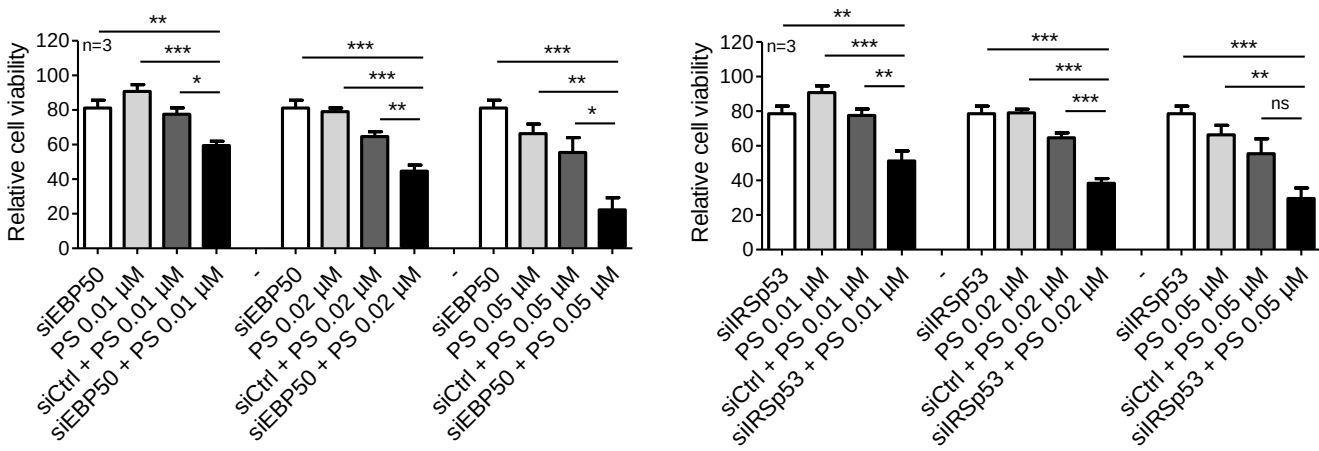


Figure 3: Biological effects of EBP50 and IRSp53 down regulation by siRNAs

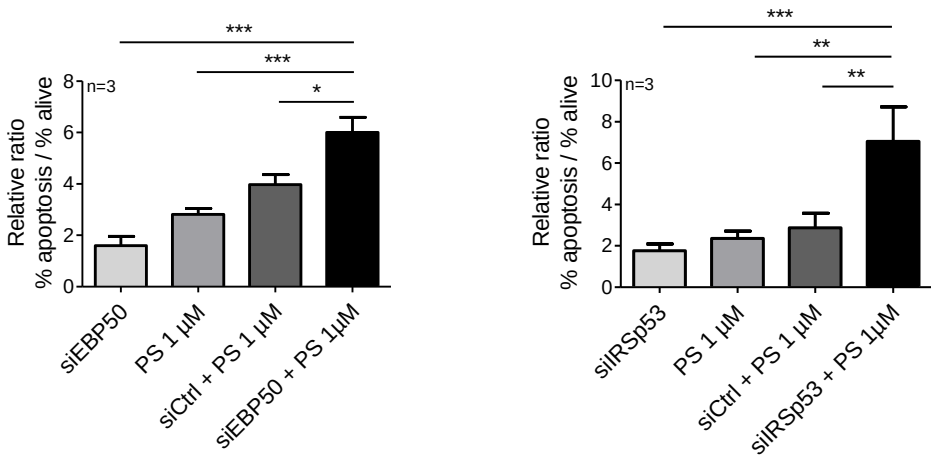
a) Western blot validation of downregulation by siRNAs in NEM157-i cells. % downregulation is indicated on graphs. b) Cell proliferation was measured by Sulforhodamine B colorimetric assay 96h after transfection. Graph is normalized to siCtrl. c) Cell death was measured by FACS with Annexin V-FITC / PI staining 72h after transfection. Graph is normalized to siCtrl. d) Migration 48h after transfection was measured using wound-healing assay. Cells were incubated 6h after injury. Graph is normalized to non-transfected cells. e) Invasion was measured in wound-healing assay coated with Matrigel® 48h after transfection. Invasion was measured 48h after injury. Graph is normalized to non-transfected cells. Representative photos of one experiment used for quantification are shown.

Figure 4

a



b



c

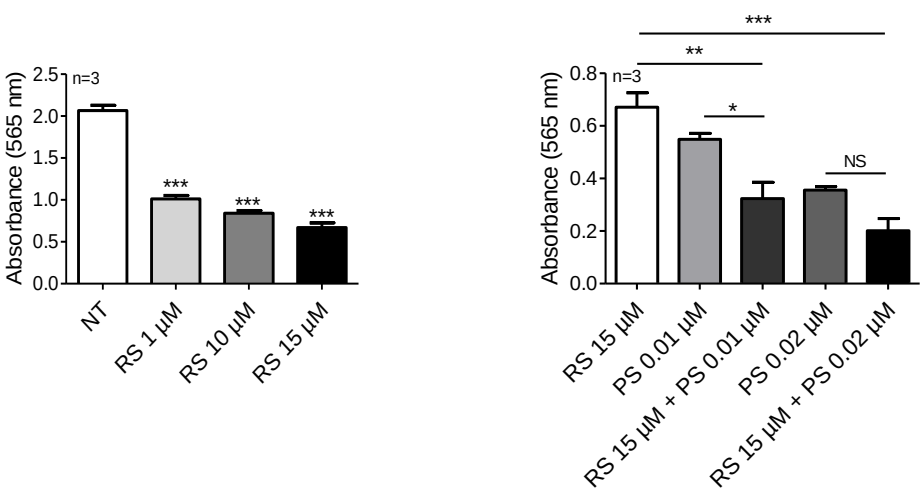


Figure 4: Combinatory effects of PS treatment and EBP50 or IRSp53 inhibition

a) NEM157-i cells were transfected with indicated siRNAs in combination with different PS doses. Cell viability was measured by Sulforhodamine B colorimetric assay 48h after PS treatment. Graph is normalized to siCtrl. b) Apoptosis was measured by flow cytometry (Annexin V-FITC/PI) 24h after PS treatment. Graph is normalized to non-transfected cells. c) Cells were treated with EBP50 inhibitor RS5517 (RS) at different doses leading to a significant decrease in cell viability. Cell viability was measured by Sulforhodamine B colorimetric assay after treatment with RS5517 alone or combines with PS at different concentration during 72 hours.

Figure 5

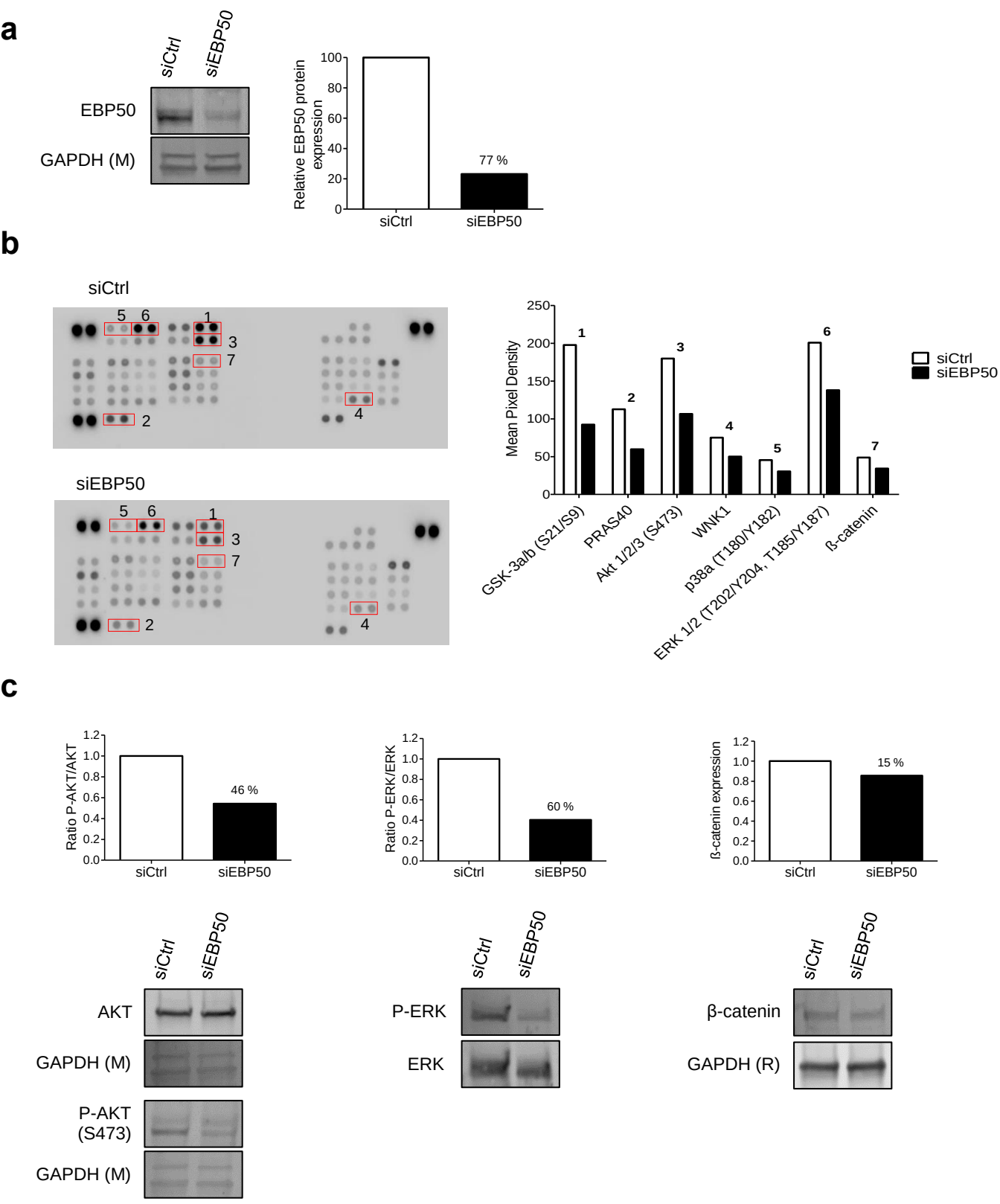
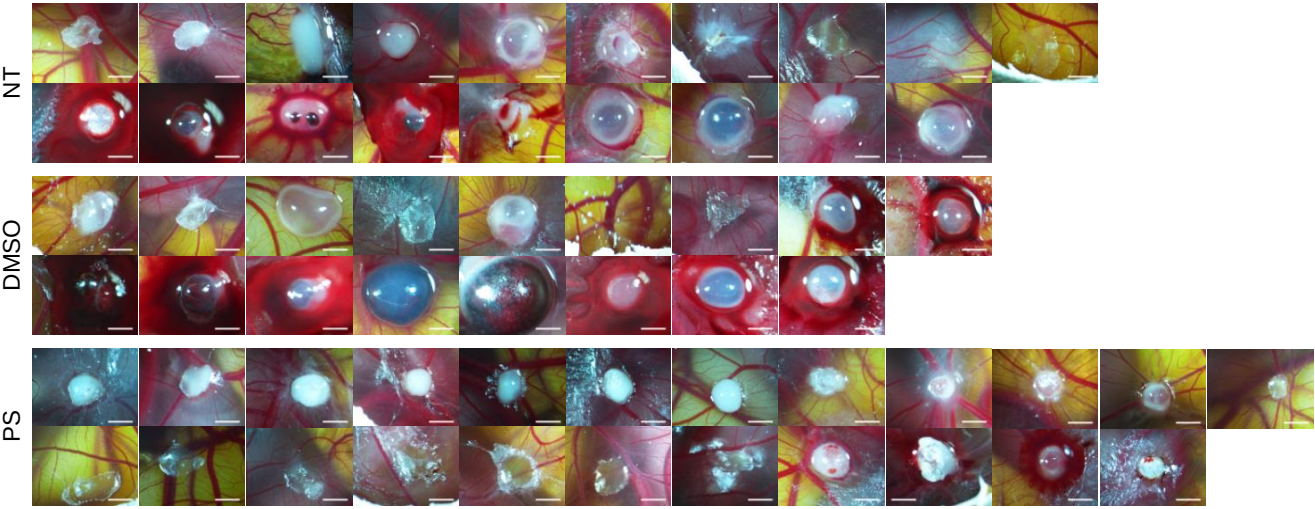


Figure 5: Knock down effects of siEBP50 on phosphorylation of protein kinases

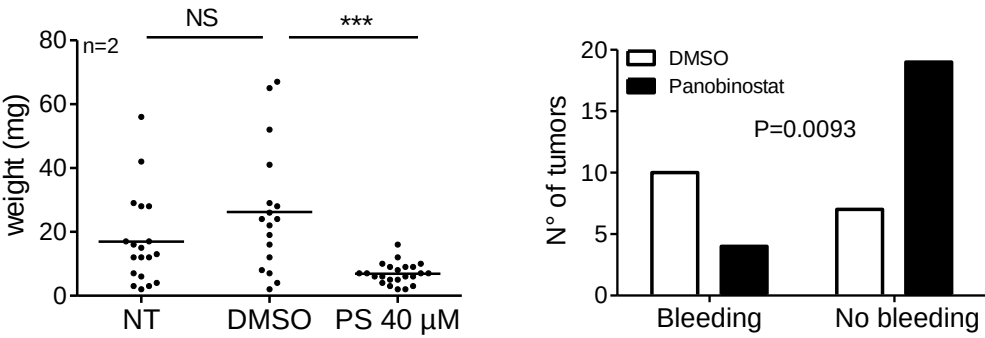
a) Validation of siEBP50 efficacy expression by Western blot in NEM168-i cells, % downregulation is indicated on graph. b) Relative levels of phosphorylation of 43 kinase phosphorylation sites were compared between siCtrl and siEBP50 after 48h of transfection. Graphs represents mean pixel density of proteins that are deregulated with a ratio <0.7-fold. Proteins are classified by numbers 1-7. c) Western blot validation of phospho-AKT (3), phospho-ERK (6) and β -catenin (7) in NEM168-i cells, % downregulation is indicated on graphs. GAPDH (R): rabbit antibody, GAPDH (M): mouse antibody.

Figure 6

a



b



c

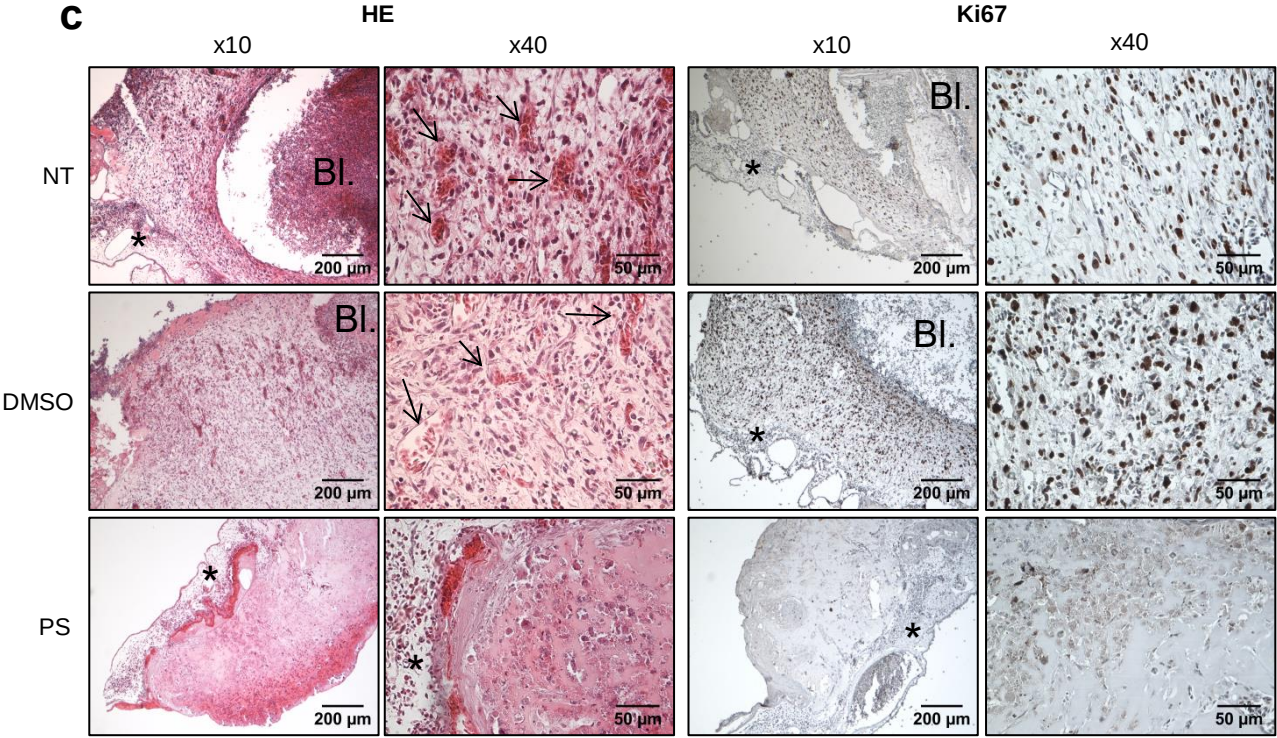
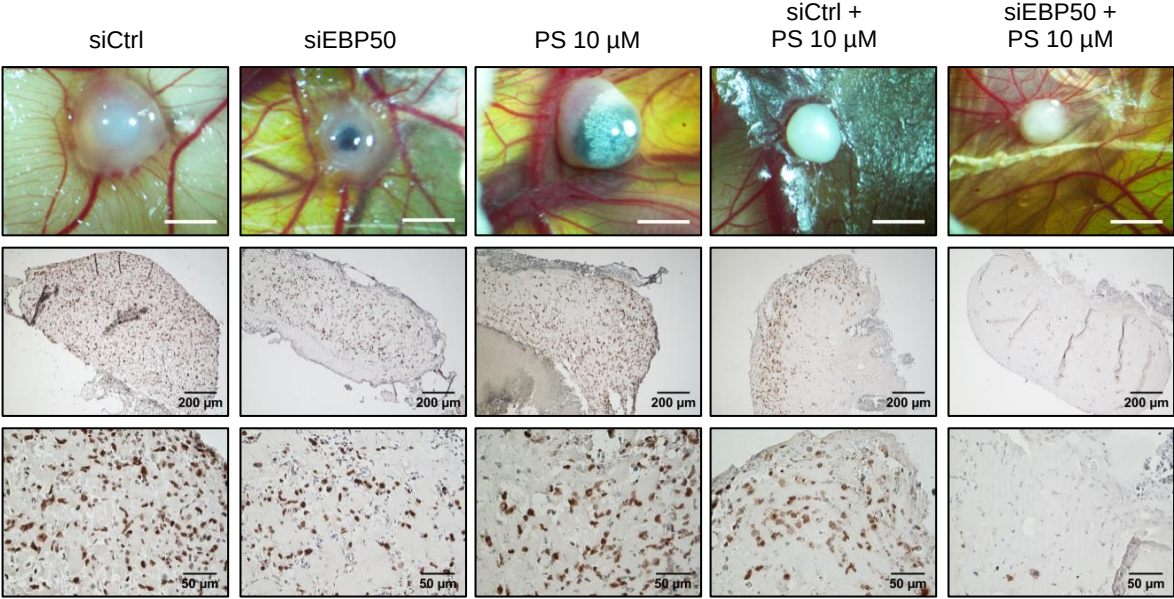


Figure 6: Development of a DMG CAM model

NEM157-i-VEGF and NEM157-i cells were mixed at 1:1 ratio embedded in Matrigel® containing PS at 40 μ M or solvent and implanted on CAMs. a) Stereomicroscopy of tumors 4 days after implantation on CAM. Scale bars represent 2mm. b) Tumor weights 7 days after implantation and resection (left graph) and classification of tumors presenting bleeding or not. c) Tumor sections stained by HE or Ki-67 immunostaining, 7 days after implantation. Bl: bleeding, *: CAM. HE: Hematoxylin-eosin, NT: not treated. Scale bars are indicated on pictures.

Figure 7

a



b

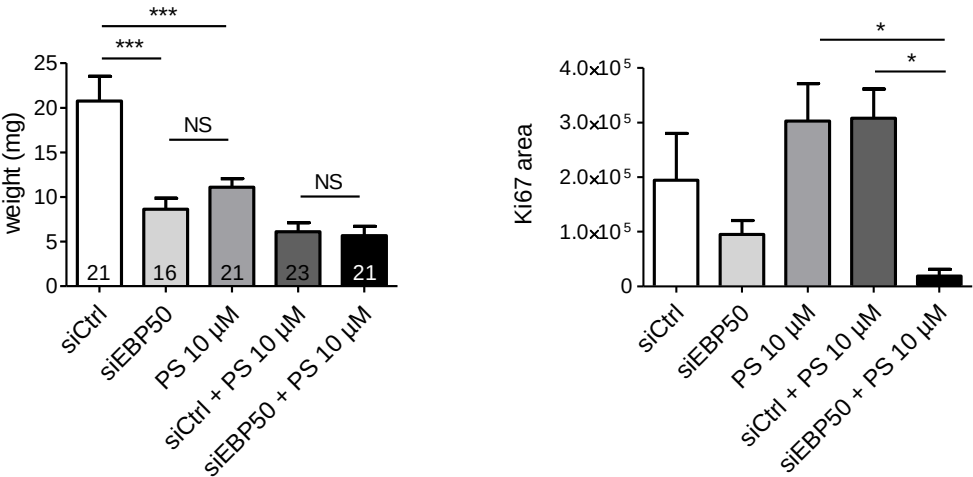


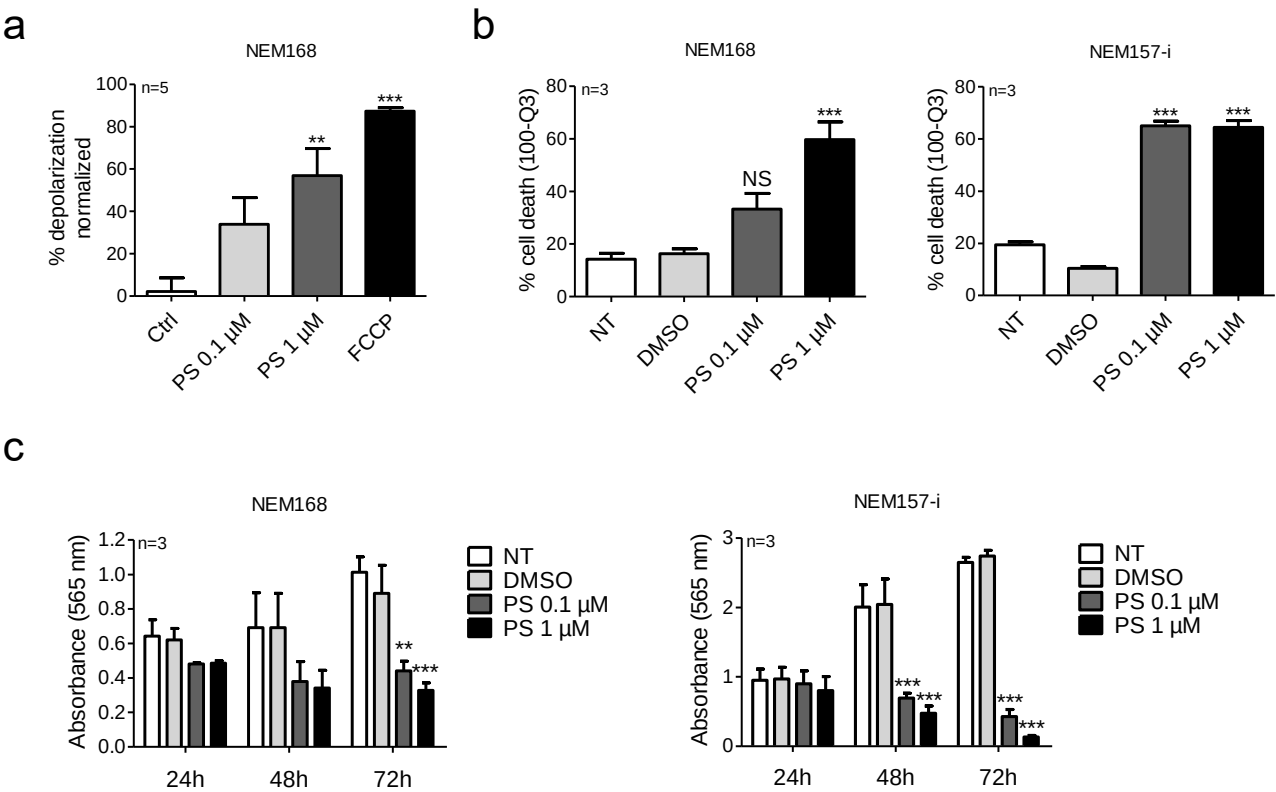
Figure 7: Combinatory effects of siEBP50 and PS on tumor development

a) Tumor monitoring by stereomicroscopy and tumor sections immunostained for Ki-67, 6 days after implantation. Scale bars are indicated on pictures (2mm for white scale bars). b) 6 days post-implantation, tumor weights and total Ki-67 area was measured. Number of CAMs per group are indicated on graph.

Supplemental Figures

Supplemental Figure 1

Figure S1: PS treatment effect in different DIPG cell lines.

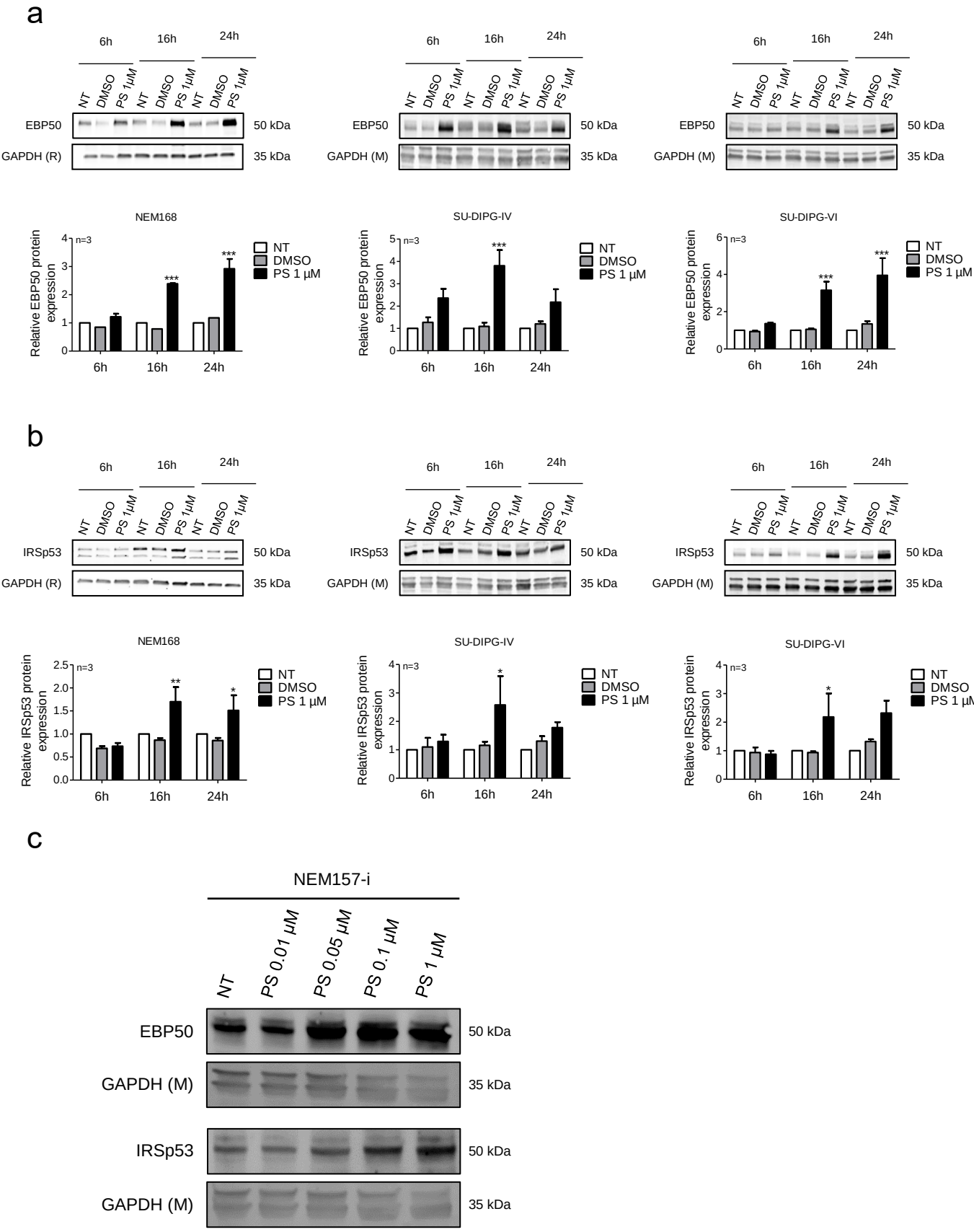


Supplementary Figure 1: PS treatment increase apoptosis and affects proliferation of additional DMG cell lines, NEM168 and NEM157-i

Cells were treated at indicated concentrations of PS or DMSO (solvent). a) BH3 profiling at 90 minutes in NEM168. Mitochondrial depolarization was measured with fluorescent dye JC-1, 16 hours after DMSO or PS treatment. Data are normalized to DMSO. b) Cell death was measured by FACS with Annexin V-FITC / PI staining after 72 hours of treatment. c) Cell growth was measured at different time points (24h, 48h and 72h) using Sulforhodamine B colorimetric assay.

Supplemental Figure 2

Figure S2: Upregulation validation of EBP50 and IRSp53 in different DMG cell lines.

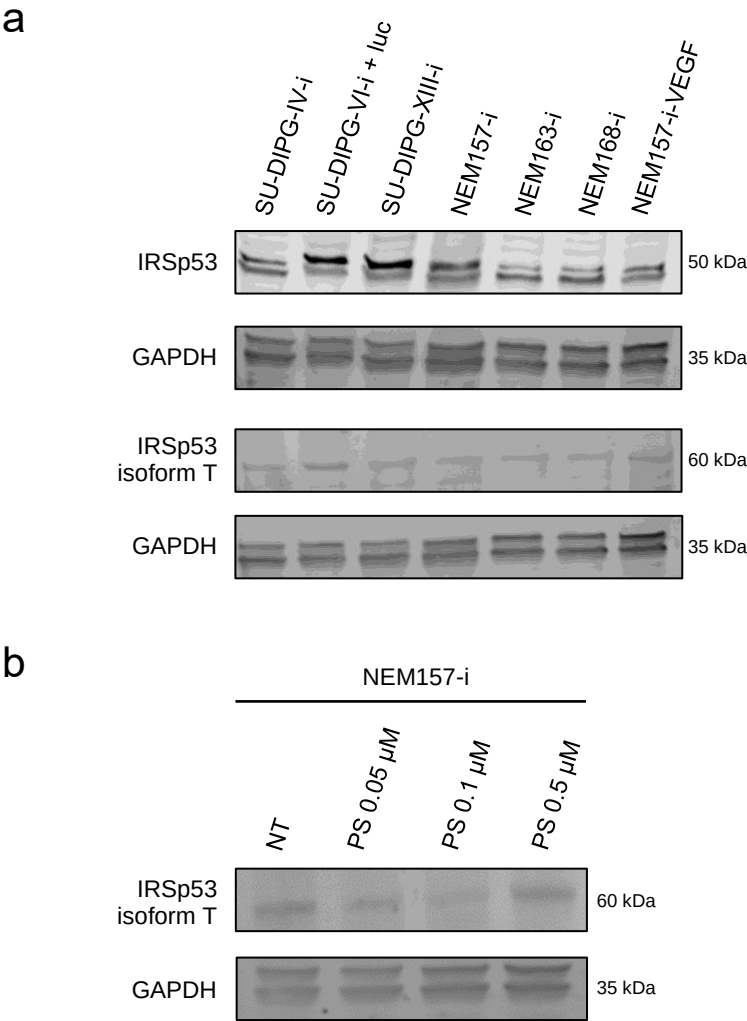


Supplementary Figure 2: Consistent up regulation of EBP50 and IRSp53 after HDACi

Additional DMG cell lines were treated with PS and expression was measured by Western blot. a) Western blot analysis of EBP50 and b) IRSp53 protein expression at indicated PS treatment durations in NEM168, SU-DIPG-IV and SU-DIPG-VI cells. Graphs were normalized to GAPDH normalization. c) Dose-dependent induction of EBP50 or IRSp53 at different concentrations of PS (0.01, 0.05, 0.1, 1 μ M) after 16 hours of treatment. NT: not treated, GAPDH (R) or (M): antibody used for GAPDH detection is rabbit (R) or mouse (M).

Supplemental Figure 3

Figure S3: Isoform T of IRSp53 expression in DMG cell lines.



Supplementary Figure 3: Expression of IRSp53 T isoform in DMG cell lines

a) Western blot analysis of total IRSp53 protein expression and isoform T in indicated DMG cell lines. b) Detection by Western blot of isoform T of IRSp53 at different concentrations of PS (0.05, 0.1, 0.5 μ M) after 16 hours of treatment. NT: not treated, +luc: cell line transduced with luciferase vector.

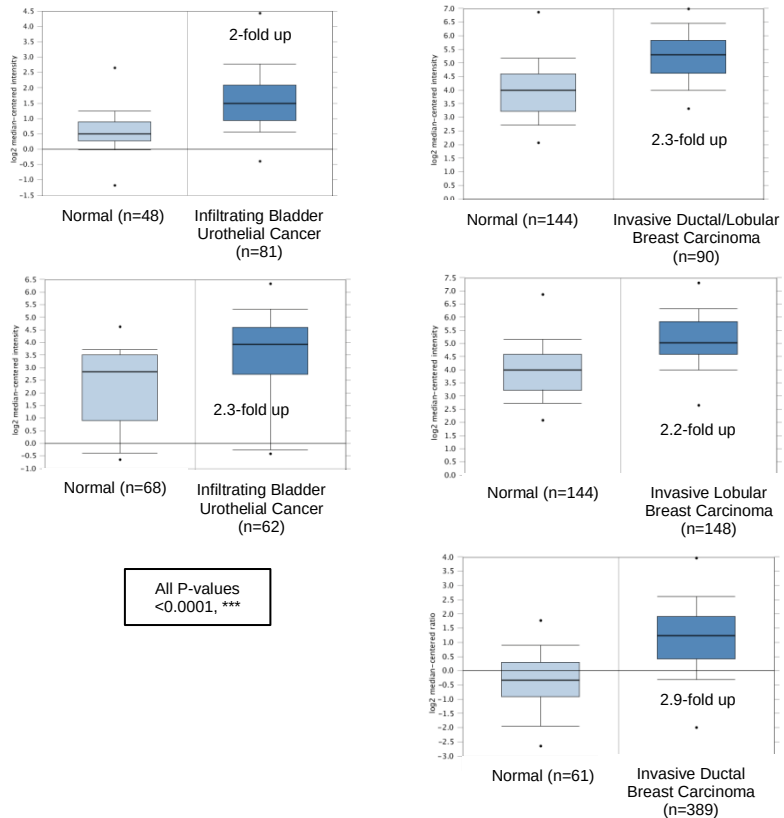
Supplemental Figure 4

a

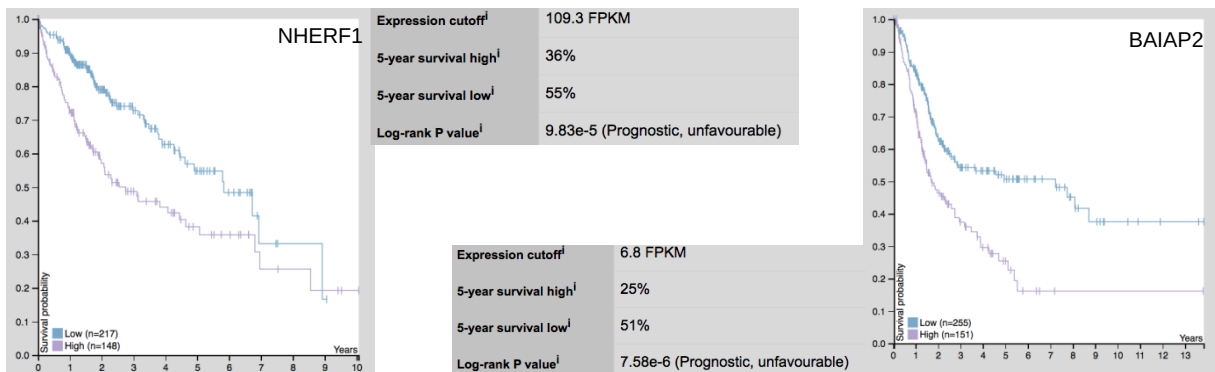
Analysis Type by Cancer	Cancer vs. Normal		Cancer vs. Cancer	
			Cancer histology	Multi-cancer
Bladder Cancer	3			
Brain and CNS Cancer		4		1
Breast Cancer	5		1	5
Cervical Cancer				
Colorectal Cancer		8		
Esophageal Cancer		2		
Gastric Cancer		3		
Head and Neck Cancer		2		1
Kidney Cancer			2	1
Leukemia		3	5	5
Liver Cancer				1
Lung Cancer	3		6	5
Lymphoma				1
Melanoma				1
Myeloma				1
Other Cancer	1	1	1	1
Ovarian Cancer	1	1		
Pancreatic Cancer				
Prostate Cancer				
Sarcoma		3	1	1
Significant Unique Analyses	13	26	16	12
Total Unique Analyses	430	727	263	

1 5 10 5 1
 ← % →

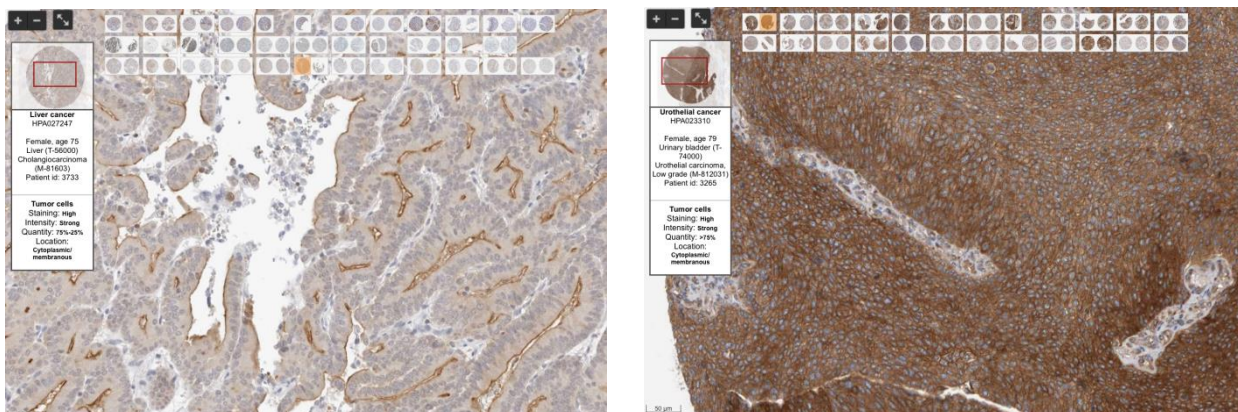
b



c



d



High resolution images can be obtained at:

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000109062-SLC9A3R1/pathology/tissue/liver+cancer>
 (Antibody HPA027247)

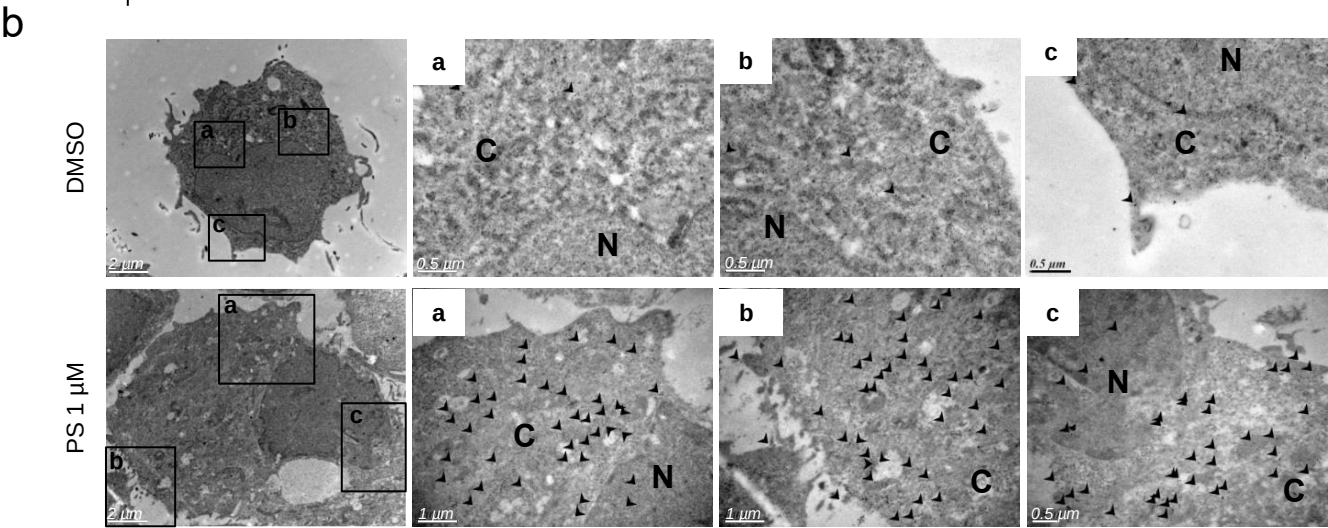
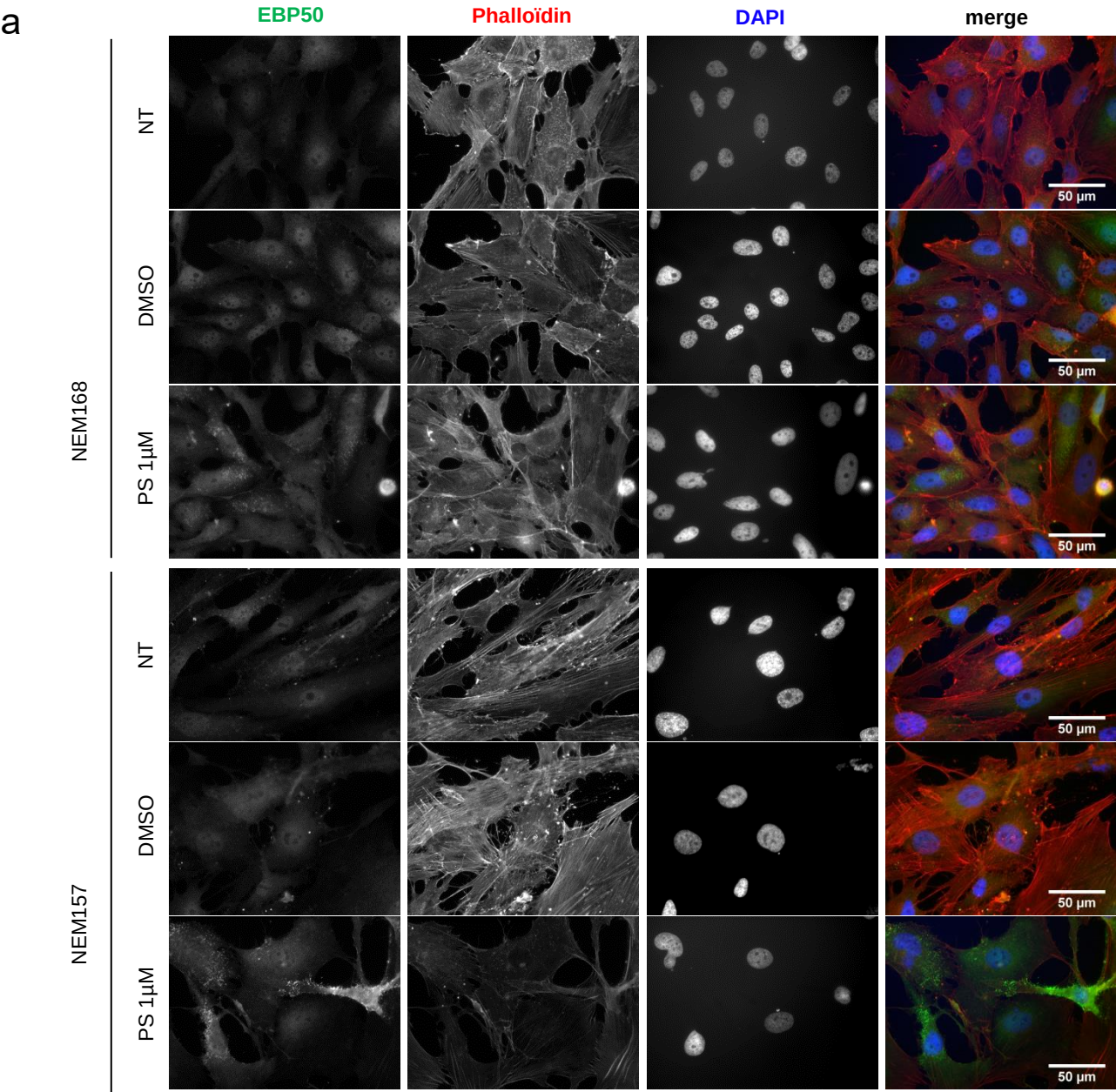
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000175866-BAIAP2/pathology/tissue/urothelial+cancer>
 (Antibody HPA023310)

Supplementary Figure 4: Over expression of SLC9A3R1 in invasive cancers and association of SLC9A3R1 and BAIAP2 with poor survival

Using Oncomine and ProteinAtlas databases we retrieved information about gene/protein expression of SLC9A3R1 and BAIAP2. a) Heterogeneous expression of SLC9A3R1 in different human tumors. b) Over expression of SLC9A3R1 in invasive cancers. c) High levels of SLC9A3R1 and BAIAP2 are associated with poor survival in invasive solid tumors such as liver cancer and urothelial cancer. d) Demonstration of protein expression of both proteins in invasive cancers.

Supplemental Figure 5

Figure S5: Localization of EBP50 by immunofluorescence and electron microscopy.

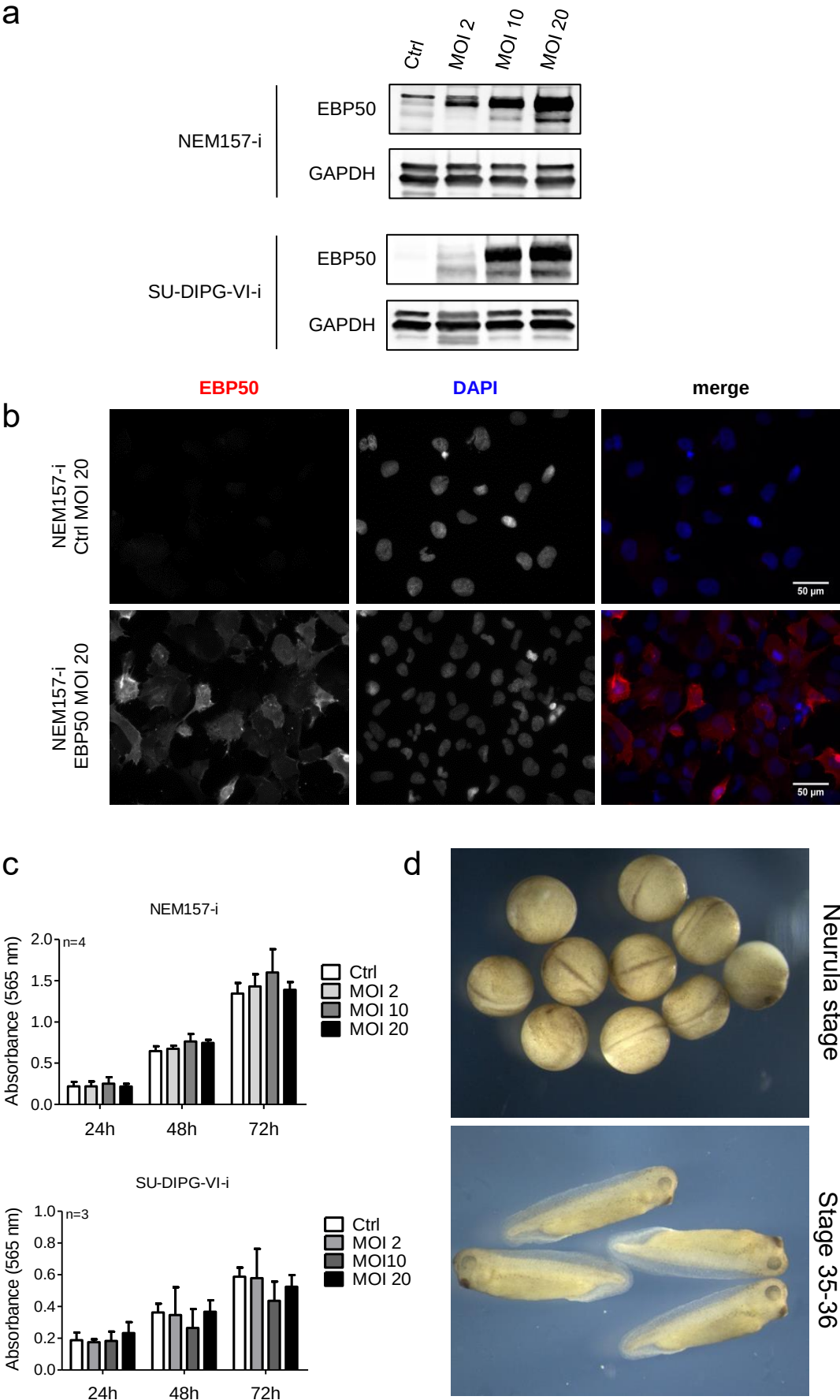


Supplementary Figure 5: Demonstration of EBP50 localization in additional DMG cell lines

NEM168 and NEM157 were treated with DMSO 0.1% or PS 1 μ M during 24 hours before fixation. a) Immunofluorescence with EBP50 antibody (green), phalloidin (red) and nuclei (blue) staining. Objective x63. b) Immunogold electron microscopy localization of EBP50 proteins in SU-DIPG-VI-i. Arrows indicate localization of EBP50 by the detection of 10 nm gold particles. SU-DIPG-VI-i cells were treated with DMSO 0.1% or PS 1 μ M during 24 hours before fixation. N: nuclei; C: cytoplasm. Scale bars are indicated on pictures.

Supplemental Figure 6

Figure S6: Effect of EBP50 over expression on cell growth and embryonic development.

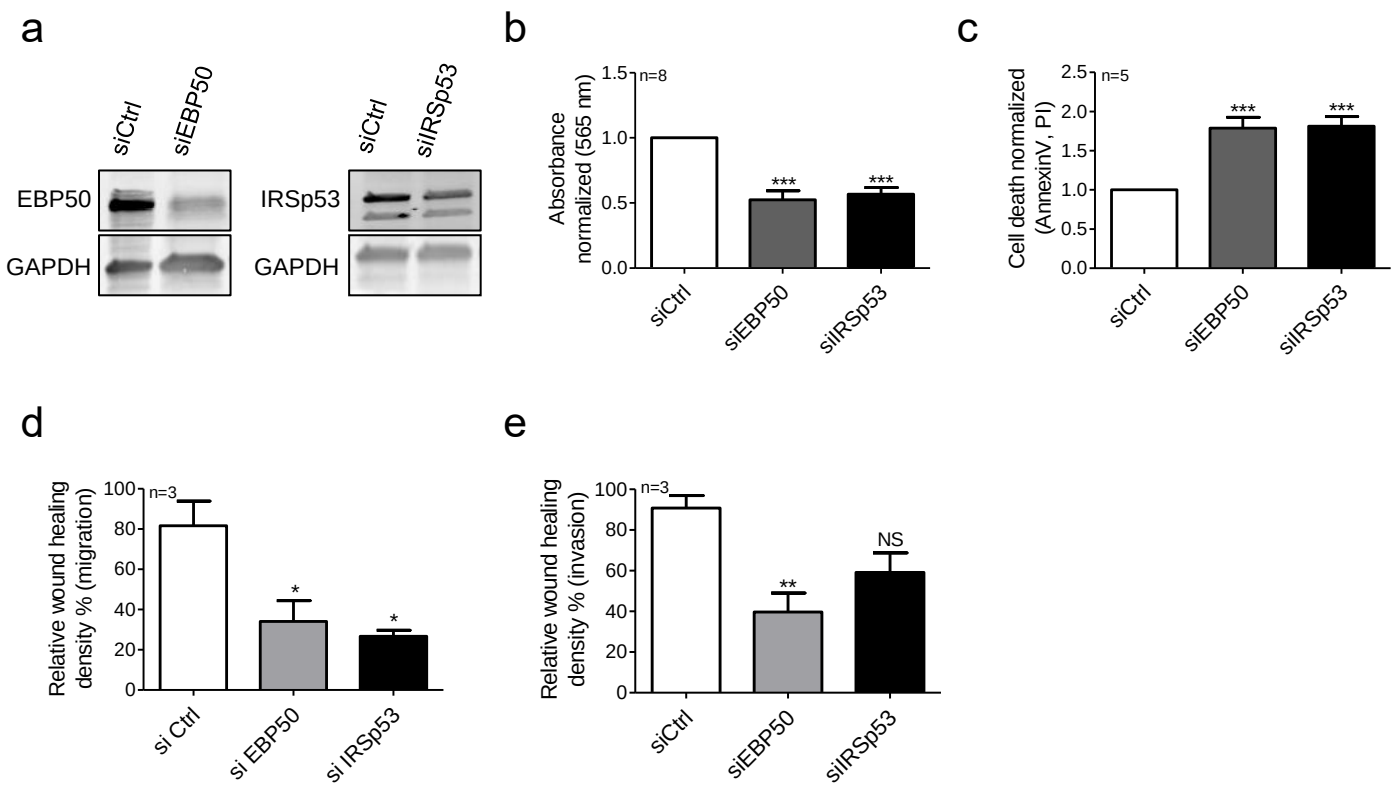


Supplementary Figure 6: Over expression of EBP50 has no effect on cell proliferation

NEM157-i or SU-DIPG-IV-i were transduced with lentivirus vector coding for EBP50 sequence at different MOIs or with control vector. a) Validation of over expression by Western blot. b) Localization of EBP50 by immunofluorescence after transduction with control vector or EBP50 lentivirus. Red: EBP50, Blue: DAPI. Ctrl: control vector, MOI: Multiplicity Of Infection. c) Cell proliferation measured by Sulforhodamine B colorimetric assay at indicated time points. d) Over expression of EBP50 in *xenopus* embryos has no visible morphological effects on development at indicated developmental stages. Two-cell stage embryos were injected with 4 ng of EBP50 mRNA into the animal pole of the two blastomeres and then observed at neurula stage and stage 35-36. No defects were observed.

Supplemental Figure 7

Figure S7: Effect of siRNA on cell phenotypes.



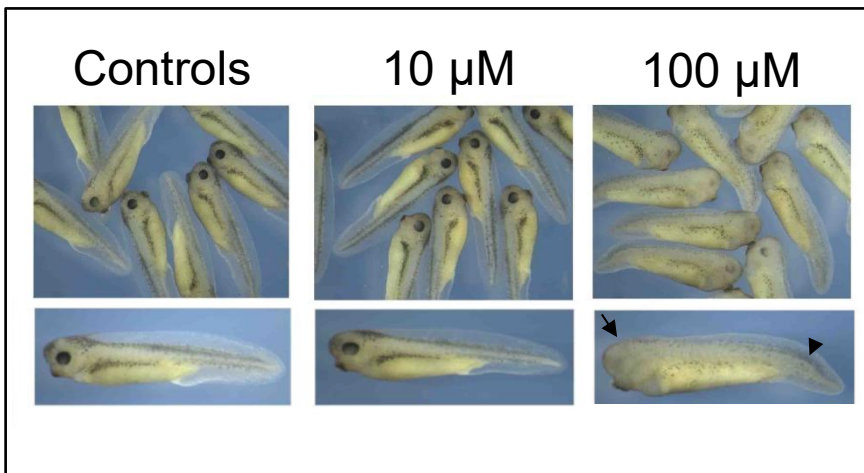
Supplementary Figure 7: Biological effects of EBP50 and IRSp53 downregulation in additional DMG cell lines

NEM168 cells were transfected with siRNAs against EBP50 or IRSp53. a) Western blot validation of down regulation by siRNAs. b) Cell proliferation assays 96h after transfection using Sulforhodamine B colorimetric assay. Graph is normalized to control siRNA. c) Cell death was measured by FACS with Annexin V-FITC / PI staining after 72h of transfection. Graph is normalized to control siRNA. d) Migration 48h after transfection was detected using wound-healing assay. Wound closure was measured 16 hours after injury. Graph is normalized to non-transfected cells. e) Invasion was measured by wound-healing assay coated with Matrigel® 48h after transfection. Wound-healing was measured 48h after injury. Graph is normalized to non-transfected cells.

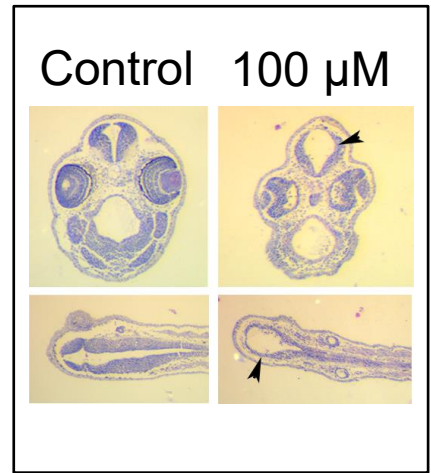
Supplemental Figure 8

Figure S8: Treatment of xenopus embryos with PS.

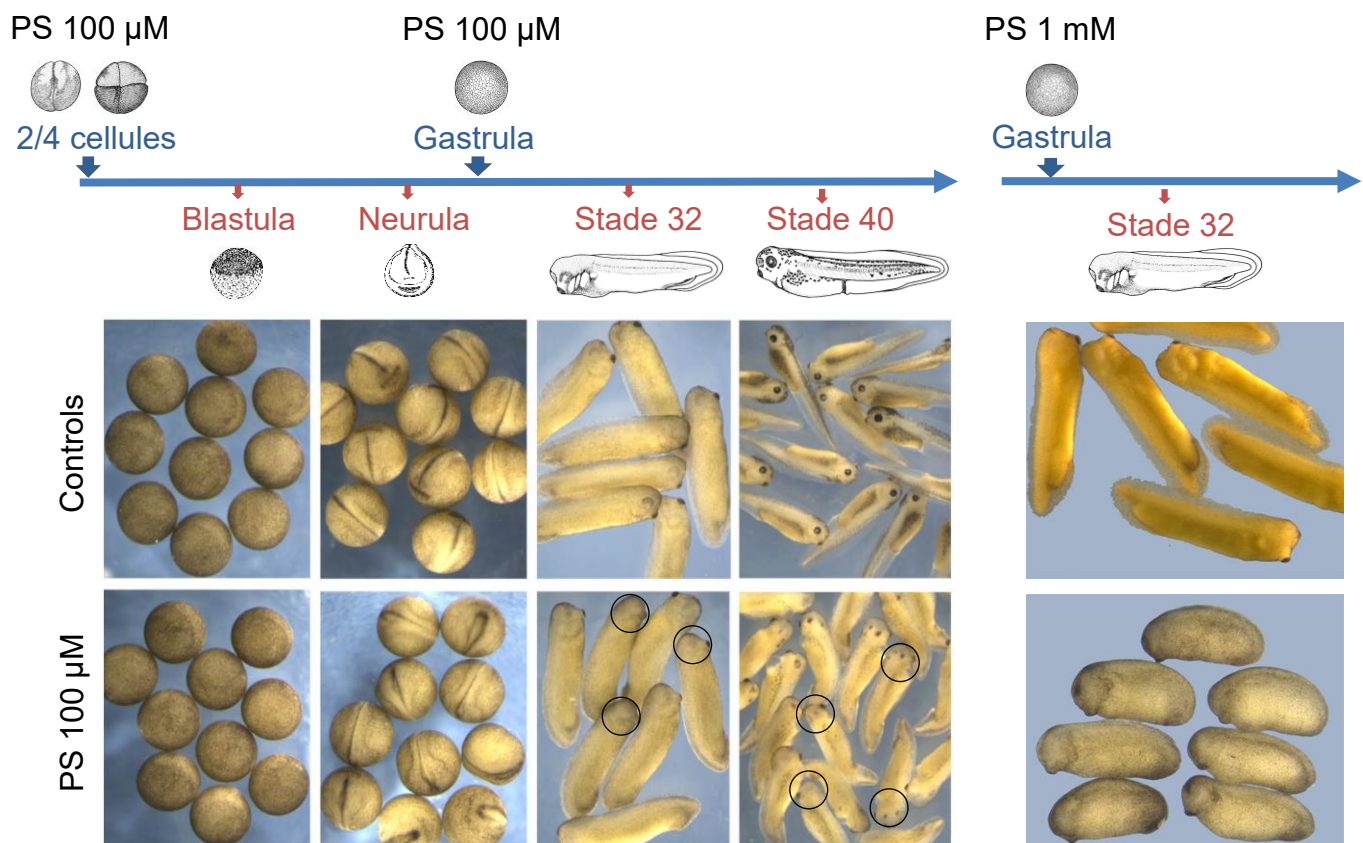
a



b



c



Supplementary Figure 8: Developmental defects of *xenopus* embryos treated with PS

Embryos were treated with PS at different concentrations and stages. a) PS treatment at 2/4-cells stage in medium and at indicated concentrations. Phenotypic alterations became evident at 100 μ M of PS characterized by brain, eye and pigmentation abnormalities, but also cardiac edema and curved tail at stage 40 (arrows). b) Histological sections of stage 40 untreated embryo (control) or treated with 100 μ M PS. Transverse (upper pannel) and frontal sections (lower pannel) show reduction in brain thickness (arrowheads) and eye malformation. c) Embryos were treated at different stages of development with 100 μ M or 1mM of PS. Delay of neural tube closure was observed after exposure to PS treatment during 2/4-cells stage. Other abnormalities observed at stage 40 in a) were also found in embryos treated at 2/4-cells stage or gastrula stage (Circles, eye malformations). At 1 mM, embryonic development was greatly delayed at stage 32.

Supplementary Table 1: Summary of proteins significantly deregulated after PS treatment in three different cell lines based on mass spectrometry analysis.

NEM157, NEM168 and SU-DIPG-IV were treated with PS at 1 μ M during 16 hours before mass spectrometry analysis. Criteria of selection were: ratio T vs NT ≥ 1.5 or ≤ 0.7 with a P-value ≤ 0.05 and specific peptides ≥ 2 (excepted for EBP50 in SU-DIPG-IV: 2/3 replicates significantly deregulated and 1 peptide detected). g1: treated, g2: not treated.

SU-DIPG-IV				
accession	description	ratio g1/g2	T-test	specific peptides
I3L4C2	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2 OS=Homo sapiens GN=BAIAP2 PE=1 SV=1	3,923567	0,048866	6
AOA0D9SEY1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4 OS=Homo sapiens GN=MAP4K4 PE=1 SV=1	2,695161	0,032684	6
J3KS22	L-xylose reductase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DCXR PE=1 SV=6	1,722574	0,019171	2
P05121	Plasminogen activator inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=SERPINE1 PE=1 SV=1	1,582604	0,049383	3
Q13011	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ECH1 PE=1 SV=2	1,570156	0,003017	5
P43686	26S protease regulatory subunit 6B OS=Homo sapiens GN=RPSM4 PE=1 SV=2	0,445055	0,01445	3
P62857	40S ribosomal protein S28 OS=Homo sapiens GN=RPS28 PE=1 SV=1	0,543699	0,02845	2
P62241	40S ribosomal protein S8 OS=Homo sapiens GN=RPS8 PE=1 SV=2	0,593474	0,042556	11
Q9H0D6	5'-3' exoribonuclease 2 OS=Homo sapiens GN=XRN2 PE=1 SV=1	0,598578	0,031604	2
P49588	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=AARS PE=1 SV=2	0,482258	0,007754	4
P61163	Alpha-centractin OS=Homo sapiens GN=ACTR1A PE=1 SV=1	0,511507	0,018928	2
P40222	Alpha-taxilin OS=Homo sapiens GN=TXLNA PE=1 SV=3	5,13E-17	0,001092	2
P17174	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=GOT1 PE=1 SV=3	0,465731	0,025085	7
F5H2F4	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MTHFD1 PE=1 SV=1	0,685362	0,044291	9
Q14444	Caprin-1 OS=Homo sapiens GN=CAPRIN1 PE=1 SV=2	0,65796	0,013389	5
Q12873	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3 OS=Homo sapiens GN=CHD3 PE=1 SV=3	7,18E-18	0,003273	3
P53618	Coatomer subunit beta OS=Homo sapiens GN=COPB1 PE=1 SV=3	0,546283	0,00401	13
P02452	Collagen alpha-1(I) chain OS=Homo sapiens GN=COL1A1 PE=1 SV=5	0,6349	0,017006	19
P02461	Collagen alpha-1(III) chain OS=Homo sapiens GN=COL3A1 PE=1 SV=4	0,26215	0,023398	5
P30046	D-dopachrome decarboxylase OS=Homo sapiens GN=DDT PE=1 SV=3	0,683697	0,04589	3
AOA0C4DFX3	EMILIN-1 OS=Homo sapiens GN=EMILIN1 PE=1 SV=1	0,391672	0,04245	5
Q7L2H7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M OS=Homo sapiens GN=EIF3M PE=1 SV=1	0,467126	0,00202	5
Q06210	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1 OS=Homo sapiens GN=GFPT1 PE=1 SV=3	0,274356	0,005874	4
I3LOA0	HCG2044781 OS=Homo sapiens GN=TMEM189-UBE2V1 PE=4 SV=1	0,451946	0,00191	3
O00410	Importin-5 OS=Homo sapiens GN=IPO5 PE=1 SV=4	0,47022	0,004698	14
Q15785	Mitochondrial import receptor subunit TOM34 OS=Homo sapiens GN=TOMM34 PE=1 SV=2	0,234448	0,027247	3
Q7L9L4	MOB kinase activator 1B OS=Homo sapiens GN=MOB1B PE=1 SV=3	0,469214	0,000312	2
C9JEV6	N-acetyl-D-glucosamine kinase OS=Homo sapiens GN=NAGK PE=1 SV=3	0,345318	0,046132	3
Q8NCW5	NAD(P)H-hydrate epimerase OS=Homo sapiens GN=APOA1BP PE=1 SV=2	0,378601	0,009163	2
Q15758	Neutral amino acid transporter B(0) OS=Homo sapiens GN=SLC1A5 PE=1 SV=2	0,687662	0,015344	4
K7EMW4	Nicalin OS=Homo sapiens GN=NCLN PE=1 SV=1	0,555634	0,03689	5
Q9Y2X3	Nucleolar protein 58 OS=Homo sapiens GN=NOP58 PE=1 SV=1	0,59907	0,032773	5
C9J7K9	Phospholipid scramblase 1 OS=Homo sapiens GN=PLSCR1 PE=1 SV=1	1,59E-16	0,001362	2
AOA0J9YVP6	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PUF60 PE=1 SV=1	0,16581	0,038966	4
Q9UHV9	Prefoldin subunit 2 OS=Homo sapiens GN=PFDN2 PE=1 SV=1	0,127089	0,028262	2
P26196	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 OS=Homo sapiens GN=DDX6 PE=1 SV=2	0,456158	0,049453	5
E7ETU9	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 OS=Homo sapiens GN=PLOD2 PE=1 SV=1	0,662407	0,028716	4
Q16647	Prostacyclin synthase OS=Homo sapiens GN=PTGIS PE=1 SV=1	0,294087	0,018418	3
Q9BZQ8	Protein Niban OS=Homo sapiens GN=FAM129A PE=1 SV=1	0,642589	0,025004	2
Q9H2M9	Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=RAB3GAP2 PE=1 SV=1	0,520497	0,003987	2
Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=G3BP1 PE=1 SV=1	0,610003	0,027248	7
E2QRG8	Receptor expression-enhancing protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=REEP5 PE=1 SV=1	0,647615	0,020971	3
P63151	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform OS=Homo sapiens GN=PPP2R2A PE=1 SV=1	0,317183	0,009489	2
P08240	Signal recognition particle receptor subunit alpha OS=Homo sapiens GN=SRPR PE=1 SV=2	0,48629	0,014331	10
Q01081	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit OS=Homo sapiens GN=U2AF1 PE=1 SV=3	0,596992	0,017611	4
Q96EM0	Trans-3-hydroxy-L-proline dehydratase OS=Homo sapiens GN=L3HYPDH PE=1 SV=2	0,479366	0,012268	2
P20290	Transcription factor BTF3 OS=Homo sapiens GN=BTF3 PE=1 SV=1	0,649638	0,015281	5
Q00577	Transcriptional activator protein Pur-alpha OS=Homo sapiens GN=PURA PE=1 SV=2	0,350073	0,000435	4
P22102	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3 OS=Homo sapiens GN=GART PE=1 SV=1	0,598707	0,009441	13
Q08123	tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase OS=Homo sapiens GN=NSUN2 PE=1 SV=2	0,450742	0,036761	2
Q13641	Trophoblast glycoprotein OS=Homo sapiens GN=TPBG PE=1 SV=1	0,690852	0,010976	2
F8W726	Ubiquitin-associated protein 2-like OS=Homo sapiens GN=UBAP2L PE=1 SV=2	0,284236	0,005956	4
K7EQ16	UV excision repair protein RAD23 homolog A (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RAD23A PE=1 SV=1	0,522194	0,018612	8
O14745	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 OS=Homo sapiens GN=SLC9A3R1 PE=1 SV=4	2,245509	0,184711	1

Supplemental Table 1

Table S1: Deregulated proteins after PS treatment based on mass spectrometry analysis.

NEM157				
accession	description	ratio g1/g2	T-test	specific peptides
K7EM11	PDZ domain-containing protein GIPC1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=GIPC1 PE=1 SV=1	6,6E+16	0,04904	2
P11169	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3 OS=Homo sapiens GN=SLC2A3 PE=1 SV=	4,94E+16	0,00393	2
P11926	Ornithine decarboxylase OS=Homo sapiens GN=ODC1 PE=1 SV=2	4,4E+16	0,01373	2
A0A0G2JH46	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain OS=Homo sapiens GN=HLA-DRA PE=1 SV=1	3,46E+16	0,02186	3
O00291	Huntingtin-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=HIP1 PE=1 SV=5	2,39E+16	0,01109	2
G3V126	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 50/57kDa, V1 subunit H, isoform CRA_c OS=Homo sapiens GN=ATP6V1H PE=1 SV=1	2,27E+16	0,02925	4
F6WST4	ORM1-like protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ORMDL1 PE=1 SV=6	1,92E+16	0,01186	2
E9PIF4	Sialidase-1 OS=Homo sapiens GN=NEU1 PE=1 SV=1	6,779869	0,00561	2
Q9UEW8	STE20/SPS1-related proline-alanine-rich protein kinase OS=Homo sapiens GN=STK39 PE=1 SV=3	6,726671	0,02527	2
P09601	Heme oxygenase 1 OS=Homo sapiens GN=HMOX1 PE=1 SV=1	5,423441	0,00296	5
P48307	Tissue factor pathway inhibitor 2 OS=Homo sapiens GN=TFPI2 PE=1 SV=1	5,322948	0,02931	4
Q9UQB8	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2 OS=Homo sapiens GN=BAIAP2 PE=1 SV=1	4,482849	0,00219	13
P25685	DnaJ homolog subfamily B member 1 OS=Homo sapiens GN=DNAJB1 PE=1 SV=4	4,036803	0,00025	10
Q86V48	Leucine zipper protein 1 OS=Homo sapiens GN=LUZP1 PE=1 SV=2	3,406704	0,0025	5
Q14315	Filamin-C OS=Homo sapiens GN=FLNC PE=1 SV=3	3,1947	0,00199	149
P40763	Signal transducer and activator of transcription 3 OS=Homo sapiens GN=STAT3 PE=1 SV=2	3,170276	0,011	5
P07305	Histone H1.0 OS=Homo sapiens GN=H1F0 PE=1 SV=3	2,913597	0,00395	5
Q13907	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1 OS=Homo sapiens GN=IDI1 PE=1 SV=2	2,723202	0,00602	3
J3KNN5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DDX41 PE=1 SV=1	2,651575	0,0086	2
Q9UI42	Carboxypeptidase A4 OS=Homo sapiens GN=CPA4 PE=1 SV=2	2,58723	0,00252	4
P29279	Connective tissue growth factor OS=Homo sapiens GN=CTGF PE=1 SV=2	2,554116	0,00184	6
Q01650	Large neutral amino acids transporter small subunit 1 OS=Homo sapiens GN=SLC7A5 PE=1 SV=2	2,33615	0,02392	2
O14745	Na ⁺ /H ⁺ exchange regulatory cofactor NHE-RF1 OS=Homo sapiens GN=SLC9A3R1 PE=1 SV=4	2,266532	0,002	8
O43290	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=SART1 PE=1 SV=1	2,223341	0,01189	2
P29992	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11 OS=Homo sapiens GN=GNA11 PE=1 SV=2	2,089291	0,00871	5
Q6EMK4	Vasorin OS=Homo sapiens GN=VASN PE=1 SV=1	2,067011	0,03598	2
C9J363	Programmed cell death 10, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=PDCD10 PE=1 SV=1	2,059497	0,01774	3
Q3ZCQ8	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50 OS=Homo sapiens GN=TIMM50 PE=1 SV=2	2,00634	0,0434	4
A0A0C4DG89	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46 OS=Homo sapiens GN=DDX46 PE=1 SV=1	1,961592	0,03203	7
O95721	Synaptosomal-associated protein 29 OS=Homo sapiens GN=SNAP29 PE=1 SV=1	1,882908	0,00373	4
O94925	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GLS PE=1 SV=1	1,866975	0,00224	5
Q14643	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 OS=Homo sapiens GN=ITPR1 PE=1 SV=3	1,846624	0,01134	2
A0A0G2JW1	Heat shock 70 kDa protein 1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1B PE=1 SV=1	1,80564	0,00092	41
P46734	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3 OS=Homo sapiens GN=MAP2K3 PE=1 SV=2	1,754398	0,00062	6
P31350	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 OS=Homo sapiens GN=RRM2 PE=1 SV=1	1,737254	0,00382	9
Q9H4M9	EH domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=EHD1 PE=1 SV=2	1,657597	0,01101	15
Q15363	Transmembrane emp24 domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=TMED2 PE=1 SV=1	1,63572	0,013	5
O94808	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2 OS=Homo sapiens GN=GFPT2 PE=1 SV=3	1,618541	0,00216	9
A0A0U1RR22	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PACSIN2 PE=1 SV=1	1,573808	0,00554	4
P42224	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta OS=Homo sapiens GN=STAT1 PE=1 SV=2	1,572214	0,00718	26
J3KTE4	Ribosomal protein L19 OS=Homo sapiens GN=RPL19 PE=1 SV=1	1,570208	0,00931	8
O75369	Filamin-B OS=Homo sapiens GN=FLNB PE=1 SV=2	1,569266	0,00095	88
P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PEBP1 PE=1 SV=3	1,561141	0,00131	7
A0A087WU45	EH domain-containing protein 4 OS=Homo sapiens GN=EHD4 PE=1 SV=1	1,557247	0,02273	9
A0A0C4DH83	EH domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens GN=EHD3 PE=1 SV=1	1,547537	0,00234	3
A6NMH8	Tetraspanin OS=Homo sapiens GN=CD81 PE=1 SV=1	1,519207	0,00828	4
B8ZZA8	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GLS PE=1 SV=1	1,511433	0,02453	2
P04181	Ornithine aminotransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=OAT PE=1 SV=1	1,507001	0,00846	12

Supplemental Table 1

Table S1: Deregulated proteins after PS treatment based on mass spectrometry analysis.

NEM157				
accession	description	ratio g1/g2	T-test	specific peptides
Q9Y5B9	FACT complex subunit SPT16 OS=Homo sapiens GN=SUPT16H PE=1 SV=1	0,699477	0,006455	4
Q16270	Insulin-like growth factor-binding protein 7 OS=Homo sapiens GN=IGFBP7 PE=1 SV=1	0,697117	0,021507	3
O43818	U3 small nucleolar RNA-interacting protein 2 OS=Homo sapiens GN=RRP9 PE=1 SV=1	0,684573	0,013927	2
P21589	5'-nucleotidase OS=Homo sapiens GN=NT5E PE=1 SV=1	0,671288	0,033833	23
P62310	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm3 OS=Homo sapiens GN=LSM3 PE=1 SV=2	0,664904	0,00371	2
Q9BVP2	Guanine nucleotide-binding protein-like 3 OS=Homo sapiens GN=GNL3 PE=1 SV=2	0,664247	0,001055	2
Q9UQ03	Coronin-2B OS=Homo sapiens GN=CORO2B PE=1 SV=4	0,657474	0,017534	2
AOA087WUF6	Fibroblast Growth Factor receptor binding OS=Homo sapiens GN=FGF2	0,64754	0,009767	3
AOA087X055	Collagen alpha-1(VI) chain OS=Homo sapiens GN=COL6A1 PE=1 SV=1	0,642326	0,023539	16
G5E972	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma OS=Homo sapiens GN=TMPO PE=1 SV=1	0,633019	0,004265	2
B1AKZ5	Astrocytic phosphoprotein PEA-15 OS=Homo sapiens GN=PEA15 PE=1 SV=1	0,632331	0,00935	3
Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3 OS=Homo sapiens GN=ILF3 PE=1 SV=3	0,629511	0,022834	14
AOA087WUK2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like OS=Homo sapiens GN=HNRNPDL PE=1 SV=1	0,628427	0,031561	4
P20700	Lamin-B1 OS=Homo sapiens GN=LMNB1 PE=1 SV=2	0,617001	0,015462	16
O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R OS=Homo sapiens GN=HNRNPR PE=1 SV=1	0,607116	0,007124	9
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	0,602794	0,041994	15
P31749	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase OS=Homo sapiens GN=AKT1 PE=1 SV=2	0,591261	0,021491	2
P08572	Collagen alpha-2(IV) chain OS=Homo sapiens GN=COL4A2 PE=1 SV=4	0,585876	0,004169	2
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain OS=Homo sapiens GN=COL6A2 PE=1 SV=4	0,577136	0,020908	10
Q5QPL9	RNA-binding protein Raly (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RALY PE=1 SV=1	0,559534	0,043277	2
Q92626	Peroxidasin homolog OS=Homo sapiens GN=PXDN PE=1 SV=2	0,558623	0,001944	6
P46937	Transcriptional coactivator YAP1 OS=Homo sapiens GN=YAP1 PE=1 SV=2	0,544119	0,005305	2
P28300	Protein-lysine 6-oxidase OS=Homo sapiens GN=LOX PE=1 SV=2	0,543525	0,015831	13
Q9Y2X3	Nucleolar protein 58 OS=Homo sapiens GN=NOP58 PE=1 SV=1	0,535154	0,04111	11
Q9NR30	Nucleolar RNA helicase 2 OS=Homo sapiens GN=DDX21 PE=1 SV=5	0,513348	0,040856	15
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain OS=Homo sapiens GN=COL6A3 PE=1 SV=5	0,503859	0,012546	64
AOA0B4J1Z1	Serine/arginine-rich-splicing factor 7 OS=Homo sapiens GN=SRSF7 PE=1 SV=1	0,498066	0,015048	3
Q13185	Chromobox protein homolog 3 OS=Homo sapiens GN=CBX3 PE=1 SV=4	0,49712	0,011786	2
HOY6E7	RNA-binding motif protein, X chromosome (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RBMX PE=1 SV=2	0,494938	0,033746	8
Q9C0E8	Protein lunapark OS=Homo sapiens GN=LNP PE=1 SV=2	0,48027	0,024908	3
Q8TDN6	Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog OS=Homo sapiens GN=BRX1 PE=1 SV=2	0,477778	0,026778	4
B2R5W2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens GN=HNRNPC PE=1 SV=1	0,476968	0,032911	12
AOA087WTA8	Collagen alpha-2(I) chain OS=Homo sapiens GN=COL1A2 PE=1 SV=1	0,476884	0,01193	14
E9PCY5	DNA topoisomerase 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TOP2B PE=1 SV=1	0,467474	0,000692	2
Q9UKD2	mRNA turnover protein 4 homolog OS=Homo sapiens GN=MRT04 PE=1 SV=2	0,464818	0,019931	3
K7EQA1	Programmed cell death protein 5 OS=Homo sapiens GN=PDCD5 PE=1 SV=1	0,45725	0,022228	5
O00567	Nucleolar protein 56 OS=Homo sapiens GN=NOP56 PE=1 SV=4	0,444172	0,016039	9
J3Q5V6	Ribosomal L1 domain-containing protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RSL1D1 PE=1 SV=1	0,44295	0,032512	7
E7EX60	Neuropilin-1 OS=Homo sapiens GN=NRP1 PE=1 SV=1	0,442606	0,044501	3
P62753	40S ribosomal protein S6 OS=Homo sapiens GN=RP56 PE=1 SV=1	0,435048	0,007916	15
MOQXL5	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=FBL PE=1 SV=1	0,433821	0,028294	8
Q75494	Serine/arginine-rich splicing factor 10 OS=Homo sapiens GN=SRSF10 PE=1 SV=1	0,43005	0,009208	2
P11047	Laminin subunit gamma-1 OS=Homo sapiens GN=LAMC1 PE=1 SV=3	0,423365	0,018273	7
P68431	Histone H3.1 OS=Homo sapiens GN=HIST1H3A PE=1 SV=2	0,420263	0,036558	3
Q99426	Tubulin-folding cofactor B OS=Homo sapiens GN=TBCB PE=1 SV=2	0,417652	0,019241	4
P02751	Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1 SV=4	0,411259	0,005408	152
B1ALY0	Protein PALM2-AKAP2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PALM2-AKAP2 PE=1 SV=1	0,407328	0,038269	3
AOA096LP25	AP2-associated protein kinase 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=AAK1 PE=1 SV=1	0,399752	0,037373	2
F8VXC8	SWI/SNF complex subunit SMARCC2 OS=Homo sapiens GN=SMARCC2 PE=1 SV=1	0,399169	0,001182	2
O75367	Core histone macro-H2A.1 OS=Homo sapiens GN=H2AFY PE=1 SV=4	0,376432	0,007882	11
AOA087WXW9	Collagen alpha-1(V) chain OS=Homo sapiens GN=COL5A1 PE=1 SV=1	0,370522	0,008043	6
Q9H9A6	Leucine-rich repeat-containing protein 40 OS=Homo sapiens GN=LRRC40 PE=1 SV=1	0,36398	0,041079	3
Q9BZE4	Nucleolar GTP-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=GTPBP4 PE=1 SV=3	0,344329	0,010066	9
O60832	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 OS=Homo sapiens GN=DKC1 PE=1 SV=3	0,322415	0,020729	3
AOA0U1RR32	Histone H2A OS=Homo sapiens GN=hCG_2039566 PE=3 SV=1	0,315805	0,032224	3
P04908	Histone H2A type 1-B/E OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AB PE=1 SV=2	0,314572	0,034126	2
P62805	Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2	0,310856	0,026197	19
P16104	Histone H2AX OS=Homo sapiens GN=H2AFX PE=1 SV=2	0,303549	0,013655	2
POCOS5	Histone H2A.Z OS=Homo sapiens GN=H2AFZ PE=1 SV=2	0,294451	0,011805	3
AOA0A0MRP6	Probable global transcription activator SNF2L1 OS=Homo sapiens GN=SMARCA1 PE=1 SV=1	0,294341	0,006137	2
P55285	Cadherin-6 OS=Homo sapiens GN=CDH6 PE=1 SV=1	0,22721	0,006814	2
P02452	Collagen alpha-1(I) chain OS=Homo sapiens GN=COL1A1 PE=1 SV=5	0,207789	0,000486	14
AOA087WXO8	Gamma-adducin OS=Homo sapiens GN=ADD3 PE=1 SV=1	0,059584	0,00024	2
Q5SW79	Centrosomal protein of 170 kDa OS=Homo sapiens GN=CEP170 PE=1 SV=1	2,4E-16	0,017399	2

Supplemental Table 1

Table S1: Deregulated proteins after PS treatment based on mass spectrometry analysis.

NEM168				
accession	description	ratio g1/g2	T-test	specific peptides
P05362	Intercellular adhesion molecule 1 OS=Homo sapiens GN=ICAM1 PE=1 SV=2	7,23E+13	0,01871	3
Q658P3	Metalloreductase STEAP3 OS=Homo sapiens GN=STEAP3 PE=1 SV=2	5,98E+13	0,00127	2
Q5JRA6	Melanoma inhibitory activity protein 3 OS=Homo sapiens GN=MIA3 PE=1 SV=1	3,45E+13	0,01083	2
F8WBF9	Protein NDRG3 OS=Homo sapiens GN=NDRG3 PE=1 SV=1	14,89035	0,00053	4
P07305	Histone H1.0 OS=Homo sapiens GN=H1F0 PE=1 SV=3	6,728538	0,0041	7
C9JZP6	Dehydrogenase/reductase SDR family member 2, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DHRS2 PE=1 SV=2	6,633558	0,01093	4
Q16763	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 S OS=Homo sapiens GN=UBE2S PE=1 SV=2	5,175655	0,01016	3
P25685	DnaJ homolog subfamily B member 1 OS=Homo sapiens GN=DNAJB1 PE=1 SV=4	4,583669	0,00815	11
E9PIF4	Sialidase-1 OS=Homo sapiens GN=NEU1 PE=1 SV=1	4,352906	0,01274	3
P60903	Protein S100-A10 OS=Homo sapiens GN=S100A10 PE=1 SV=2	4,153812	0,03044	2
P04183	Thymidine kinase, cytosolic OS=Homo sapiens GN=TK1 PE=1 SV=2	3,87542	0,03399	6
J3KSH8	Hematological and neurological-expressed 1 protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HN1 PE=1 SV=7	3,104943	0,02746	2
Q86V48	Leucine zipper protein 1 OS=Homo sapiens GN=LUZP1 PE=1 SV=2	3,017679	0,03132	7
P31350	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 OS=Homo sapiens GN=RRM2 PE=1 SV=1	2,865699	0,01822	14
O00622	Protein CYR61 OS=Homo sapiens GN=CYP61 PE=1 SV=1	2,823294	0,01962	10
O15427	Monocarboxylate transporter 4 OS=Homo sapiens GN=SLC16A3 PE=1 SV=1	2,716372	0,01081	2
P18031	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1 OS=Homo sapiens GN=PTPN1 PE=1 SV=1	2,607929	0,03204	6
Q14745	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 OS=Homo sapiens GN=SLC9A3R1 PE=1 SV=4	2,431079	0,00388	5
Q9NUQ8	ATP-binding cassette sub-family F member 3 OS=Homo sapiens GN=ABCF3 PE=1 SV=2	2,422118	0,03691	3
M0R3B2	Nitric oxide synthase-interacting protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NOSIP PE=1 SV=7	2,389821	0,00417	6
B0QYN7	SUMO-conjugating enzyme OS=Homo sapiens GN=UBE2I PE=1 SV=1	2,378214	0,04214	3
Q9UJ42	Carboxypeptidase A4 OS=Homo sapiens GN=CPA4 PE=1 SV=2	2,36947	0,0189	3
C9J6P4	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1 OS=Homo sapiens GN=ZC3HAV1 PE=1 SV=1	2,330166	0,03054	3
P07996	Thrombospondin-1 OS=Homo sapiens GN=THBS1 PE=1 SV=2	2,286039	0,01309	9
H3BN98	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=2	2,236188	0,00678	3
Q9NVJ2	ADP-ribosylation factor-like protein 8B OS=Homo sapiens GN=ARL8B PE=1 SV=1	2,231159	0,0056	6
I3L4C2	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2 OS=Homo sapiens GN=BAIAP2 PE=1 SV=1	2,23074	0,00983	7
F6SF26	P2X purinoceptor 4 OS=Homo sapiens GN=P2RX4	2,191171	0,01606	2
P62857	40S ribosomal protein S28 OS=Homo sapiens GN=RPS28 PE=1 SV=1	2,121804	0,01251	2
P46734	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3 OS=Homo sapiens GN=MAP2K3 PE=1 SV=2	2,098057	0,02	4
E7ESJ7	Protein FAM114A2 OS=Homo sapiens GN=FAM114A2 PE=1 SV=1	2,056219	0,03062	3
F8W9S7	GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=GAPVD1 PE=1 SV=1	2,045967	0,04026	4
Q14315	Filamin-C OS=Homo sapiens GN=FLNC PE=1 SV=3	1,995747	0,00461	151
C9JIZ6	Prosaposin OS=Homo sapiens GN=PSAP PE=1 SV=2	1,944805	0,02279	3
H7C0R7	NADH-cytochrome b5 reductase 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CYP5R1 PE=1 SV=1	1,914055	0,0166	3
P12277	Creatine kinase B-type OS=Homo sapiens GN=CKB PE=1 SV=1	1,855769	0,0013	16
B1AJQ6	Syntaxin-12 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=STX12 PE=1 SV=2	1,855598	0,02682	2
J3KNN5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DDX41 PE=1 SV=1	1,735407	0,02732	2
E9PN17	ATP synthase subunit g, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5L PE=1 SV=1	1,663077	0,0281	3
E9PJH7	Mitochondrial glutamate carrier 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SLC25A22 PE=1 SV=5	1,657703	0,01654	2
A0A0G2JW1	Heat shock 70 kDa protein 1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1B PE=1 SV=1	1,626655	0,00367	25
M0R165	Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1 OS=Homo sapiens GN=EPS15L1 PE=1 SV=1	1,609514	0,00914	4
C9JFR7	Cytochrome c (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CYCS PE=1 SV=1	1,595694	0,03311	5
Q9NVG8	TBC1 domain family member 13 OS=Homo sapiens GN=TBC1D13 PE=1 SV=3	1,57316	0,0193	3
A6NCE7	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 beta 2 OS=Homo sapiens GN=MAP1LC3B2	1,542329	0,00563	2
J3KQ34	COP9 signalosome complex subunit 7b OS=Homo sapiens GN=COPS7B PE=1 SV=1	1,53989	0,03656	3
P36551	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=CPOX PE=1 SV=3	1,535266	0,02834	3
P63220	40S ribosomal protein S21 OS=Homo sapiens GN=RPS21 PE=1 SV=1	1,52631	0,03462	6
O75369	Filamin-B OS=Homo sapiens GN=FLNB PE=1 SV=2	1,51807	0,00168	98
O95831	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=AIFM1 PE=1 SV=1	1,516563	0,00923	4
Q92522	Histone H1x OS=Homo sapiens GN=H1FX PE=1 SV=1	1,514788	0,02309	6
A0A087X1E4	Arfaptin-2 OS=Homo sapiens GN=ARFIP2 PE=1 SV=1	1,505524	0,02168	3
P62304	Small nuclear ribonucleoprotein E OS=Homo sapiens GN=SNRPE PE=1 SV=1	1,500248	0,01864	2

Supplemental Table 1

Table S1: Deregulated proteins after PS treatment based on mass spectrometry analysis.

NEM168				
accession	description	ratio g1/g2	T-test	specific peptides
E9PJW4	Wnt-protein binding OS=Homo Sapiens GN=WLS	0,684544	0,00129	12
H7BXY3	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30 OS=Homo sapiens GN=DHX30 PE=1 SV=1	0,42047	0,00281	19
Q16537	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform OS=Homo sapiens GN=PPP2R5E PE=1 SV=1	0,61027	0,00577	2
A0A0U1RQZ9	Probable global transcription activator SNF2L2 OS=Homo sapiens GN=SMARCA2 PE=1 SV=1	0,336616	0,00644	2
O75935	Dynactin subunit 3 OS=Homo sapiens GN=DCTN3 PE=1 SV=1	0,639301	0,00647	13
E7EMS6	Catechol O-methyltransferase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=COMT PE=1 SV=1	0,196397	0,0083	4
O00505	Importin subunit alpha-4 OS=Homo sapiens GN=KPNA3 PE=1 SV=2	0,503703	0,00862	2
P07741	Adenine phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens GN=APRT PE=1 SV=2	0,625727	0,01564	4
Q04446	1,4-alpha-glucan-branching enzyme OS=Homo sapiens GN=GBE1 PE=1 SV=3	0,699193	0,01704	9
F8VRD2	Rac GTPase-activating protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RACGAP1 PE=1 SV=7	0,295493	0,01726	7
Q15746	Myosin light chain kinase, smooth muscle OS=Homo sapiens GN=MYLK PE=1 SV=4	0,386208	0,01727	62
P21589	5'-nucleotidase OS=Homo sapiens GN=NT5E PE=1 SV=1	0,620316	0,02067	23
B4E3T4	HCG2043421, isoform CRA_c OS=Homo sapiens GN=RBPM5 PE=1 SV=1	0,337108	0,02298	15
Q9UKK3	Poly [ADP-ribose] polymerase 4 OS=Homo sapiens GN=PARP4 PE=1 SV=3	0,524752	0,02315	2
Q96S52	GPI transamidase component PIG-S OS=Homo sapiens GN=PIGS PE=1 SV=3	0,478689	0,02344	5
Q9H7D7	WD repeat-containing protein 26 OS=Homo sapiens GN=WDR26 PE=1 SV=3	0,679662	0,02396	2
O60264	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5 OS=Homo sapiens GN=SMARCA5 PE=1 SV=1	0,636892	0,02466	2
P61964	WD repeat-containing protein 5 OS=Homo sapiens GN=WDR5 PE=1 SV=1	0,351861	0,02519	5
Q99661	Kinesin-like protein KIF2C OS=Homo sapiens GN=KIF2C PE=1 SV=2	0,597825	0,02633	2
Q16643	Drebrin OS=Homo sapiens GN=DBN1 PE=1 SV=4	0,684602	0,02783	5
E9PEP6	Neuropilin-1 OS=Homo sapiens GN=NRP1 PE=1 SV=2	0,450653	0,028	3
P02751	Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1 SV=4	0,62328	0,02998	4
Q6P1J9	Parafibromin OS=Homo sapiens GN=CDG3 PE=1 SV=1	0,431481	0,03255	4
P05412	Transcription factor AP-1 OS=Homo sapiens GN=JUN PE=1 SV=2	0,383012	0,03404	7
O43150	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=ASAP2 PE=1 SV=3	0,573062	0,03662	3
E7EMK3	Flotillin-2 OS=Homo sapiens GN=FLOT2 PE=1 SV=1	0,667033	0,04072	2
Q9H9A6	Leucine-rich repeat-containing protein 40 OS=Homo sapiens GN=LRRC40 PE=1 SV=1	0,410141	0,04252	2
E7EPJ7	Triple functional domain protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TRIO PE=1 SV=2	0,411988	0,04351	2
A0A0A0MSJ0	ATP-dependent RNA helicase DDX42 OS=Homo sapiens GN=DDX42 PE=1 SV=1	0,668164	0,04384	2
P20700	Lamin-B1 OS=Homo sapiens GN=LMNB1 PE=1 SV=2	0,620461	0,0448	2
Q15021	Condensin complex subunit 1 OS=Homo sapiens GN=NCAPD2 PE=1 SV=3	0,679325	0,04693	2

Discussion

Le panobinostat (PS) est un inhibiteur de la régulation épigénétique qui a déjà montré son efficacité sur la diminution de la croissance des tumeurs DIPG (Grasso *et al.*, 2015 ; Hennika *et al.*, 2017). C'est un inhibiteur des histones désacétylases (HDACi) capable d'induire l'apoptose et l'inhibition de la prolifération de lignées DIPG. En revanche, peu d'informations sont connues à ce jour quant à son mécanisme d'action.

I- Induction de l'apoptose précoce par le PS

Dans un premier temps, j'ai montré l'activation précoce de l'apoptose dans les lignées DIPG traitées par le PS grâce à la technique du "BH3 profiling". Mon étude montre qu'après 16 heures d'incubation seulement, la cellule DIPG répond très rapidement au traitement par le PS en s'engageant dans l'apoptose par rapport à une cellule non traitée. De plus, ces résultats nous indiquent que le PS agit potentiellement sur la voie intrinsèque de l'apoptose en dérégulant l'équilibre entre protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. Par exemple, dans le cancer du poumon, la quantité de protéines anti-apoptotiques Bcl-2 est diminuée suite au traitement par le PS (Atadja, 2009). De plus, d'autres HDACi tels que le SAHA et le butyrate, induisent l'apoptose des cellules en activant le relargage de cytochromes c (Shao *et al.*, 2004). C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'étudier l'expression des protéines après une exposition de courte durée par le PS.

La mise en place de la technique de "BH3 profiling" dans notre laboratoire a été difficile à cause du nombre de paramètres qui ont dû être ajustés en fonction des lignées. Mais les avantages de cette technique nous laissent penser, qu'après amélioration, elle pourrait être utilisée dans le criblage de drogues actives sur les cellules DIPG. Montero *et al.* ont déjà mis en place ce protocole pour plusieurs types de cancers : cancer du sein, pulmonaire, hématologiques et mélanome (Montero *et al.*, 2015). L'identification de la sensibilité à différentes drogues des cellules DIPG directement isolées de biopsies serait possible grâce à cette technique. Cela permettrait ainsi un traitement personnalisé des jeunes patients. Ces traitements personnalisés se développent de plus en plus suite à la mise en évidence de l'hétérogénéité des tumeurs entre patients. Il existe déjà des essais cliniques avec un traitement personnalisé pour le DIPG établi en fonction des altérations génétiques découvertes dans les biopsies tumorales (NCT02274987, NCT03155620, NCT02233049).

II- Analyses de l'étude protéomique :

Afin de comprendre les mécanismes et les protéines qui sont impliqués dans l'activation de l'apoptose précoce des cellules DIPG, j'ai étudié la dérégulation des protéines après 16 heures de traitement au PS par une analyse de spectrométrie de masse.

À partir de cette analyse, nous avons identifié 227 protéines dont l'expression était dérégulée par rapport aux cellules DIPG non traitées. La comparaison du protéome des 3 lignées étudiées (SU-DIPG-IV, NEM157 et NEM168) ne nous a pas permis de mettre en évidence la présence d'effecteurs de la voie apoptotique qui seraient impliqués dans la mort cellulaire (facteurs pro- et anti-apoptotiques, cytochrome c, caspases). Néanmoins, d'après les résultats de "BH3 profiling", le PS induit l'apoptose des cellules en activant la dépolarisation de la membrane mitochondriale. L'une des raisons qui pourraient expliquer l'absence de dérégulation des effecteurs de la voie apoptotique est l'expression potentielle de dérivés réactifs à l'oxygène. Ces dérivés peuvent être exprimés par la mitochondrie après traitement par le PS et induire la dépolarisation de la membrane et le relargage de cytochromes c conduisant à la mort cellulaire. En effet, d'autres HDACi sont capables d'induire la génération de ces dérivés après traitement de cellules cancéreuses (Ruefli *et al.*, 2001 ; Singh *et al.*, 2018 ; Wasim et Chopra, 2018). La détection par cytométrie en flux d'un composé fluorescent activé par oxydation permettrait de valider la présence de ces dérivés réactifs à l'oxygène dans les cellules DIPG traitées au PS.

La comparaison des protéomes des lignées NEM157 et NEM168 uniquement montre que 18 protéines communes sont dérégulées. Après l'étude des réseaux d'interactions protéine-protéine, il n'est ressorti aucune voie de signalisation prédominante. Toutefois quelques-unes de ces 18 protéines pourraient expliquer le phénotype engendré par le PS, telles que :

- La neuropiline 1 (NRP1) est sous-régulée en présence du PS. C'est un co-récepteur transmembranaire qui interagit avec la plexine A1 et le récepteur au VEGF durant le développement neuronal et l'angiogenèse. Elle est impliquée dans la vascularisation mais aussi dans la progression tumorale (Ding *et al.*, 2018 ; Hu *et al.*, 2007 ; Miyauchi *et al.*, 2016 ; Pan *et al.*, 2007). Le PS pourrait donc avoir un effet anti-angiogénique en inhibant l'expression de NRP1.
- La lamine B est une autre protéine dont la production est diminuée dans les lignées de DIPG traitées par le PS. Elle est importante pour la stabilité de l'enveloppe nucléaire

et elle forme la lamina nucléaire, un maillage fibrillaire dense bordant l'enveloppe nucléaire. Elle est dérégulée dans certains cancers (Irianto *et al.*, 2016). L'absence de cette protéine dans les cellules conduit à la décondensation de la chromatine et à une redistribution des marqueurs épigénétiques H3K27me3 dans les cellules d'adénocarcinome du colon. L'inhibition de la lamine B provoque une instabilité de l'enveloppe nucléaire, et une diminution de la prolifération cellulaire (Camps *et al.*, 2015). Toutefois, dans le cancer du sein, sa surexpression est associée à un meilleur pronostic (Irianto *et al.*, 2016). Il serait donc intéressant de comprendre le rôle de cette protéine dans les DIPG.

- Les quantités de HSP70 ("Heat Shock Protein 70") et de DNAJB1 ("DnaJ homology subfamily member"), une sous-unité de HSP40, sont augmentées suite au traitement par le PS. La dérégulation de HSP70 a déjà été mise en évidence dans les leucémies myéloïdes aiguës (Mandawat *et al.*, 2010) et les tumeurs de Wilms (Yan-Fang *et al.*, 2015) après traitement par le PS. Ces deux protéines chaperonnes participent au bon repliement des protéines au cours d'un stress cellulaire. La surexpression d'HSP70 est souvent associée à la malignité de la tumeur (Chatterjee et Burns, 2017). L'inhibition de HDAC6 par les HDACi conduit à l'acétylation de HSP90. Cette acétylation inhibe l'activité de la protéine et il en résulte une augmentation de la protéine HSP70 (Fiskus *et al.*, 2008). HSP70 et DNAJB1 coopèrent pour inhiber la translocation de l'effecteur BAX du cytoplasme vers la mitochondrie, inhibant ainsi l'apoptose (Beere, 2004 ; Takayama *et al.*, 2003). L'augmentation de ces protéines après traitement par le PS n'est donc pas forcément un avantage pour contrer la progression tumorale.

Par ailleurs, notre étude n'a mis en évidence la dérégulation d'aucune HDAC. Le PS n'agit pas sur le niveau d'expression des HDAC mais sur leur site catalytique, ce qui les empêche alors de jouer leur rôle de désacétylases. Ce traitement n'agit donc pas uniquement sur l'expression des gènes au travers de la régulation épigénétique mais il est aussi capable de maintenir ou d'augmenter l'acétylation de certaines protéines, ce qui a des conséquences pour la cellule cancéreuse. Il serait donc important de comparer l'acétylation de protéines avant et après traitement pour identifier celles dont l'acétylation est modifiée par le PS. L'utilisation d'anticorps spécifiques permet de discriminer les protéines qui sont acétylées ou non. Il est aussi possible d'analyser l'acétylome par spectrométrie de masse pour étudier l'ensemble des

effets du PS sur l'acétylation. Cette méthode a déjà été utilisée dans les cellules HeLa après traitement par le PS (Scholz *et al.*, 2015).

L'une des découvertes majeures de cette étude est la mise en évidence de l'augmentation de l'expression des protéines EBP50 et IRSp53 après traitement par le PS. De façon étonnante, seules ces deux protéines sont dérégulées à la hausse dans les 3 lignées. Sans traitement, l'expression de ces deux protéines est similaire dans les tumeurs DIPG et dans le tissu sain. Cela reflète donc l'effet direct de la drogue sur la dérégulation de leur expression. Pour EBP50, la dérégulation est directement liée à l'expression du gène. En effet, une publication de Kremer *et al.* montre une corrélation entre l'augmentation de l'ARNm EBP50 et le traitement par le PS dans les ostéoblastes (Kremer *et al.*, 2015). Une publication décrit la surexpression d'EBP50 et d'IRSp53 dans les ostéoblastes murins après traitement par un HDACi, le SAHA (Dudakovic *et al.*, 2013). L'analyse bibliographique montre que ces deux protéines, et plus particulièrement la protéine EBP50, pourraient jouer un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire. En effet, dans le glioblastome la perte de la localisation membranaire d'EBP50 est associée à l'augmentation de la croissance tumorale. La protéine aurait plutôt un rôle oncogénique dans les glioblastomes après délocalisation dans le cytoplasme (Molina *et al.*, 2010). Dans le cancer du sein non invasif, le niveau d'expression d'EBP50 est diminuée et l'induction de sa surexpression au niveau membranaire conduit à la diminution de la prolifération des cellules reflétant plutôt un rôle suppresseur de tumeur (Yao *et al.*, 2012). L'objectif principal a donc été de caractériser le rôle d'EBP50, défini par sa localisation, et le rôle d'IRSp53 dans la progression tumorale des cellules DIPG.

III- Rôle oncogénique d'EBP50 et d'IRSp53 dans les tumeurs DIPG.

- **EBP50**

Le rôle oncogénique ou suppresseur de tumeur d'EBP50 est défini par sa localisation cellulaire. L'expression non-membranaire est généralement associée à la tumorigenèse (Vaquero *et al.*, 2017). J'ai donc analysé la localisation d'EBP50 dans les cellules DIPG et étudié l'effet de sa sous-expression par ARN interférent. L'immunofluorescence ainsi que la microscopie électronique ont mis en évidence la présence d'EBP50 dans le cytoplasme, le noyau et la membrane de la cellule. De plus, la diminution de son expression entraîne l'activation de l'apoptose et la diminution de la prolifération ainsi que la diminution de la

migration et de l'invasion. EBP50 aurait donc un rôle pro-tumoral dans ces lignées or le traitement par le PS exacerbe le niveau d'expression de cette dernière. La localisation étant un paramètre clé dans le rôle de la protéine, la recherche de la localisation d'EBP50 dans des tissus de tumeurs DIPG et sa comparaison à des tissus sains permettrait de valider le rôle oncogénique d'EBP50 dans ces tissus. Malheureusement à cause du manque de matériels biologiques disponible pour les tumeurs DIPG, je n'ai pas pu réaliser cette expérience.

EBP50 est capable d'interagir par ses domaines PDZ avec différentes protéines impliquées dans la croissance tumorale, dont la β -caténine. Dans certains cancers, tels que le cancer colorectal (Saponaro *et al.*, 2018) ou le carcinome hépatocellulaire (Shibata *et al.*, 2003), la translocation nucléaire de la β -caténine est liée à la perte de la localisation membranaire d'EBP50 et à la progression tumorale. En revanche, dans 23 échantillons de tissus post-mortem de patients DIPG, aucune localisation nucléaire de la β -caténine n'a été mise en évidence après immunomarquage (Ballester *et al.*, 2013). La voie WNT ne semble donc pas activée dans les DIPG et impliquée dans le rôle oncogénique de la protéine EBP50.

La voie de signalisation PI3K-Akt pourrait être une des voies régulées par EBP50 à l'aide de son domaine PDZ1. En effet, au cours de mes travaux, j'ai montré que la diminution de l'expression d'EBP50 par un ARN interférent induit une diminution de l'activation de la protéine Akt par déphosphorylation. J'ai également mis en évidence une diminution de la phosphorylation des protéines sous-jacentes d'Akt qui sont PRAS40 et GSK3- α/β . EBP50 a déjà été décrite comme étant impliquée dans la régulation de la protéine Akt (Molina *et al.*, 2010). De plus, RS5517, une molécule spécifiquement développée par Saponaro *et al.* interagit et inhibe les liaisons avec le domaine PDZ1 d'EBP50 (Saponaro *et al.*, 2018). L'utilisation de cette molécule induit une diminution de la prolifération cellulaire identique à celle induite par l'utilisation d'un ARN interférent. Le domaine PDZ1 et les protéines qui interagissent avec ce dernier sont alors potentiellement impliquées dans la maintenance de la croissance cellulaire. Enfin, une étude du mélanome montre que l'inhibition de la phosphorylation d'Akt dans le noyau est due à la relocalisation nucléaire de PTEN en absence d'EBP50. Le domaine PDZ1 d'EBP50, séquestre PTEN au niveau du cytoplasme et permet ainsi l'activation d'Akt (Fang *et al.*, 2015). Ces interactions pourraient être à l'origine de l'activation de la voie PI3K-Akt (figure 36).

Par ailleurs, la molécule SAHA, qui est aussi un HDACi, induit la surexpression de la protéine EBP50 mais augmente également le niveau de phosphorylation d'Akt dans des

cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (Dudakovic *et al.*, 2015). L'effet oncogénique d'EBP50 pourrait donc être lié à l'activation d'Akt dans les cellules DIPG. Il paraît nécessaire d'identifier les interactions moléculaires d'EBP50 afin de confirmer ou non ces hypothèses par technique de co-immunoprécipitation.

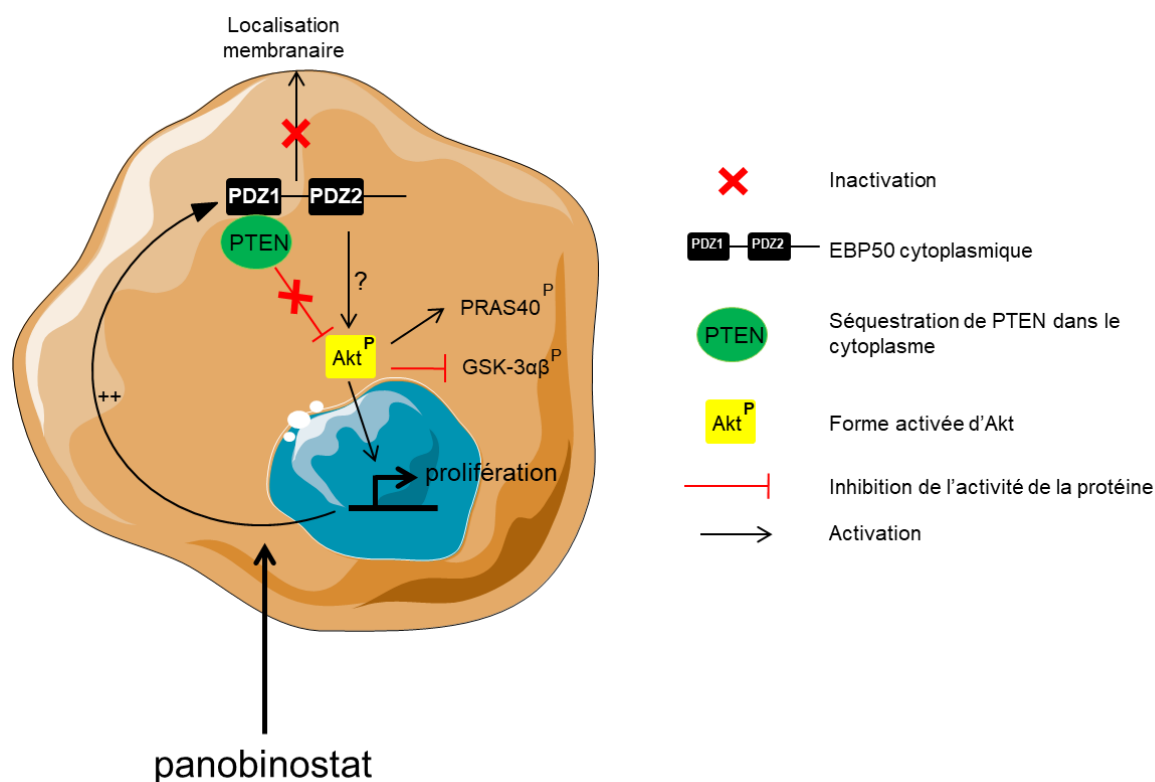


Figure 36 : Représentation des hypothèses pouvant expliquer les rôles d'EBP50 dans les cellules DIPG traitées au panobinostat.

Enfin, les résultats obtenus avec la molécule RS5517 nous indique qu'une redistribution cellulaire d'EBP50 ou le blocage des domaines PDZ plutôt qu'une inhibition d'expression permettrait de mieux contrôler les effets de la protéine EBP50. En effet, elle est impliquée dans des voies de signalisation importantes à la survie des cellules saines. Il est donc préférable de limiter ses interactions plutôt que de bloquer entièrement son expression pour son utilisation en thérapie ciblée.

Après surexpression d'EBP50 par infection lentivirale, nous nous attendions à une hausse de la prolifération des cellules or aucun effet n'a été observé. Cela a aussi été validé chez le modèle Xénope. En effet, après la surexpression de l'ARNm EBP50 au stade 2

cellules, aucun changement phénotypique de l'embryon n'a été constaté pendant le développement jusqu'au stade 36. EBP50 étant une protéine adaptatrice, elle dépend de l'expression et de l'interaction avec d'autres protéines potentiellement impliquées dans la prolifération. L'hypothèse est que le niveau maximal d'interaction serait déjà atteint dans les cellules DIPG avant traitement, ce qui expliquerait l'absence d'augmentation de la prolifération cellulaire. Une seconde hypothèse serait que la vitesse de la division cellulaire est déjà au maximum en conditions contrôles et que la surexpression d'EBP50 ne peut donc pas augmenter la prolifération cellulaire.

Le PS étant un inhibiteur de plusieurs HDAC, il induit l'expression de gènes suppresseurs de tumeur ainsi que des gènes impliqués dans le maintien de la tumeur et dans le développement de mécanismes de résistance. Ces mécanismes ont été décrits pour d'autres HDACi (voir introduction chapitre II, II-2.4). J'ai pu observer que la surexpression d'EBP50 par infection lentivirale des lignées DIPG n'a pas d'effet sur la survie cellulaire. Cela suggère que la surexpression d'EBP50 induite par le PS n'est pas impliquée dans un mécanisme de résistance directe. En revanche, l'augmentation d'EBP50 pourrait être un signe de résistance indirecte par le maintien d'un niveau critique de la protéine nécessaire à la prolifération et à la survie des cellules DIPG.

- **IRSp53**

Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence la surexpression de la protéine IRSp53 suite au traitement par le PS. Contrairement à EBP50, IRSp53 est surexprimée seulement au bout de 16 heures mais cette surexpression est transitoire en présence de PS. Une hypothèse serait que la cellule est capable de réguler l'expression d'IRSp53 après activation par le traitement. Les mécanismes mis en jeu sont à ce jour inconnus. Une analyse de microarray a mis en évidence la surexpression d'IRSp53 au bout de 2 heures de traitement par le SAHA dans les ostéoblastes. Ce résultat permet de confirmer la régulation épigénétique du gène BAIAP2/IRSp53.

Là encore, la production d'IRSp53 n'est pas dérégulée dans les tumeurs DIPG comparée au tissu sain. En revanche, la diminution de son expression par ARN interférent induit une diminution de la prolifération associée à une augmentation de la mort cellulaire des

DIPG. Tout comme la protéine EBP50, IRSp53 aurait un rôle oncogénique dans les tumeurs DIPG. Une publication de Liu *et al.* met en évidence une diminution de la phosphorylation d'Akt et de STAT3 mais aussi de la cycline D1 et de FAK quand IRSp53 est sous-exprimée dans des fibroblastes murins transformés par l'oncogène v-Src ou dans des cellules HeLa (Liu *et al.*, 2010). Cela est dû à la protéine Eps8, connue pour interagir avec Rac et induire l'activation de la voie PI3K-Akt. Eps8 interagit avec le domaine SH3 d'IRSp53 et permet ainsi d'accroître l'activation de Rac1 par le complexe Eps8/Abi-1/Sos-1, facteur d'échange de nucléotide guanine (figure 37).

La double transfection d'ARN interférents contre EBP50 et IRSp53 n'a pas démontrée d'effet combinatoire sur la diminution de la prolifération par rapport à la transfection seule de l'un ou de l'autre ARN interférents. La même voie de signalisation PI3K-Akt pourrait être régulée par EBP50 et IRSp53, ce qui expliquerait ce résultat. L'inhibition de la prolifération serait déjà au maximum après la diminution d'EBP50 ou d'IRSp53 et associée à l'inactivation de la voie PI3K-Akt. Toutefois, ces résultats n'ont pas été ajoutés à la publication car cette hypothèse reste à être validée.

Enfin, j'ai montré que la diminution d'IRSp53 est aussi associée à la diminution de la migration et de l'invasion des cellules DIPG. IRSp53 est une protéine qui joue un rôle important dans la motilité cellulaire et elle est participe à la création des filopodes et des lamellipodes. L'inhibition de l'expression d'IRSp53 induit une diminution de la cicatrisation à la fois *in vitro* dans des fibroblastes et *in vivo* dans un modèle de souris KO pour IRSp53 (Disanza *et al.*, 2013). Cette protéine pourrait jouer un rôle prédominant dans la dissémination de la tumeur à travers le tissu sain. Cela pourrait être dépendant de l'interaction du domaine IMD d'IRSp53 avec Rac1, responsable de l'initiation de la formation des lamellipodes (figure 37) (voir chapitre III, II-4.2). Il serait intéressant d'étudier l'interaction entre IRSp53 et Rac1 qui est une protéine dérégulée dans le cancer et qui joue un rôle important dans la migration cellulaire et dans la diffusion de la tumeur dans le tissu sain environnant.

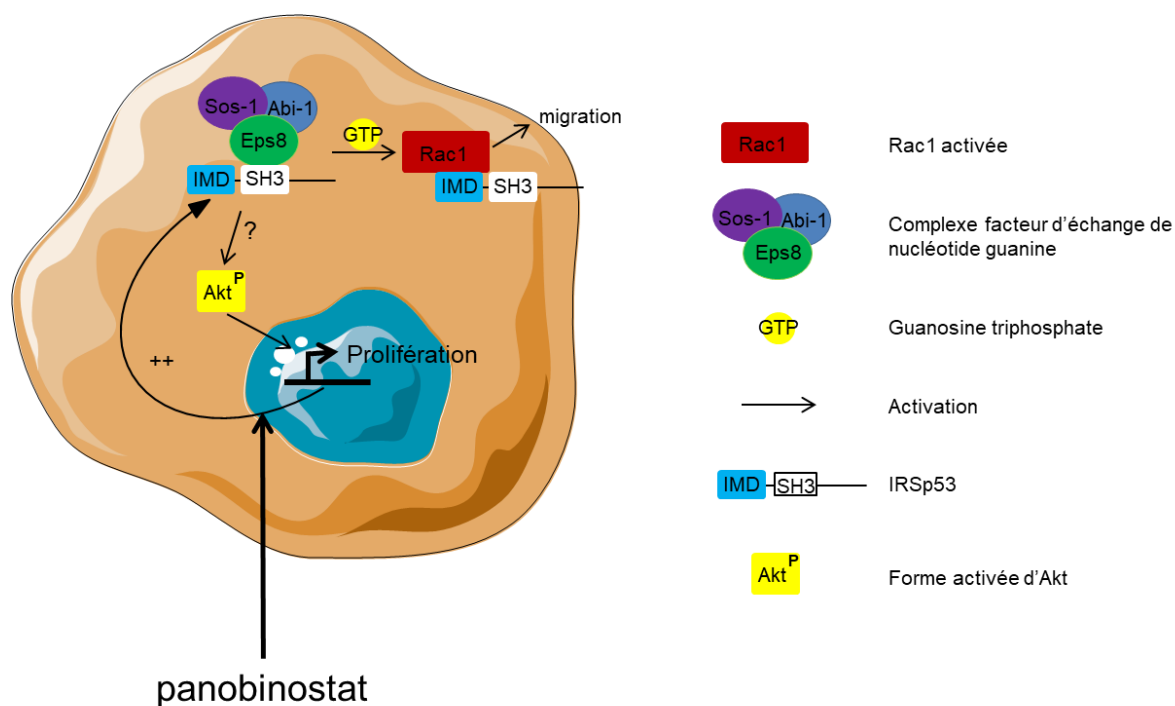


Figure 37 : Représentation des hypothèses pouvant expliquer les rôles d'IRSp53 dans les cellules DIPG traitées au panobinostat.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons fait le choix d'étudier d'avantage la protéine EBP50 que la protéine IRSp53. Tout d'abord, j'ai rencontré des difficultés à surexprimer IRSp53 par infection lentivirale dans des lignées DIPG. De plus, la protéine IRSp53 possède 4 isoformes qui ne diffèrent que par leur extrémité C-terminale (50 acides aminés). Chaque isoforme possède des fonctions différentes dans la cellule. La seule isoforme connue à ce jour pour être impliquée dans le cancer du sein est l'isoforme T. Cette isoforme est bien présente dans les DIPG mais elle n'est pas induite par le PS. Au cours de ma thèse, l'isoforme surexprimée après traitement par le PS n'a pas été identifiée et la surexpression n'a pas pu aboutir. De ce fait, je n'ai pas pu identifier le rôle de la surexpression d'IRSp53 dans les cellules DIPG. Une des explications à cet échec pourraient être dû à l'infection des cellules par un vecteur comportant la séquence murine d'IRSp53 et non humaine.

Aucun traitement ciblant IRSp53 n'a encore été développé. Comme elle joue un rôle important dans le chimiotactisme des macrophages (Abou-Kheir *et al.*, 2008) mais aussi dans la formation des synapses et la transmission du signal (Mattila et Lappalainen, 2008), l'inhibition de son expression ou de ses fonctions pourrait engendrer des effets néfastes sur le développement cérébral du patient. Avec le peu de connaissances que nous avons quant à

l'effet d'une inhibition prolongée d'IRSp53, il n'est pas envisageable à l'heure actuelle de cibler cette molécule dans le cadre d'un traitement anticancéreux.

EBP50 et IRSp53 sont des protéines adaptatrices qui permettent l'interaction entre plusieurs protéines. Elles n'ont donc pas un rôle unique dans la cellule et leurs partenaires définissent leur rôle cellulaire. C'est donc un mécanisme complexe qui se met en place à travers l'interaction des PDZ mais aussi avec d'autres domaines décrits pour la protéine IRSp53. En effet, les protéines oncogéniques agissent à un endroit précis de la cellule ou interagissent avec d'autres partenaires grâce à l'interaction avec les protéines adaptatrices. Sans l'implication de ces dernières, les protéines oncogéniques ne peuvent pas maintenir la progression tumorale.

IV- EBP50, une cible pour un traitement combinatoire avec le PS ?

- **Toxicité du PS et validation *in vitro* de la combinaison**

Au cours de nos travaux, nous avons testé l'effet du panobinostat à différentes doses sur le développement du xénope. Des altérations phénotypiques ont déjà été décrites au cours du développement pour d'autres HDACi, tels que la trichostatine A (Damjanovski *et al.*, 2000) ou l'acide valproïque (Pennati *et al.*, 2001). En revanche aucune publication n'a étudié l'effet du PS à certaines concentrations sur le développement embryonnaire. Ce traitement a pour but de soigner des enfants âgés de 6 à 10 ans, dont le développement n'est pas terminé. De plus, dans le modèle orthotopique de souris réalisé par Hennika *et al.*, les auteurs montrent l'effet létal du PS sur les souris génétiquement modifiées lorsqu'il est administré en concentration importante (Hennika *et al.*, 2017). L'un des objectifs secondaires de notre article a donc été de trouver une alternative à l'utilisation de cette drogue à fortes doses afin d'éviter tout effet secondaire suite à la prise du PS par des jeunes enfants. Nous avons donc étudié l'association d'un traitement par du PS à faible dose avec des ARN interférents ciblant EBP50 ou IRSp53. Nous avons montré une meilleure efficacité du double traitement que de chaque traitement utilisé seul *in vitro*. Une autre alternative pourrait être l'administration améliorée par convection locale ou CED. En effet, une étude de Singleton *et al.* a montré qu'une injection de PS soluble directement au niveau du tronc cérébral chez le rat n'induit pas d'effets toxiques même après 14 jours (Singleton *et al.*, 2018). Par contre, le traitement

prolongé des cellules DIPG par le PS induit une résistance à la drogue (Grasso *et al.*, 2015). L'utilisation de traitements combinés pourrait donc permettre d'éviter l'émergence de résistances à la chimiothérapie.

- **Validation *in vivo* de la combinaison d'un traitement combiné anti-EBP50 et du PS.**

Le modèle CAM

Nous avons pu mettre en place un nouveau modèle d'étude des tumeurs DIPG, le modèle préclinique de l'embryon de poulet. Ce modèle peut être utilisé dans le criblage à court terme de cibles thérapeutiques avec peu de contraintes et à moindres frais. Néanmoins, l'utilisation de ce modèle nécessite la modification des cellules DIPG qui doivent exprimer le VEGF₁₆₅ afin de pouvoir s'implanter sur la CAM et d'y former une tumeur. En effet, les lignées DIPG non modifiées sont incapables de s'implanter et de former une tumeur de taille suffisante. Une hypothèse serait que la vitesse de prolifération des cellules ainsi que la formation des nouveaux vaisseaux n'est pas assez rapide pour permettre une bonne implantation des cellules et un développement tumoral. Peu d'études ont été menées pour comprendre la vascularisation des tumeurs DIPG. D'après l'étude transcriptomique de Buczkowicz *et al.* en 2014, l'étude du génome entier de plusieurs tissus DIPG comparée au tissu non-tumoral montre qu'il n'y pas de différence significative d'expression des différentes isoformes du VEGF (Buczkowicz *et al.*, 2014). Ces résultats ont été analysés par le Dr Kasia Hooks, ancien membre de l'équipe, à partir de la banque de donnée GSE50021 publiée par Buczkowicz *et al.* Une étude publiée en 2018 note l'absence de VEGF dans les 3 lignées DIPG (SU-DIPG IV, VI et XIII) (Shaik *et al.*, 2018). En revanche, une autre publication montre une augmentation du gène *VEGF-A* dans les tumeurs DIPG. Cette différence est accentuée dans les tumeurs post-mortem comparées aux tumeurs issus de biopsies (Jansen *et al.*, 2016). Malgré ces résultats contradictoires, nous avons néanmoins fait le choix de surexprimer le VEGF en nous basant sur l'étude des glioblastomes exprimant naturellement le VEGF qui favorise l'implantation des cellules tumorales cérébrales dans ce modèle (Hagedorn *et al.*, 2005).

La validation de ce modèle a été testée après traitement des tumeurs par le PS à une concentration de 40 μ M. Le traitement induit la diminution de la croissance des cellules

tumorales ainsi qu'une inhibition de la vascularisation pour une majorité de tumeurs par rapport aux cellules traitées par le solvant. Cela confirme l'effet anti-angiogénique déjà décrit par Yao *et al.* après xénogreffes de cellules de glioblastomes chez la souris. L'inhibition du complexe HSP90/HDAC6 par le PS conduit à la dégradation de HIF-1 α et à la diminution de l'expression du facteur VEGF chez ces souris (Yao *et al.*, 2017). De même, la sous-expression de NRP1 observée après traitement par le PS pourrait conduire à ces effets.

Les premiers résultats du traitement de ces cellules par une faible dose de PS (qui seul n'induit pas d'inhibition de croissance de la tumeur) associée à la diminution de l'expression d'EBP50 montrent une diminution de la prolifération cellulaire et de la croissance tumorale. Ces résultats préliminaires suggèrent l'effet réel de la combinaison de traitements dans ce modèle.

Xénogreffes de cellules DIPG chez la souris NOD-SCID

Malgré l'établissement du modèle CAM qui permet de valider l'effet des traitements dans un contexte *in vivo*, il est tout de même important de valider l'effet de ce traitement sur un modèle mammifère. Nous avons donc essayé de mettre en place un modèle murin avec comme objectif de valider les effets d'une thérapie ciblée contre la protéine EBP50 en combinaison avec le PS.

Durant mes travaux de thèse, j'ai testé l'implantation sous-cutanée de lignées DIPG dans des souris NOD-SCID. Pour déterminer quelle lignée cellulaire utiliser, nous avons d'abord implanté un million de cellules de chaque lignée disponible (SU-DIPG IV-i, SU-DIPG XIII-i, NEM157-i, NEM168-i) dans le flanc des souris. Seules les cellules SU-DIPG IV-i ont été capables de développer une masse tumorale au bout de 3 semaines (figure 38a).

D'après ces résultats préliminaires, nous avons implanté un million de cellules SU-DIPG-IV-i dans le flanc de souris NOD-SCID et constitué deux groupes de 10 souris traités par le PS ou par le solvant. Nous avons décidé de traiter les tumeurs avec 20 mg/kg de PS en injection intrapéritonéale, une fois par semaine, après que la tumeur ait atteint 200 mm³. Nous nous sommes basés sur les travaux de Grasso *et al.* qui ont démontré un réel effet du traitement à cette concentration (Grasso *et al.*, 2015). Après l'injection de 3 traitements, nous avons constaté que le PS n'avait plus d'effet sur la diminution de la croissance tumorale (figure 38b). Nous avons donc continué à traiter les souris 3 fois par semaine avec la même

concentration afin de retrouver un effet sur la croissance tumorale. 3 semaines après le début du traitement, les souris ont été sacrifiées. La pesée des tumeurs après sacrifice n'a mis en évidence aucune différence significative de la croissance tumorale entre les tumeurs contrôles et traitées par le PS (figure 38c). Ces résultats préliminaires soulignent la difficulté de mettre en place un modèle de souris pour le traitement des DIPG. Ces travaux ne font pas partie de la publication que nous avons écrite car ce modèle doit être amélioré. En effet, les concentrations utilisées doivent être optimisées afin de permettre le traitement des souris et induire la réduction tumorale sans pour autant avoir de toxicité. Ces résultats préliminaires nous ont néanmoins permis de valider la surexpression de la protéine EBP50 dans les tumeurs après un dernier traitement de 24 heures (figure 38d). En revanche, aucune augmentation n'a été détectée pour la protéine IRSp53, ce qui peut être expliqué par le temps de sacrifice après traitement : 24 heures alors que *in vitro*, l'expression de la protéine est induite 16 heures après le traitement. Les perspectives de ce travail sont de valider l'efficacité d'une thérapie ciblée qui associe un inhibiteur d'EBP50 et du PS dans ce modèle. L'utilisation de la molécule RS5517 combinée au PS dans ce modèle murin pourrait être envisagée pour la relocalisation subcellulaire d'EBP50 dans les lignées DIPG et voir les effets sur la progression tumorale.

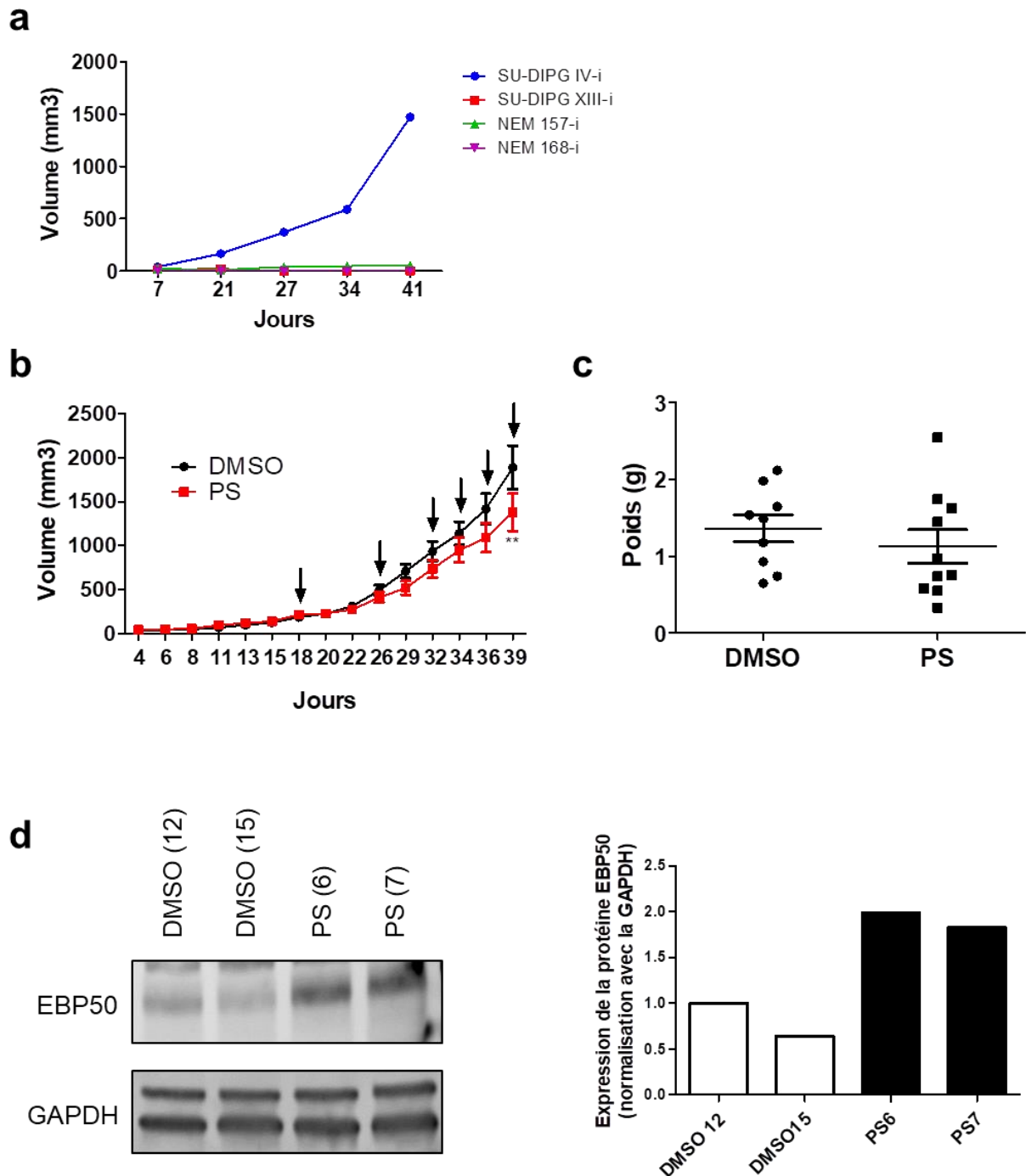


Figure 38 : Évaluation de l'effet du PS sur les tumeurs DIPG dans un modèle de souris NOD-SCID.

a) Mesure des différentes tumeurs à l'aide d'un pied à coulisse après implantation d'un million de cellules (SU-DIPG-IV-i, SU-DIPG-XIII-i, NEM157-i, NEM168-i) dans le flanc de souris NOD-SCID, n=1 pour chaque lignée. Les résultats présentés en (b), (c) et (d) correspondent à l'implantation de 1.10^6 cellules SU-DIPG-IV-i dans le flanc des souris NOD-SCID. b) Mesure de la taille des tumeurs sur les souris à l'aide d'un pied à coulisse. Les souris ont été traitées par injection intrapéritonéale de PS à une concentration de 20mg/kg (rouge, n=10) ou du solvant, DMSO (noir, n=9). Les fréquences de traitements sont annotées par des flèches. c) Poids des tumeurs après sacrifice des souris, 39 jours après implantation. d) Western blot et quantification de la protéine EBP50 dans les tumeurs de souris traitées par le PS (souris 6 et 7) ou le solvant (souris 12 et 15) 24h après le dernier traitement au PS.

Conclusion générale

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence la surexpression des protéines EBP50 et IRSp53 suite au traitement par le panobinostat. D'après mes données, ces deux protéines auraient un rôle oncogénique dans les lignées DIPG et leur absence induit la mort par apoptose des cellules cancéreuses. La combinaison du panobinostat avec des inhibiteurs d'EBP50 ou d'IRSp53 permettrait d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie dans le traitement des tumeurs DIPG.

En parallèle, j'ai développé un nouveau modèle d'étude des tumeurs DIPG sur la membrane chorioallantoïdienne d'embryon de poulet permettant désormais le criblage de molécules thérapeutiques afin de bloquer le développement et la croissance tumorale. Ce modèle animal a permis de valider l'efficacité *in vivo* de la combinaison d'une thérapie ciblée contre EBP50 et du panobinostat.

Références

Abou-Kheir W, Isaac B, Yamaguchi H, Cox D (2008). Membrane targeting of WAVE2 is not sufficient for WAVE2-dependent actin polymerization: a role for IRSp53 in mediating the interaction between Rac and WAVE2. *J Cell Sci* **121**: 379-90.

Adams JM, Cory S (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**: 1324-37.

Ahmed S, Goh WI, Bu W (2010). I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **21**: 350-356.

Ahronian LG, Lewis BC (2014). Using the RCAS-TVA system to model human cancer in mice. *Cold Spring Harb Protoc* **2014**: 1128-35.

Allis CD, Jenuwein T (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews. Genetics* **17**: 487-500.

Anderson RC, Kennedy B, Yanes CL, Garvin J, Needle M, Canoll P *et al* (2013). Convection-enhanced delivery of topotecan into diffuse intrinsic brainstem tumors in children. *J Neurosurg Pediatr* **11**: 289-95.

Ángeles Fernández-Gil M, Palacios-Bote R, Leo-Barahona M, Mora-Encinas JP (2010). Anatomy of the Brainstem: A Gaze Into the Stem of Life. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* **31**: 196-219.

Anne M, Sammartino D, Barginear MF, Budman D (2013). Profile of panobinostat and its potential for treatment in solid tumors: an update. *OncoTargets and Therapy* **6**: 1613-1624.

Atadja P (2009). Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges. *Cancer Letters* **280**: 233-241.

Baeyens N, de Meester C, Yerna X, Morel N (2011). EBP50 is involved in the regulation of vascular smooth muscle cell migration and cytokinesis. *Journal of Cellular Biochemistry* **112**: 2574-2584.

Balke M, Neumann A, Kersting C, Agelopoulos K, Gebert C, Gosheger G *et al* (2010). Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane. *BMC Res Notes* **3**: 58.

Bali P, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F *et al* (2005). Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 26729-26734.

Ballester LY, Wang Z, Shandilya S, Miettinen M, Burger PC, Eberhart CG *et al* (2013). Morphologic characteristics and immunohistochemical profile of diffuse intrinsic pontine gliomas. *Am J Surg Pathol* **37**: 1357-64.

Bartholow TL, Becich MJ, Chandran UR, Parwani AV (2011). Immunohistochemical analysis of ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 in prostatic adenocarcinoma. *BMC urology* **11**: 12.

Barua NU, Lowis SP, Woolley M, O'Sullivan S, Harrison R, Gill SS (2013). Robot-guided convection-enhanced delivery of carboplatin for advanced brainstem glioma. *Acta Neurochir (Wien)* **155**: 1459-65.

Bayat S, Shekari Khaniani M, Choupani J, Alivand MR, Mansoori Derakhshan S (2018). HDACis (class I), cancer stem cell, and phytochemicals: Cancer therapy and prevention implications. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **97**: 1445-1453.

Becher OJ, Hambardzumyan D, Walker TR, Helmy K, Nazarian J, Albrecht S *et al* (2010). Preclinical evaluation of radiation and perifosine in a genetically and histologically accurate model of brainstem glioma. *Cancer Research* **70**: 2548-2557.

Beere HM (2004). "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* **117**: 2641-51.

Bender S, Tang Y, Lindroth AM, Hovestadt V, Jones DT, Kool M *et al* (2013). Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell* **24**: 660-72.

Benitah SA, Valeron PF, van Aelst L, Marshall CJ, Lacal JC (2004). Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta* **1705**: 121-32.

Blasco MA (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* **6**: 611-22.

Bobsin K, Kreienkamp HJ (2016). Severe learning deficits of IRSp53 mutant mice are caused by altered NMDA receptor-dependent signal transduction. *J Neurochem* **136**: 752-763.

Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED, Bockers TM (2002). ProSAP/Shank postsynaptic density proteins interact with insulin receptor tyrosine kinase substrate IRSp53. *J Neurochem* **83**: 1013-7.

Boratkó A, Gergely P, Csontos C (2012). Cell cycle dependent association of EBP50 with protein phosphatase 2A in endothelial cells. *PloS One* **7**: e35595.

Boyault C, Zhang Y, Fritah S, Caron C, Gilquin B, Kwon SH *et al* (2007). HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes & Development* **21**: 2172-2181.

Bredlau AL, Dixit S, Chen C, Broome AM (2017). Nanotechnology Applications for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Curr Neuroparmacol* **15**: 104-115.

Broadbent D, Ahmadzai MM, Kammala AK, Yang C, Occhiuto C, Das R *et al* (2017). Roles of NHERF Family of PDZ-Binding Proteins in Regulating GPCR Functions. *Advances in Immunology* **136**: 353-385.

Broere N, Hillesheim J, Tuo B, Jorna H, Houtsmuller AB, Shenolikar S *et al* (2007). Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Activation Is Reduced in the Small Intestine of Na⁺/H⁺ Exchanger 3 Regulatory Factor 1 (NHERF-1)- but Not NHERF-2-deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 37575-37584.

Broniscer A, Baker SD, Wetmore C, Pai Panandiker AS, Huang J, Davidoff AM *et al* (2013). Phase I Trial, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Vandetanib and Dasatinib in Children with Newly Diagnosed Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**: 3050-3058.

Broniscer A, Jia S, Mandrell B, Hamideh D, Huang J, Onar-Thomas A *et al* (2018). Phase 1 trial, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of dasatinib combined with crizotinib in children with recurrent or progressive high-grade and diffuse intrinsic pontine glioma. *Pediatric Blood & Cancer* **65**: e27035.

Brown ZZ, Muller MM, Jain SU, Allis CD, Lewis PW, Muir TW (2014). Strategy for "detoxification" of a cancer-derived histone mutant based on mapping its interaction with the methyltransferase PRC2. *J Am Chem Soc* **136**: 13498-501.

Buczkowicz P, Hawkins C (2015). Pathology, Molecular Genetics, and Epigenetics of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front Oncol* **5**: 147.

Buczkowicz P, Hoeman C, Rakopoulos P, Pajovic S, Letourneau L, Dzamba M *et al* (2014). Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nat Genet* **46**: 451-6.

Bugiani M, Veldhuijzen van Zanten SEM, Caretti V, Schellen P, Aronica E, Noske DP *et al* (2017). Deceptive morphologic and epigenetic heterogeneity in diffuse intrinsic pontine glioma. *Oncotarget* **8**: 60447-60452.

Butler LM, Zhou X, Xu W-S, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA *et al* (2002). The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 11700-11705.

Cage TA, Samagh SP, Mueller S, Nicolaides T, Haas-Kogan D, Prados M *et al* (2013). Feasibility, safety, and indications for surgical biopsy of intrinsic brainstem tumors in children. *Childs Nerv Syst* **29**: 1313-9.

Cain JE, McCaw A, Jayasekara WSN, Rossello FJ, Marini KD, Irving AT *et al* (2013). Sustained Low-Dose Treatment with the Histone Deacetylase Inhibitor LBH589 Induces Terminal Differentiation of Osteosarcoma Cells. *Sarcoma* **2013**: 608964.

Calinescu A-A, Kamran N, Baker G, Mineharu Y, Lowenstein PR, Castro MG (2015). Overview of current immunotherapeutic strategies for glioma. *Immunotherapy* **7**: 1073-1104.

Camps J, Erdos MR, Ried T (2015). The role of lamin B1 for the maintenance of nuclear structure and function. *Nucleus* **6**: 8-14.

Cardone RA, Bellizzi A, Busco G, Weinman EJ, Dell'Aquila ME, Casavola V *et al* (2007). The NHERF1 PDZ2 domain regulates PKA-RhoA-p38-mediated NHE1 activation and invasion in breast tumor cells. *Molecular Biology of the Cell* **18**: 1768-1780.

Caretti V, Sewing AC, Lagerweij T, Schellen P, Bugiani M, Jansen MH *et al* (2014). Human pontine glioma cells can induce murine tumors. *Acta Neuropathol* **127**: 897-909.

Castel D, Philippe C, Calmon R, Dret LL, Truffaux N, Boddaert N *et al* (2015). Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathologica* **130**: 815-827.

Cavenagh JD, Popat R (2018). Optimal Management of Histone Deacetylase Inhibitor-Related Adverse Events in Patients With Multiple Myeloma: A Focus on Panobinostat. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* **18**: 501-507.

Centonze M, Saponaro C, Mangia A (2018). NHERF1 Between Promises and Hopes: Overview on Cancer and Prospective Openings. *Translational Oncology* **11**: 374-390.

Chan KM, Fang D, Gan H, Hashizume R, Yu C, Schroeder M *et al* (2013). The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev* **27**: 985-90.

Chang S, McKinsey TA, Zhang CL, Richardson JA, Hill JA, Olson EN (2004). Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development. *Mol Cell Biol* **24**: 8467-76.

Chang S, Young BD, Li S, Qi X, Richardson JA, Olson EN (2006). Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10. *Cell* **126**: 321-34.

Chatterjee S, Burns TF (2017). Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *Int J Mol Sci* **18**.

Chen Z, Li S, Subramaniam S, Shyy JY-J, Chien S (2017). Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers. *Annual Review of Biomedical Engineering* **19**: 195-219.

Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res* **6**: 1521-33.

Cheng S, Li Y, Yang Y, Feng D, Yang L, Ma Q *et al* (2013). Breast cancer-derived K172N, D301V mutations abolish Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 inhibition of platelet-derived growth factor receptor signaling. *FEBS Lett* **587**: 3289-95.

Chheda ZS, Kohanbash G, Okada K, Jahan N, Sidney J, Pecoraro M *et al* (2018). Novel and shared neoantigen derived from histone 3 variant H3.3K27M mutation for glioma T cell therapy. *J Exp Med* **215**: 141-157.

Chiao M-T, Cheng W-Y, Yang Y-C, Shen C-C, Ko J-L (2013). Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) causes tumor growth slowdown and triggers autophagy in glioblastoma stem cells. *Autophagy* **9**: 1509-1526.

Chittiboina P, Heiss JD, Warren KE, Lonser RR (2014). Magnetic resonance imaging properties of convective delivery in diffuse intrinsic pontine gliomas. *J Neurosurg Pediatr* **13**: 276-82.

Choi EJ, Cho BJ, Lee DJ, Hwang YH, Chun SH, Kim HH *et al* (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.

Choi J, Ko J, Racz B, Burette A, Lee J-R, Kim S *et al* (2005). Regulation of Dendritic Spine Morphogenesis by Insulin Receptor Substrate 53, a Downstream Effector of Rac1 and Cdc42 Small GTPases. *Journal of Neuroscience* **25**: 869-879.

Chou AM, Sem KP, Lam WJ, Ahmed S, Lim CY (2017). Redundant functions of I-BAR family members, IRSp53 and IRTKS, are essential for embryonic development. *Scientific Reports* **7**: 40485.

Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC *et al* (2009). Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science* **325**: 834-840.

Chua JJE, Kindler S, Boyken J, Jahn R (2010). The architecture of an excitatory synapse. *J Cell Sci* **123**: 819-823.

Cimini D, Mattiuzzo M, Torosantucci L, Degrossi F (2003). Histone hyperacetylation in mitosis prevents sister chromatid separation and produces chromosome segregation defects. *Molecular Biology of the Cell* **14**: 3821-3833.

Clap eron A, Guedj N, Mergey M, Vignjevic D, Desbois-Mouthon C, Boissan M *et al* (2012). Loss of EBP50 stimulates EGFR activity to induce EMT phenotypic features in biliary cancer cells. *Oncogene* **31**: 1376-1388.

Clymer J, Kieran MW (2018). The Integration of Biology Into the Treatment of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: A Review of the North American Clinical Trial Perspective. *Front Oncol* **8**: 169.

Cohen KJ, Jabado N, Grill J (2017). Diffuse intrinsic pontine gliomas-current management and new biologic insights. Is there a glimmer of hope? *Neuro Oncol* **19**: 1025-1034.

Creasy CL (2017). Untangling the role of mutant histone H3 in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Med* **23**: 413-414.

Cunningham R, Brazie M, Kanumuru S, E X, Biswas R, Wang F *et al* (2007). Sodium-hydrogen exchanger regulatory factor-1 interacts with mouse urate transporter 1 to regulate renal proximal tubule uric acid transport. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* **18**: 1419-1425.

Damjanovski S, Sachs LM, Shi YB (2000). Multiple stage-dependent roles for histone deacetylases during amphibian embryogenesis: implications for the involvement of extracellular matrix remodeling. *Int J Dev Biol* **44**: 769-76.

Deczkowska A, Baruch K, Schwartz M (2016). Type I/II Interferon Balance in the Regulation of Brain Physiology and Pathology. *Trends in Immunology* **37**: 181-192.

DI Fazio P, Montalbano R, Quint K, Alinger B, Kemmerling R, Kiesslich T *et al* (2013). The pan-deacetylase inhibitor panobinostat modulates the expression of epithelial-mesenchymal transition markers in hepatocellular carcinoma models. *Oncology Letters* **5**: 127-134.

Dickinson M, Johnstone RW, Prince HM (2010). Histone deacetylase inhibitors: potential targets responsible for their anti-cancer effect. *Invest New Drugs* **28 Suppl 1**: S3-20.

Ding Y, Zhou J, Wang S, Li Y, Mi Y, Gao S *et al* (2018). Anti-neuropilin-1 monoclonal antibody suppresses the migration and invasion of human gastric cancer cells via Akt dephosphorylation. *Exp Ther Med* **16**: 537-546.

Disanza A, Bisi S, Winterhoff M, Milanesi F, Ushakov DS, Kast D *et al* (2013). CDC42 switches IRSp53 from inhibition of actin growth to elongation by clustering of VASP. *EMBO J* **32**: 2735-50.

Disanza A, Mantoani S, Hertzog M, Gerboth S, Frittoli E, Steffen A *et al* (2006). Regulation of cell shape by Cdc42 is mediated by the synergic actin-bundling activity of the Eps8-IRSp53 complex. *Nat Cell Biol* **8**: 1337-47.

Dosemeci A, Burch A, Loo H, Toy D, Tao-Cheng J-H (2017). IRSp53 accumulates at the postsynaptic density under excitatory conditions. *PloS One* **12**: e0190250.

Du G, Gu Y, Hao C, Yuan Z, He J, Jiang WG *et al* (2016a). The cellular distribution of Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 is determined by the PDZ-I domain and regulates the malignant progression of breast cancer. *Oncotarget* **7**: 29440-29453.

Du G, Hao C, Gu Y, Wang Z, Jiang WG, He J *et al* (2016b). A Novel NHERF1 Mutation in Human Breast Cancer Inactivates Inhibition by NHERF1 Protein in EGFR Signaling. *Anticancer Research* **36**: 1165-1173.

Dudakovic A, Camilleri ET, Lewallen EA, McGee-Lawrence ME, Riester SM, Kakar S *et al* (2015). Histone deacetylase inhibition destabilizes the multi-potent state of uncommitted adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Journal of Cellular Physiology* **230**: 52-62.

Dudakovic A, Evans JM, Li Y, Middha S, McGee-Lawrence ME, van Wijnen AJ *et al* (2013). Histone deacetylase inhibition promotes osteoblast maturation by altering the histone H4 epigenome and reduces Akt phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* **288**: 28783-28791.

Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J (2017). Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *International Journal of Molecular Sciences* **18**.

Ediger TR, Kraus WL, Weinman EJ, Katzenellenbogen BS (1999). Estrogen receptor regulation of the Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor. *Endocrinology* **140**: 2976-2982.

Ediger TR, Park S-E, Katzenellenbogen BS (2002). Estrogen Receptor Inducibility of the Human Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor/Ezrin-Radixin-Moesin Binding Protein 50 (NHE-RF/EBP50) Gene Involving Multiple Half-Estrogen Response Elements. *Molecular Endocrinology* **16**: 1828-1839.

Edwards MS, Wara WM, Urtasun RC, Prados M, Levin VA, Fulton D *et al* (1989). Hyperfractionated radiation therapy for brain-stem glioma: a phase I-II trial. *Journal of Neurosurgery* **70**: 691-700.

El-Khouly FE, van Vuurden DG, Stroink T, Hulleman E, Kaspers GJL, Hendrikse NH *et al* (2017). Effective Drug Delivery in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: A Theoretical Model to Identify Potential Candidates. *Front Oncol* **7**: 254.

Eot-Houllier G, Fulcrand G, Magnaghi-Jaulin L, Jaulin C (2009). Histone deacetylase inhibitors and genomic instability. *Cancer Letters / MXR Cancer Lett* **274**: 169-76.

Fang XY, Song R, Chen W, Yang YY, Gu YH, Shu YQ *et al* (2015). PRL-3 Promotes the Malignant Progression of Melanoma via Triggering Dephosphorylation and Cytoplasmic Localization of NHERF1. *J Invest Dermatol* **135**: 2273-2282.

Filbin MG, Tirosh I, Hovestadt V, Shaw ML, Escalante LE, Mathewson ND *et al* (2018). Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq. *Science (New York, N.Y.)* **360**: 331-335.

Fiskus W, Rao R, Fernandez P, Herger B, Yang Y, Chen J *et al* (2008). Molecular and biologic characterization and drug sensitivity of pan-histone deacetylase inhibitor-resistant acute myeloid leukemia cells. *Blood* **112**: 2896-905.

Fouassier L, Rosenberg P, Mergey M, Saubaméa B, Clapéron A, Kinnman N *et al* (2009). Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein (EBP50), an estrogen-inducible scaffold protein, contributes to biliary epithelial cell proliferation. *The American Journal of Pathology* **174**: 869-880.

Fouassier L, Yun CC, Fitz JG, Doctor RB (2000). Evidence for Ezrin-Radixin-Moesin-binding Phosphoprotein 50 (EBP50) Self-association through PDZ-PDZ Interactions. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 25039-25045.

Fried I, Lossos A, Ben Ami T, Dvir R, Toledano H, Ben Arush MW *et al* (2017). Preliminary results of immune modulating antibody MDV9300 (pidilizumab) treatment in children with diffuse intrinsic pontine glioma. *J Neurooncol* **136**: 189-195.

Funato K, Major T, Lewis PW, Allis CD, Tabar V (2014). Use of human embryonic stem cells to model pediatric gliomas with H3.3K27M histone mutation. *Science* **346**: 1529-33.

Funato Y, Terabayashi T, Suenaga N, Seiki M, Takenawa T, Miki H (2004). IRSp53/Eps8 complex is important for positive regulation of Rac and cancer cell motility/invasiveness. *Cancer Research* **64**: 5237-5244.

Gandesiri M, Chakilam S, Ivanovska J, Benderska N, Ocker M, Di Fazio P *et al* (2012). DAPK plays an important role in panobinostat-induced autophagy and commits cells to apoptosis under autophagy deficient conditions. *Apoptosis* **17**: 1300-15.

Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P (2002). Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem* **277**: 25748-55.

Gao T, Furnari F, Newton AC (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Molecular Cell* **18**: 13-24.

Garbett D, Bretscher A (2014). The surprising dynamics of scaffolding proteins. *Molecular Biology of the Cell* **25**: 2315-2319.

Garbett D, LaLonde DP, Bretscher A (2010). The scaffolding protein EBP50 regulates microvillar assembly in a phosphorylation-dependent manner. *J Cell Biol* **191**: 397-413.

Garbett D, Sauvanet C, Viswanatha R, Bretscher A (2013). The tails of apical scaffolding proteins EBP50 and E3KARP regulate their localization and dynamics. *Molecular Biology of the Cell* **24**: 3381-3392.

Georgescu M-M, Cote G, Agarwal NK, White CL (2014). NHERF1/EBP50 Controls Morphogenesis of 3D Colonic Glands by Stabilizing PTEN and Ezrin-Radixin-Moesin Proteins at the Apical Membrane. *Neoplasia (New York, N.Y.)* **16**: 365-374.e2.

Georgescu M-M, Gagea M, Cote G (2016). NHERF1/EBP50 Suppresses Wnt- β -Catenin Pathway-Driven Intestinal Neoplasia. *Neoplasia (New York, N.Y.)* **18**: 512-523.

Georgescu M-M, Yell P, Mobley BC, Shang P, Georgescu T, Wang S-HJ *et al* (2015). NHERF1/EBP50 is an organizer of polarity structures and a diagnostic marker in ependymoma. *Acta Neuropathologica Communications* **3**.

Goh WI, Lim KB, Sudhakaran T, Sem KP, Bu W, Chou AM *et al* (2012). mDia1 and WAVE2 proteins interact directly with IRSp53 in filopodia and are involved in filopodium formation. *J Biol Chem* **287**: 4702-14.

Good MC, Zalatan JG, Lim WA (2011). Scaffold Proteins: Hubs for Controlling the Flow of Cellular Information. *Science (New York, N.Y.)* **332**: 680-686.

Goodwin CR, Xu R, Iyer R, Sankey EW, Liu A, Abu-Bonsrah N *et al* (2016). Local delivery methods of therapeutic agents in the treatment of diffuse intrinsic brainstem gliomas. *Clin Neurol Neurosurg* **142**: 120-127.

Grasso CS, Tang Y, Truffaux N, Berlow NE, Liu L, Debily MA *et al* (2015). Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Med* **21**: 555-9.

Greer EL, Shi Y (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature reviews. Genetics* **13**: 343-357.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* **140**: 883-899.

Gunther HS, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R *et al* (2008). Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene* **27**: 2897-909.

Guo Y, Wang M, Jia X, Zhu H, Zhi Y, Yuan L (2018). Wnt signaling pathway upregulates DNMT1 to trigger NHERF1 promoter hypermethylation in colon cancer. *Oncology Reports* **40**: 1165-1173.

Gupta N, Goumnerova LC, Manley P, Chi SN, Neuberg D, Puligandla M *et al* (2018). Prospective Feasibility and Safety Assessment of Surgical Biopsy for Patients with Newly Diagnosed Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Neuro Oncol*.

Gwak HS, Park HJ (2017). Developing chemotherapy for diffuse pontine intrinsic gliomas (DIPG). *Crit Rev Oncol Hematol* **120**: 111-119.

Haberland M, Montgomery RL, Olson EN (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* **10**: 32-42.

Haery L, Thompson RC, Gilmore TD (2015). Histone acetyltransferases and histone deacetylases in B- and T-cell development, physiology and malignancy. *Genes & Cancer* **6**: 184-213.

Hagedorn M, Javerzat S, Gilges D, Meyre A, de Lafarge B, Eichmann A *et al* (2005). Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1643-8.

Halsall JA, Turner BM (2016). Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy: An evolutionarily ancient resistance response may explain their limited success. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **38**: 1102-1110.

Hamisch C, Kickingeder P, Fischer M, Simon T, Ruge MI (2017). Update on the diagnostic value and safety of stereotactic biopsy for pediatric brainstem tumors: a systematic review and meta-analysis of 735 cases. *J Neurosurg Pediatr* **20**: 261-268.

Hanahan D, Folkman J (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**: 353-64.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.

Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**: 646-674.

Hashizume R, Andor N, Ihara Y, Lerner R, Gan H, Chen X *et al* (2014). Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat Med* **20**: 1394-6.

Hashizume R, Smirnov I, Liu S, Phillips JJ, Hyer J, McKnight TR *et al* (2012). Characterization of a diffuse intrinsic pontine glioma cell line: implications for future investigations and treatment. *J Neurooncol* **110**: 305-13.

Hayashi Y, Molina JR, Hamilton SR, Georgescu M-M (2010). NHERF1/EBP50 is a new marker in colorectal cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)* **12**: 1013-1022.

He J, Lau AG, Yaffe MB, Hall RA (2001). Phosphorylation and cell cycle-dependent regulation of Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1 by Cdc2 kinase. *J Biol Chem* **276**: 41559-65.

Hennika T, Becher OJ (2015). Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: Time for Cautious Optimism. *J Child Neurol* **31**: 1377-85.

Hennika T, Hu G, Olaciregui NG, Barton KL, Ehteda A, Chitranjan A *et al* (2017). Pre-Clinical Study of Panobinostat in Xenograft and Genetically Engineered Murine Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Models. *PLoS One* **12**: e0169485.

Hoeman C, Shen C, Becher OJ (2018). CDK4/6 and PDGFRA Signaling as Therapeutic Targets in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front Oncol* **8**: 191.

Hoffend NC, Magner WJ, Tomasi TB (2017). The epigenetic regulation of Dicer and microRNA biogenesis by Panobinostat. *Epigenetics* **12**: 105-112.

Honda K, Yamada T, Hayashida Y, Idogawa M, Sato S, Hasegawa F *et al* (2005). Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer. *Gastroenterology* **128**: 51-62.

Hrabeta J, Stiborova M, Adam V, Kizek R, Eckschlager T (2014). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **158**: 161-9.

Hsu PP, Sabatini DM (2008). Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell* **134**: 703-707.

Hu B, Guo P, Bar-Joseph I, Imanishi Y, Jarzynka M, Bogler O *et al* (2007). Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway. *Oncogene* **26**: 5577-5586.

Huang B, Yang X-D, Lamb A, Chen L-F (2010). Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway. *Cellular Signalling* **22**: 1282-1290.

Huang TY, Piunti A, Lulla RR, Qi J, Horbinski CM, Tomita T *et al* (2017). Detection of Histone H3 mutations in cerebrospinal fluid-derived tumor DNA from children with diffuse midline glioma. *Acta Neuropathol Commun* **5**: 28.

Hung AY, Sheng M (2002). PDZ Domains: Structural Modules for Protein Complex Assembly. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 5699-5702.

Hurley RA, Flashman LA, Chow TW, Taber KH (2010). The brainstem: anatomy, assessment, and clinical syndromes. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* **22**: iv, 1-7.

Huttner A (2017). Molecular Neuropathology and the Ontogeny of Malignant Gliomas. In: J. Moliterno Geae (ed). *Malignant Brain Tumors : State of the Art Treatment*. Springer International Publishing pp 15-29.

Imai Y, Maru Y, Tanaka J (2016). Action mechanisms of histone deacetylase inhibitors in the treatment of hematological malignancies. *Cancer Science* **107**: 1543-1549.

Irianto J, Pfeifer CR, Ivanovska IL, Swift J, Discher DE (2016). Nuclear lamins in cancer. *Cellular and molecular bioengineering* **9**: 258-267.

Jansen MH, Lagerweij T, Sewing AC, Vugts DJ, van Vuurden DG, Molthoff CF *et al* (2016). Bevacizumab Targeting Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: Results of 89Zr-Bevacizumab PET Imaging in Brain Tumor Models. *Mol Cancer Ther* **15**: 2166-74.

Janssens GO, Jansen MH, Lauwers SJ, Nowak PJ, Oldenburger FR, Bouffet E *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**: 315-20.

Jawerka M, Colak D, Dimou L, Spiller C, Lagger S, Montgomery RL *et al* (2010). The specific role of histone deacetylase 2 in adult neurogenesis. *Neuron Glia Biol* **6**: 93-107.

Ji M, Yuan L, Lv X, Dong W, Peng X (2014). EBP50 regulates the apoptosis of pancreatic cancer cells by decreasing the expression levels of Bcl-2. *Experimental and Therapeutic Medicine* **8**: 919-924.

Johung T, Monje M (2017a). Neuronal activity in the glioma microenvironment. *Curr Opin Neurobiol* **47**: 156-161.

Johung TB, Monje M (2017b). Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: New Pathophysiological Insights and Emerging Therapeutic Targets. *Curr Neuropharmacol* **15**: 88-97.

Jones PA, Baylin SB (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* **128**: 683-692.

Jones PA, Issa J-PJ, Baylin S (2016). Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nature Reviews Genetics* **17**: 630-641.

Jubierre L, Jiménez C, Rovira E, Soriano A, Sábado C, Gros L *et al* (2018). Targeting of epigenetic regulators in neuroblastoma. *Experimental & Molecular Medicine* **50**: 51.

Kamiya K, Michel V, Giraudet F, Riederer B, Foucher I, Papal S *et al* (2014). An unusually powerful mode of low-frequency sound interference due to defective hair bundles of the auditory outer hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 9307-9312.

Kang J, Park H, Kim E (2016). IRSp53/BAIAP2 in dendritic spine development, NMDA receptor regulation, and psychiatric disorders. *Neuropharmacology* **100**: 27-39.

Karn T, Ruckhäberle E, Hanker L, Müller V, Schmidt M, Solbach C *et al* (2011). Gene expression profiling of luminal B breast cancers reveals NHERF1 as a new marker of endocrine resistance. *Breast Cancer Research and Treatment* **130**: 409-420.

Kast DJ, Yang C, Disanza A, Boczkowska M, Madasu Y, Scita G *et al* (2014). Mechanism of IRSp53 inhibition and combinatorial activation by Cdc42 and downstream effectors. *Nature Structural & Molecular Biology* **21**: 413-422.

Kaye EC, Baker JN, Broniscer A (2014). Management of diffuse intrinsic pontine glioma in children: current and future strategies for improving prognosis. *CNS Oncology* **3**: 421-431.

Kim E, Niethammer M, Rothschild A, Jan YN, Sheng M (1995). Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* **378**: 85-88.

Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW *et al* (2001). Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med* **7**: 437-43.

Kislin KL, McDonough WS, Eschbacher JM, Armstrong BA, Berens ME (2009). NHERF-1: modulator of glioblastoma cell migration and invasion. *Neoplasia (New York, N.Y.)* **11**: 377-387.

Klymkowsky MW, Savagner P (2009). Epithelial-Mesenchymal Transition. *The American Journal of Pathology* **174**: 1588-1593.

Kommidi H, Tosi U, Maachani UB, Guo H, Marnell CS, Law B *et al* (2018). 18F-Radiolabeled Panobinostat Allows for Positron Emission Tomography Guided Delivery of a Histone Deacetylase Inhibitor. *ACS medicinal chemistry letters* **9**: 114-119.

Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science (New York, N.Y.)* **269**: 1737-1740.

Kotian S, Liyanarachchi S, Zelent A, Parvin JD (2011). Histone deacetylases 9 and 10 are required for homologous recombination. *J Biol Chem* **286**: 7722-6.

Kreimann EL, Morales FC, de Orbata-Cruz J, Takahashi Y, Adams H, Liu T-J *et al* (2007). Cortical stabilization of beta-catenin contributes to NHERF1/EBP50 tumor suppressor function. *Oncogene* **26**: 5290-5299.

Kremer KN, Dudakovic A, Hess AD, Smith BD, Karp JE, Kaufmann SH *et al* (2015). Histone Deacetylase Inhibitors Target the Leukemic Microenvironment by Enhancing a Nherf1-Protein Phosphatase 1 α -TAZ Signaling Pathway in Osteoblasts. *The Journal of Biological Chemistry* **290**: 29478-29492.

Kretsovali A, Hadjimichael C, Charmpilas N (2012). Histone Deacetylase Inhibitors in Cell Pluripotency, Differentiation, and Reprogramming. *Stem Cells International* **2012**.

Krugmann S, Jordens I, Gevaert K, Driessens M, Vandekerckhove J, Hall A (2001). Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Current biology: CB* **11**: 1645-1655.

Kruidenier L, Chung C-w, Cheng Z, Liddle J, Che K, Joberty G *et al* (2012). A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* **488**: 404-408.

Kuzmichev A, Jenuwein T, Tempst P, Reinberg D (2004). Different Ezh2-Containing Complexes Target Methylation of Histone H1 or Nucleosomal Histone H3. *Molecular Cell* **14**: 183-193.

Lamprecht G, Seidler U (2006). The emerging role of PDZ adapter proteins for regulation of intestinal ion transport. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **291**: G766-G777.

Lanzetti L, Rybin V, Malabarba MG, Christoforidis S, Scita G, Zerial M *et al* (2000). The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5. *Nature* **408**: 374-7.

Lapin DH, Tsoli M, Ziegler DS (2017). Genomic Insights into Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front Oncol* **7**: 57.

Laubach JP, Moreau P, San-Miguel JF, Richardson PG (2015). Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **21**: 4767-4773.

Lazar CS, Cresson CM, Lauffenburger DA, Gill GN (2004). The Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor stabilizes epidermal growth factor receptors at the cell surface. *Molecular Biology of the Cell* **15**: 5470-5480.

Lee EQ, Reardon DA, Schiff D, Drappatz J, Muzikansky A, Grimm SA *et al* (2015). Phase II study of panobinostat in combination with bevacizumab for recurrent glioblastoma and anaplastic glioma. *Neuro-Oncology* **17**: 862-867.

Lee SH, Kerff F, Chereau D, Ferron F, Klug A, Dominguez R (2007). Structural basis for the actin-binding function of missing-in-metastasis. *Structure* **15**: 145-55.

Lehnertz B, Zhang YW, Boivin I, Mayotte N, Tomellini E, Chagraoui J *et al* (2017). H3(K27M/I) mutations promote context-dependent transformation in acute myeloid leukemia with RUNX1 alterations. *Blood* **130**: 2204-2214.

Leslie KL, Song GJ, Barrick S, Wehbi VL, Vilardaga J-P, Bauer PM *et al* (2013). Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 (EBP50) and nuclear factor- κ B (NF- κ B): a feed-forward loop for systemic and vascular inflammation. *The Journal of Biological Chemistry* **288**: 36426-36436.

Lewis-Saravalli S, Campbell S, Claing A (2013). ARF1 controls Rac1 signaling to regulate migration of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells. *Cellular Signalling* **25**: 1813-1819.

Lewis PW, Muller MM, Koletsky MS, Cordero F, Lin S, Banaszynski LA *et al* (2013). Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science* **340**: 857-61.

Li H, Zhang B, Liu Y, Yin C (2014). EBP50 inhibits the migration and invasion of human breast cancer cells via LIMK/cofilin and the PI3K/Akt/mTOR/MMP signaling pathway. *Med Oncol* **31**: 162.

Li J, Poulikakos PI, Dai Z, Testa JR, Callaway DJE, Bu Z (2007). Protein kinase C phosphorylation disrupts Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 autoinhibition and promotes cystic fibrosis transmembrane conductance regulator macromolecular assembly. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 27086-27099.

Lim HC, Jou T-S (2016). Ras-activated RSK1 phosphorylates EBP50 to regulate its nuclear localization and promote cell proliferation. *Oncotarget* **7**: 10283-10296.

Lin GL, Nagaraja S, Filbin MG, Suvà ML, Vogel H, Monje M (2018). Non-inflammatory tumor microenvironment of diffuse intrinsic pontine glioma. *Acta Neuropathologica Communications* **6**: 51.

Lin KT, Wang YW, Chen CT, Ho CM, Su WH, Jou YS (2012a). HDAC inhibitors augmented cell migration and metastasis through induction of PKCs leading to identification of low toxicity modalities for combination cancer therapy. *Clin Cancer Res* **18**: 4691-701.

Lin Y-Y, Hsu Y-H, Huang H-Y, Shann Y-J, Huang C-YF, Wei S-C *et al* (2012b). Aberrant nuclear localization of EBP50 promotes colorectal carcinogenesis in xenotransplanted mice by modulating TCF-1 and β -catenin interactions. *The Journal of Clinical Investigation* **122**: 1881-1894.

Lindquist RA, Guinto CD, Rodas-Rodriguez JL, Fuentealba LC, Tate MC, Rowitch DH *et al* (2016). Identification of proliferative progenitors associated with prominent postnatal growth of the pons. *Nature Communications* **7**: 11628.

Lisiero DN, Soto H, Everson RG, Liao LM, Prins RM (2014). The histone deacetylase inhibitor, LBH589, promotes the systemic cytokine and effector responses of adoptively transferred CD8⁺ T cells. *J Immunother Cancer* **2**: 8.

Liu H, Hu Q, Kaufman A, D'Ercole AJ, Ye P (2008). Developmental expression of histone deacetylase 11 in the murine brain. *J Neurosci Res* **86**: 537-43.

Liu P-S, Jong T-H, Maa M-C, Leu T-H (2010). The interplay between Eps8 and IRSp53 contributes to Src-mediated transformation. *Oncogene* **29**: 3977-3989.

Long W, Yi Y, Chen S, Cao Q, Zhao W, Liu Q (2017). Potential New Therapies for Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Frontiers in Pharmacology* **8**.

Lonser RR, Warren KE, Butman JA, Quezado Z, Robison RA, Walbridge S *et al* (2007). Real-time image-guided direct convective perfusion of intrinsic brainstem lesions. Technical note. *J Neurosurg* **107**: 190-7.

Losson H, Schneckenger M, Dicato M, Diederich M (2016). Natural Compound Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi): Synergy with Inflammatory Signaling Pathway Modulators and Clinical Applications in Cancer. *Molecules (Basel, Switzerland)* **21**.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK *et al* (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* **131**: 803-20.

Lulla RR, Saratsis AM, Hashizume R (2016). Mutations in chromatin machinery and pediatric high-grade glioma. *Sci Adv* **2**: e1501354.

Ma Q, Jiao Y, Hao Y, Yan S, Lyu N, Gao H *et al* (2016). Targeting of NHERF1 through RNA interference inhibits the proliferation and migration of metastatic prostate cancer cells. *Oncology Letters* **11**: 1149-1154.

MacDonald BT, Tamai K, He X (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell* **17**: 9-26.

Mackay A, Burford A, Carvalho D, Izquierdo E, Fazal-Salom J, Taylor KR *et al* (2017). Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* **32**: 520-537.e5.

Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R *et al* (2005). Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Medicinal Research Reviews* **25**: 261-309.

Malfettone A, Saponaro C, Paradiso A, Simone G, Mangia A (2012). Peritumoral vascular invasion and NHERF1 expression define an immunophenotype of grade 2 invasive breast cancer associated with poor prognosis. *BMC cancer* **12**: 106.

Mandawat A, Fiskus W, Buckley KM, Robbins K, Rao R, Balusu R *et al* (2010). Pan-histone deacetylase inhibitor panobinostat depletes CXCR4 levels and signaling and exerts synergistic antimyeloid activity in combination with CXCR4 antagonists. *Blood* **116**: 5306-15.

Mangia A, Chiriatti A, Bellizzi A, Malfettone A, Stea B, Zito FA *et al* (2009). Biological role of NHERF1 protein expression in breast cancer. *Histopathology* **55**: 600-608.

Mangia A, Malfettone A, Saponaro C, Tommasi S, Simone G, Paradiso A (2011). Human epidermal growth factor receptor 2, Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1, and breast cancer susceptibility gene-1 as new biomarkers for familial breast cancers. *Human Pathology* **42**: 1589-1595.

Mangia A, Saponaro C, Malfettone A, Bisceglie D, Bellizzi A, Asselti M *et al* (2012). Involvement of nuclear NHERF1 in colorectal cancer progression. *Oncology Reports* **28**: 889-894.

Marks PA, Xu W-S (2009). Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *Journal of Cellular Biochemistry* **107**: 600-608.

- Mathew RK, Rutka JT (2018). Diffuse Intrinsic Pontine Glioma : Clinical Features, Molecular Genetics, and Novel Targeted Therapeutics. *J Korean Neurosurg Soc* **61**: 343-351.
- Mattila PK, Lappalainen P (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **9**: 446-454.
- Maudsley S, Zamah AM, Rahman N, Blitzer JT, Luttrell LM, Lefkowitz RJ *et al* (2000). Platelet-Derived Growth Factor Receptor Association with Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor Potentiates Receptor Activity. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 8352-8363.
- Maury E, Hashizume R (2016). Epigenetic modification in chromatin machinery and its deregulation in pediatric brain tumors: Insight into epigenetic therapies. *Epigenetics* **12**: 353-369.
- Millard TH, Dawson J, Machesky LM (2007). Characterisation of IRTKS, a novel IRSp53/MIM family actin regulator with distinct filament bundling properties. *J Cell Sci* **120**: 1663-72.
- Misuraca KL, Cordero FJ, Becher OJ (2015). Pre-Clinical Models of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front Oncol* **5**: 172.
- Misuraca KL, Hu G, Barton KL, Chung A, Becher OJ (2016). A Novel Mouse Model of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Initiated in Pax3-Expressing Cells. *Neoplasia* **18**: 60-70.
- Miyauchi JT, Chen D, Choi M, Nissen JC, Shroyer KR, Djordevic S *et al* (2016). Ablation of Neuropilin 1 from glioma-associated microglia and macrophages slows tumor progression. *Oncotarget* **7**: 9801-9814.
- Mohammad F, Weissmann S, Leblanc B, Pandey DP, Hojfeldt JW, Comet I *et al* (2017). EZH2 is a potential therapeutic target for H3K27M-mutant pediatric gliomas. *Nat Med* **23**: 483-492.
- Molina JR, Agarwal NK, Morales FC, Hayashi Y, Aldape KD, Cote G *et al* (2012). PTEN, NHERF1 and PHLPP form a tumor suppressor network that is disabled in glioblastoma. *Oncogene* **31**: 1264-1274.
- Molina JR, Morales FC, Hayashi Y, Aldape KD, Georgescu M-M (2010). Loss of PTEN binding adapter protein NHERF1 from plasma membrane in glioblastoma contributes to PTEN inactivation. *Cancer Research* **70**: 6697-6703.
- Monje M, Mitra SS, Freret ME, Raveh TB, Kim J, Masek M *et al* (2011). Hedgehog-responsive candidate cell of origin for diffuse intrinsic pontine glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 4453-8.
- Montero J, Sarosiek KA, DeAngelo JD, Maertens O, Ryan J, Ercan D *et al* (2015). Drug-induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy. *Cell* **160**: 977-89.

Morales FC, Hayashi Y, van Pelt CS, Georgescu MM (2012). NHERF1/EBP50 controls lactation by establishing basal membrane polarity complexes with prolactin receptor. *Cell Death Dis* **3**: e391.

Morales FC, Takahashi Y, Kreimann EL, Georgescu M-M (2004a). Ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50 organizes ERM proteins at the apical membrane of polarized epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 17705-17710.

Morales FC, Takahashi Y, Kreimann EL, Georgescu MM (2004b). Ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50 organizes ERM proteins at the apical membrane of polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17705-10.

Morales FC, Takahashi Y, Momin S, Adams H, Chen X, Georgescu M-M (2007). NHERF1/EBP50 head-to-tail intramolecular interaction masks association with PDZ domain ligands. *Molecular and Cellular Biology* **27**: 2527-2537.

Morris MJ, Monteggia LM (2013). Unique functional roles for class I and class II histone deacetylases in central nervous system development and function. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **31**: 370-381.

Mottamal M, Zheng S, Huang TL, Wang G (2015). Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules (Basel, Switzerland)* **20**: 3898-3941.

Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC (2010). Chapter 3 - Regulatory T Cells in Cancer. In: Vande Woude GF and Klein G (eds). *Advances in Cancer Research*. Academic Press. pp 57-117.

Mount CW, Majzner RG, Sundaresh S, Arnold EP, Kadapakkam M, Haile S *et al* (2018). Potent antitumor efficacy of anti-GD2 CAR T cells in H3-K27M+ diffuse midline gliomas. *Nature Medicine* **24**: 572-579.

Muscat A, Popovski D, Jayasekara WSN, Rossello FJ, Ferguson M, Marini KD *et al* (2016). Low-Dose Histone Deacetylase Inhibitor Treatment Leads to Tumor Growth Arrest and Multi-Lineage Differentiation of Malignant Rhabdoid Tumors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **22**: 3560-3570.

Nagaraja S, Vitanza NA, Woo PJ, Taylor KR, Liu F, Zhang L *et al* (2017). Transcriptional Dependencies in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* **31**: 635-652.e6.

Nakagawa H, Miki H, Nozumi M, Takenawa T, Miyamoto S, Wehland J *et al* (2003). IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *J Cell Sci* **116**: 2577-83.

New M, Olzscha H, La Thangue NB (2012). HDAC inhibitor-based therapies: Can we interpret the code? *Molecular Oncology* **6**: 637-656.

Nichol JN, Dupéré-Richer D, Ezponda T, Licht JD, Miller WH (2016). H3K27 Methylation: A Focal Point of Epigenetic Deregulation in Cancer. *Advances in Cancer Research* **131**: 59-95.

Nikbakht H, Panditharatna E, Mikael LG, Li R, Gayden T, Osmond M *et al* (2016). Spatial and temporal homogeneity of driver mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Commun* **7**: 11185.

Nourry C, Grant SGN, Borg J-P (2003). PDZ Domain Proteins: Plug and Play! *Science Signaling* **2003**: re7-re7.

Ochs K, Ott M, Bunse T, Sahm F, Bunse L, Deumelandt K *et al* (2017). K27M-mutant histone-3 as a novel target for glioma immunotherapy. *Oncoimmunology* **6**: e1328340.

Okamura-Oho Y, Miyashita T, Yamada M (2001). Distinctive tissue distribution and phosphorylation of IRSp53 isoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **289**: 957-960.

Opinto G, Silvestris N, Centonze M, Graziano G, Pinto R, Fucci L *et al* (2017). Hierarchical clustering analysis identifies metastatic colorectal cancers patients with more aggressive phenotype. *Oncotarget* **8**: 87782-87794.

Pan MR, Hsu MC, Chen LT, Hung WC (2018). Orchestration of H3K27 methylation: mechanisms and therapeutic implication. *Cell Mol Life Sci* **75**: 209-223.

Pan Q, Chanthery Y, Liang WC, Stawicki S, Mak J, Rathore N *et al* (2007). Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* **11**: 53-67.

Pan Y, Wang L, Dai JL (2006). Suppression of breast cancer cell growth by Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 (NHERF1). *Breast Cancer Res* **8**: R63.

Pan Y, Weinman EJ, Dai JL (2008). Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 inhibits platelet-derived growth factor signaling in breast cancer cells. *Breast Cancer Res* **10**: R5.

Panditharatna E, Yaeger K, Kilburn LB, Packer RJ, Nazarian J (2015). Clinicopathology of diffuse intrinsic pontine glioma and its redefined genomic and epigenomic landscape. *Cancer Genet* **208**: 367-73.

Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H *et al* (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* **344**: 1396-401.

Pathania M, De Jay N, Maestro N, Harutyunyan AS, Nitarska J, Pahlavan P *et al* (2017). H3.3K27M Cooperates with Trp53 Loss and PDGFRA Gain in Mouse Embryonic Neural Progenitor Cells to Induce Invasive High-Grade Gliomas. *Cancer Cell* **32**: 684-700.e9.

- Paugh BS, Broniscer A, Qu C, Miller CP, Zhang J, Tatevossian RG *et al* (2011). Genome-wide analyses identify recurrent amplifications of receptor tyrosine kinases and cell-cycle regulatory genes in diffuse intrinsic pontine glioma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**: 3999-4006.
- Paugh BS, Zhu X, Qu C, Endersby R, Diaz AK, Zhang J *et al* (2013). Novel Oncogenic PDGFRA Mutations in Pediatric High-Grade Gliomas. *Cancer Research* **73**: 6219-6229.
- Pennati R, Gropelli S, de Bernardi F, Sotgia C (2001). Action of valproic acid on *Xenopus laevis* development: teratogenic effects on eyes. *Teratog Carcinog Mutagen* **21**: 121-33.
- Piunti A, Hashizume R, Morgan MA, Bartom ET, Horbinski CM, Marshall SA *et al* (2017). Therapeutic targeting of polycomb and BET bromodomain proteins in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Nat Med* **23**: 493-500.
- Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H *et al* (2003). Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science (New York, N.Y.)* **300**: 131-135.
- Platten M, Bunse L, Wick W, Bunse T (2016). Concepts in glioma immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **65**: 1269-1275.
- Plessier A, Le Dret L, Varlet P, Beccaria K, Lacombe J, Meriaux S *et al* (2017). New in vivo avatars of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) from stereotactic biopsies performed at diagnosis. *Oncotarget* **8**: 52543-52559.
- Pollack IF, Jakacki RI, Butterfield LH, Hamilton RL, Panigrahy A, Potter DM *et al* (2014). Antigen-specific immune responses and clinical outcome after vaccination with glioma-associated antigen peptides and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in children with newly diagnosed malignant brainstem and nonbrainstem gliomas. *J Clin Oncol* **32**: 2050-8.
- Puget S, Beccaria K, Blauwblomme T, Roujeau T, James S, Grill J *et al* (2015). Biopsy in a series of 130 pediatric diffuse intrinsic Pontine gliomas. *Childs Nerv Syst* **31**: 1773-80.
- Puget S, Blauwblomme T, Grill J (2012). Is biopsy safe in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma? *Am Soc Clin Oncol Educ Book*: 629-33.
- Qian DZ, Kato Y, Shabbeer S, Wei Y, Verheul HM, Salumbides B *et al* (2006). Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589. *Clin Cancer Res* **12**: 634-42.
- Quemener C, Baud J, Boye K, Dubrac A, Billottet C, Soulet F *et al* (2016). Dual Roles for CXCL4 Chemokines and CXCR3 in Angiogenesis and Invasion of Pancreatic Cancer. *Cancer Res* **76**: 6507-6519.
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M *et al* (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593-599.
- Recinos PF, Sciubba DM, Jallo GI (2007). Brainstem tumors: where are we today? *Pediatr Neurosurg* **43**: 192-201.

Reczek D, Berryman M, Bretscher A (1997). Identification of EBP50: A PDZ-containing Phosphoprotein that Associates with Members of the Ezrin-Radixin-Moesin Family. *The Journal of Cell Biology* **139**: 169-179.

Riggs MG, Whittaker RG, Neumann JR, Ingram VM (1977). n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature* **268**: 462-4.

Robens JM, Yeow-Fong L, Ng E, Hall C, Manser E (2010). Regulation of IRSp53-dependent filopodial dynamics by antagonism between 14-3-3 binding and SH3-mediated localization. *Mol Cell Biol* **30**: 829-44.

Robey RW, Chakraborty AR, Basseville A, Luchenko V, Bahr J, Zhan Z *et al* (2011). Histone deacetylase inhibitors: emerging mechanisms of resistance. *Molecular Pharmaceutics* **8**: 2021-2031.

Rosato RR, Almenara JA, Dai Y, Grant S (2003). Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. *Molecular Cancer Therapeutics* **2**: 1273-1284.

Roy BC, Kakinuma N, Kiyama R (2009). Kank attenuates actin remodeling by preventing interaction between IRSp53 and Rac1. *The Journal of Cell Biology* **184**: 253-267.

Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Sutton VR, Tainton KM, Kofler R *et al* (2001). The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10833-8.

Saidi A, Hagedorn M, Allain N, Verpelli C, Sala C, Bello L *et al* (2009). Combined targeting of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor potently inhibits glioma growth and invasiveness. *Int J Cancer* **125**: 1054-64.

Saotome I, Curto M, McClatchey AI (2004). Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. *Dev Cell* **6**: 855-64.

Saponaro C, Sergio S, Coluccia A, De Luca M, La Regina G, Mologni L *et al* (2018). β -catenin knockdown promotes NHERF1-mediated survival of colorectal cancer cells: implications for a double-targeted therapy. *Oncogene* **37**: 3301-3316.

Saratsis AM, Yadavilli S, Magge S, Rood BR, Perez J, Hill DA *et al* (2012). Insights into pediatric diffuse intrinsic pontine glioma through proteomic analysis of cerebrospinal fluid. *Neuro-Oncology* **14**: 547-560.

Sarosiek KA, Ni Chonghaile T, Letai A (2013). Mitochondria: gatekeepers of response to chemotherapy. *Trends Cell Biol* **23**: 612-9.

Sathe M, Muthukrishnan G, Rae J, Disanza A, Thattai M, Scita G *et al* (2018). Small GTPases and BAR domain proteins regulate branched actin polymerisation for clathrin and dynamin-independent endocytosis. *Nature Communications* **9**: 1835.

Sato T, Irie S, Kitada S, Reed JC (1995). FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science (New York, N.Y.)* **268**: 411-415.

Scholz C, Weinert BT, Wagner SA, Beli P, Miyake Y, Qi J *et al* (2015). Acetylation site specificities of lysine deacetylase inhibitors in human cells. *Nat Biotechnol* **33**: 415-23.

Schroeder KM, Hoeman CM, Becher OJ (2014). Children are not just little adults: recent advances in understanding of diffuse intrinsic pontine glioma biology. *Pediatr Res* **75**: 205-9.

Schroeder TM, Nair AK, Staggs R, Lamblin A-F, Westendorf JJ (2007). Gene profile analysis of osteoblast genes differentially regulated by histone deacetylase inhibitors. *BMC Genomics* **8**: 362.

Scita G, Confalonieri S, Lappalainen P, Suetsugu S (2008). IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends in Cell Biology* **18**: 52-60.

Scutti JAB (2018). Importance of immune monitoring approaches and the use of immune checkpoints for the treatment of diffuse intrinsic pontine glioma: From bench to clinic and vice versa (Review). *Int J Oncol* **52**: 1041-1056.

Seidler U, Singh AK, Cinar A, Chen M, Hillesheim J, Hogema B *et al* (2009). The Role of the NHERF Family of PDZ Scaffolding Proteins in the Regulation of Salt and Water Transport. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1165**: 249-260.

Shaik S, Kennis B, Maegawa S, Schadler K, Yanwen Y, Callegari K *et al* (2018). REST upregulates gremlin to modulate diffuse intrinsic pontine glioma vasculature. *Oncotarget* **9**: 5233-5250.

Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X (2004). Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 18030-18035.

Sheng R, Chen Y, Yung Gee H, Stec E, Melowic HR, Blatner NR *et al* (2012). Cholesterol modulates cell signaling and protein networking by specifically interacting with PDZ domain-containing scaffold proteins. *Nature Communications* **3**: 1249.

Shenolikar S, Minkoff CM, Steplock DA, Evangelista C, Liu M-Z, Weinman EJ (2001). N-terminal PDZ domain is required for NHERF dimerization. *FEBS Letters* **489**: 233-236.

Shenolikar S, Voltz JW, Minkoff CM, Wade JB, Weinman EJ (2002). Targeted disruption of the mouse NHERF-1 gene promotes internalization of proximal tubule sodium-phosphate cotransporter type IIa and renal phosphate wasting. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 11470-11475.

Shi W, Palmer JD, Werner-Wasik M, Andrews DW, Evans JJ, Glass J *et al* (2016). Phase I trial of panobinostat and fractionated stereotactic re-irradiation therapy for recurrent high grade gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* **127**: 535-539.

Shibata T, Chuma M, Kokubu A, Sakamoto M, Hirohashi S (2003). EBP50, a beta-catenin-associating protein, enhances Wnt signaling and is over-expressed in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **38**: 178-86.

Short DB, Trotter KW, Reczek D, Kreda SM, Bretscher A, Boucher RC *et al* (1998). An Apical PDZ Protein Anchors the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to the Cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 19797-19801.

Simon JA, Lange CA (2008). Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **647**: 21-29.

Singh A, Patel VK, Jain DK, Patel P, Rajak H (2016). Panobinostat as Pan-deacetylase Inhibitor for the Treatment of Pancreatic Cancer: Recent Progress and Future Prospects. *Oncology and Therapy* **4**: 73-89.

Singh AK, Bishayee A, Pandey AK (2018). Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy. *Nutrients* **10**.

Singh BN, Zhang G, Hwa YL, Li J, Dowdy SC, Jiang SW (2010). Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. *Expert Rev Anticancer Ther* **10**: 935-54.

Singleton WG, Collins AM, Bienemann AS, Killick-Cole CL, Haynes HR, Asby DJ *et al* (2017). Convection enhanced delivery of panobinostat (LBH589)-loaded pluronic nanomicelles prolongs survival in the F98 rat glioma model. *International Journal of Nanomedicine* **12**: 1385-1399.

Singleton WGB, Bieneman AS, Woolley M, Johnson D, Lewis O, Wyatt MJ *et al* (2018). The distribution, clearance, and brainstem toxicity of panobinostat administered by convection-enhanced delivery. *Journal of Neurosurgery. Pediatrics*: 1-9.

Solomon DA, Wood MD, Tihan T, Bollen AW, Gupta N, Phillips JJ *et al* (2015). Diffuse Midline Gliomas with Histone H3-K27M Mutation: A Series of 47 Cases Assessing the Spectrum of Morphologic Variation and Associated Genetic Alterations. *Brain Pathol* **26**: 569-80.

Song GJ, Barrick S, Leslie KL, Sicari B, Fiaschi-Taesch NM, Bisello A (2010). EBP50 inhibits the anti-mitogenic action of the parathyroid hormone type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **49**: 1012-1021.

Song GJ, Leslie KL, Barrick S, Mamonova T, Fitzpatrick JM, Drombosky KW *et al* (2015). Phosphorylation of ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 (EBP50) by Akt promotes stability and mitogenic function of S-phase kinase-associated protein-2 (Skp2). *J Biol Chem* **290**: 2879-87.

Song J, Bai J, Yang W, Gabrielson EW, Chan DW, Zhang Z (2007). Expression and clinicopathological significance of oestrogen-responsive ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 in breast cancer. *Histopathology* **51**: 40-53.

Souweidane MM, Kramer K, Pandit-Taskar N, Zhou Z, Haque S, Zanzonico P *et al* (2018). Convection-enhanced delivery for diffuse intrinsic pontine glioma: a single-centre, dose-escalation, phase 1 trial. *Lancet Oncol* **19**: 1040-1050.

Steffen A, Faix J, Resch GP, Linkner J, Wehland J, Small JV *et al* (2006). Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. *Mol Biol Cell* **17**: 2581-91.

Stemmer-Rachamimov AO, Wiederhold T, Nielsen GP, James M, Pinney-Michalowski D, Roy JE *et al* (2001). NHE-RF, a Merlin-Interacting Protein, Is Primarily Expressed in Luminal Epithelia, Proliferative Endometrium, and Estrogen Receptor-Positive Breast Carcinomas. *The American Journal of Pathology* **158**: 57-62.

Stokka AJ, Mosenden R, Ruppelt A, Lygren B, Taskén K (2010). The adaptor protein EBP50 is important for localization of the protein kinase A–Ezrin complex in T-cells and the immunomodulating effect of cAMP. *Biochemical Journal* **425**: 381-388.

Strazielle N, Creidy R, Marcus C, Boucraut J, Ghersi-Egea J-F (2016). T-Lymphocytes Traffic into the Brain across the Blood-CSF Barrier: Evidence Using a Reconstituted Choroid Plexus Epithelium. *PLoS ONE* **11**.

Subbiah VK, Kranjec C, Thomas M, Banks L (2011). PDZ domains: the building blocks regulating tumorigenesis. *The Biochemical Journal* **439**: 195-205.

Subramanian H, Gupta K, Ali H (2012). Roles for NHERF1 and NHERF2 on the regulation of C3a receptor signaling in human mast cells. *PLoS One* **7**: e51355.

Sun L, Zheng J, Wang Q, Song R, Liu H, Meng R *et al* (2016). NHERF1 regulates actin cytoskeleton organization through modulation of α -actinin-4 stability. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **30**: 578-589.

Suraweera A, O'Byrne KJ, Richard DJ (2018). Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi. *Frontiers in Oncology* **8**: 92.

Svitkina TM, Bulanov EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM *et al* (2003). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol* **160**: 409-21.

Takahashi K, Suzuki K (2010). WAVE2 targeting to phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate mediated by insulin receptor substrate p53 through a complex with WAVE2. *Cellular Signalling* **22**: 1708-1716.

Takayama S, Reed JC, Homma S (2003). Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* **22**: 9041-7.

Tan MH, Au KF, Yablonovitch AL, Wills AE, Chuang J, Baker JC *et al* (2013). RNA sequencing reveals a diverse and dynamic repertoire of the *Xenopus tropicalis* transcriptome over development. *Genome Research* **23**: 201.

Tate MC, Lindquist RA, Nguyen T, Sanai N, Barkovich AJ, Huang EJ *et al* (2015). Postnatal growth of the human pons: a morphometric and immunohistochemical analysis. *The Journal of Comparative Neurology* **523**: 449-462.

Taylor KR, Mackay A, Truffaux N, Butterfield YS, Morozova O, Philippe C *et al* (2014a). Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Genet* **46**: 457-61.

Taylor KR, Vinci M, Bullock AN, Jones C (2014b). ACVR1 mutations in DIPG: lessons learned from FOP. *Cancer Res* **74**: 4565-70.

Thirant C, Bessette B, Varlet P, Puget S, Cadusseau J, Tavares Sdos R *et al* (2011). Clinical relevance of tumor cells with stem-like properties in pediatric brain tumors. *PLoS One* **6**: e16375.

Thurn KT, Thomas S, Moore A, Munster PN (2011). Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Future oncology (London, England)* **7**: 263-283.

Trivedi CM, Luo Y, Yin Z, Zhang M, Zhu W, Wang T *et al* (2007). Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3 beta activity. *Nat Med* **13**: 324-31.

Truffaux N, Philippe C, Paulsson J, Andreiulo F, Guerrini-Rousseau L, Cornilleau G *et al* (2014). Preclinical evaluation of dasatinib alone and in combination with cabozantinib for the treatment of diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro Oncol* **17**: 953-64.

Valdez BC, Li Y, Murray D, Brammer JE, Liu Y, Hosing C *et al* (2016). Differential effects of histone deacetylase inhibitors on cellular drug transporters and their implications for using epigenetic modifiers in combination chemotherapy. *Oncotarget* **7**: 63829-63838.

Van Veggel M, Westerman E, Hamberg P (2018). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Panobinostat. *Clin Pharmacokinet* **57**: 21-29.

Vaquero J, Nguyen Ho-Bouldoires TH, Claperon A, Fouassier L (2017). Role of the PDZ-scaffold protein NHERF1/EBP50 in cancer biology: from signaling regulation to clinical relevance. *Oncogene*.

Vargas A, Zeisser-Laboue M, Lange N, Gurny R, Delie F (2007). The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* **59**: 1162-76.

Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E *et al* (2004). Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* **119**: 555-66.

Veldhuijzen van Zanten SE, Baugh J, Chaney B, De Jongh D, Sanchez Aliaga E, Barkhof F *et al* (2017). Development of the SIOPE DIPG network, registry and imaging repository: a collaborative effort to optimize research into a rare and lethal disease. *J Neurooncol* **132**: 255-266.

Venkatesh HS, Johung TB, Caretti V, Noll A, Tang Y, Nagaraja S *et al* (2015). Neuronal Activity Promotes Glioma Growth through Neuroligin-3 Secretion. *Cell* **161**: 803-816.

Venkatesh HS, Tam LT, Woo PJ, Lennon J, Nagaraja S, Gillespie SM *et al* (2017). Targeting neuronal activity-regulated neuroligin-3 dependency in high-grade glioma. *Nature* **549**: 533-537.

Veringa SJE, Biesmans D, van Vuurden DG, Jansen MHA, Wedekind LE, Horsman I *et al* (2013). In vitro drug response and efflux transporters associated with drug resistance in pediatric high grade glioma and diffuse intrinsic pontine glioma. *PloS One* **8**: e61512.

Vinci M, Burford A, Molinari V, Kessler K, Popov S, Clarke M *et al* (2018). Functional diversity and cooperativity between subclonal populations of pediatric glioblastoma and diffuse intrinsic pontine glioma cells. *Nat Med* **24**: 1204-1215.

Vondriska TM, Pass JM, Ping P (2004). Scaffold proteins and assembly of multiprotein signaling complexes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **37**: 391-397.

Waddington CH (2012). The epigenotype. 1942. *International Journal of Epidemiology* **41**: 10-13.

Wagner S, Benesch M, Berthold F, Gnekow AK, Rutkowski S, Strater R *et al* (2006). Secondary dissemination in children with high-grade malignant gliomas and diffuse intrinsic pontine gliomas. *Br J Cancer* **95**: 991-7.

Walker DA, Liu J, Kieran M, Jabado N, Picton S, Packer R *et al* (2013). A multi-disciplinary consensus statement concerning surgical approaches to low-grade, high-grade astrocytomas and diffuse intrinsic pontine gliomas in childhood (CPN Paris 2011) using the Delphi method. *Neuro Oncol* **15**: 462-8.

Wang B, Yang Y, Friedman PA (2008). Na/H Exchange Regulatory Factor 1, a Novel AKT-associating Protein, Regulates Extracellular Signal-regulated Kinase Signaling through a B-Raf–Mediated Pathway. *Molecular Biology of the Cell* **19**: 1637-1645.

Wang L, Qi Y, Xiong Y, Peng Z, Ma Q, Zhang Y *et al* (2017a). Ezrin-Radixin-Moesin Binding Phosphoprotein 50 (EBP50) Suppresses the Metastasis of Breast Cancer and HeLa Cells by Inhibiting Matrix Metalloproteinase-2 Activity. *Anticancer Research* **37**: 4353-4360.

Wang ZJ, Ge Y, Poulik J, Edwards H (2017b). Concomitant Use of Panobinostat and Reirradiation in Progressive DIPG: Report of 2 Cases. *J Pediatr Hematol Oncol* **00**: 4.

Warren KE (2018). Beyond the Blood:Brain Barrier: The Importance of Central Nervous System (CNS) Pharmacokinetics for the Treatment of CNS Tumors, Including Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Frontiers in Oncology* **8**.

Warren KE, Killian K, Suuriniemi M, Wang Y, Quezado M, Meltzer PS (2012). Genomic aberrations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro-Oncology* **14**: 326-332.

Wasim L, Chopra M (2018). Synergistic anticancer effect of panobinostat and topoisomerase inhibitors through ROS generation and intrinsic apoptotic pathway induction in cervical cancer cells. *Cell Oncol (Dordr)* **41**: 201-212.

- Weinman EJ, Biswas R, Steplock D, Douglass TS, Cunningham R, Shenolikar S (2010). Sodium-Hydrogen Exchanger Regulatory Factor 1 (NHERF-1) Transduces Signals That Mediate Dopamine Inhibition of Sodium-Phosphate Co-transport in Mouse Kidney. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 13454-13460.
- Weinman EJ, Cunningham R, Shenolikar S (2005). NHERF and regulation of the renal sodium-hydrogen exchanger NHE3. *Pflügers Arch* **450**: 137-44.
- Weinman EJ, Steplock D, Shenolikar S (2003). NHERF-1 uniquely transduces the cAMP signals that inhibit sodium-hydrogen exchange in mouse renal apical membranes. *FEBS letters* **536**: 141-144.
- Weinman EJ, Steplock D, Wang Y, Shenolikar S (1995). Characterization of a protein cofactor that mediates protein kinase A regulation of the renal brush border membrane Na(+)-H⁺ exchanger. *Journal of Clinical Investigation* **95**: 2143-2149.
- Wheeler DS, Barrick SR, Grubisha MJ, Brufsky AM, Friedman PA, Romero G (2011). Direct interaction between NHERF1 and Frizzled regulates β -catenin signaling. *Oncogene* **30**: 32-42.
- Wheeler GN, Brandli AW (2009). Simple vertebrate models for chemical genetics and drug discovery screens: lessons from zebrafish and Xenopus. *Dev Dyn* **238**: 1287-308.
- Wilson AJ, Byun D-S, Nasser S, Murray LB, Ayyanar K, Arango D *et al* (2008). HDAC4 promotes growth of colon cancer cells via repression of p21. *Molecular Biology of the Cell* **19**: 4062-4075.
- Wilson AJ, Byun DS, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y *et al* (2006). Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem* **281**: 13548-58.
- Wood PJ, Strong R, McArthur GA, Michael M, Algar E, Muscat A *et al* (2018). A phase I study of panobinostat in pediatric patients with refractory solid tumors, including CNS tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*.
- Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfort J *et al* (2012). Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet* **44**: 251-3.
- Wu YL, Maachani UB, Schweitzer M, Singh R, Wang M, Chang R *et al* (2017a). Dual Inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK Pathways Induces Synergistic Antitumor Effects in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Cells. *Transl Oncol* **10**: 221-228.
- Wu Z, Connolly J, Biggar KK (2017b). Beyond histones – the expanding roles of protein lysine methylation. *The FEBS Journal* **284**: 2732-2744.
- Xu C, Liu X, Geng Y, Bai Q, Pan C, Sun Y *et al* (2017). Patient-derived DIPG cells preserve stem-like characteristics and generate orthotopic tumors. *Oncotarget* **8**: 76644-76655.

- Yamaguchi T, Cubizolles F, Zhang Y, Reichert N, Kohler H, Seiser C *et al* (2010). Histone deacetylases 1 and 2 act in concert to promote the G1-to-S progression. *Genes & Development* **24**: 455-469.
- Yan-Fang T, Zhi-Heng L, Li-Xiao X, Fang F, Jun L, Gang L *et al* (2015). Molecular Mechanism of the Cell Death Induced by the Histone Deacetylase Pan Inhibitor LBH589 (Panobinostat) in Wilms Tumor Cells. *PLoS One* **10**: e0126566.
- Yang X, Du G, Yu Z, Si Y, Martin TA, He J *et al* (2017). A Novel NHERF1 Mutation in Human Breast Cancer and Effects on Malignant Progression. *Anticancer Research* **37**: 67-73.
- Yao W, Feng D, Bian W, Yang L, Li Y, Yang Z *et al* (2012). EBP50 inhibits EGF-induced breast cancer cell proliferation by blocking EGFR phosphorylation. *Amino Acids* **43**: 2027-2035.
- Yao Z-G, Li W-H, Hua F, Cheng H-X, Zhao M-Q, Sun X-C *et al* (2017). LBH589 Inhibits Glioblastoma Growth and Angiogenesis Through Suppression of HIF-1 α Expression. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **76**: 1000-1007.
- Yee AJ, Raje NS (2018). Panobinostat and Multiple Myeloma in 2018. *The Oncologist* **23**: 516-517.
- Yeh TC, Ogawa W, Danielsen AG, Roth RA (1996). Characterization and cloning of a 58/53-kDa substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 2921-2928.
- Yun CH, Oh S, Zizak M, Steplock D, Tsao S, Tse CM *et al* (1997). cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 3010-3015.
- Zaghloul MS, Eldebawy E, Ahmed S, Mousa AG, Amin A, Refaat A *et al* (2014). Hypofractionated conformal radiotherapy for pediatric diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG): a randomized controlled trial. *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **111**: 35-40.
- Zhang Y, Kwon S, Yamaguchi T, Cubizolles F, Rousseaux S, Kneissel M *et al* (2008). Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol Cell Biol* **28**: 1688-701.
- Zhao H, Pykalainen A, Lappalainen P (2011). I-BAR domain proteins: linking actin and plasma membrane dynamics. *Curr Opin Cell Biol* **23**: 14-21.
- Zhou Z, Luther N, Ibrahim GM, Hawkins C, Vibhakar R, Handler MH *et al* (2013). B7-H3, a potential therapeutic target, is expressed in diffuse intrinsic pontine glioma. *Journal of neuro-oncology* **111**: 257-264.
- Zupkovitz G, Tischler J, Posch M, Sadzak I, Ramsauer K, Egger G *et al* (2006). Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* **26**: 7913-28.

Traitement du gliome infiltrant du tronc cérébral par un régulateur épigénétique : rôle d'EBP50 et d'IRSp53

Le gliome infiltrant du tronc cérébral (en anglais “diffuse intrinsic pontine glioma”, DIPG) est une tumeur pédiatrique rare et très agressive. La durée moyenne de survie après diagnostic est inférieure à un an. Une caractéristique génétique majeure des DIPG est la mutation de l'histone H3 (H3K27M). L'évolution des connaissances en épigénétique a permis de concevoir des inhibiteurs de régulateurs épigénétiques capables de modifier, voire de contrebalancer, l'effet de cette mutation. Ainsi, le panobinostat (PS), un inhibiteur des histone-désacétylases, diminue la croissance cellulaire et conduit à la mort des cellules de DIPG *in vitro* et *in vivo*. Son efficacité est en cours d'évaluation dans des essais cliniques.

Mon projet de thèse avait pour objectif de déterminer le rôle d'EBP50 et d'IRSp53, deux protéines spécifiquement dérégulées dans les lignées de DIPG après traitement des cellules par le PS. EBP50 est connue pour intervenir dans la progression tumorale mais sa dualité de fonction, à la fois oncogène et suppresseur de tumeur, nous a conduits à étudier plus précisément son rôle dans les cellules de DIPG. IRSp53 a été peu étudiée dans les cancers solides, bien qu'elle semble jouer un rôle important dans la motilité cellulaire et l'invasion. La diminution de l'expression d'IRSp53 et d'EBP50 par ARN interférence dans des lignées DIPG induit la mort des cellules par apoptose et bloque leur croissance ainsi que leur motilité cellulaire, ce qui suggérerait que ces deux protéines sont oncogéniques dans ce modèle. De plus, la localisation cytoplasmique et nucléaire d'EBP50 semble en accord avec son rôle pro-oncogénique dans les cellules de DIPG. En étudiant *in vitro* l'effet d'un traitement combinatoire du PS avec des inhibiteurs de l'expression d'EBP50 ou d'IRSp53, j'ai mis en évidence une augmentation de la sensibilité des cellules de DIPG au traitement par le PS. Enfin, j'ai validé le traitement ciblant EBP50 *in vivo* dans un modèle préclinique d'embryon de poulet. En conclusion, ces deux protéines constituent de nouvelles cibles thérapeutiques dans les DIPG et un moyen d'augmenter l'efficacité du PS.

Mots clés : gliomes pédiatriques ; tronc cérébral ; panobinostat ; épigénétique ; EBP50 ; IRSp53.

Abstract

Treatment of diffuse intrinsic pontine glioma by HDAC inhibition: role of EBP50 and IRSp53

Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG), is a rare and highly aggressive pediatric tumor. The average survival time after diagnosis is less than one year. A major genetic characteristic of this disease is the mutation of histone H3 (H3K27M). The evolution of knowledge in epigenetics has made it possible to design epigenetic regulatory inhibitors able to modify, or even offset, the effect of this mutation. For example, panobinostat (PS), a histone deacetylase inhibitor, reduces cell growth and induces DIPG cell death, both *in vitro* and *in vivo*. Its effectiveness is currently being evaluated in clinical trials.

My thesis project aimed at determining the role of two proteins, EBP50 and IRSp53, deregulated in different DIPG cell lines after treatment with PS. EBP50 has already been described as involved in tumor progression but its dual function, both oncogenic and tumor suppressor, has led us to further investigate its role in the DIPG cells. IRSp53 has been poorly studied in solid cancers, though it plays an important role in cell motility and invasion. Down-regulation by RNA silencing of these two proteins in DIPG cell lines induces apoptosis, decreases cell growth and motility, leading us to the hypothesis that these two proteins are oncogenic proteins. In addition, the cytoplasmic and nuclear localization of the EBP50 protein is consistent with its oncogenic role in DIPG cells. Then, I investigated the effect of combinatorial therapy that associates PS with EBP50 or IRSp53 expression inhibitors. My results show an increase in the antitumor effect *in vitro* for both proteins but also *in vivo* for EBP50, in a preclinical model, the chicken embryo. In conclusion, these two proteins could be the targets of new treatments for DIPG tumors in combination with PS to enhance its efficacy.

Key words: Pediatric glioma; brainstem; panobinostat; epigenetics; EBP50; IRSp53.