



HAL
open science

Modélisation *in vitro* & *in vivo* de la résistance à la radiothérapie dans les gliomes infiltrants du tronc cérébral (DIPG)

Coralie Werbrouck

► **To cite this version:**

Coralie Werbrouck. Modélisation *in vitro* & *in vivo* de la résistance à la radiothérapie dans les gliomes infiltrants du tronc cérébral (DIPG). Cancer. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASL001 . tel-03618052

HAL Id: tel-03618052

<https://theses.hal.science/tel-03618052v1>

Submitted on 24 Mar 2022

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.

Modélisation *in vitro* et *in vivo* de la
résistance à la radiothérapie des gliomes
infiltrant du tronc cérébral (DIPG)

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°582 : cancérologie : biologie – médecine – santé (CBMS)

Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, Inserm,
Biomarqueurs prédictifs et nouvelles stratégies thérapeutiques en oncologie,
94800, Villejuif, France.

Référent : Faculté de médecine

Thèse présentée et soutenue le 4 Septembre 2020, par

Coralie WERBROUCK

Composition du Jury

| | |
|---|---------------------------|
| François BOUSSIN DR CEA, Université Paris-Saclay | Président du Jury |
| Claire PECQUEUR DR CNRS, CRCINA | Rapporteur & Examinatrice |
| Pierre VERRELLE PU-PH, Université Clermont-Auvergne, CMIB, Institut Curie | Rapporteur & Examineur |
| Pierre LEBLOND PH, Centre Léon Bérard | Examineur |
| David CASTEL CR INSERM, Gustave Roussy | Directeur de thèse |
| Marie-Anne DEBILY Maître de conférence, Université d'Evry Val d'Essonne | Co-directrice de thèse |

Pour Lambert,

REMERCIEMENTS

Avant tout, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury, Claire Pecqueur, Pierre Verrelle, François Boussin et Pierre Leblond, pour avoir accepté de consacrer du temps à l'évaluation de ce travail. Plus particulièrement, j'exprime toute ma reconnaissance à Claire Pecqueur et Pierre Verrelle pour avoir eu la gentillesse d'accepter le rôle de rapporteur.

Ensuite, je voudrais remercier sincèrement Jacques Grill pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je tiens surtout à exprimer mon admiration pour son engagement sans faille dans la lutte contre les tumeurs cérébrales de l'enfant, sa gentillesse, sa disponibilité, pour la relecture de ce manuscrit et sa pédagogie même au-delà des frontières du laboratoire.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et remercier infiniment mes deux directeurs de thèse, Marie-Anne Debily et David Castel, sans qui, cette aventure n'aurait pas eu lieu. Je vous remercie pour la confiance que vous avez placée en moi en me confiant un projet aussi exigeant. Je vous remercie également pour ces années riches en apprentissage et découvertes, pour votre encadrement, votre disponibilité et votre implication dans la formation des jeunes chercheurs. Je tiens également à vous remercier pour la confiance que vous m'avez accordée en me permettant de présenter ces résultats dans différents congrès et enfin pour la relecture de ce manuscrit.

Je remercie l'ensemble du comité scientifique en charge de la sélection du Parcours d'Excellence en Cancérologie financé par la Fondation Philanthropia pour m'avoir fait confiance en m'attribuant une bourse de thèse pour la réalisation de ce projet. Je tiens à remercier également les associations qui ont financé ce projet, la Société Française de Lutte contre les Cancers et Leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent et The Cure Starts Now.

Un grand merci à l'ensemble de membres passés et présents de la Grill Team pour ces années passées à travailler ensemble. Je remercie spécialement Emilie Barret,

technicienne au sein de l'équipe, pour m'avoir guidé lors de mes premiers jours au laboratoire et pour son aide infallible lorsque mes deux mains n'étaient pas suffisantes. Je remercie Claudia Evangelista, Alexandre Plessier, Jane Merlevede et Marco Bruschi pour avoir été mes grands frères de thèse et pour vos précieux conseils. Je remercie également Romain Brusini, stagiaire de M2 (2017), et María-Jesús Lobón Iglesias, clinicienne et stagiaire en M1 (2017), pour leur contribution au projet. Je remercie Ludivine Le Dret, ingénieur d'études et Manon Lancien, technicienne, pour leurs précieuses aides à l'animalerie. Enfin, je remercie particulièrement Thomas Kergrohen, pour son expertise en bio-informatique, mais surtout pour avoir été mon fidèle partenaire d'entraînement en course à pied pendant plus de 2 ans.

Je remercie également toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce projet : Michele Mondini, Gwenaël Le Teuff, Morgane Belle, Yann Lecluse, merci pour votre aide.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'ex-UMR8203, les membres de l'U981 pour leur accueil, la sympathie et la bonne humeur dont ils ont fait preuve. Je remercie également l'ensemble des doctorants de l'école doctorale CBMS pour ces moments d'échanges et de convivialités au cours des différents évènements qui ont jalonné ces années de thèse.

Enfin, je remercie ma famille et tout particulièrement mes parents et mes grands-parents pour votre amour et votre soutien inconditionnel depuis bientôt 28 ans, car sans vous je ne serais pas ici aujourd'hui.

Je souhaite aussi remercier mes beaux parents pour leur attention et ma belle-maman pour avoir été la première à relire ce manuscrit.

Pour finir, mes derniers remerciements sont pour celui qui partage ma vie depuis de nombreuses années, mon compagnon de cordée pour le meilleur et pour le pire, je ne sais pas ce que je ferais sans toi. Cette thèse, c'est surtout à toi que je la dois.

In the Middle of Difficulty Lies Opportunity

Albert Einstein

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| TABLE DES MATIERES | 8 |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | 11 |
| LISTE DES ILLUSTRATIONS | 13 |
| INTRODUCTION | 15 |
| 1. Les gliomes infiltrants du tronc cérébral (DIPG) | 15 |
| 1.1. Généralités sur les tumeurs cérébrales | 15 |
| 1.2. Présentation clinique des DIPG | 17 |
| 1.2.1. Diagnostic | 17 |
| 1.2.2. Traitement standard et progression de la maladie..... | 19 |
| 1.2.3. Rôle de la biopsie au diagnostic | 19 |
| 1.3. Altérations moléculaires des DIPG | 21 |
| 1.3.1. Mutations somatiques récurrentes en position K27 de l'histone H3 | 21 |
| 1.3.1.1. Histone H3 et régulations épigénétiques de l'expression des gènes | 21 |
| 1.3.1.2. Propriétés des différents variant d'histone : H3.1/H3.2 et H3.3..... | 24 |
| 1.3.1.3. Conséquences épigénétiques de la mutation H3-K27M..... | 27 |
| 1.3.2. Autres altérations moléculaires récurrentes dans les DIPG..... | 30 |
| 1.3.2.1. TP53 et voies de réparation des dommages à l'ADN..... | 30 |
| 1.3.2.2. ATRX | 32 |
| 1.3.2.3. Mutations et amplification de PDGFRA | 32 |
| 1.3.2.4. Altération de la voie PI3K/mTOR..... | 32 |
| 1.3.2.5. ACVR1 dans la voie des BMP | 32 |
| 1.3.2.6. Variations de nombre de copies (CNV) | 35 |
| 1.4. Hétérogénéité des DIPG : identification de sous-groupes selon l'histone H3 muté 37 | |
| 1.5. Modèles d'études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de DIPG développés au laboratoire ... | 40 |
| 2. Radiothérapie, effets des radiations ionisantes et résistance | 43 |
| 2.1. Notions physiques..... | 44 |
| 2.1.1. Rayonnements ionisants et sources de rayonnements | 44 |
| 2.1.1.1. Les rayonnements alpha | 44 |
| 2.1.1.2. Les rayonnements bêta | 45 |

| | |
|---|------------|
| 2.1.1.3. Les photons : rayonnements X et gamma | 45 |
| 2.1.1.4. Neutrons | 45 |
| 2.1.2. Dose : absorbé, équivalente et efficace | 45 |
| 2.1.3. Transfert d'énergie linéique (TEL)..... | 46 |
| 2.1.4. Radiothérapie <i>versus</i> protonthérapie | 48 |
| 2.2. Effets moléculaires et cellulaires des rayonnements ionisants | 49 |
| 2.2.1. Formation des dommages radio-induits..... | 49 |
| 2.2.1.1. Chronologie des événements..... | 49 |
| 2.2.1.2. Dommages de l'ADN | 51 |
| 2.2.1.3. Dommages de la membrane cellulaire et des autres organites..... | 52 |
| 2.2.2. Réponse cellulaire aux dommages à l'ADN..... | 52 |
| 2.2.2.1. Points de contrôle du cycle cellulaire..... | 53 |
| 2.2.2.2. Signalisation des dommages à l'ADN..... | 54 |
| 2.2.2.3. Réparation des dommages à l'ADN : NHEJ, HR et BER | 57 |
| 2.2.2.4. Maintien de l'épigénome et rôle de l'histone H3.3 dans la réparation de l'ADN ... | 60 |
| 3. Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (<i>review in preparation</i>) | 61 |
| OBJECTIFS INITIAUX DU PROJET DOCTORAL | 98 |
| RESULTATS | 100 |
| 1. Etude des déterminants moléculaires de la résistance à l'irradiation.... | 100 |
| 1.1. TP53 pathway alterations drive radioresistance in diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) (<i>Werbrouck et al. Clin Cancer Res, 2019</i>) | 100 |
| 1.2. Résultats complémentaires à la publication..... | 148 |
| 1.2.1. Matériels et méthodes..... | 149 |
| 1.2.1.1. CDOX : modèles orthotopiques murins de DIPG | 149 |
| 1.2.1.2. Mise au point du protocole d'irradiation des modèles in vivo | 150 |
| 1.2.1.3. Evaluation in vivo du Prexasertib en combinaison avec l'irradiation | 151 |
| 1.2.2. Résultats | 152 |
| 1.2.2.1. Etablissement du protocole d'irradiation des modèles in vivo | 152 |
| 1.2.2.2. Evaluation in vivo du Prexasertib en combinaison avec l'irradiation | 157 |
| 1.3. Discussion & perspectives | 159 |
| 2. Evaluation de l'effet synergique de combinaison de différents médicaments candidats avec l'irradiation | 165 |
| 2.1. Matériels et méthodes..... | 169 |
| 2.1.1. Les médicaments candidats évalués | 169 |

| | |
|--|------------|
| 2.1.2. Réalisation de courbes de dose-réponse <i>in vitro</i> par suivi de la prolifération | 171 |
| 2.1.3. Ajout des drogues avec un pico-distributeur | 171 |
| 2.1.4. Irradiation <i>in vitro</i> | 172 |
| 2.2. Résultats | 172 |
| 2.2.1. Évaluation de l'efficacité <i>in vitro</i> des inhibiteurs en agent seul | 172 |
| 2.2.2. Évaluation de l'efficacité préclinique <i>in vitro</i> des médicaments en combinaison avec la radiothérapie | 174 |
| 2.3. Discussion & perspectives | 176 |
| 3. Modélisation de la rechute post-irradiation dans les DIPG | 180 |
| 3.1. Matériels et méthodes..... | 182 |
| 3.1.1. Suivi de lignage et de la dynamique clonale par marquage RVB | 182 |
| 3.1.2. Imagerie <i>in vitro</i> et analyse par ImageJ | 185 |
| 3.1.3. Transparisation d'échantillons et imagerie en 3D de cerveau entier | 188 |
| 3.2. Résultats | 190 |
| 3.2.1. Caractérisation de modèles <i>in vitro</i> résistant à l'irradiation de DIPG : dose réponse et cycle cellulaire | 190 |
| 3.2.2. Suivi de lignage <i>in vitro</i> par marquage RVB | 192 |
| 3.2.3. Mise au point du protocole de transparisation de cerveau de souris | 195 |
| 3.2.4. Imagerie 3D d'un cerveaux CDOX NEM289 après irradiation | 197 |
| 3.3. Discussion & perspectives | 199 |
| DISCUSSION GENERALE | 201 |
| 1. Mutations de <i>TP53</i> : un marqueur théranostique | 201 |
| 2. Potentielles cibles thérapeutiques radiosensibilisantes | 202 |
| 3. Plan de radiothérapie des modèles murins de DIPG..... | 204 |
| 4. Modélisation par suivi de lignage | 205 |
| PRESENTATION EN CONGRES | 206 |
| REFERENCES | 208 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|-----------|---|
| 3DISCO | 3d imaging of solvent-cleared organs |
| ACVR1 | activin a receptor, type i |
| ATRX | alpha thalassemia mental retardation syndrome x linked |
| BED | dose biologiquement efficace |
| BER | base excision repair |
| BET | bromodomain and extraterminal domain |
| BIOMEDE | biological medicine for diffuse intrinsic pontine glioma (dipg) eradication |
| BLI | bioluminescence |
| BRD4 | bromodomain-containing protein 4 |
| CDOX | cells-derived orthotopical xenografts |
| CGH array | puce d'hybridation génomique comparative |
| CHD2 | chromodomain helicase dna binding protein 2 |
| CNS | système nerveux central |
| DAXX | death domain-associated protein 6 |
| DBE | dibenzyléther |
| DCM | dichlorométhane |
| DIPG | diffuse intrinsic pontine glioma |
| DL50 | dose induisant une létalité de 50% des cellules |
| DNMT | dna methyltransferase |
| GBM | glioblastome |
| GSC | glioma stem-like cells |
| HAT | histone acetyl transferase |
| HDAC | histone deacetylase |
| HDM | histone demethylase |
| HGG | gliomes de haut grade |
| HMT | histone methyltransferase |
| hNSC | human neural stem cells |
| HR | homologous recombination |
| IC50 | concentration inhibitrice de 50% des cellules |
| IR | irradiation |
| IRM | imagerie par résonance magnétique |
| KDM6 | lysine demethylase 6 |
| LUC | firefly luciférase |

| | |
|--------------|--|
| MOI | multiplicity of infection |
| mTOR | mammalian target of rapamycin |
| NHEJ | non-homologous end-joining |
| OMS | organisation mondiale de la santé |
| OS | survie globale |
| PAR | poly- <i>adp</i> ribosyles |
| PARP | poly(adénosine diphosphate (<i>adp</i>)-ribose) polymérase |
| PCR | amplification en chaîne par polymérase |
| PDGFRA | platelet derived growth factor receptor alpha |
| PDOX | patient-derived orthotopical xenografts |
| PFA | paraformaldéhyde |
| pHGG | gliomes de haut grade pédiatrique |
| PI3K | phosphoinositide 3-kinase |
| PRC2 | polycomb repressive complex 2 |
| PTM | modifications post-traductionnelles |
| RNAseq | séquençage à haut débit de l'arn |
| ROS | espèces réactives de l'oxygène |
| RT | radiothérapie |
| RTK | récepteur à activité tyrosine kinase |
| RVB | rouge vert bleu |
| shARN | petit arn en épingle à cheveux |
| t-SNE | t-distributed stochastic neighbor embedding |
| TEL | transfert d'énergie linéique |
| TGF- β | facteur de croissance transformant β |
| THF | tétrahydrofurane |
| TP53 | tumor protein 53 |
| TTP1 | délai de première progression post-radiothérapie |
| WES | séquençage à haut débit de l'exome |

LISTE DES ILLUSTRATIONS

| | |
|---|----|
| Figure 1. Incidence et mortalité liées aux tumeurs du système nerveux central et distribution de ces tumeurs selon leurs malignités | 17 |
| Figure 2. Les différentes cellules cérébrales : les neurones et les cellules gliales, et l'origine présumée des gliomes | 18 |
| Figure 3. Les gliomes infiltrants du tronc cérébral : localisation et diagnostic | 19 |
| Figure 4. Biopsie stéréotaxique de DIPG | 21 |
| Figure 5. Structure de la chromatine et modifications post-traductionnelles | 23 |
| Figure 6. Les enzymes de modification des marques épigénétiques | 24 |
| Figure 7. Les différents variants d'histone | 25 |
| Figure 8. Alignement des séquences protéiques des différents variant d'histone H3 | 26 |
| Figure 9. Comparaison des variants H3.1/H3.2 et H3.3 de l'histone H3 | 27 |
| Figure 10. Les variants d'histones H3 et leurs protéines chaperons | 28 |
| Figure 11. Conséquence de la mutation H3-K27M sur la marque épigénétique H3K27me3 | 30 |
| Figure 12. Impact de la mutation H3 K27M sur l'expression des gènes | 31 |
| Figure 13. Principales altérations moléculaires de 1000 patients atteints de HGG pédiatrique | 34 |
| Figure 14. Activation de TP53 et réponses cellulaires associées | 32 |
| Figure 15. Régions fréquemment altérés dans les patients H3-K27M | 37 |
| Figure 16. Des associations préférentielles d'altérations définissent deux sous-groupes de DIPG selon l'histone mutée | 38 |
| Figure 17. Distribution et classification des pHGG selon le profil de méthylation de l'ADN | 40 |
| Figure 18. Portrait clinique des deux sous-groupes de DIPG | 41 |
| Figure 19. Modèles cellulaires et murins de DIPG développés au laboratoire | 42 |
| Figure 20. Illustration des différents rayonnements dans notre quotidien | 45 |
| Figure 21. Le transfert d'énergie linéique (TEL) dépend des caractéristiques de la particule incidente | 47 |
| Figure 22. Distribution de la dose en fonction de la profondeur dans l'eau pour différents types de rayonnements | 48 |
| Figure 23. Evolution de la radiothérapie au cours du XX siècle | 50 |
| Figure 24. Les rayonnements ionisants induisent des dommages à l'ADN par des effets directs et indirects via la radiolyse de l'eau | 51 |
| Figure 25. Les différents types de dommage de l'ADN | 52 |
| Figure 26. Les différents dommages à l'ADN, leurs sources et mécanismes de réparation associés | 54 |
| Figure 27. Points de contrôle du cycle cellulaire | 55 |
| Figure 28. Modèle de recrutement et d'activation des PIKK : DNA-PKcs, ATM et ATR en réponse aux dommages à l'ADN | 56 |

| | |
|--|-----|
| Figure 29. Activation des voies ATM-Chk2 et ATR-Chk1 en réponse aux dommages à l'ADN et à la présence d'ADN simple brin | 57 |
| Figure 30. Signalisation des cassures simple brin par PARP1 | 58 |
| Figure 31. Mécanismes de réparation des dommages à l'ADN radio-induits | 60 |
| Figure 32. Le recrutement de l'histone H3.3 est médié par CHD2 lors de la réparation des cassures double brin par la voie NHEJ | 61 |
| Figure 33. Modélisation <i>in vivo</i> de la réponse à la radiothérapie | 150 |
| Figure 34. Évaluation de l'effet de différents protocoles d'irradiation des modèles murins de DIPG | 154 |
| Figure 35. Evaluation de différents plans d'irradiation de modèles murins de DIPG | 156 |
| Figure 36. Suivi individuel du signal de bioluminescence dans le tronc cérébral et dans le bulbe olfactif des CDOX NEM292 et NEM290 traités irradiation par 6 x 6 Gy et 8 x 4 Gy | 157 |
| Figure 37. Evaluation préclinique du Prexasertib en combinaison avec l'irradiation dans le modèle murin CDOX NEM 292 | 159 |
| Figure 38. Médicaments épigénétiques pour le traitement des DIPG | 168 |
| Figure 39. Dose réponse des inhibiteurs en mono-agent pour 2 GSC : NEM328 et NEM290 | 174 |
| Figure 40. Courbes de dose-réponse des combinaisons d'inhibiteurs avec irradiation (DL50) pour NEM328 et NEM290 | 176 |
| Figure 41. Principe du suivi de lignage pour l'étude de la résistance aux traitements | 183 |
| Figure 42. Principe du marquage multicolore RVB | 184 |
| Figure 43. Cartes des plasmides du marquage RVB | 186 |
| Figure 44. Exemple d'image RVB de la GSC NEM328 marquée | 188 |
| Figure 45. Principe de la transparenisation d'organe et l'imagerie par microscope à feuille de lumière | 189 |
| Figure 46. Caractérisations de GSC « naïves » et « résistantes » à l'irradiation | 192 |
| Figure 47. Comparaison de la prolifération de GSC non-transduites et de GSC RVB | 193 |
| Figure 48. Suivi de lignage par marquage RVB après irradiation NEM292 | 194 |
| Figure 49. Comparaison des spectres monochromatiques des réplicats contrôles et traités par irradiation pour NEM292 | 195 |
| Figure 50. Evolution d'un cerveau de souris au cours du protocole d'immunomarquage et de transparenisation par 3DISCO | 196 |
| Figure 51. Images 3D d'un cerveau de souris adulte xénotransplanté par U87-mKate2 | 197 |
| Figure 52. Imagerie 3D d'un cerveau transparenisé de CDOX NEM289 et traité par irradiation (10 x 2 Gy) | 199 |
| Tableau 1. Les différents régimes de radiothérapie utilisés et leurs doses biologiquement efficaces (BED) correspondantes | 152 |
| Tableau 2. Informations sur les candidats médicaments évalués | 171 |
| Tableau 3. Propriétés des protéines fluorescentes et paramètres d'acquisition | 187 |

INTRODUCTION

1. Les gliomes infiltrants du tronc cérébral (DIPG)

1.1. Généralités sur les tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales constituent de nos jours la principale cause de mortalité et de morbidité par cancer chez les enfants, les adolescents et les jeunes adultes devant les leucémies (Fig. 1) (Ostrom et al., 2018 ; Siegel et al., 2016). Selon le rapport d'Ostrom *et al.* d'après les données du 'Central Brain Tumor Registry of the United States' (CBTRU), les tumeurs du système nerveux central ont une incidence d'environ 5-6 cas pour 100 000 habitants chez les enfants de moins de 14 ans.

Tout âge confondu, 30,9% des tumeurs du système nerveux central sont malignes. Cela représente 28% des tumeurs cérébrales chez les adultes de plus de 20 ans et 67% chez les enfants de moins de 14 ans.

Parmi les tumeurs cérébrales malignes, la majorité d'entre elles sont des gliomes. Ces tumeurs expriment des marqueurs gliaux présumant un développement à partir de cellules gliales ou de leurs progéniteurs (Fig. 2) (Canoll and Goldman, 2008 ; Ludwig and Kornblum, 2017). Les gliomes de haut grade (HGG) sont les gliomes les plus agressifs et représentent 85% des gliomes de l'adulte et environ 15-20% des gliomes de l'enfant (Rasmussen et al., 2017 ; Braunstein et al., 2017). Parmi les HGG, les glioblastomes représentent les tumeurs cérébrales primaires les plus courantes. Ce sont des tumeurs supratentorielles qui touchent majoritairement des adultes (Ostrom et al., 2018). Au sein des gliomes de haut grade pédiatrique (pHGG), les gliomes infiltrants du tronc cérébral (ou DIPG pour Diffuse Intrinsic Pontine Glioma) ou plus largement les gliomes diffus de la ligne médiane (DMG), représentent la forme la plus sévère des tumeurs pédiatriques solides avec une médiane de survie inférieure à un an (Louis et al., 2016).

INTRODUCTION - Les gliomes infiltrants du tronc cérébral (DIPG)

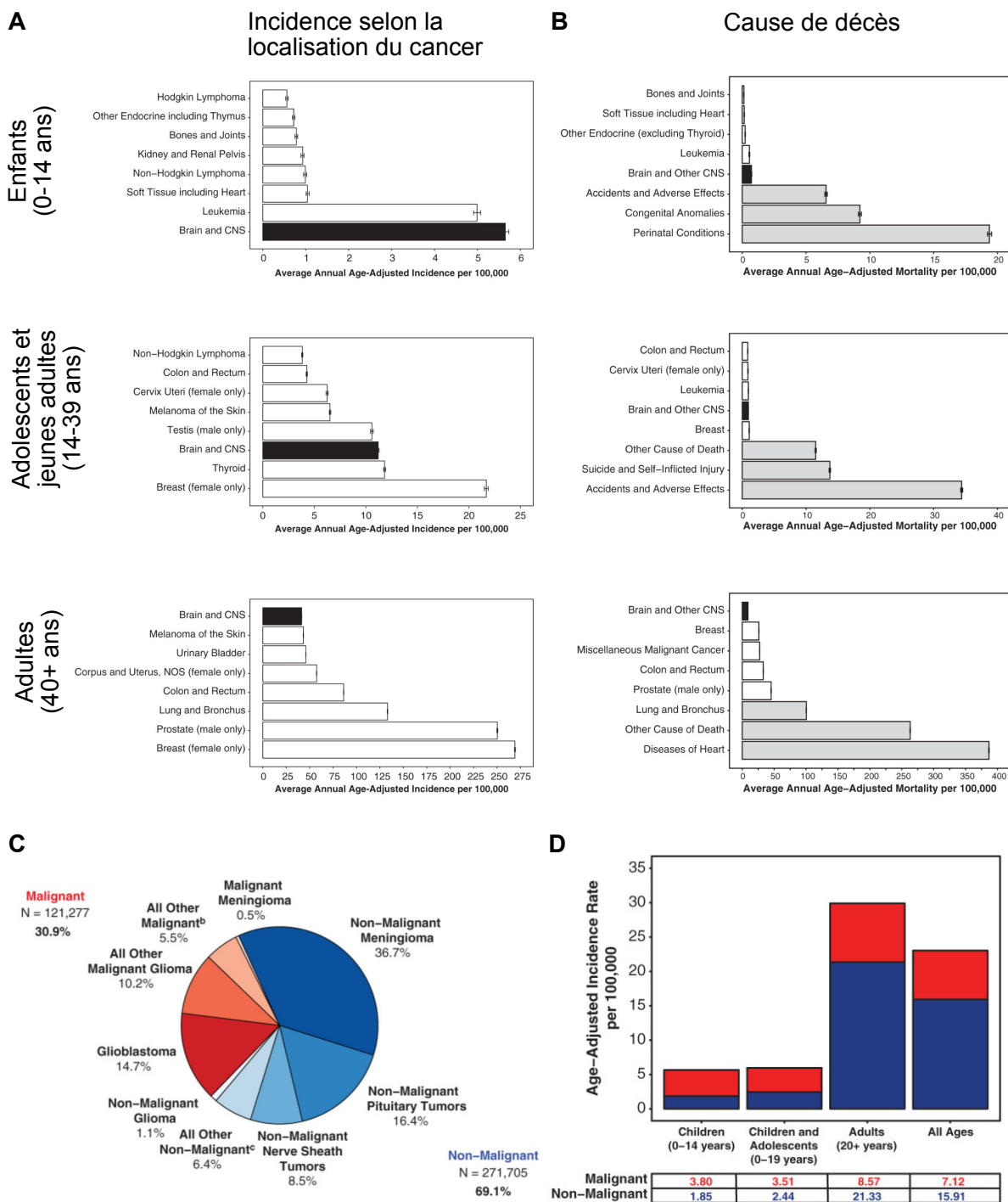


Figure 1. Incidence et mortalité liées aux tumeurs du système nerveux central et distribution de ces tumeurs selon leurs malignités

Taux d'incidence annuel moyen selon la localisation du cancer (A) et taux de mortalité annuel moyen (B) selon différentes classes d'âges : enfants (0-14 ans), adolescents et jeunes adultes (14-39 ans) et adultes (>40 ans). (C) Distribution des tumeurs selon leur malignité. Les tumeurs cérébrales malignes représentent 30,9% des tumeurs. (D) Distribution des tumeurs malignes vs. non-malignes selon les catégories d'âge. Chez les enfants et les adolescents, les tumeurs malignes représentent plus de 50% des tumeurs. Modifié de Ostrom et al., 2018

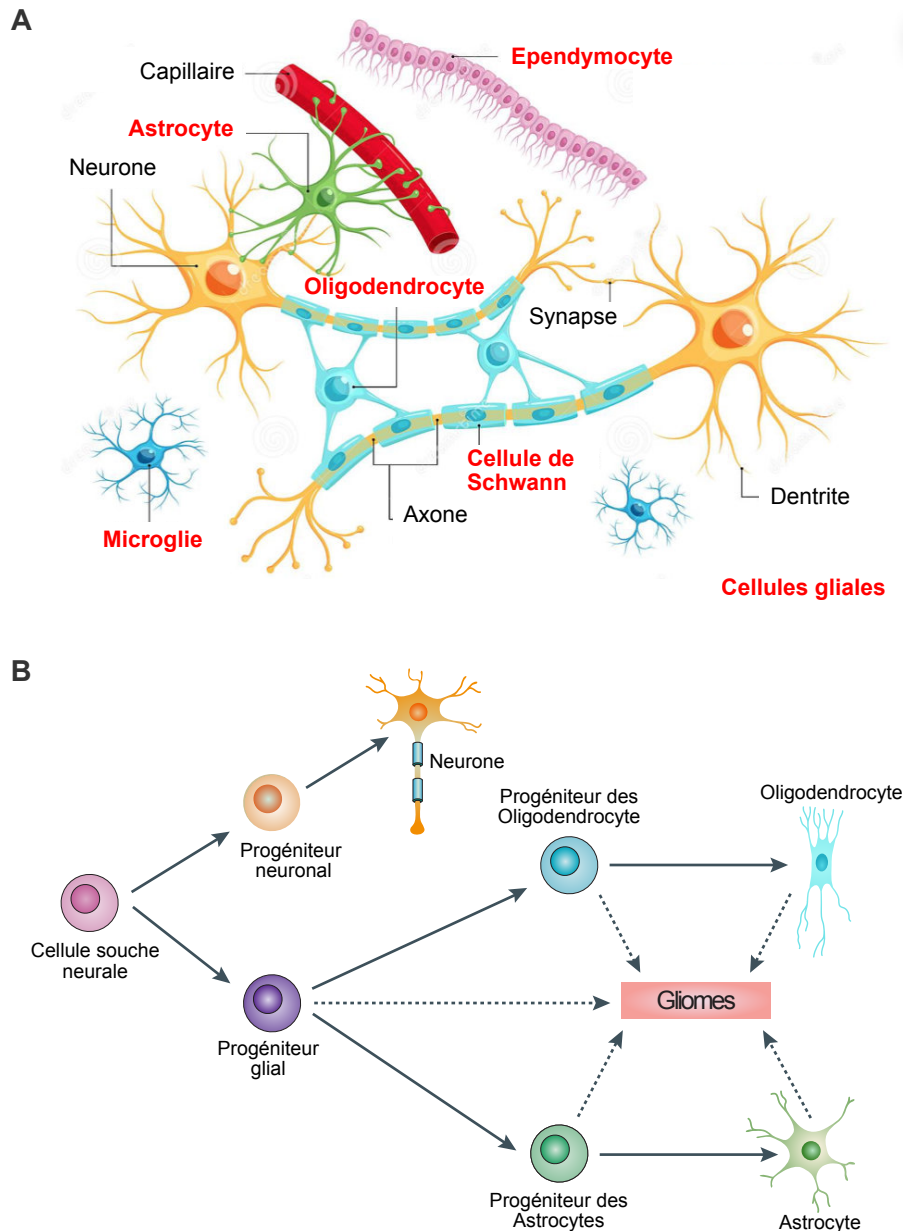


Figure 2. Les différentes cellules cérébrales : les neurones et les cellules gliales, et l'origine présumée des gliomes

(A) Les principaux types de cellules gliales sont les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules de Schwann, la microglie et les épendymocytes. Les cellules gliales représentent plus de 50% des cellules cérébrales, et ont pour fonction de soutenir les neurones (Dimou and Götz, 2014). (B) L'apparition d'altérations génomiques dans un de ces types cellulaires ou leurs précurseurs est à l'origine de la tumorigenèse des gliomes.

Modifié de Huse and Holland, 2010

1.2. Présentation clinique des DIPG

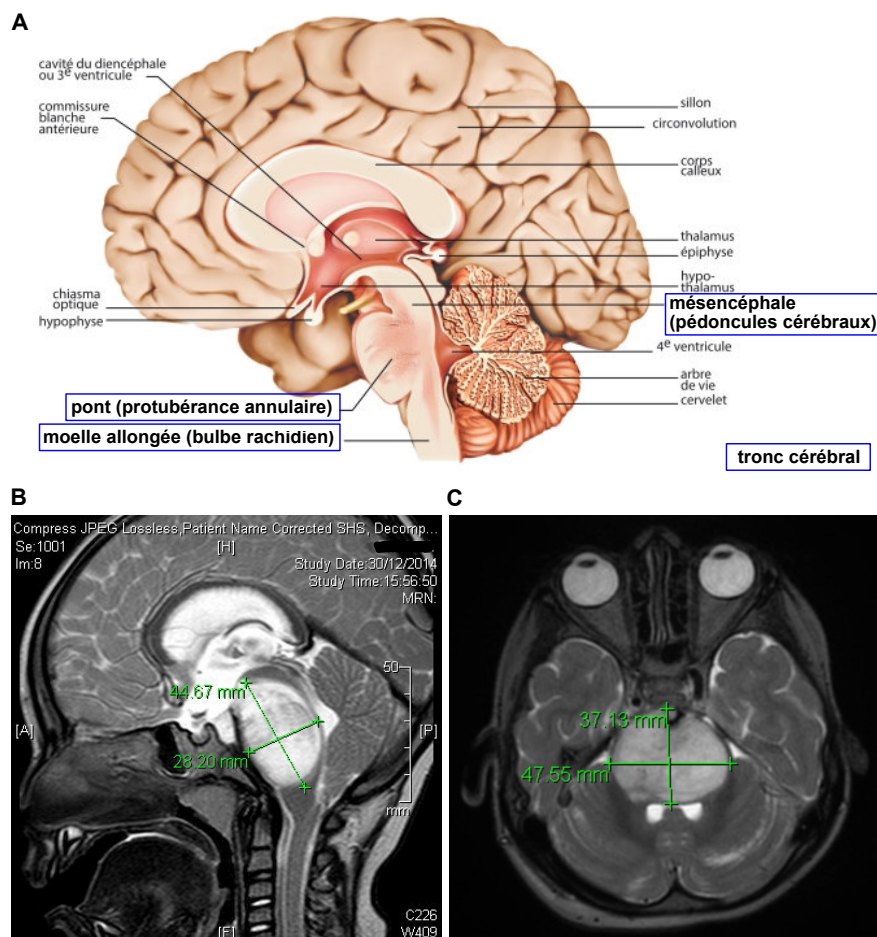
1.2.1. Diagnostic

Les gliomes infiltrants du tronc cérébral représentent 10 à 15% des tumeurs du système nerveux central chez l'enfant (Warren et al., 2012), soit environ 50 cas par

INTRODUCTION - Les gliomes infiltrants du tronc cérébral (DIPG)

an en France. Les DIPG touchent principalement les jeunes enfants et la moyenne d'âge au diagnostic est de 6,5 ans (Mackay et al., 2017). Ces tumeurs, localisées au niveau du tronc cérébral, ne forment pas de masse tumorale, mais infiltrent le tissu sain.

Les premiers symptômes apparaissent brutalement, et sont suivis d'une rapide progression en quelques jours ou semaines. Le délai entre les premiers signes et le diagnostic est généralement inférieur à 3 mois (Cohen et al., 2017). Les patients souffrent généralement d'une ataxie, d'un syndrome pyramidal ainsi que d'une paralysie des nerfs crâniens (Robison and Kieran, 2014). Le diagnostic est généralement réalisé par imagerie par résonance magnétique (IRM). L'IRM permet de détecter une masse centrée sur le pont du tronc cérébral qui en occupe généralement plus de 50% et qui comprime le cervelet (Fig. 3).



1.2.2. Traitement standard et progression de la maladie

Le caractère infiltrant et la localisation protubérantielle profonde dans une zone sensible du cerveau font des DIPG des tumeurs inopérables. Très peu de progrès ont été accomplis dans la prise en charge des DIPG depuis l'introduction de la radiothérapie il y a 60 ans (Coutel, 1959), qui reste à ce jour le traitement standard de ces tumeurs. Le traitement conventionnel repose presque exclusivement sur la radiothérapie focale, et une dose totale de 54-59,4 Gy est délivrée en 30-33 fractions quotidiennes de 1,8 Gy (Cohen et al., 2017). Malgré plus de 200 essais cliniques introduisant un hyper ou hypo fractionnement, des escalades de doses (jusqu'à 72 Gy) ou l'utilisation d'agents radiosensibilisants, les DIPG demeurent universellement incurables (Gallitto et al., 2019; Robison and Kieran, 2014). Même si la majorité des patients présentent une amélioration clinique après radiothérapie, cet effet n'est que transitoire, la réponse étant inévitablement suivie par une nouvelle progression. A ce jour, la médiane de survie reste faible, de 10,8 mois post-diagnostic (Mackay et al., 2017) et la quasi-totalité des patients décède entre 6 mois et deux ans après le diagnostic (Puget et al., 2015; Reyes-Botero et al., 2014; Warren et al., 2012).

Tous ces critères font des DIPG l'un des plus grands défis de l'oncologie pédiatrique à ce jour.

1.2.3. Rôle de la biopsie au diagnostic

Pendant longtemps les DIPG ont été assimilés aux gliomes de l'adulte, et la compréhension de leur biologie n'en est qu'à ses prémices. Ce manque de connaissance sur les mécanismes moléculaires sous-jacents résulte notamment d'un accès très limité à du matériel biologique jusqu'à récemment.

Les neurochirurgiens de l'hôpital Necker-Enfants malades ont été les premiers à réaliser des biopsies stéréotaxiques au diagnostic dès 2002 (Fig. 4) (Puget et al., 2015). Dans leur étude rétrospective publiée en 2015, le Pr S. Puget et son équipe ont montré que le risque associé à la biopsie du tronc cérébral n'était pas supérieur au risque associé aux biopsies réalisées dans d'autres localisations du cerveau (3,9% de morbidité transitoire sur 130 biopsies réalisées).

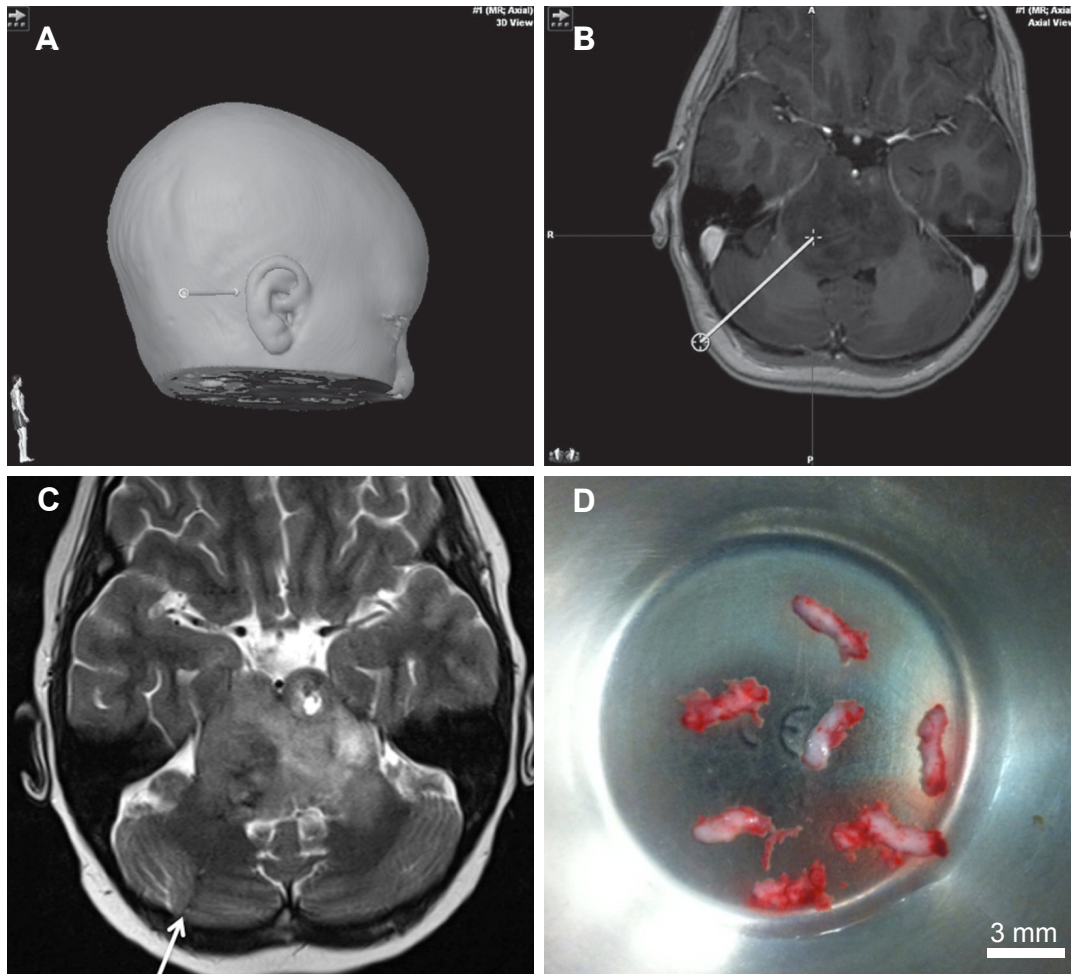


Figure 4. Biopsie stéréotaxique de DIPG

Planification du trajet de la biopsie par schéma 3D (A) et IRM T1 en coupe axiale (B). IRM T2 post opératoire ; la flèche indique le trajet de l'aiguille (C). Biopsies obtenues (D).

Adapté de Puget et al., 2015

Aujourd'hui, la réalisation d'une biopsie au diagnostic est largement pratiquée. Elle est réalisée pour chaque patient inclus dans l'essai clinique BIOMEDE (Biological Medicine for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG) Eradication) NCT02233049, actuellement en cours à Gustave Roussy. La biopsie permet (i) de confirmer le diagnostic par immunohistochimie, (ii) d'étudier les altérations moléculaires par un séquençage à haut débit de l'exome (WES) de la tumeur et du sang du patient, permettant d'identifier les mutations somatiques et les remaniements chromosomiques accumulés dans l'ensemble des gènes codants, et l'étude du transcriptome par RNAseq qui permet d'étudier les dérégulations dans l'expression des gènes, (iii) de développer des modèles cellulaires et murins.

1.3. Altérations moléculaires des DIPG

1.3.1. Mutations somatiques récurrentes en position K27 de l'histone H3

Grace à la réintroduction des biopsies au diagnostic, l'analyse des altérations chromosomiques comme des délétions ou des amplifications de segments d'ADN réalisé par puce d'hybridation génomique comparative (CGH array) ont permis de distinguer les HGG pédiatriques (pHGG) des HGG adultes (Paugh et al., 2010). Puis, l'analyse du profil d'expression des gènes par puce à ADN a permis d'individualiser les DIPG des pHGG hémisphériques (Puget et al., 2012). En 2012, grâce au développement des technologies de génomique et l'accessibilité croissante aux échantillons de patients, des mutations somatiques récurrentes entraînant la substitution de la lysine en position 27 par une méthionine (K27M) de l'histone H3 ont été découvertes (Schwartzentruber et al., 2012 ; Wu et al., 2012). Il s'agit des premiers travaux publiés décrivant la présence d'une mutation d'histone dans un cancer. Cette mutation H3-K27M a permis d'individualiser sur le plan moléculaire les pHGG de la ligne médiane situées dans le tronc, le thalamus et la moelle épinière (Sturm et al., 2012). Ceci a conduit à la création d'une nouvelle entité dans la classification des tumeurs cérébrales de l'Organisation Mondiale de la Santé en 2016 (OMS) *Diffuse Midline Glioma, H3K27M mutant*.

Chez les patients atteints de DIPG, plus de 90% des patients présentent la mutation H3-K27M (Castel et al., 2015). A noter qu'il existe d'autres altérations de l'histone H3, comme la mutation H3.3-G34R/V qui définit un sous-groupe de HGG hémisphériques (Sturm et al., 2012). Depuis lors, la mutation H3-K27M a été retrouvée dans les leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte avec une incidence de 1,6% (Boileau et al., 2019).

Avant d'aller plus loin dans l'oncogenèse unique des DIPG et des conséquences de cette mutation H3-K27M, nous présenterons dans un premier temps le rôle des protéines d'histone dans un contexte physiologique normal.

1.3.1.1. Histone H3 et régulations épigénétiques de l'expression des gènes

La chromatine est une structure nucléoprotéique permettant l'enroulement et l'empaquetage de l'ADN, support de l'information génétique, dans les noyaux des cellules eucaryotes (Felsenfeld and Groudine, 2003). La chromatine est constituée

d'octamères d'histones autour desquels 146 paires de base de la double hélice d'ADN s'enroulent pour former les nucléosomes, l'unité fonctionnelle de la chromatine (Fig. 5) (Luger et al., 1997).

La chromatine peut être sous deux états différents de compaction: une forme relâchée, l'euchromatine, transcriptionnellement active et une forme hautement condensée, l'hétérochromatine, au sein de laquelle les séquences nucléotidiques sont rendues inaccessibles et par conséquent la transcription impossible (Tollervey and Lunyak, 2012).

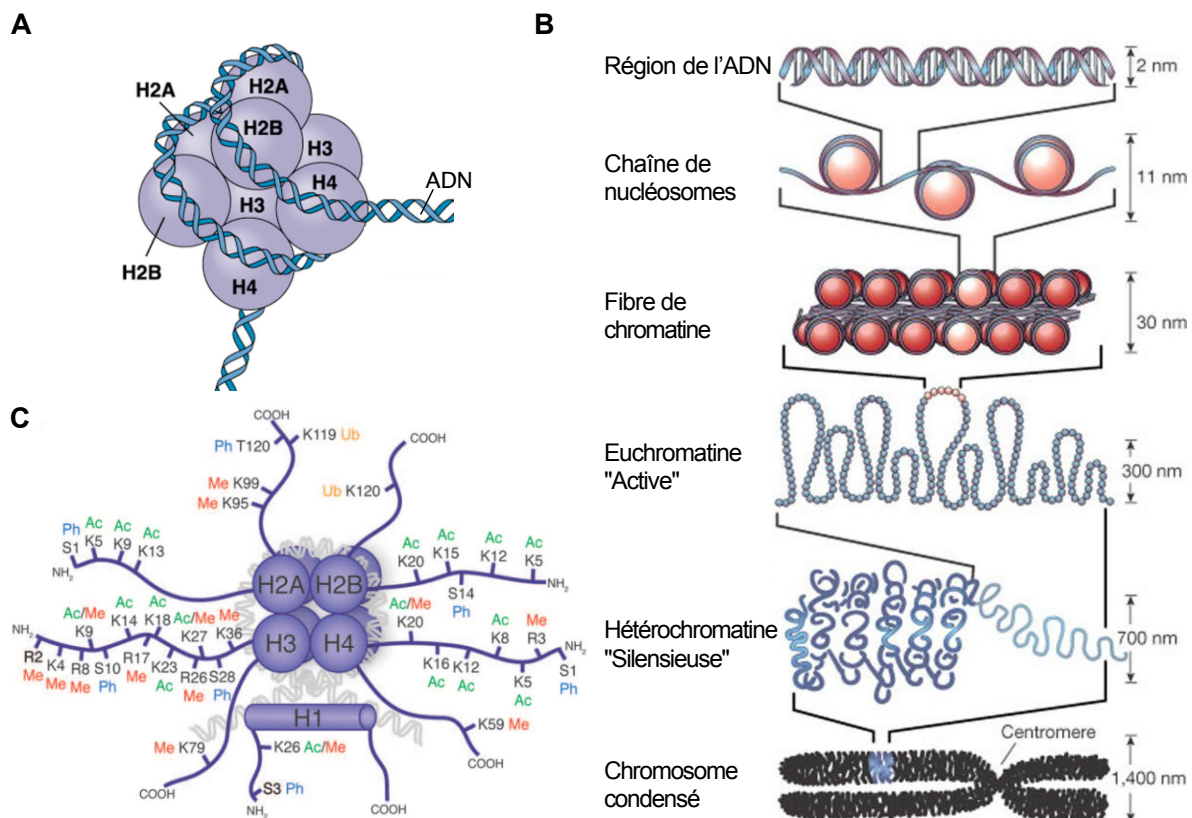


Figure 5. Structure de la chromatine et modifications post-traductionnelles

A. Présentation schématique d'un nucléosome composé de huit protéines d'histone (H2A, H2B, H3 et H4)₂ autour desquelles s'enroule l'ADN. B. Les chaînes de nucléosomes se compactent pour former des fibres de chromatine qui vont se condenser plus ou moins pour former l'euchromatine et l'hétérochromatine. C. Ces différents états de la chromatine sont régulés par des modifications post-traductionnelles au niveau des queues N-terminales des histones (phosphorylation (P), acétylation (Ac), ubiquitinylation (Ub) et méthylation (Me)). Adapté de Felsenfeld and Groudine, 2003 et Tollervey and Lunyak, 2012

Cette dynamique de la chromatine est régulée par des modifications post-traductionnelles (PTM) (méthylation, acétylation, phosphorylation, ubiquitination, ...) sur des résidus d'acides aminés spécifiques au niveau des queues N- et C-terminales non structurées des histones. La combinaison de l'ensemble de ces PTM

forme le code histone. Les régions sous forme d'euchromatine active sont notamment caractérisées par la présence des marques épigénétiques H3K4me3, H3K9ac et H3K27ac alors que les modifications post-traductionnelles H3K9me3 et H3K27me3 sont retrouvées dans les régions sous forme d'hétérochromatine.

Les mécanismes épigénétiques permettant l'expression des gènes sans modification de la séquence d'ADN sont des mécanismes complexes hautement orchestrés et collaboratifs au sein de la cellule. Parmi ces mécanismes, plusieurs familles d'enzymes sont responsables de la modification des marques épigénétiques. Ces marques sont apposées, lues et supprimées par des enzymes dites "*writers*", "*readers*" et "*erasers*", respectivement (Fig. 6). Parmi les *writers*, le Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) a pour fonction d'apposer les marques de di- et triméthylation au niveau de la lysine 27 de l'histone H3 via sa sous-unité enzymatique EZH2.

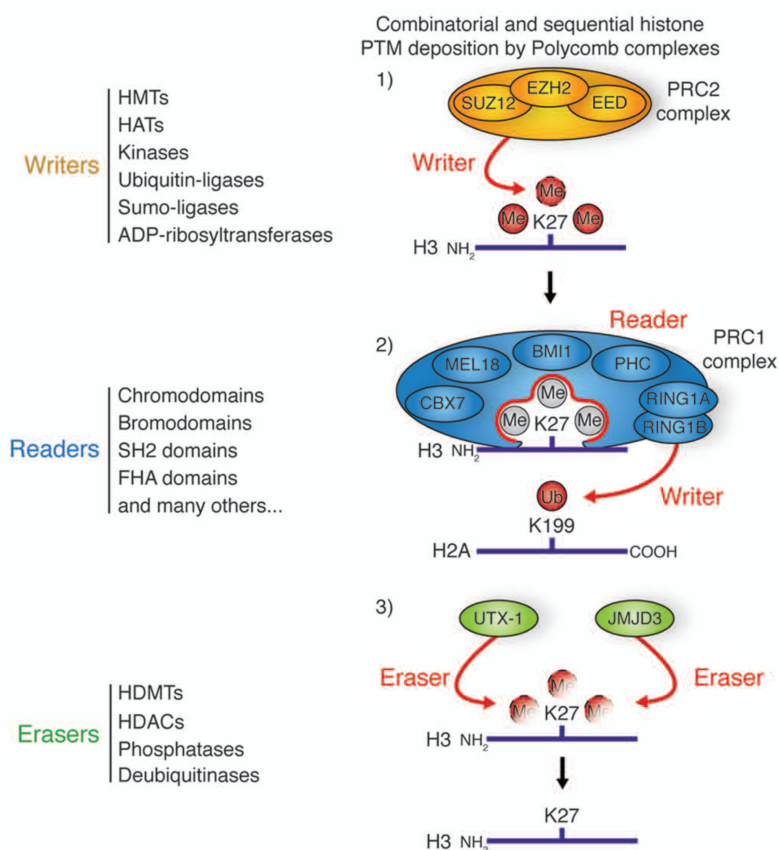


Figure 6. Les enzymes de modification des marques épigénétiques

Il existe 3 familles d'enzymes de modification des marques épigénétiques. Les *writers* sont des complexes qui apposent des marques épigénétiques comme le complexe PRC2. Les *readers* sont des complexes qui reconnaissent la présence des marques épigénétiques. Les *erasers* sont des complexes qui ont pour fonction d'enlever les marques épigénétiques. Histone methyltransferases (HMTs); histone acetyl transferases (HATs); histone demethylases (HDMs); histone deacetylases (HDACs)

Adapté de Tollervey and Lunyak, 2012

1.3.1.2. Propriétés des différents variant d'histone : H3.1/H3.2 et H3.3

Pour chaque famille d'histone, il existe différents variants excepté pour l'histone H4 (Fig. 7). Il y a 4 variants de l'histone H2A, 4 variants de l'histone H3 et 7 variants de l'histone de liaison H1. Chez les patients atteints de DIPG, la mutation H3-K27M est retrouvée dans les gènes *HIST1H3B/C* et *H3F3A* codant respectivement l'histone canonique H3.1, et le variant H3.3. Quelques rares cas présentent une mutation dans le gène *HIST2H3A/C* codant l'histone canonique H3.2. Tous les variants d'histone H3 ont une même fonction au cœur du nucléosome, mais malgré de faibles différences entre leurs séquences protéiques, seulement 5 acides aminés entre le variant H3.1 et le variant H3.3, les variants d'histone H3 ont des propriétés différentes (Fig. 8) (Szenker et al., 2011).

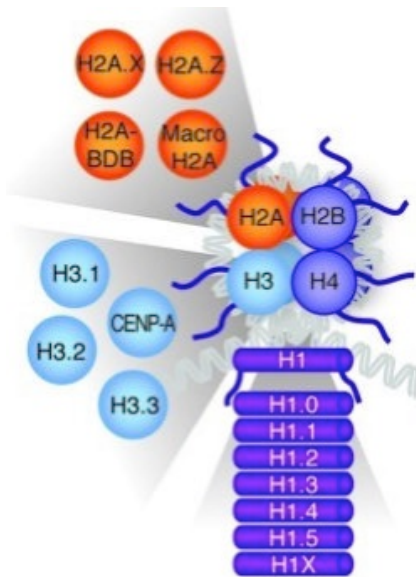


Figure 7. Les différents variants d'histone

Pour chaque type d'histone, il existe différents variants qui sont représentés d'une même couleur sur le schéma.

Adapté de Tollervey and Lunyak, 2012

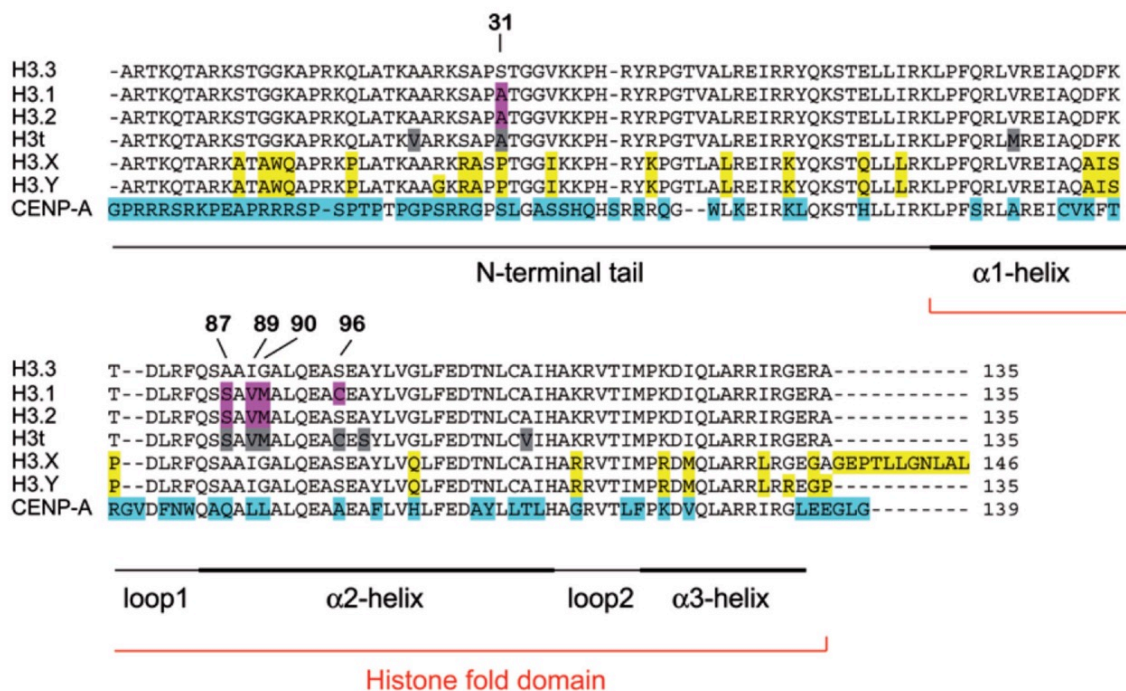


Figure 8. Alignement des séquences protéiques des différents variant d'histone H3

Les séquences protéiques des différents variants sont comparées avec la séquence du variant "ancestral" H3.3. Les différences entre le variant H3.3 et les variants H3.1/H3.2 sont surlignées en violet, les différences avec le variant H3t en gris, les différences avec les variants H3.X/H3.Y en jaune et les différences avec le variant CENP-A en bleue. Les séquences des variants H3.3 et H3.1 diffèrent de 5 acides aminés, de 4 acides aminés entre les variants H3.3 et H3.2 et seulement d'un acide aminé entre les variants H3.1 et H3.2. Adapté de Szenker et al., 2011

Les gènes codant les variants H3.1 et H3.2 sont organisés en clusters et ne possèdent pas d'introns. Le variant H3.3 est codé quant à lui par deux gènes composés d'introns et d'exons sur deux chromosomes différents, 1q et 17q (Fig. 9). Les variants H3.1 et H3.2 sont transcrits au cours de la réplication de l'ADN soit pendant la phase S du cycle cellulaire. L'organisation des gènes (en cluster) ainsi que la structure de l'ARN (extrémité en tige-boucle) permet une transcription et une traduction plus rapide afin d'empaqueter l'ADN néosynthétisé. A l'inverse, l'histone H3.3 est exprimée constitutivement tout au long du cycle cellulaire. Les différents variants d'histone H3 ont également des localisations différentes dans la chromatine. Les variants H3.1 et H3.2 sont retrouvées dans les régions sous forme d'hétérochromatine contenant des gènes non exprimés. Le variant H3.3 est à l'inverse retrouvé dans les nucléosomes au niveau des gènes actifs de l'euchromatine et des régions télomériques et péri-centromériques (Goldberg et al., 2010). L'histone H3.3 est incorporé dans la chromatine pour reformer les

nucléosomes après le passage de la machinerie de transcription de l'ADN ou de réparation de cassures (Luijsterburg et al., 2016). Enfin, différentes protéines chaperones sont responsables, selon la localisation, de l'incorporation des histones dans les chromosomes, (Fig. 10) (Goldberg et al., 2010 ; Szenker et al., 2011 ; Sitbon et al., 2017).

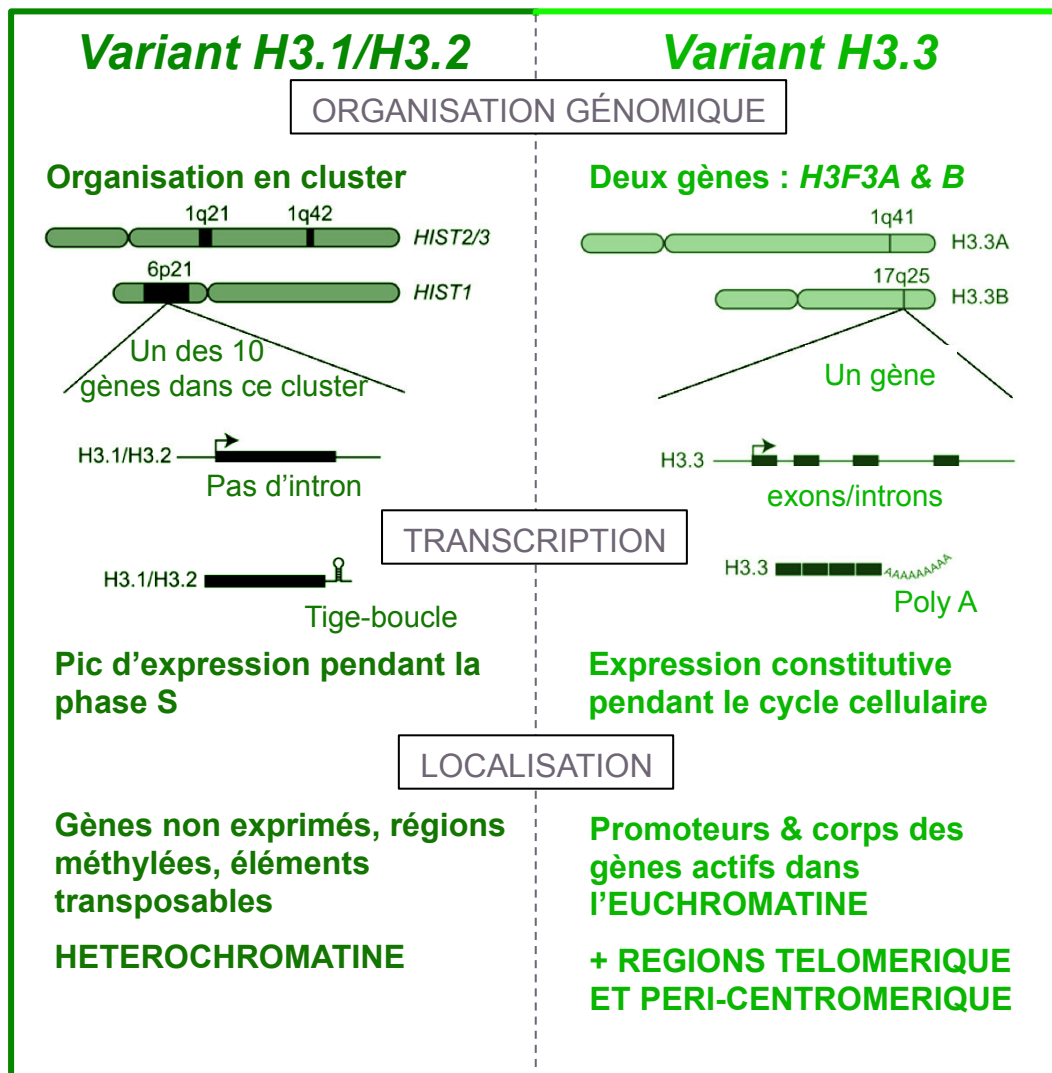


Figure 9. Comparaison des variants H3.1/H3.2 et H3.3 de l'histone H3

Les gènes codant les variants H3.1 et H3.3 ont des organisations génomiques et une transcription au cours de différentes phases du cycle cellulaire. La localisation de ses variants dans le génome est également différente.

Modifié de Szenker et al., 2011

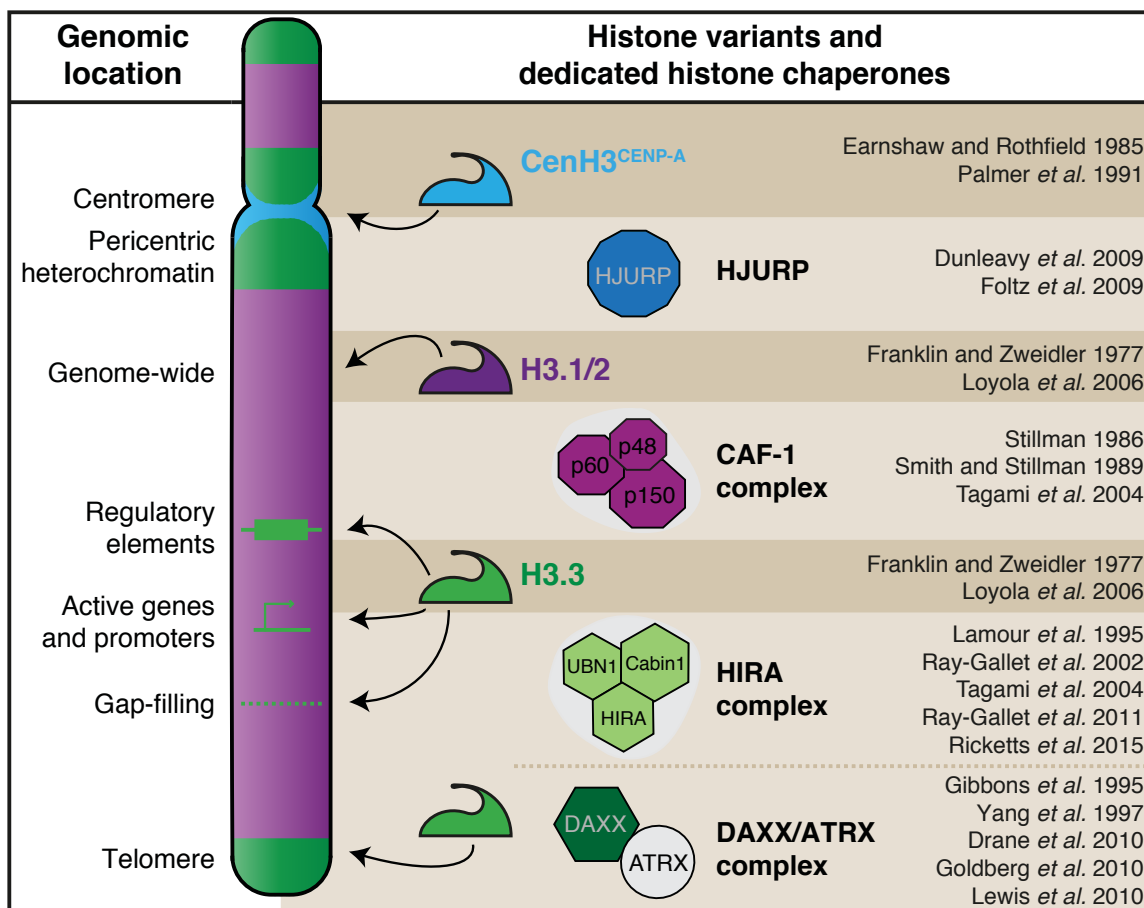


Figure 10. Les variants d'histones H3 et leurs protéines chaperons

En fonction de la localisation dans le génome différentes protéines chaperons sont recrutées et permettent l'incorporation de variants d'histone distincts. Par exemple, le variant H3.3 est intégré dans les gènes actifs par le complexe HIRA, et au niveau des télomères par le complexe DAXX/ATR.

Adapté de Sitbon et al., 2017

1.3.1.3. Conséquences épigénétiques de la mutation H3-K27M

En 2013, Lewis *et al.* ont montré en Western Blot et en immunohistochimie que les cellules de DIPG arborant une mutation H3-K27M hétérozygote dans l'un des 15 gènes codant l'histone H3 présentent une diminution globale de triméthylation de la lysine 27 (H3K27me3) de tous les histone H3 (Fig. 11) (Lewis *et al.*, 2013). Ces résultats ont été validés *in vitro* à l'aide de cellules HEK293T exprimant des transgènes H3.3 mutées en position K27 pour l'ensemble des substitutions possibles. Seules les mutations H3-K27I et H3-K27M induisent *in vitro* une perte de triméthylation en H3K27. De manière intéressante, notre groupe a identifié un cas de DIPG présentant la mutation H3-K27I présentant également la perte de triméthylation en H3K27 (Castel *et al.*, 2015). Peu de temps après, Bender et son équipe ont

montré que cet effet dominant négatif de l'histone mutée H3-K27M, est dû à un recrutement aberrant du complexe PRC2 au niveau des histones mutées (Bender et al., 2013). Des expériences de co-immunoprécipitation ont révélé que PRC2 était enrichi au niveau de l'histone H3-K27M. Selon les auteurs, le complexe PRC2 serait piégé par les histones mutées, ne pouvant donc plus apposer les marques de di-triméthylation sur les histones H3 sauvages. Paradoxalement, certains loci présentent des niveaux anormalement élevés de la marque H3K27me3 (Fig. 12). Plus récemment, les travaux de Stafford montrent que l'interaction entre PRC2 et H3-K27M est un processus dynamique dans lequel PRC2 présente bien une plus grande affinité pour les histones mutées H3-K27M, mais que l'interaction de ces deux protéines est seulement transitoire (Stafford et al., 2018). De plus, l'interaction de PRC2 avec l'histone mutée induit une baisse d'activité du complexe PRC2 par le biais d'un changement de conformation allostérique. A l'inverse, PRC2 serait allostériquement activé par la liaison avec la marque H3K27me3 conduisant à des gains focaux de cette PTM.

Par ailleurs, l'inhibition de PRC2 entraîne également une hypométhylation de l'ADN (Reddington et al., 2013) qui est associée, tout comme la perte de H3K27me3, à l'activation de la transcription des gènes en regard (Bender et al., 2013).

La protéine mutée H3-K27M induit donc une perte globale de la marque H3K27me3 qui conduit à des dérèglements épigénétiques majeurs dont une activation de l'expression de gènes normalement réprimés par le complexe PRC2.

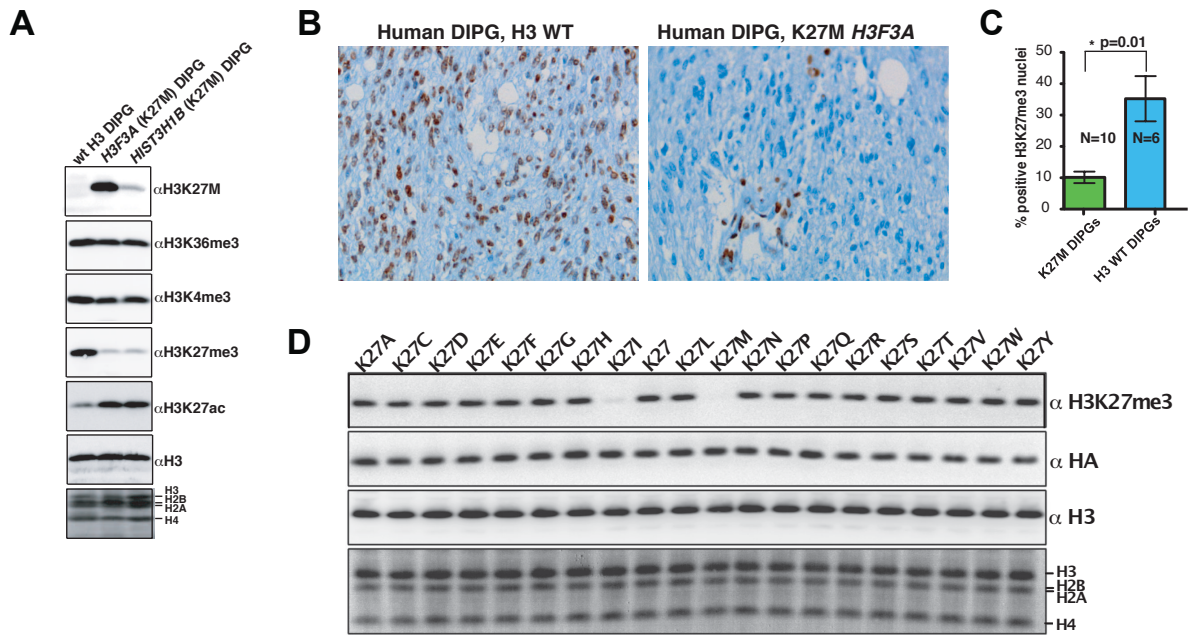


Figure 11. Conséquence de la mutation H3-K27M sur la marque épigénétique H3K27me3

A. Western Blot sur des extraits d'histones à partir de cellules de DIPG présentant une forme sauvage ou mutée de l'histone H3. B. Immunohistochimie H3K27me3 sur des tumeurs primaires de DIPG présentant ou non la mutation H3-K27M et quantification du pourcentage de noyaux positifs en immunohistochimie (C) (P=0,01 ; test de student non-apparié). D. Western Blot sur des extraits protéiques de cellules 293T transduites par différents transgènes H3.3-K27X, X correspondant à l'ensemble des acides aminés. L'anticorps anti-HA montre la quantité de transgène relative à l'H3.3 total (incluant l'endogène).

Adapté de Lewis et al., 2013

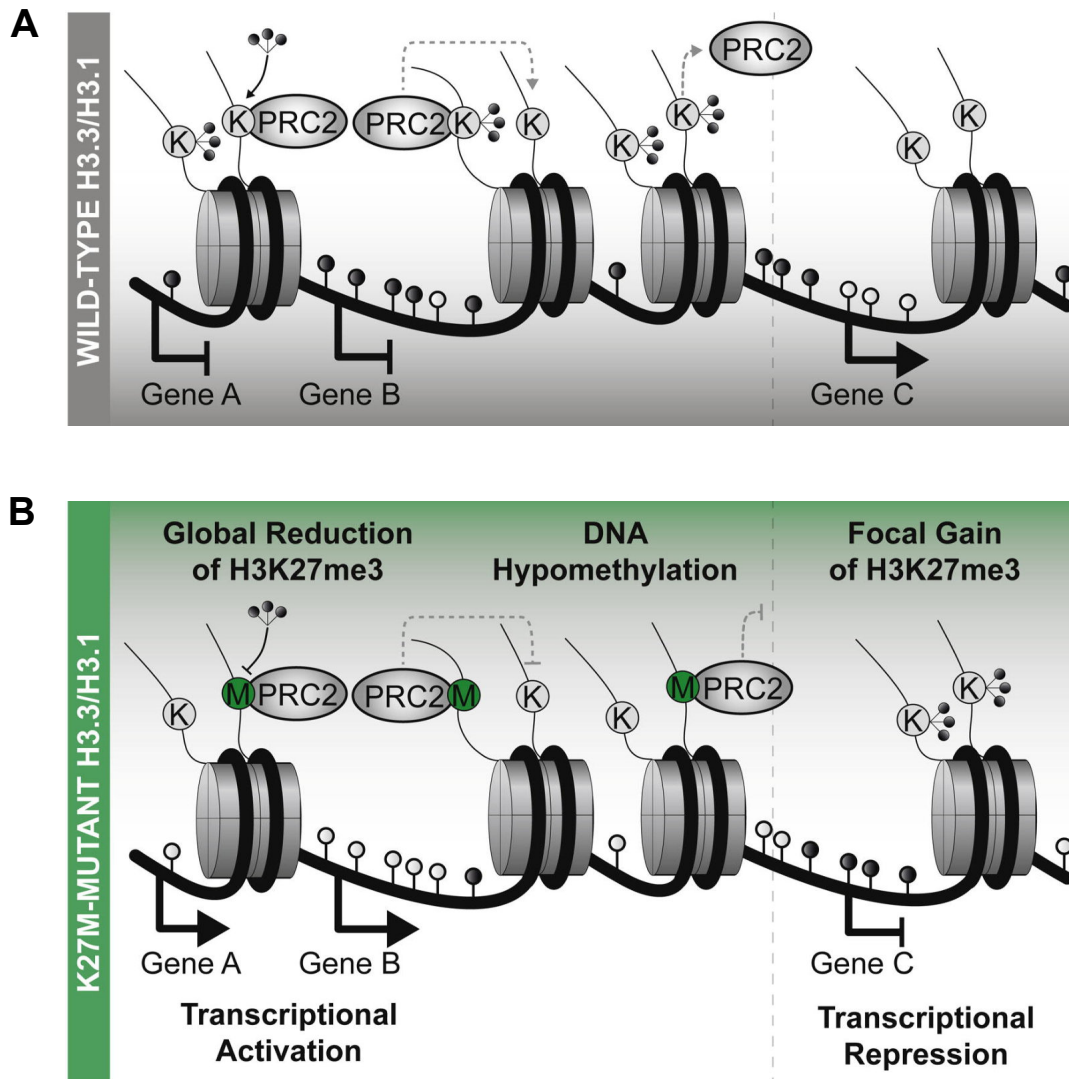


Figure 12. Impact de la mutation H3 K27M sur l'expression des gènes

En contexte normal (A), le complexe PRC2 appose les marques de di- et tri-méthylation au niveau de la lysine 27 de l'histone H3. La marque épigénétique H3 K27me3 a pour conséquence d'inhiber l'expression des gènes. En présence de la forme mutée H3-K27M (B), le complexe PRC2 se retrouve piégé et ne peut plus déposer les marques H3K27me3 sur les histones sauvages H3 entraînant une hypométhylation de l'ADN et une activation des gènes en regard. Ces cellules H3-K27M présentent également sur certains loci des gains focaux de H3K27me3 réprimant la transcription des gènes en regard.

Adapté de Bender et al., 2013

1.3.2. Autres altérations moléculaires récurrentes dans les DIPG

1.3.2.1. TP53 et voies de réparation des dommages à l'ADN

TP53 représente l'un des gènes les plus communément mutés en oncologie puisqu'il est retrouvé altéré dans plus de 50% des cancers (Perri et al., 2016). Les mutations de TP53 sont souvent associées à une instabilité génomique, ainsi qu'à une capacité

d'invasion et de formation de métastases (Bieging et al., 2014 ; Joerger and Fersht, 2016). Les mutations de *TP53* sont présentes dans 40% à 77% des DIPG selon les études (Fig. 13A) (Grill et al., 2012 ; Khuong-Quang et al., 2012 ; Puget et al., 2012). Le gène *TP53* code un facteur de transcription (également appelé p53) qui, en réponse à de nombreux signaux de stress, est spécifiquement activé par des modifications post-traductionnelles (Fig. 14). TP53 conduit à une grande diversité de réponses comme l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence ou la réparation de l'ADN (Bieging et al., 2014 ; Vogelstein et al., 2000).

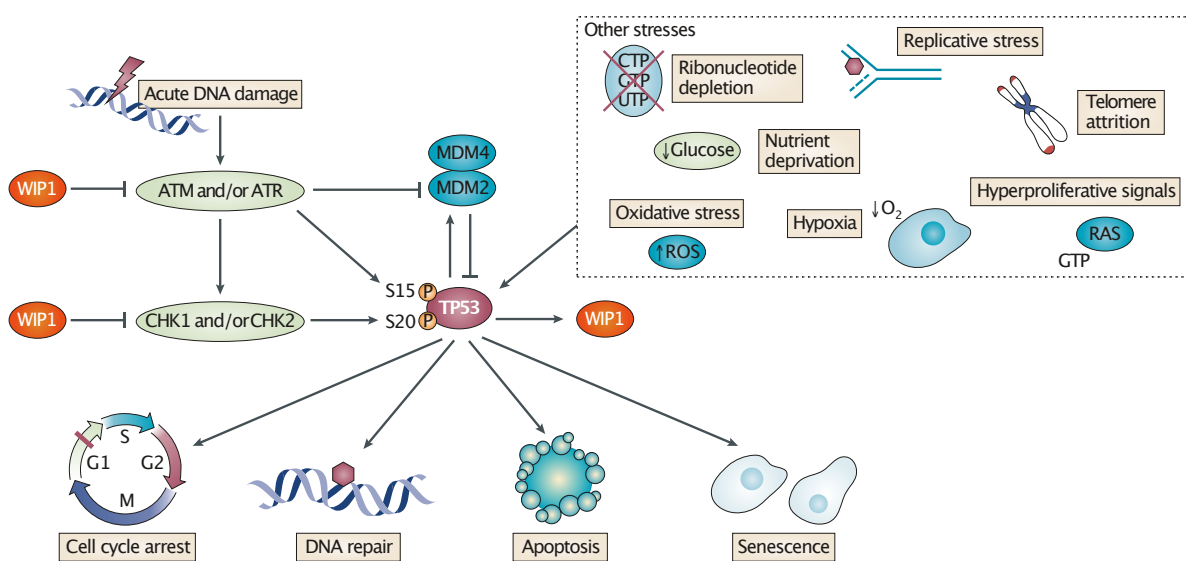


Figure 14. Activation de TP53 et réponses cellulaires associées

TP53 est un facteur de transcription activé par phosphorylation en réponse à de nombreux stress cellulaires (encadré en pointillé). Dans le cas de dommages à l'ADN, TP53 sera activé via ATM et/ou ATR. L'activation de TP53 induit différentes réponses cellulaires comme l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose ou encore la sénescence.

Modifié de Bieging et al., 2014 et Maerken et al., 2009

Des mutations dans la voie de réponse aux dommages à l'ADN sont également souvent associées aux DIPG. Des mutations de *PPM1D*, codant pour la phosphatase WIP1, sont présentes dans 10-12% des cas (Zhang et al., 2014 ; Wu et al., 2014). La transcription de *WIP1* est induite par TP53 en réponse aux dommages à l'ADN. L'expression de *WIP1* crée une boucle de rétroaction négative qui aide à limiter l'activité de la voie TP53 à la fin d'une réponse au stress en déphosphorylant CHK1/2, ATM/ATR et TP53 elle-même, créant ainsi une régulation négative (Maerken et al., 2009). D'autres mutations plus rares d'ATM ou de MDM2 ont également déjà été décrites (Wu et al., 2014 ; Mackay et al., 2017).

1.3.2.2. *ATRX*

ATRX est une sous-unité du complexe DAXX/*ATRX*, qui est responsable de l'incorporation des variants d'histones H3.3 au niveau des télomères. Des altérations d'*ATRX* entraînent des difficultés de réparation de l'ADN par la voie Non-Homologous End-Joining (NHEJ) et une instabilité chromosomique chez la souris (Koschmann et al., 2016). Environ 15% des patients de DIPG présente une mutation d'*ATRX* (Fig. 13B) (Schwartzentruber et al., 2012 ; Mackay et al., 2017). Cette altération est fréquente à l'autopsie mais relativement rare au diagnostic (Cohen et al., 2017).

1.3.2.3. *Mutations et amplification de PDGFRA*

PDGFRA est un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) qui intervient dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires, comme la différenciation et la croissance cellulaire (Lemmon and Schlessinger, 2010). La majorité des altérations de *PDGFRA* sont des amplifications dans 28-39% des cas de DIPG et dans 5-9% des cas ce sont des mutations *PDGFRA* (Fig. 13C) (Paugh et al., 2010 ; Khuong-Quang et al., 2012 ; Buczkowicz et al., 2014 ; Puget et al., 2012).

1.3.2.4. *Altération de la voie PI3K/mTOR*

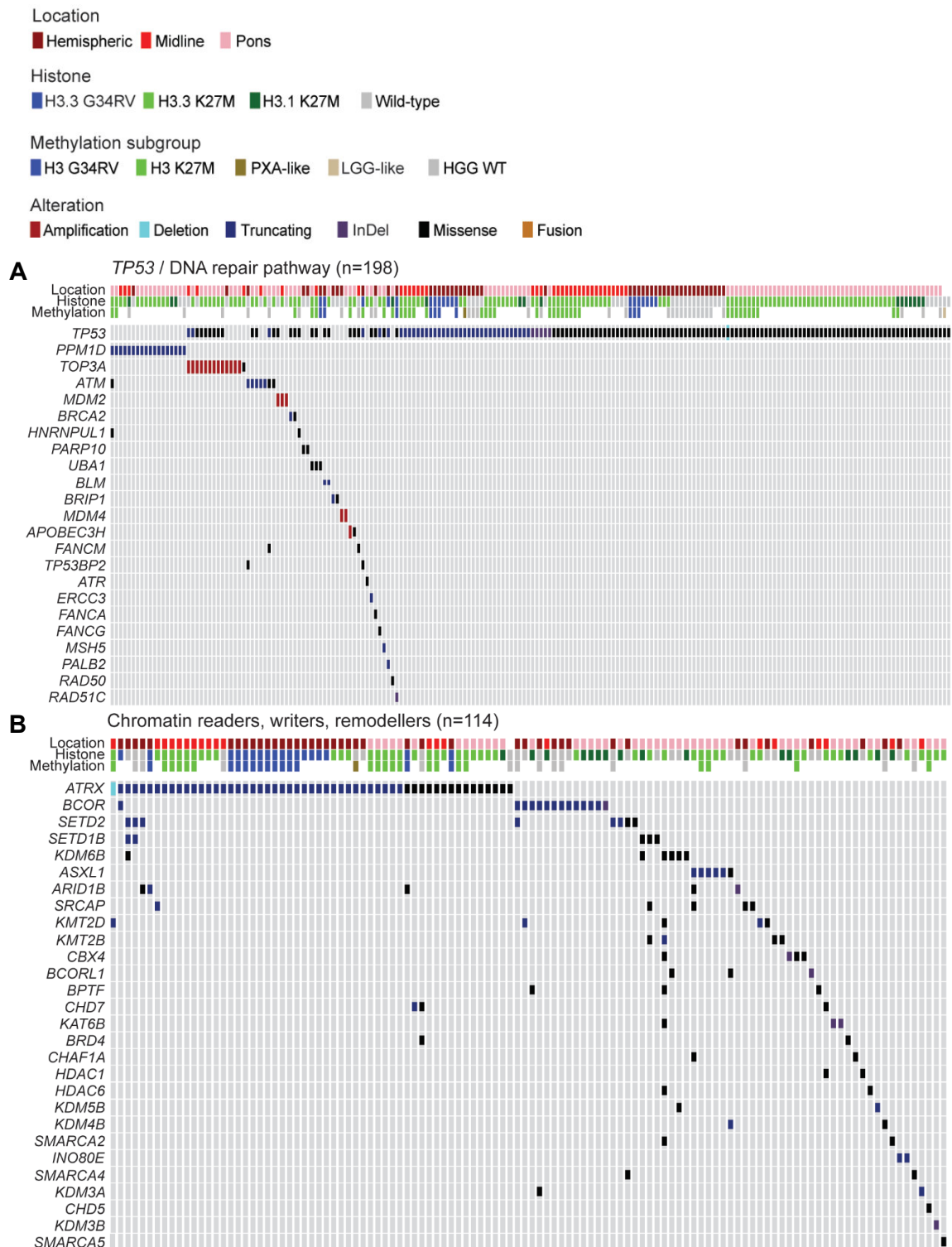
La voie PI3K/mTOR occupe une place importante dans les mécanismes de régulation du cycle cellulaire. C'est une voie de signalisation souvent activée dans différents types de cancers (Ersahin et al., 2015). Les altérations de la voie PI3K/mTOR sont principalement dues à des mutations activatrices de *PIK3CA*, *PIK3R1* ou inactivatrices de *PTEN* et sont présentes dans environ 30% des cas de DIPG (Fig. 13D) (Grill et al., 2012 ; Buczkowicz et al., 2014 ; Mackay et al., 2017).

1.3.2.5. *ACVR1 dans la voie des BMP*

ACVR1, également connu sous le nom de *ALK2*, est un des trois récepteurs de type I des BMP (protéines de la morphogénèse osseuse) (Rigueur et al., 2015). Les BMP font partie de la famille du facteur de croissance TGF- β qui régule la chondrogenèse (formation du cartilage). Les mutations d'*ACVR1* entraînent une activation constitutive de la voie SMAD (Fontebasso et al., 2014). Elles sont retrouvées dans

INTRODUCTION - Les gliomes infiltrants du tronc cérébral (DIPG)

20-32% des DIPG (Fig. 13E) (Buczkwicz et al., 2014 ; Fontebasso et al., 2014 ; Wu et al., 2014 ; Taylor et al., 2014). Une partie de ces mutations sont communes à la maladie génétique rare, la fibrodysplasie ossifiante progressive (FOP) (Taylor et al., 2014).



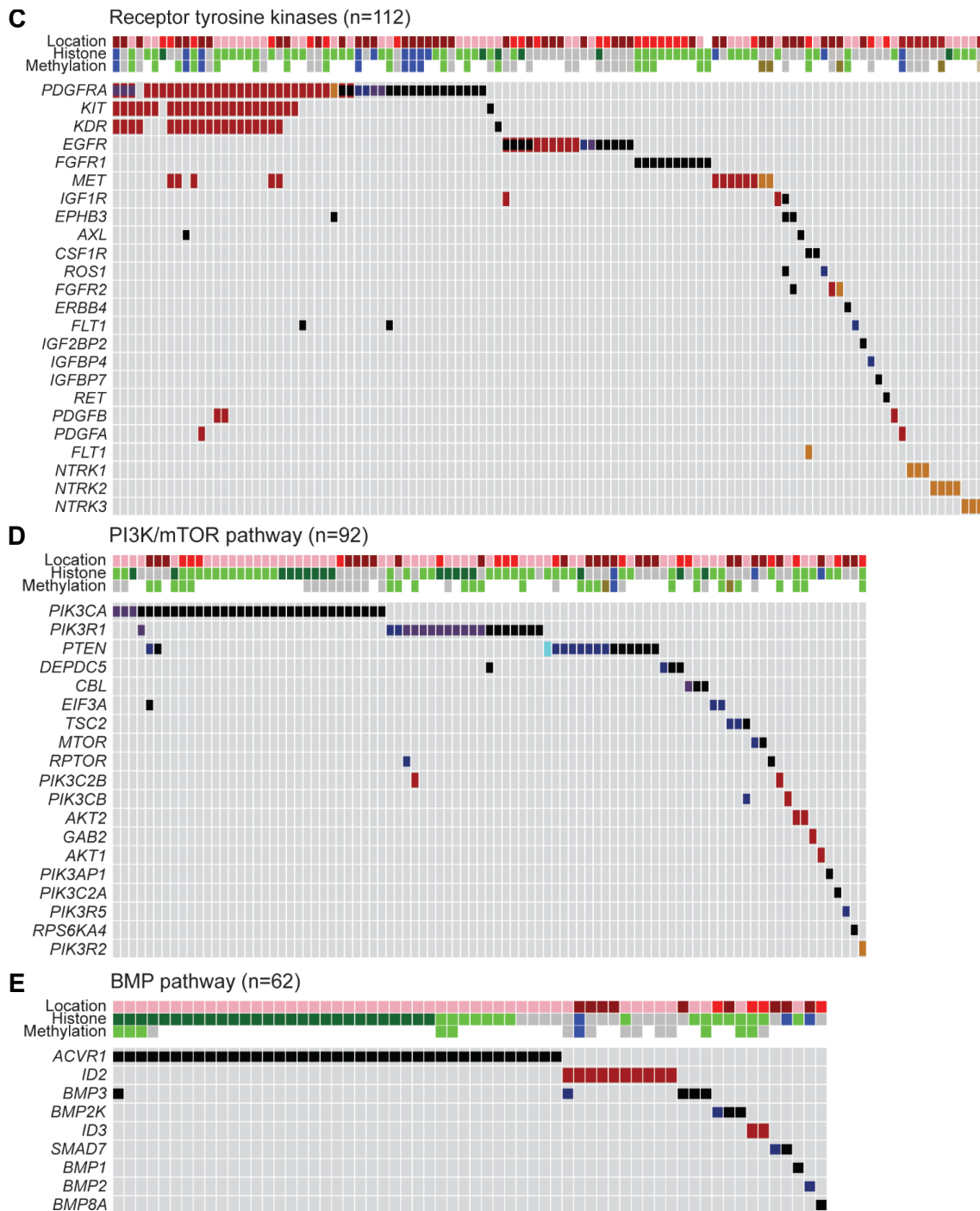


Figure 13. Principales altérations moléculaires de 1000 patients atteints de HGG pédiatrique

Représentation de la distribution des altérations moléculaires selon les voies de signalisation altérées : TP53 et la voie de réparation des dommages à l'ADN (A), les protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine (B), les récepteurs à tyrosine kinase (C), la voie PI3K/mTOR (D) et la voie des BMP. La distribution des différentes altérations est définie selon la localisation de la tumeur, les mutations d'histones et le profil de méthylation. Les DMG sont définis par la mutation H3-K27M et une localisation dans la ligne médiane. Les gliomes mutés H3.3 G34RV sont des HGG pédiatriques hémisphériques. Les gliomes notés *Wild-Type*, ne présentant pas de mutation d'histone, appartiennent à une entité encore mal définie.

Modifié de Mackay et al., 2017

1.3.2.6. Variations de nombre de copies (CNV)

Les cellules cancéreuses déficientes dans les voies de maintien de l'intégrité génomique (*TP53*, voies de réparation de l'ADN, *ATRX*, ...) présentent souvent des altérations structurales à l'échelle des gènes (délétions et amplifications) ou à l'échelle de bras entiers de chromosomes (pertes et gains).

D'après une méta-analyse de 1000 génomes de HGG pédiatrique (pHGG) et de DIPG de Mackay et coll., les patients mutés H3.3-K27M présentent davantage de délétions et d'amplifications (dont les amplifications de *PDGFRA* précédemment décrites) en comparaison aux patients mutés H3.1-K27M (Fig. 15A) (Mackay et al., 2017). Au niveau des variations de nombres de bras chromosomiques entiers, les tumeurs H3.3-K27M présentent des gains et des pertes réparties sur le génome dont certaines altérations sont significativement associées au sous-groupe H3.3-K27M (gain du 1q, perte du 13q et 14q) (Fig. 15B). Le génome des tumeurs H3.1-K27M semble moins remanié que celui des tumeurs H3.3-K27M. En effet, les tumeurs H3.1-K27M présentent moins de pertes et de gains mais elles sont caractérisées par un gain du 1q et du chromosome 2 et une perte du 14q et 16q.

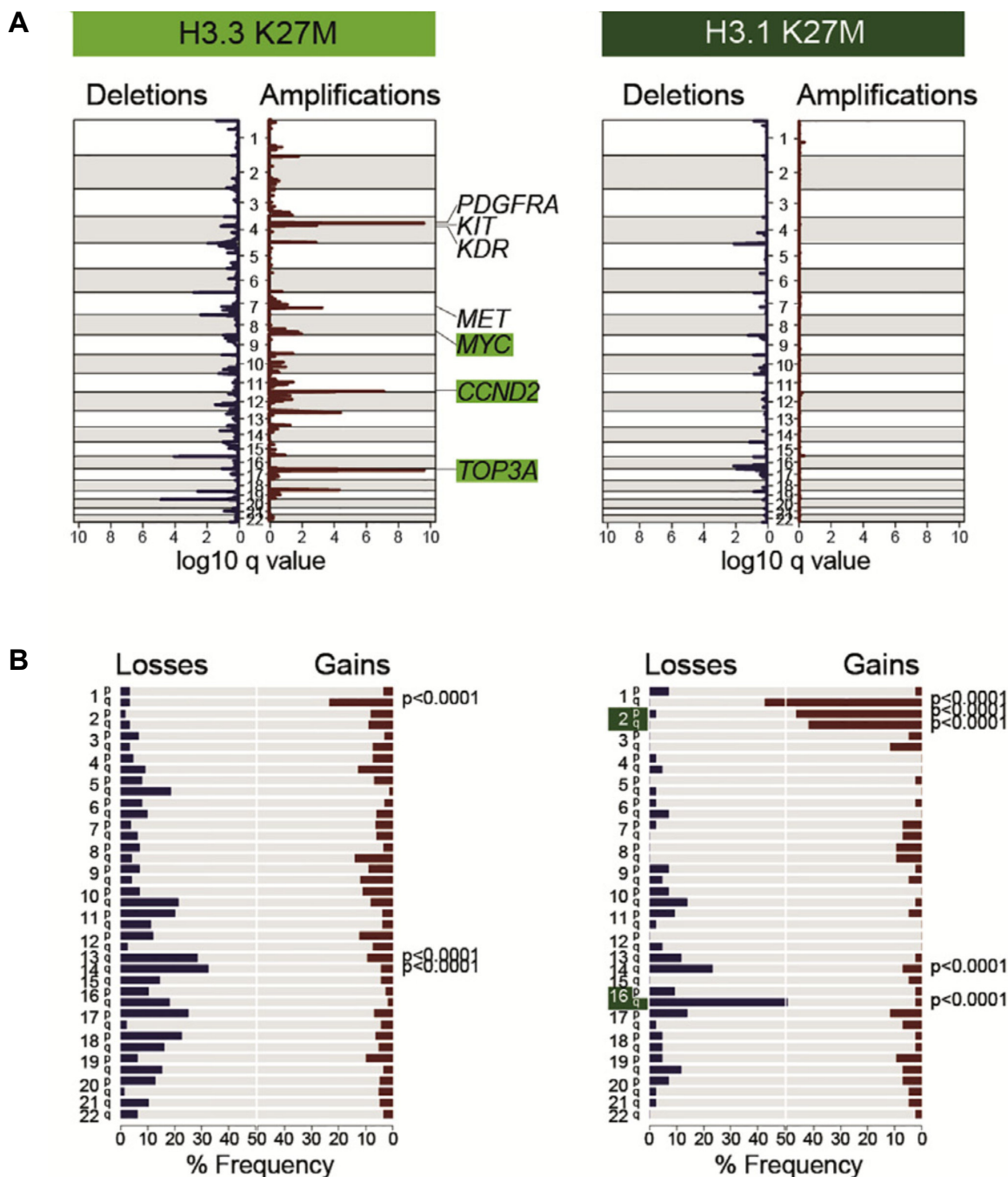


Figure 15. Régions fréquemment altérés dans les patients H3-K27M

Délétions et amplifications locales indiquées en fonction des chromosomes (A) et fréquences des pertes et gains de bras chromosomiques entiers chez les patients H3-K27M (B) (analyse GISTIC à partir de données de WES).

Adapté de Mackay et al., 2017

1.4. Hétérogénéité des DIPG : identification de sous-groupes selon l'histone H3 muté

Comme indiqué précédemment, les DIPG présentent une oncogénèse unique induite par les mutations H3-K27M qui a conduit à la définition d'une nouvelle entité dans la classification de l'OMS 2016, *Diffuse Midline Glioma, H3K27M mutant* (Louis et al., 2016).

Cependant, l'oncogénèse au sein des DIPG n'est pas uniforme et notre équipe a montré que deux sous-groupes de tumeurs peuvent être définis selon le variant d'histone muté H3.1 ou H3.3 (Castel et al., 2015). Dans cette étude, les sous-groupes ont été identifiés à partir des profils d'expression des 23 gènes les plus dérégulés. Selon le sous-groupe, le paysage mutationnel des DIPG montre des associations préférentielles de gènes (Fig. 16). Les patients mutés dans le variant H3.1 présentent des mutations d'*ACVR1* (80%) (Taylor et al., 2014) et un gain du chromosome 1q et 2 alors que les patients mutés dans le variant H3.3 arborent majoritairement des mutations de *TP53* (70%) ou des amplifications de *PDGFRA* (Puget et al., 2012). Ces associations préférentielles ont également été décrites dans l'analyse des 1000 génomes de pHGG et DIPG (Mackay et al., 2017).

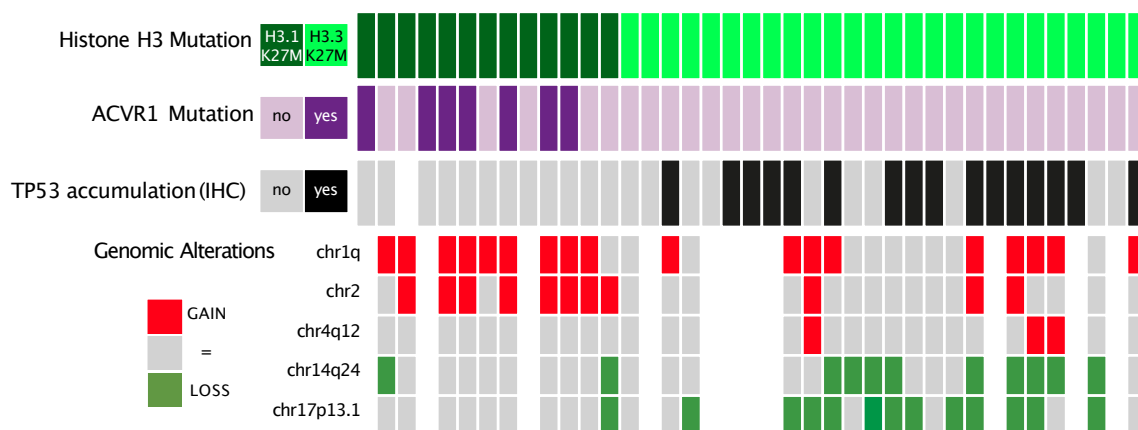


Figure 16. Des associations préférentielles d'altérations définissent deux sous-groupes de DIPG selon l'histone mutée

Les patients H3.1-K27M présentent préférentiellement des mutations d'*ACVR1* et un gain du chromosome 1q et 2. Les patients H3.3-K27M arborent majoritairement des altérations de *TP53* identifiées par des accumulations de TP53 en immunohistochimie (IHC).

Modifié de Castel et al., 2015

Plus récemment, notre équipe a réalisé une étude transcriptomique et épigénétique sur une cohorte de 215 patients de pHGG (Castel et al., 2018). Pour de ces 80 patients, les profils de méthylation de l'ADN ont été étudiés (Fig. 17). Les résultats confirment la distinction entre les tumeurs mutées H3-K27M et les autres pHGG d'une part mais également des tumeurs H3.1-K27M et H3.3-K27M sur la base de leur méthylome. En revanche, les tumeurs H3-K27M localisées dans le thalamus et dans le tronc ne peuvent pas être discriminées sur leur profil de méthylation. Ces résultats confirment l'appartenance des DIPG à une entité plus large que sont les gliomes diffus de la ligne médiane mutés H3-K27M.

L'analyse du transcriptome et des profils d'expression des gènes ont identifiés des signatures moléculaires propres à chaque sous-groupe de patient H3.1-K27M et H3.3-K27M (Castel et al., 2015). Les patients H3.1-K27M présentent une surexpression des gènes associés à une différenciation mésenchymateuse, préalablement identifiée dans les GBM adultes et une signature moléculaire astrocytaire. Ils présentent également une surexpression des gènes impliqués dans l'œdème, l'angiogenèse et l'hypoxie avec une activation de HIF1 α . Ces résultats sont en concordance avec les données cliniques et histopathologiques. Les tumeurs H3.3-K27M présentent quant à elles, une signature moléculaire d'oligodendrocytes, une surexpression de gènes proneuraux et impliqués dans la progression métastatique. La majorité (70%) des patients des DIPG étant des patients mutés dans l'histone H3.3, ces signatures associées aux patients H3.3-K27M avaient déjà été identifiées en 2012 (Puget et al., 2012).

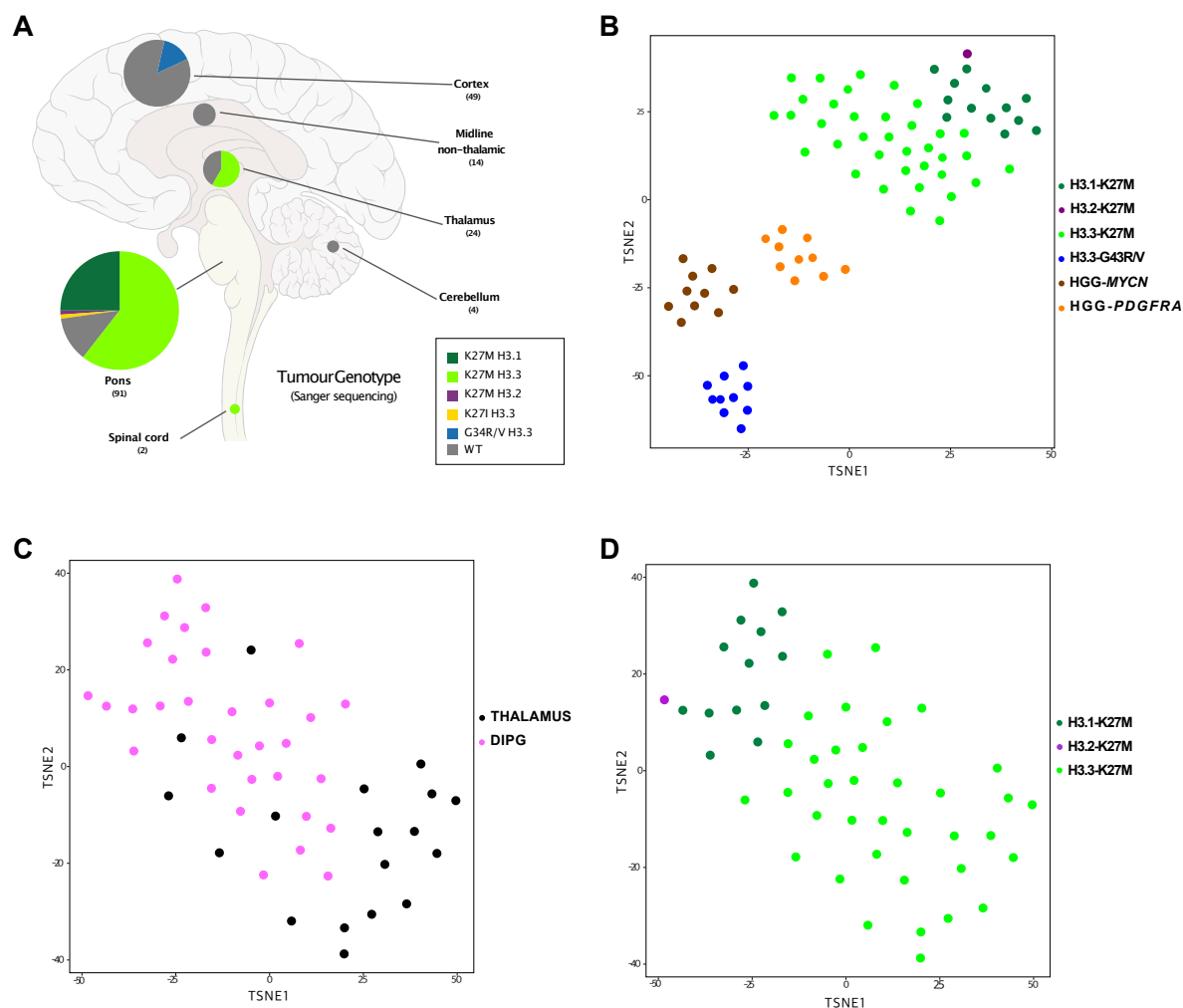


Figure 17. Distribution et classification des pHGG selon le profil de méthylation de l'ADN

A. Localisation tumorale de 183 pHGG en fonction des mutations de l'histone H3. B. Analyse t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) de 80 profils de méthylation de pHGG, d'après les sondes présentant un niveau de méthylation le plus variable ($SD > 0,25$). Les tumeurs de la ligne médiane sont représentées en fonction de l'histone H3 mutée, les autres pHGG ne présentant pas de mutation H3-K27M sont représentés en 3 groupes : H3.3-G34R/V, HGG-MYCN et HGG-PDGFRα. C-D. Analyse t-SNE de 50 profils de méthylation de tumeurs H3 K27M.

Modifié de Castel et al., 2015 & Castel et al., 2018

Enfin, d'un point de vue clinique, les patients n'ont pas les mêmes caractéristiques selon le variant d'histone H3 muté (Castel et al., 2015). Les patients H3.1-K27M sont plus jeunes avec une moyenne d'âge au diagnostic de 5,1 ans contre 7,4 ans pour les patients H3.3-K27M (Fig. 18). Les patients H3.1-K27M présentent les tumeurs les moins agressives et sont majoritairement des bons répondeurs à la radiothérapie, par opposition aux patients H3.3-K27M avec 85% et 55,3% de patients avec une amélioration clinique post-radiothérapie, respectivement. Les tumeurs H3.1-K27M sont également moins métastatiques, seulement 9% contre 43% des patients H3.3-

K27M. Enfin, ces différences cliniques conduisent à des différences de survie. Les patients H3.1-K27M ont une médiane de survie de 15 mois après le diagnostic alors que les patients H3.3-K27M ont seulement une médiane de survie de 9,2 mois.

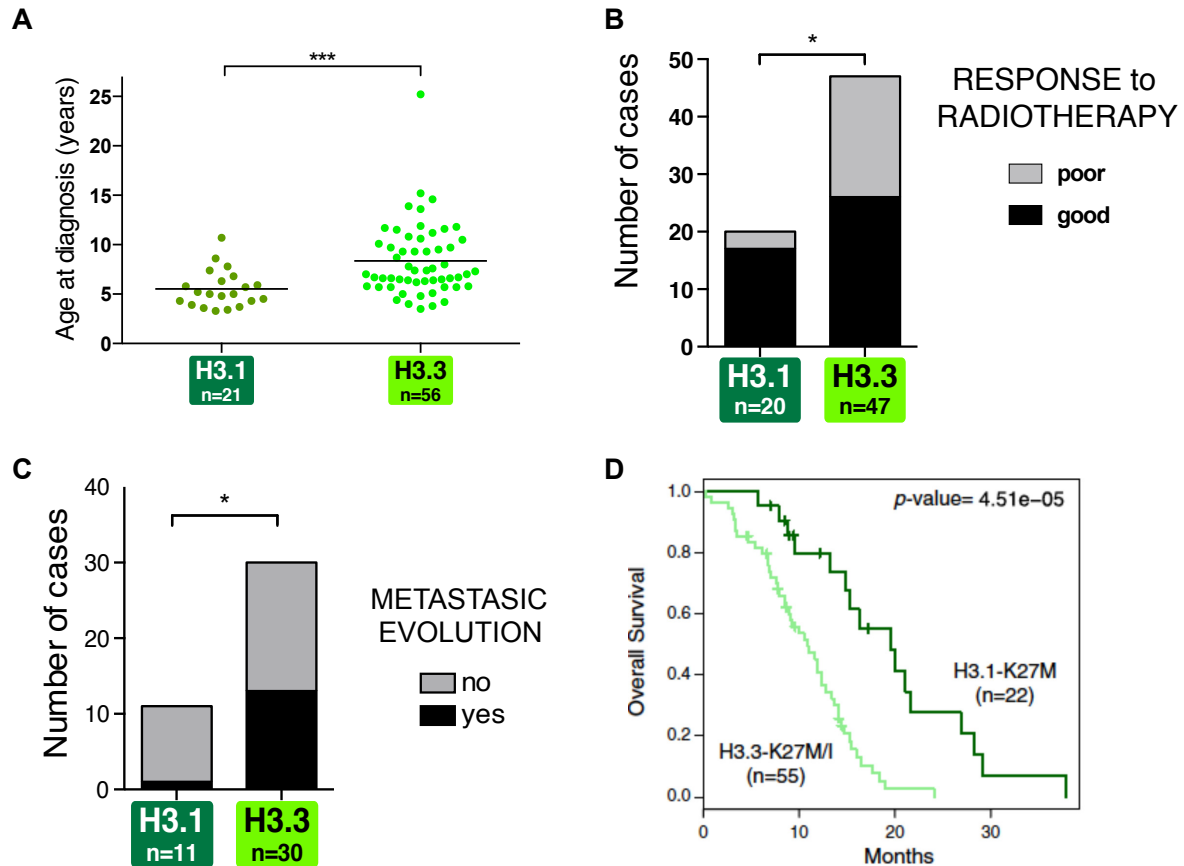


Figure 18. Portrait clinique des deux sous-groupes de DIPG

Les patients portant une mutation dans le variant d'histone H3.1 n'ont pas les mêmes caractéristiques cliniques que les patients mutés dans le variant H3.3. Les patients mutés H3.1-K27M sont plus jeunes, ils sont majoritairement des bons répondeurs cliniquement à la radiothérapie et présentent rarement de métastases intracrâniennes. Ces patients sont également ceux qui ont le meilleur pronostic.

Adapté de Castel et al., 2015

1.5. Modèles d'études *in vitro* et *in vivo* de DIPG développés au laboratoire

Grace à l'étroite collaboration avec le service de neurochirurgie de l'hôpital Necker-Enfants Malades (Pr S. Puget), notre laboratoire a développé ces dernières années, à partir de matériel tumoral primaire de DIPG prélevé au diagnostic, des cultures primaires de DIPG appelées Glioma Stem-like Cells (GSC) (Fig. 19). Ces cellules sont cultivées dans des conditions de cellules souches neurales adhérentes sur un

support recouvert de laminine (Pollard et al., 2009) et sont greffées de manière orthotopique dans le tronc de souris immunodéprimées afin d'établir des modèles *in vivo* (Plessier et al., 2017). Notre équipe possède l'une des plus grandes collections de modèles cellulaires et murins de DIPG comptabilisant plus de 30 GSC, 20 PDOX (Patient-Derived Orthotopical Xenografts) et 9 CDOX (Cells-Derived Orthotopical Xenografts). Nos modèles représentent la diversité observée chez les patients et conservent les traits caractéristiques des DIPG (Plessier et al., 2017).

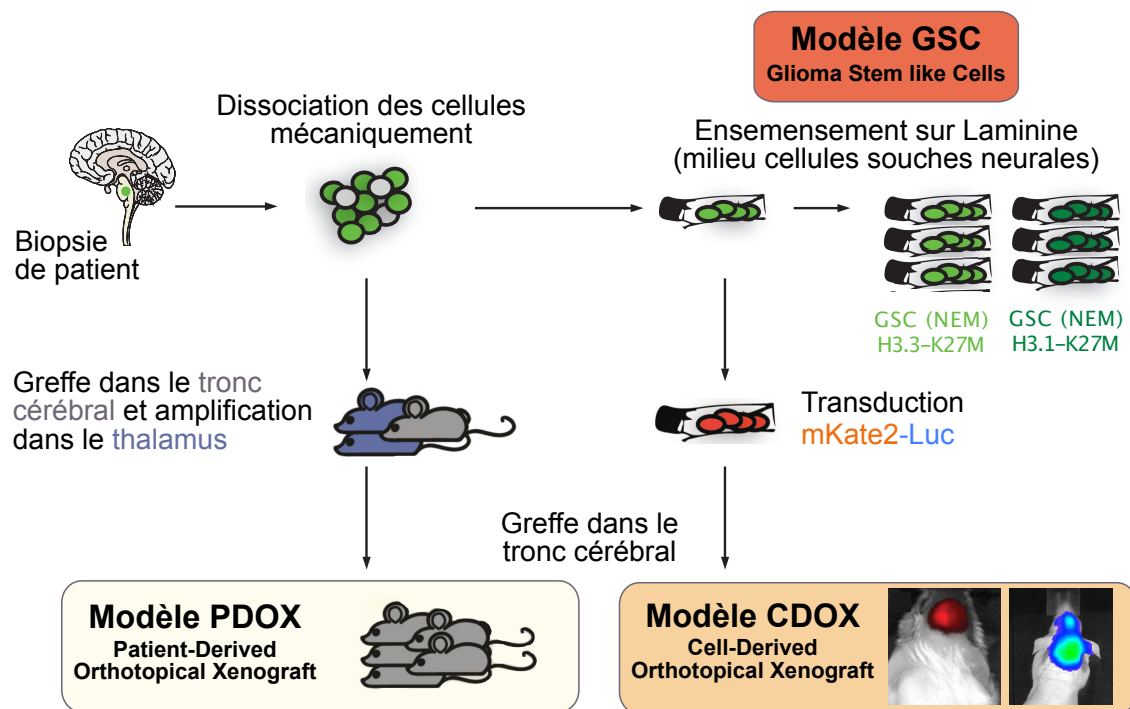


Figure 19. Modèles cellulaires et murins de DIPG développés au laboratoire

Les biopsies de patients reçues au laboratoire sont dans un premier temps dissociées mécaniquement. La suspension cellulaire est soit greffée directement dans le tronc cérébral ou dans le thalamus de souris Nude (modèle PDOX, patient-derived orthotopical xenograft) ou soit mise en culture *in vitro* dans un milieu de cellules souches neurales dans des flasques recouvertes de laminine (modèle GSC, glioma stem-like cells). Les GSC sont soit maintenues en culture *in vitro*, soit transduites par un vecteur lentiviral codant pour une protéine fluorescente (mKate2) et le gène de la Luciférase (Luc) pour être xéno greffées dans le tronc cérébral de souris Nude (modèle CDOX, cell-derived orthotopical xenograft). Les modèles CDOX permettent de réaliser un suivi longitudinal de la tumeur en développement par mesure de la bioluminescence.

Modifié de Plessier et al., 2017

En conclusion, la découverte de mutations somatiques récurrentes en position K27 de l'histone H3 dans les gènes *HIST1H3B/C* et *H3F3A* codant respectivement l'histone canonique H3.1, et le variant H3.3 a permis d'individualiser les DIPG sur le plan moléculaire. Cette protéine modifiée induit une perte globale de la marque H3K27me3 et conduit à des dérèglements épigénétiques majeurs. Les DIPG présentent une oncogenèse unique dont l'évènement initiateur est la mutation H3-K27M. Ainsi deux sous-groupes de tumeurs peuvent être définis selon le variant d'histone muté H3.1 ou H3.3, chacun présentant une évolution clinique et une réponse à la radiothérapie différente. Les mécanismes de radiorésistance n'ayant jamais été étudiés dans les DIPG, il nous est donc apparu selon nous décisif de comprendre pourquoi certaines tumeurs répondent mieux et plus longtemps à la radiothérapie et comment, tôt ou tard, tous les patients vont rechuter.

2. Radiothérapie, effets des radiations ionisantes et résistance

La radiothérapie est une technique de traitement du cancer utilisant des rayonnements ionisants. C'est la thérapie cytotoxique la plus efficace pour le contrôle et le traitement locorégional des cancers solides (Schau and McBride, 2015). L'objectif de ce traitement est de détruire les cellules cancéreuses par les conséquences cellulaires induites par l'irradiation. La radiothérapie occupe une place importante dans la prise en charge des cancers (Baskar et al., 2012). Elle peut être utilisée seule, en traitement curatif locorégional, ou alors en association avec d'autres modalités thérapeutiques (chirurgie, chimiothérapie, immunothérapie ou hormonothérapie). Elle est utilisée dans plus de 50% des traitements en oncologie et dans 40% des cas, elle contribue aux traitements curatifs.

La radiothérapie est le traitement standard des DIPG depuis plus de 60 ans (Coutel, 1959). Cependant, même si la majorité des patients présentent une amélioration clinique après radiothérapie, cet effet n'est que transitoire, la réponse étant inévitablement suivie par une nouvelle progression (Cohen et al., 2017).

L'utilisation de la radiothérapie en médecine date de plus d'un siècle. En 1895, les rayons X sont inventés par Wilhelm Conrad Röntgen (Röntgen, 1898), et la radiothérapie se développe au début du XXe siècle grâce aux travaux de Marie Curie qui a découvert les éléments radioactifs polonium et radium en 1898. A partir de ce moment, la radio-oncologie devient une spécialité à part entière de la médecine (Baskar et al., 2012). La radio-oncologie est une discipline multidisciplinaire, incluant physique, chimie, biologie et médecine. Le type de radiations, les doses administrées, le plan de traitement mais aussi les caractéristiques biologiques de la tumeur et des tissus sains environnant sont des facteurs qui contribuent à l'issue clinique du traitement par radiothérapie (Allen et al., 2017).

Dans ce chapitre, nous présenterons dans un premier temps quelques notions physiques essentielles à la compréhension, puis nous étudierons les effets moléculaires et cellulaires des rayonnements ionisants.

2.1. Notions physiques

2.1.1. Rayonnements ionisants et sources de rayonnements

Les rayonnements sont classés en deux catégories, les rayonnements non-ionisants qui ne peuvent pas ioniser la matière comme les fréquences radios et micro-ondes et les rayonnements ionisants (Fig. 20). Les rayonnements ionisants ont la particularité d'émettre une énergie suffisante pour transformer les atomes en ions.

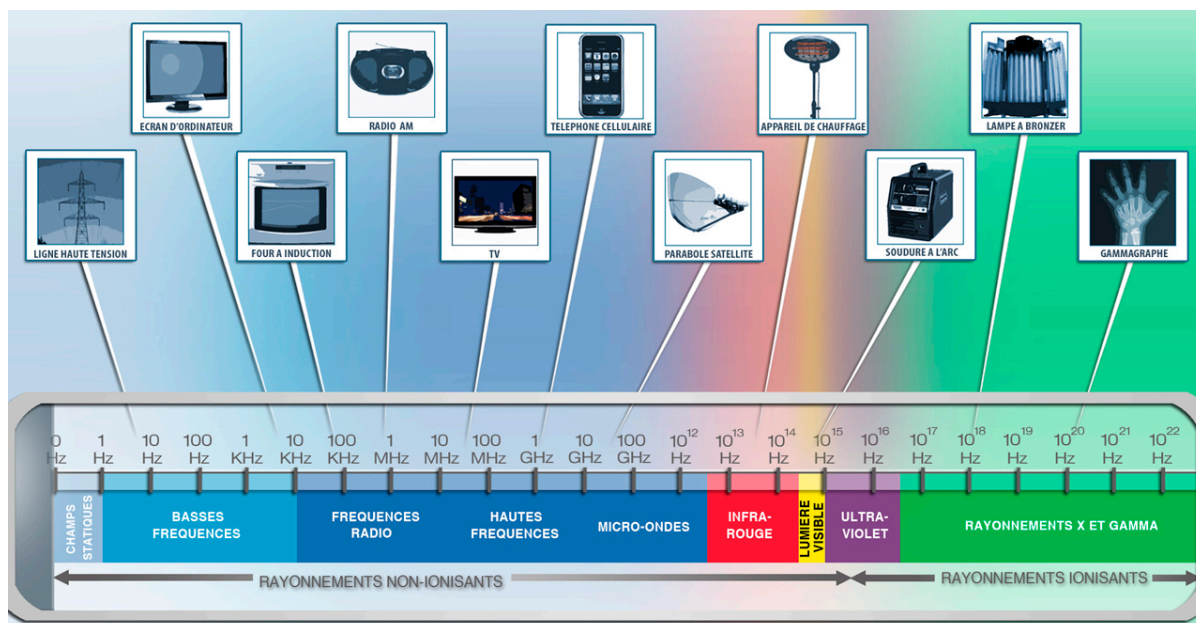


Figure 20. Illustration des différents rayonnements dans notre quotidien

Adapté de www.irsn.fr

Parmi les rayonnements ionisants, on distingue, les rayonnements avec des particules chargées (électrons, protons, particules alpha) et les rayonnements avec des particules non-chargées (les neutrons et les photons dont les rayons X et rayons gamma). Les rayonnements non chargés sont des rayonnements indirectement ionisants. Les particules non chargées, photons ou neutrons, vont, respectivement, mettre en mouvement des électrons ou des protons, qui sont des particules ionisantes.

2.1.1.1. Les rayonnements alpha

Les rayonnements alpha sont émis de la désintégration d'un noyau lourd avec un excès de protons. Les rayonnements alpha sont des faisceaux constitués de noyaux d'hélium (2 protons et 2 neutrons). Ils sont très ionisants mais étant constitués d'une

particule lourde, ils sont peu pénétrants et ne peuvent donc pas être utilisés en clinique.

2.1.1.2. Les rayonnements bêta

Les rayonnements bêta viennent de l'émission soit d'un électron (rayonnement β^-) ou d'un positon (rayonnement β^+) par un atome radioactif. Les rayonnements β^- sont utilisés en radiothérapie et imagerie (SPECT) alors que les rayonnements β^+ sont utilisés en imagerie seulement (TEP). En radiothérapie, le parcours des rayonnements β^- dépend de leur énergie initiale.

2.1.1.3. Les photons : rayonnements X et gamma.

Les rayons X sont des photons qui proviennent de transitions électroniques provoquées par la collision d'un électron avec un atome. En médecine, les rayons X sont produits par des tubes à rayons X en radiologie ou par des accélérateurs linéaires en radiothérapie.

Les rayons gamma sont également des photons émis lors de désintégration de noyaux atomiques comme le $^{60}\text{Cobalt}$. Les rayonnements gamma sont utilisés en imagerie pour la réalisation de scintigraphie ou pour le traitement des tumeurs par curiethérapie.

2.1.1.4. Neutrons

Les neutrons sont des particules produites par les cyclotrons, un accélérateur de particules. Les neutrons ont un trajet linéaire dans la matière et vont arracher les protons au milieu traversé. Les cyclotrons sont des infrastructures importantes, seuls quelques centres sont équipés en France.

2.1.2. Dose : absorbé, équivalente et efficace

La dose dont l'unité internationale est le Gray (Gy) correspond à l'énergie moyenne absorbée par unité de masse (1 Gy = 1 Joule/kg).

La dose absorbée correspond à la quantité d'énergie cédée par le rayonnement, c'est la dose qui est mesurée (en Gray). La dose équivalente (en Sievert) est calculée en multipliant la dose absorbée par un facteur dépendant du type de rayonnement. Enfin selon le tissu où l'organe touché, on calcul la dose efficace en multipliant la dose équivalente par un facteur tissulaire (Lenaerts and Coucke, 2014). En radio-oncologie, la comparaison des différents plans de traitement a conduit à la

mise en place de modèles théoriques de calcul d'équivalence radiobiologique ou BED (dose biologiquement efficace) (Jones et al., 2001). Différents modèles existent, plus ou moins complexe, selon les paramètres pris en compte. Dans ce travail, nous utiliserons la formule suivante :

$$BED = D \left[1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right]$$

où D correspond à la dose totale et d à la dose par fraction et le ratio α/β dépend des caractéristiques des cellules irradiées.

2.1.3. Transfert d'énergie linéique (TEL)

Le transfert d'énergie linéique (TEL) correspond à la quantité d'énergie transférée par une particule ionisante dans un milieu en fonction de la distance parcourue par la particule dont l'unité est le keV/ μm . Il dépend donc des caractéristiques de la particule : charge, vitesse et masse (Fig 21). Par exemple, les rayonnements électromagnétiques comme les rayons X et gamma sont considérés comme rayonnements de bas TEL contrairement aux protons qui ont un haut TEL.

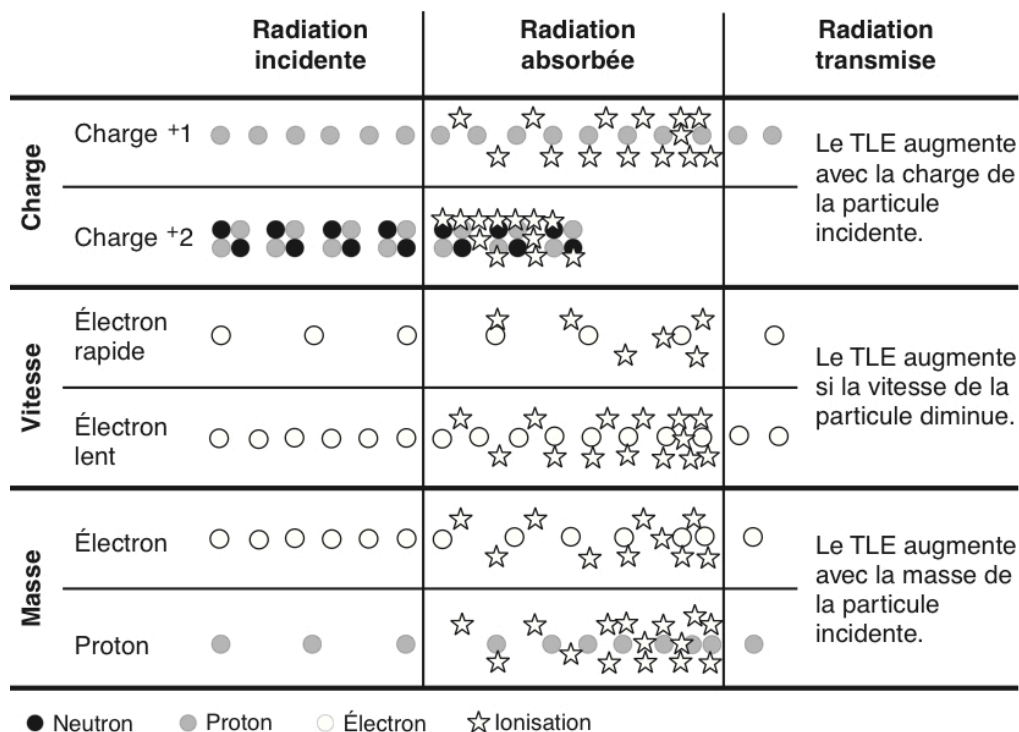


Figure 21. Le transfert d'énergie linéique (TEL) dépend des caractéristiques de la particule incidente

Le TEL est proportionnel au carré de la charge, inversement proportionnel au carré de sa vitesse et proportionnel à la masse de la particule.

Source livre Radioprotection en radiodiagnostic – 3^e édition, page 69

Ainsi, en fonction du type de particules chargées ou non, la distribution de la dose en fonction de la profondeur dans l'eau (ou dans un corps humain) sera différente (Fig. 22). Les particules chargées comme les protons ont la particularité de traverser la matière avec peu de dispersion et de déposer leur énergie à une profondeur donnée (*i.e.* dans la région du pic de Bragg). La profondeur dépend de l'énergie initiale. Les particules non chargées comme les neutrons et les rayonnements de bas TEL vont entraîner une forte densité d'ionisation le long de leur parcours dans le tissu.

Les rayonnements gamma dont le maximal de la dose est situé à 0,5 cm sont surtout utilisés dans le traitement des irradiations superficielles comme les tumeurs cutanées alors que les rayons X sont utilisés pour le traitement des tumeurs plus profondes.

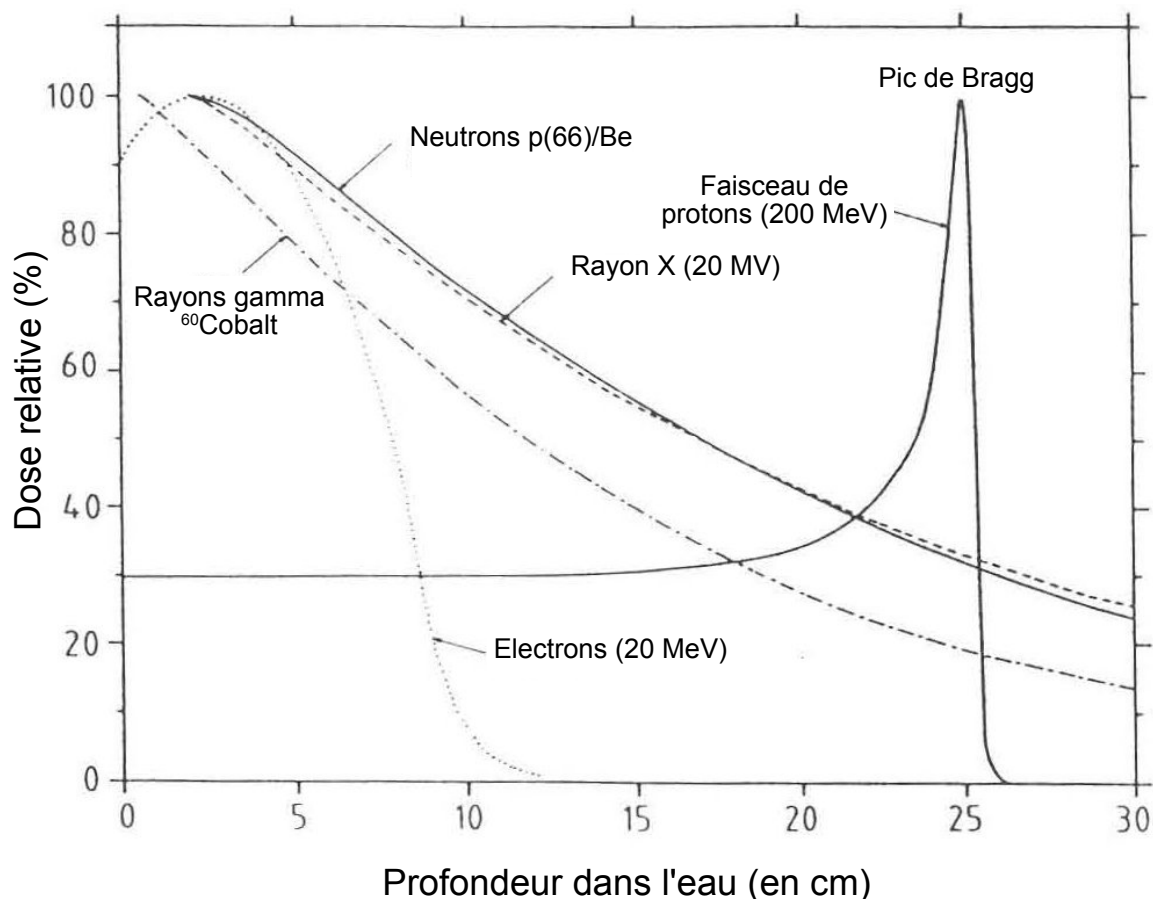


Figure 22. Distribution de la dose en fonction de la profondeur dans l'eau pour différents types de rayonnements

Modifié de Jones, 1999

2.1.4. Radiothérapie versus protonthérapie

Des progrès scientifiques ont jalonné le XXe siècle et ont fait évoluer l'utilisation de la radiothérapie (Fig. 23). Parmi les plus importants, l'utilisation de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomographie par émission de positons (TEP) dans les années 1970-1980, ont permis de faire évoluer la radiothérapie conformationnelle 3D (3DCRT) en radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (RCMI) et la radiothérapie guidée par l'image (IGRT). L'association RCMI et IGRT permet de mieux définir les volumes à traiter par imagerie fonctionnelle et ainsi éviter le risque de « sous-dosage » et donc de récurrence tout en ayant une meilleure préservation des organes sains et moins d'effets secondaires (Louvel et al., 2008).

Les propriétés physiques des protons, à savoir le dépôt de leur énergie dans la région du pic de Bragg, font des protons le rayonnement idéal pour le traitement des tumeurs en profondeur.

Néanmoins, cette technologie est encore très peu utilisée du fait de l'utilisation d'équipement très lourd (cyclotrons) et la nécessité d'être extrêmement précis dans la délimitation du volume d'irradiation. Pendant longtemps les technologies d'imagerie ne permettaient pas d'être assez précis notamment pendant le traitement à cause des mouvements dus à la respiration et les battements du cœur du patient par exemple. Aujourd'hui, les avancées technologiques permettent l'utilisation de la protonthérapie. L'avantage majeur est de pouvoir augmenter la dose reçue par la tumeur sans toucher les tissus sains avoisinants (Allen et al., 2012). Des premiers essais cliniques sont en cours et notamment un essai clinique en phase II (NRG-BN001) est en cours pour l'irradiation de tumeurs cérébrales adultes (glioblastomes).

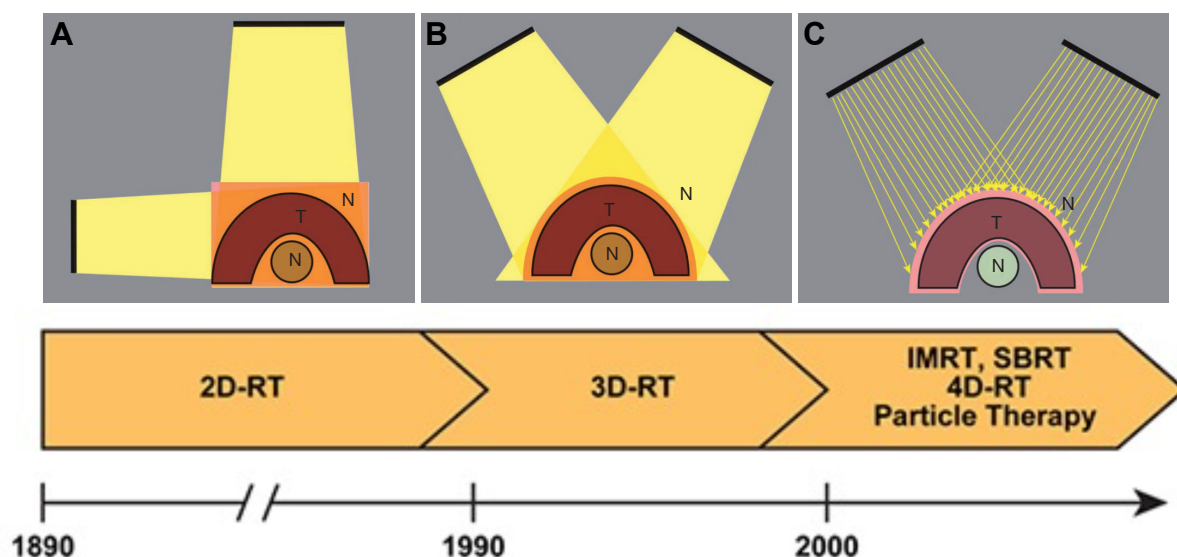


Figure 23. Evolution de la radiothérapie au cours du XX siècle

La radiothérapie moderne est caractérisée par ajustement du volume d'irradiation à la tumeur en limitant l'irradiation des tissus sains adjacents. Exemple schématique d'irradiation d'une tumeur concave (T) entourée de tissu sain normal (N) ou la zone irradiée est délimitée en orange. Dans le cas de radiothérapie 2D (A), les plans d'irradiation sont orthogonaux permettent de délimiter un volume d'irradiation rectangulaire. L'utilisation de la radiothérapie 3D (B) permet grâce aux différents angles d'irradiation de réduire l'irradiation du tissu sain à l'extérieur de la tumeur. Enfin, la radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (C) permet de délimiter parfaitement les contours de la tumeur en utilisant de nombreux faisceaux.

Modifié de Choi and Cho, 2016

2.2. Effets moléculaires et cellulaires des rayonnements ionisants

2.2.1. Formation des dommages radio-induits

2.2.1.1. Chronologie des événements

Lors d'une irradiation, les premières conséquences de l'irradiation sont des conséquences physiques qui durent une fraction de seconde (10^{-15} s). Cette phase physique correspond aux premières interactions entre le rayonnement et les atomes rencontrés (ionisation, excitation de la matière).

Dans un deuxième temps très rapide, une seconde, la phase physico-chimique, ou l'ADN va être endommagé par des effets direct ou indirect de l'irradiation (Fig. 24). Dans le cas d'un effet direct (15-20% des lésions), l'ADN subit directement des dommages par ionisation des bases de l'ADN ou du squelette sucre-phosphate via l'interaction directe avec une particule chargée. Les effets indirects sont dus à la

radiolyse de l'eau. L'ionisation des molécules d'eau entraîne la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), également appelés radicaux libres, qui peuvent diffuser et réagir avec l'ADN et induire également des dommages.

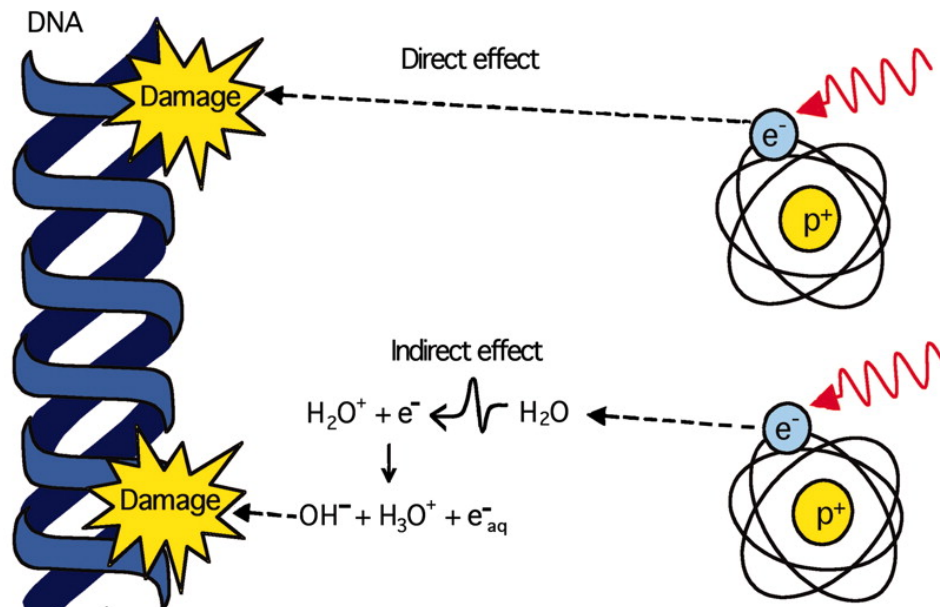


Figure 24. Les rayonnements ionisants induisent des dommages à l'ADN par des effets directs et indirects via la radiolyse de l'eau

Adapté de Morgan and Sowa, 2005

Puis, une phase biologique dans les premières minutes/heures qui suivent l'irradiation au cours de laquelle la cellule va réparer ses dommages. Tout dommage non réparé sera à l'origine d'une mutation. Ces mutations peuvent être à l'origine d'un cancer radio-induit dans les mois ou années qui suivent.

Quelques jours post-irradiation, si les dommages étaient trop importants et n'ont pu être réparés, la cellule entre en apoptose.

Enfin, une phase tissulaire s'observe dans les jours à plusieurs années après l'irradiation. Elle correspond aux conséquences à l'échelle tissulaire. L'utilisation de la radiothérapie, pour le traitement de tumeurs cérébrales chez de jeunes enfants, a ainsi pour conséquence une diminution des fonctions cérébrales (Moxon-Emre et al., 2016).

2.2.1.2. Dommages de l'ADN

L'ADN représente une cible critique des rayonnements ionisants qui peut subir différents dommages (Fig. 25) (Wang et al., 2018). Cette molécule est fréquemment endommagée par des lésions intrinsèques dues au métabolisme cellulaire, des agents chimiques et/ou des rayonnements de l'environnement (rayonnement solaire, pollution, tabac,...) (Burkart et al., 1999). Ainsi, une cellule va, chaque jour, faire face à des dommages endogènes. En moyenne, on comptabilise entre 10000 et 55000 cassures simple brin, 3200 bases oxydées, 12600 sites abasiques, 8 cassures double brin, et quelques pontages ADN-protéine (Wang et al., 2018).

Pour une irradiation de 1 Gy, on compte par cellule : 1000 cassures simple brin, 2000 bases oxydées, 250 sites abasiques, 40 cassures double brin, et 150 pontages ADN-protéique, supplémentaires (Ward, 1988).

Parmi ces dommages radio-induits ce sont les cassures double brins qui sont particulièrement létales et dont le nombre augmente significativement après irradiation en comparaison aux conditions physiologiques. Les cassures simple brin sont quant à elles considérées comme des lésions sublétales, elles sont individuellement réparables mais provoqueront la mort cellulaire en cas d'accumulation.

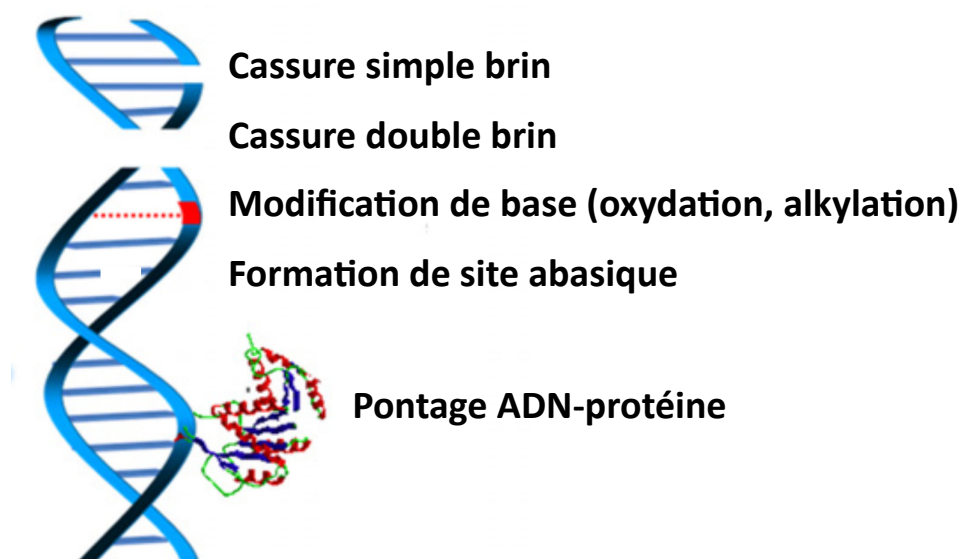


Figure 25. Les différents types de dommage de l'ADN

Les effets direct et indirect des rayonnements ionisants vont être à l'origine de différents dommages de l'ADN : cassure simple et double brin, modification de base, la formation d'un site abasique ou encore des pontages ADN-protéines.

Modifié de Wang et al., 2018

2.2.1.3. Dommages de la membrane cellulaire et des autres organites

En comparaison au noyau cellulaire, le cytoplasme des cellules est moins sensible aux rayonnements (Chapman and Nahum, 2016). Une irradiation du cytoplasme uniquement de 250 Gy empêche la prolifération cellulaire alors qu'une irradiation du noyau avec une dose de 2 Gy inhibe la division de la moitié des cellules. Néanmoins, les rayonnements ionisants peuvent également altérer directement la membrane cellulaire ainsi que des organites comme les ribosomes et les mitochondries (Somosy, 2000). Les principaux effets des rayonnements ionisants sur la membrane plasmique sont des modifications de structure et d'organisation comme l'oxydation des lipides insaturés et la génération de céramides ayant un rôle dans la signalisation cellulaire (Corre et al., 2010). L'ADN des mitochondries peut également être altéré entraînant des dysfonctions comme une production de ROS persistante dans des cellules irradiées (Kam and Banati, 2013 ; Szumiel, 2015). Il a été montré par une étude protéomique que la quantité de ribosomes diminue rapidement (1h) après irradiation (Bennetzen et al., 2018). Cette diminution est due à une transcription inhibée de l'ARN ribosomique mais surtout due à une protéolyse importante, les ribosomes ayant une demi-vie longue d'environ une semaine.

2.2.2. Réponse cellulaire aux dommages à l'ADN

Le maintien de l'intégrité du génome est essentiel pour maintenir l'homéostasie et assurer une transmission du matériel génétique intact au cours des générations cellulaires. L'ADN étant constamment endommagé par des agressions endogènes et environnementales, des mécanismes moléculaires hautement conservés et très bien coordonnés permettent le signalement et la réparation des lésions (Weeden and Asselin-Labat, 2018). Selon la nature de la lésion, différentes voies de réparation sont activées par la cellule (Fig. 26). L'ensemble de ces mécanismes est appelé la réponse aux dommages à l'ADN (DNA Damage Repair, DDR).

| DNA lesions | Pyrimidine dimers | DNA adducts DNA crosslinks | Base oxidation Base hydrolysis Base damage | Single strand breaks | Double strand breaks | Replication error |
|----------------------|-------------------|-------------------------------|--|----------------------|--|-------------------------|
| Common cause | UV | carcinogens | ROS, UV, high temperature | ionizing radiation | ionizing radiation, ROS, stalled replication forks | inherent in replication |
| Mechanisms of repair | NER | NER | BER | BER | HR NHEJ | MMR |

Figure 26. Les différents dommages à l'ADN, leurs sources et mécanismes de réparation associés

BER, base excision repair; HR, homologous recombination; MMR, mismatch repair; NER, nucleotide excision repair; NHEJ, non-homologous end joining; ROS, reactive oxygen species; UV, ultraviolet.

Modifié de Weeden and Asselin-Labat, 2018

En plus des mécanismes de réparation, les cellules répondent également aux dommages en arrêtant leur cycle cellulaire via l'activation de points de contrôle ou "checkpoints" ou en programmant leur mort en cas de dommages irréversibles (Kastan and Bartek, 2004).

2.2.2.1. Points de contrôle du cycle cellulaire

Il est important pour la cellule de réparer l'ensemble de ses dommages avant la division cellulaire, toute lésion non-réparée entraînant l'apparition d'une mutation chez une des cellules filles. Pour cela, trois points de contrôle sont présents pour arrêter le cycle cellulaire (Fig. 27) (Poon, 2016). Le point de contrôle en G1/S permet d'arrêter le cycle avant la réplication de l'ADN en cas de dommages ou de manque de matériel de synthèse nécessaire pour la réplication de l'ADN. Le point de contrôle en phase S permet de retarder la réplication pour permettre la réparation de dommages survenus pendant cette phase du cycle. Enfin le point de contrôle en phase G2/M est la dernière chance pour la cellule de réparer les lésions persistantes avant la division des deux cellules filles pendant la mitose.

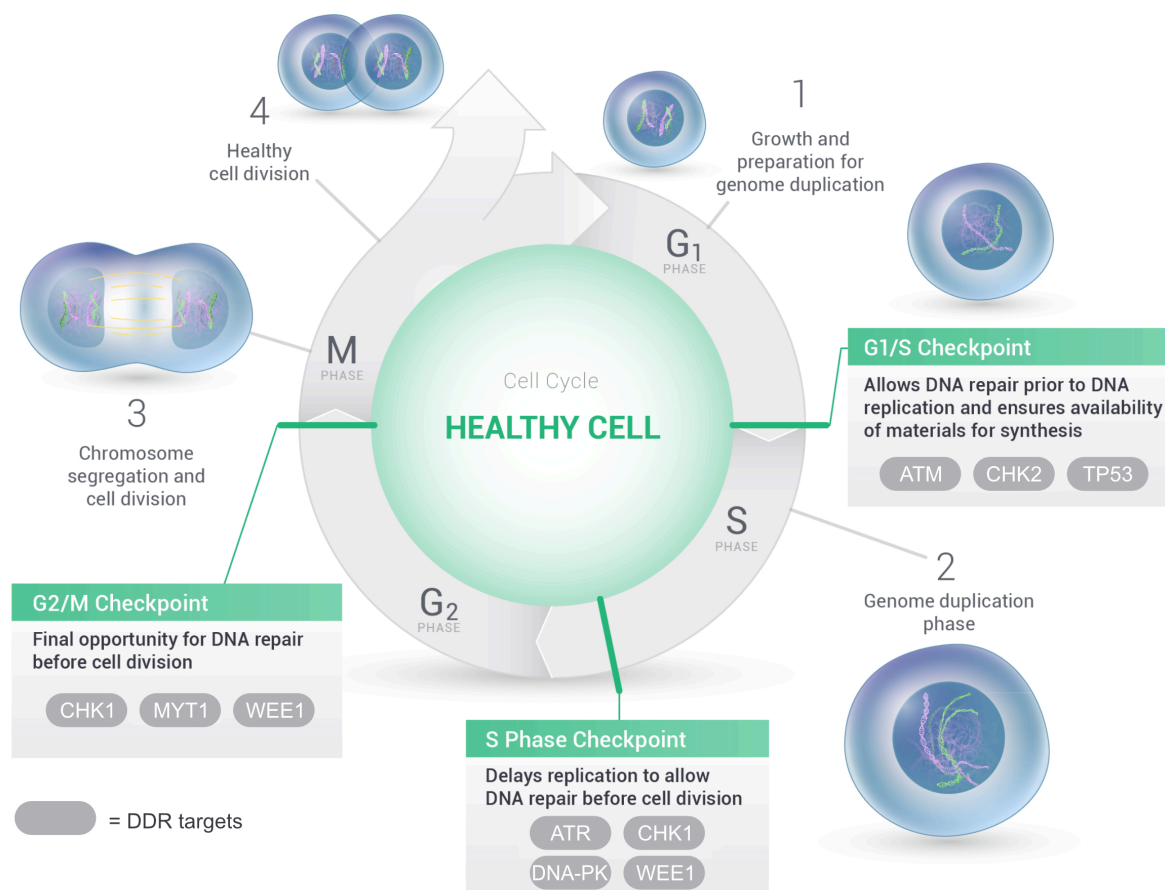


Figure 27. Points de contrôle du cycle cellulaire

L'intégrité de l'ADN est maintenue par la présence de points de contrôle ou "checkpoints" au cours de la progression du cycle cellulaire. En cas de dommages de l'ADN, les points de contrôles G1/S et G2/M permettent d'arrêter le cycle cellulaire et le point de contrôle en phase S permet de retarder la réplication de l'ADN.

Modifié de O'Connor, 2015 (image Zierra Oncology)

2.2.2.2. Signalisation des dommages à l'ADN

ATM, ATR et DNA-PKcs sont trois kinases présentant des similarités structurales qui appartiennent à la famille des phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-related kinases (PIKK) (Blackford and Jackson, 2017). Ces kinases sont recrutées et activées au niveau des dommages afin de transduire le signal aux protéines effectrices (Fig. 28). DNA-PKcs et ATM sont deux protéines recrutés au niveau des cassures double brin par les protéines KU70/KU80 et le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1), respectivement. La protéine ATR est recrutée, quant à elle, au niveau de l'ADN simple brin associé aux protéines RPA et ATRIP. Une cascade d'évènements va alors résulter de cette activation comme l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation des dommages.

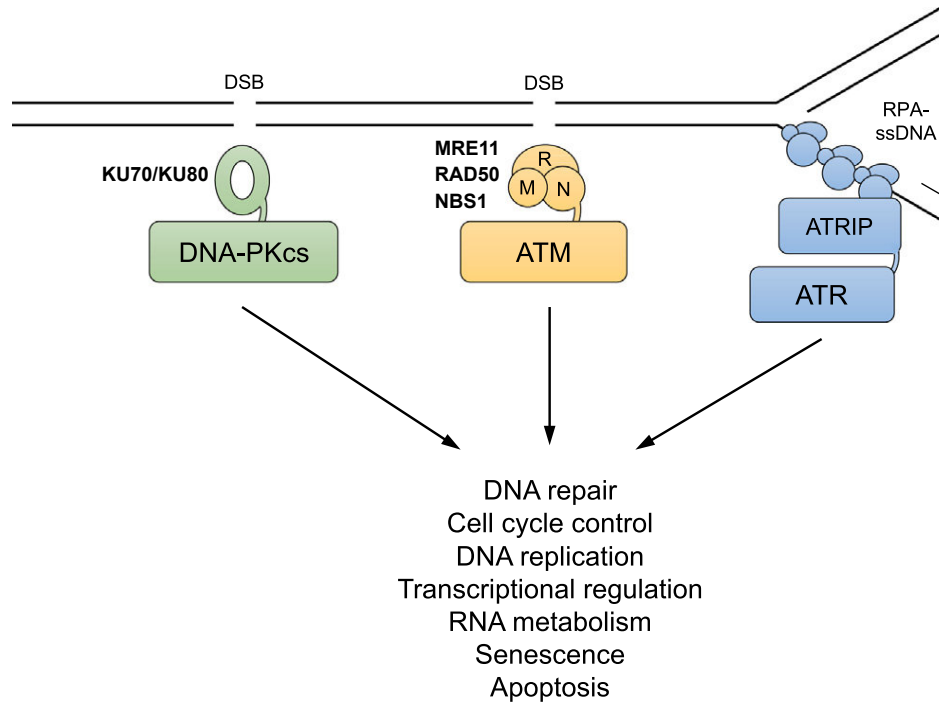


Figure 28. Modèle de recrutement et d'activation des PIKK : DNA-PKcs, ATM et ATR en réponse aux dommages à l'ADN

DNA-PKcs et ATM sont recrutés respectivement au niveau des cassures double brin par les protéines KU70/KU80 et le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1). ATR est recruté au niveau de l'ADN simple brin associé aux protéines RPA et ATRIP.

Modifié Blackford and Jackson, 2017

ATM est impliqué dans la réponse cellulaire des cassures double brin via la phosphorylation de nombreuses protéines (Matsuoka et al., 2007). Parmi celles-ci, l'histone H2AX est phosphorylée sur la serine en position 139 (γ H2AX) (Rogakou et al., 1998). La forme phosphorylée γ H2AX se situe au niveau des cassures double brin, induisant une modification de la structure de la chromatine et un recrutement d'autres protéines impliquées dans la réparation (van Attikum and Gasser, 2009).

ATR est impliqué dans la signalisation des structures d'ADN simple brin qui peuvent survenir lors de multiples événements comme des cassures double brin et simple brin, des ponts inter-brins ou encore en cas de stress répliatif (blocage de la fourche de réplication). La cible directe d'ATR est CHK1 qui va activer le point de contrôle de la phase S et ainsi inhiber l'activation de nouvelles origines de réplication via la dégradation de Cdc25A (Sørensen et al., 2003). CHK1 intervient également dans l'arrêt du cycle en G2/M pour empêcher l'entrée de la cellule en mitose si des dommages non-réparés persistent (Beucher et al., 2009).

ATM et ATR ont des fonctions communes, comme la phosphorylation d'H2AX et TP53 par exemple (Fig. 29) (Smith et al., 2010). Cela permet une compensation en cas de défaillance d'une des protéines.

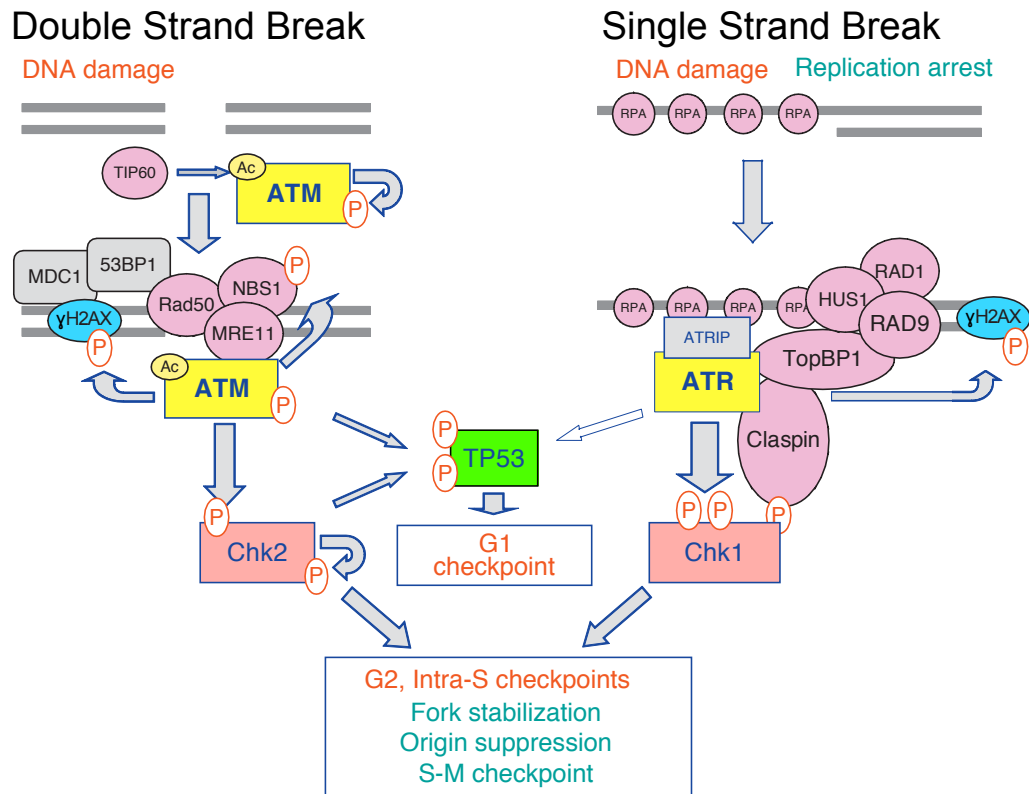


Figure 29. Activation des voies ATM-Chk2 et ATR-Chk1 en réponse aux dommages à l'ADN et à la présence d'ADN simple brin

Les phosphorylations sont indiquées par un P en orange et les acétylations par Ac en jaune
 Modifié de Smith et al., 2010

Les cassures simple brin réparées par excision de base (Base Excision Repair, BER) et sont signalées par la protéine Poly(Adénosine diphosphate (ADP)-Ribose) Polymérase (PARP) (Fig. 30) (Ray Chaudhuri and Nussenzweig, 2017). Ces cassures sont détectées par la protéine PARP1, qui s'active en utilisant des NAD^+ comme source d'ADP ribose pour synthétiser des homopolymères de Poly-ADP ribosyles (PAR) sur elle-même ainsi que sur d'autres protéines cibles. L'enzyme poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) est responsable de la dégradation des ces polymères de PAR. La coordination entre PARP1 et PARG assure une présence transitoire de concentrations élevées de PAR dans la cellule (Braun et al., 1994).

Cela permet le recrutement de protéines de réparation comme XRCC1 de la voie BER.

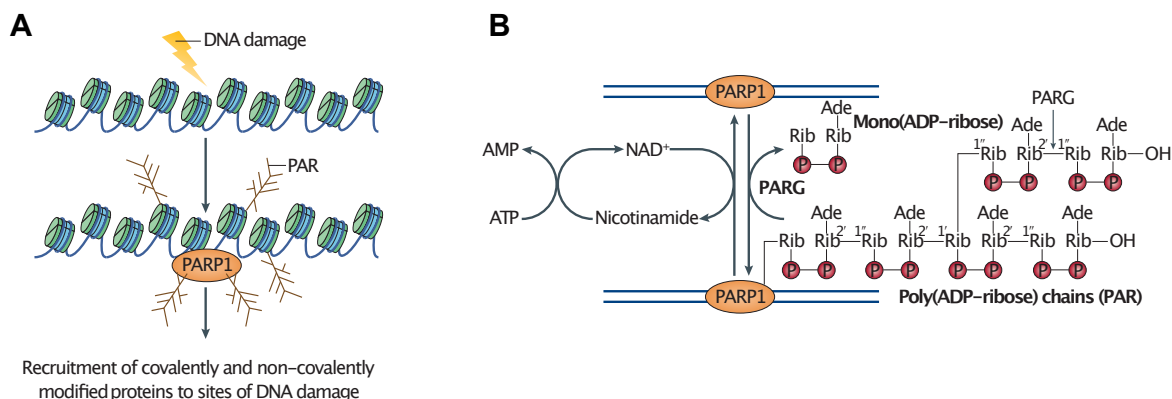


Figure 30. Signalisation des cassures simple brin par PARP1

A. Les cassures simple brin sont détectées par la protéine PARP1, qui s'active et synthétise des homopolymères de Poly-ADP ribosyles (PAR) sur elle-même ainsi que sur d'autres protéines cibles afin de permettre le recrutement de protéines de réparation comme XRCC1 de la voie BER. B. PARP1 utilise des NAD^+ comme source d'ADP ribose pour synthétiser des homopolymères Poly-ADP ribosyles. L'enzyme poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) est responsable de la dégradation de ces polymères de PAR.

Modifié Ray Chaudhuri and Nussenzweig, 2017

2.2.2.3. Réparation des dommages à l'ADN : NHEJ, HR et BER

Parmi les lésions toxiques radio-induites, les cassures double brin sont réparées par un mécanisme de ligation non homologue (Non Homologous End-Joining, NHEJ) dans 80% des cas (lors de la phase G0/G1 et début de phase S) ou par recombinaison homologue (Homologous Recombination, HR) lorsque le deuxième brin déjà répliqué peut servir de matrice pour la réparation (Beucher et al., 2009). Les cassures simple brin et les dommages de bases sont réparés par excision de base (Base Excision Repair, BER). L'ensemble des voies de réparation utilisent un processus similaire : après la signalisation du dommage, des protéines vont être recrutées et vont s'accumuler au niveau de la lésion pour leur réparation (Fig. 31).

Dans le cas de la NHEJ, après le recrutement de DNA-PKcs par KU70/KU80 et la signalisation de la cassure double brin, les extrémités de l'ADN vont être digérées par le complexe ARTEMIS puis les extrémités seront reliées par l'activité d'un complexe de polymérases et de ligases constitué de XRCC4, XLF et LigIV (Lans et al., 2012).

La réparation par la voie HR est la voie de réparation privilégiée lorsque la cellule est en fin de phase S ou en phase G2/M. C'est une réparation sans erreur puisqu'un brin

d'ADN déjà répliqué sert de modèle. La signalisation du dommage via ATM et le complexe MRN permet le recrutement de différents facteurs qui vont digérer les extrémités. L'ADN simple brin généré par la résection est immédiatement lié à RPA ensuite remplacée par la recombinaise RAD51. RAD51 favorise ensuite la recombinaison avec le brin d'ADN intact.

Les cassures simple brin sont signalées par PARP1 afin de recruter un complexe de polymérase et de ligases constitué pol β , XRCC1 et LigIII.

Dans le cas d'une base endommagée, celle-ci sera excisée par la Glycosylase générant ainsi un site apyrimidique. Celui-ci sera alors reconnu par l'endonucléase APE-1 qui catalysera l'ouverture de l'ADN et permettra au complexe de polymérase et de ligases constitué de pol β , XRCC1 et LigIII de finaliser la réparation (Krokan and Bjørås, 2013).

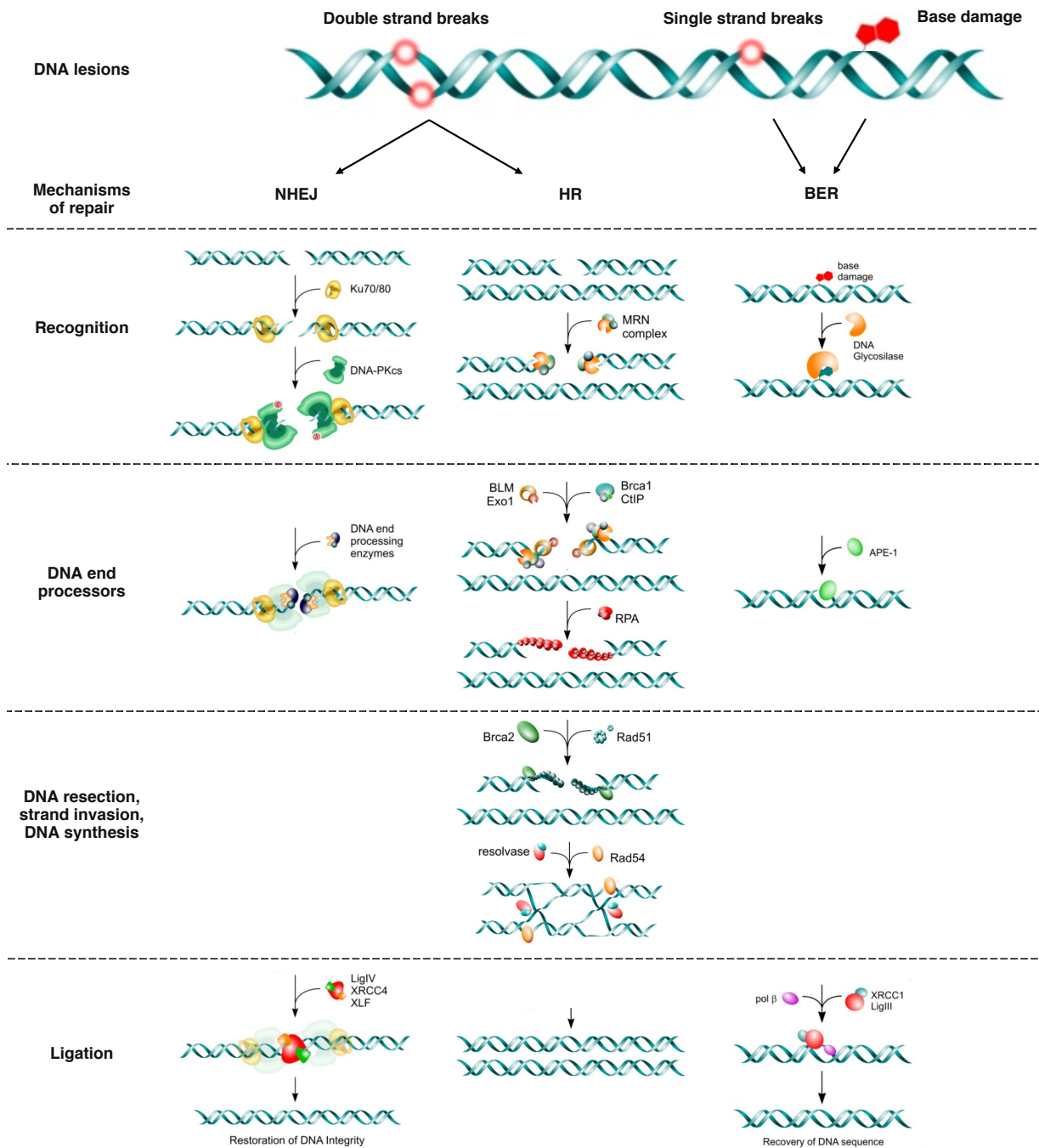


Figure 31. Mécanismes de réparation des dommages à l'ADN radio-induits

Les cassures double brin sont réparées majoritairement par la ligation non homologue (NHEJ). Lorsque le deuxième brin d'ADN est répliqué, celui-ci sert de matrice et les cellules utilisent alors la recombinaison homologue (HR) comme mécanisme de réparation de leurs cassures double brins. Les cassures simple brin et les dommages de bases sont réparés par excision de base (BER). Dans tous les modes de réparation, une étape de signalisation des dommages permet de recruter les protéines qui vont modifier les extrémités de l'ADN endommagé afin de réparer la lésion.

Modifié de Storici, 2011 & Lans et al., 2012

2.2.2.4. *Maintien de l'épigénome et rôle de l'histone H3.3 dans la réparation de l'ADN*

Les dommages à l'ADN et leur réparation constituent un challenge pour le maintien des marques épigénétiques (Dabin et al., 2016). Bien que les mécanismes de maintien des marques épigénétiques au cours de la réparation de l'ADN soit peu connus, il a été montré que pendant le processus de réparation, des protéines de remodelage de la chromatine sont recrutées au niveau des cassures (Lans et al., 2012). Parmi elles, la protéine Chromodomain Helicase DNA binding protein 2 (CHD2) est recrutée lors de la réparation de cassures double brin (Luijsterburg et al., 2016). CHD2 favorise le recrutement de l'histone H3.3 pour la reformation des nucléosomes lors de la voie NHEJ (Fig. 32). Luijsterburg et son équipe ont également montré qu'une inhibition de H3.3 entraîne une sévère réduction de NHEJ et une hypersensibilité à l'irradiation.

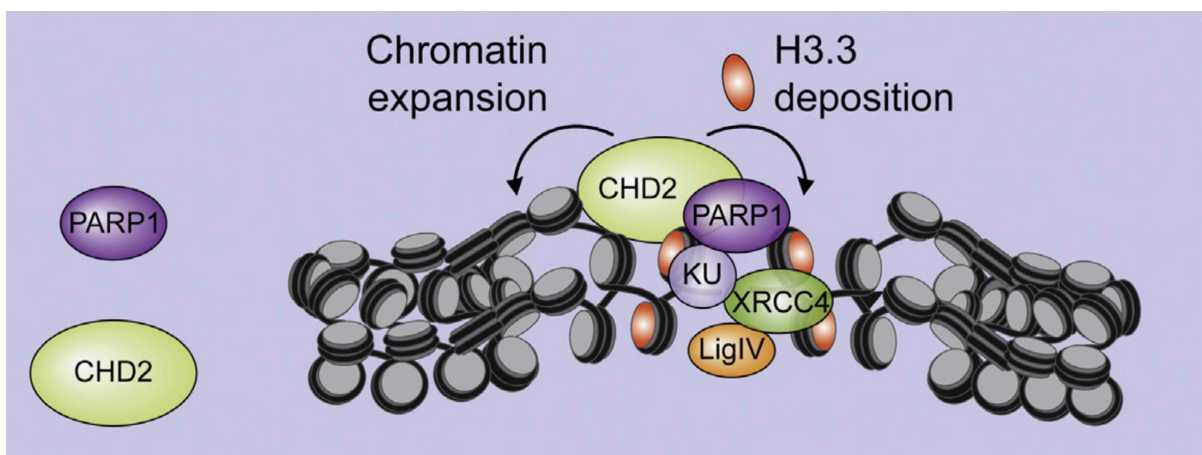


Figure 32. Le recrutement de l'histone H3.3 est médié par CHD2 lors de la réparation des cassures double brin par la voie NHEJ

PARP1 (poly(ADP-ribose) polymérase 1) recrute CHD2 (Chromodomain Helicase DNA binding protein 2) au niveau de la cassure double brin afin de favoriser le recrutement de l'histone H3.3 pour la reformation du nucléosome.

Adapté de Luijsterburg et al., 2016

3. Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (*review in preparation*)

Dans ce dernier chapitre qui fait l'objet d'une revue scientifique actuellement en préparation, nous présenterons les mécanismes de résistance à la radiothérapie dans les gliomes malins.

Pour cela, nous proposons une étude comparative entre les mécanismes de radioresistance des DIPG, des gliomes pédiatriques, et des glioblastomes, des gliomes adultes. Parmi les mécanismes de résistance à la radiothérapie, nous distinguerons les mécanismes de résistance dus à des propriétés intrinsèques aux cellules tumorales ou dues à des caractéristiques du microenvironnement.

Nous compléterons notre étude en présentant les différentes stratégies thérapeutiques utilisées, et en cours de développement, pour radiosensibiliser ces tumeurs.

Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts

Werbrouck, C¹; Debily, M-A^{1,2}; Castel D¹; Grill, J^{1,3}

- 1 U981, Molecular Predictors and New Targets in Oncology, INSERM, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, 94805, Villejuif, France.
- 2 Université d'Evry-Val d'Essonne, Boulevard François Mitterrand, Evry, 91057, France
- 3 Département de Cancérologie de l'Enfant et de l'Adolescent, Gustave Roussy, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Villejuif 94805, France.

Introduction

Brain tumors are among the most aggressive of all forms of cancer and the first contributor of cancer-related death in children, adolescent and young adults (Ostrom et al., 2018). Gliomas are the most common primary central nervous system (CNS) tumors. High-grade gliomas (HGG) account for 85% of gliomas in adults and for approximately 15-20% in children (Rasmussen et al., 2017), (Braunstein et al., 2017). Pediatric high-grade gliomas (pHGG) were considered to mimic their adult counterparts until recent genomic studies which unraveled significant differences between tumors arising at different ages (Bax et al., 2010),(Paugh et al., 2010). Indeed, distinct driver alterations and expression profiles emerge which may have an impact both on the way we interpret previous studies and design the future ones.

The World Health Organization (WHO) CNS classification, updated in 2016, included molecular parameters in addition to histology to define tumor entities (Louis et al., 2016). New entities have been defined and tumors have been re-classified, including gliomas. The more aggressive forms of HGG in children and in adults are, respectively, glioblastomas (GBM) and diffuse midline glioma H3K27M-mutant

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

(DMG) whose main archetypal tumor is diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) (**Table 1**). GBM represents around 60% of adults HGG (Ostrom et al., 2018). On the basis of the phase III trial of the EORTC (Stupp et al., 2005), standard treatment for these GBM comprises now surgical resection of the gross tumor mass followed by radiotherapy of 60Gy in 30–33 fractions of 1.8–2Gy with temozolomide (TMZ) as chemotherapy administered daily during and after radiotherapy. The addition of TMZ to standard radiotherapy has been adopted as a standard of care in pediatric non-brainstem HGG as well (Cohen et al., 2011), (Grill et al., 2018). The efficacy of TMZ is however limited in midline diffuse glioma, H3K27M mutant in adults as well as in children (Cohen et al., 2011), (Chassot et al., 2012), (Grill et al., 2018), (Grill et al., 2018). With respect to surgery, DMG are not resectable due to their deep-seated location in a sensitive area of the brain as well as their highly infiltrative nature. Since the discovery of the effect of RT on brainstem tumors sixty years ago (Coutel, 1959), this therapeutic modality has remained the only validated treatment for DMG. As in GBM, this usually consists in 3D conformal photon-based radiotherapy to a range of 54–59.4Gy given in 30–33 fractions of 1.8Gy daily (Cohen et al., 2017). A variety of adjuvant chemotherapeutic combinations and radiosensitizers have been used, but with disappointing results (Rechberger et al., 2019). Modifying radiotherapy schedules did not deeply impact outcome as well. Despite the use of radiation therapy in addition to surgery and chemotherapy, most patients harboring a GBM or children with DMG will die within 2 years of diagnosis.

Table 1. Key characteristics of primary high-grade gliomas

| | Glioblastoma (GBM) | Diffuse Intrinsic (archetypal DMG) | Pontine Glioma |
|---------------------------------|--|---|---|
| Age at diagnosis | 62 years | 6.5 years | |
| Localisation | Supratentorial | Midline structure | |
| Phenotype | Infiltrative Tumor mass Neoangiogenesis Extensive necrosis | Diffuse gliomas No tumor mass Limited angiogenesis | |
| Molecular characteristic | IDH wildtype TERT promoteur mutations (72%) EGFR amplifications (35%) TP53 mutations (27%) PTEN loss (24%) | H3 K27M (94%) H3.1 K27M (21%) - ACVR1 (83%) - PI3K/Akt/mTOR (58%) - TP53 (16%) - PDGFRA mutations (8%) | H3.3 K27M (73%) - TP53 (80%) - PI3K/Akt/mTOR (16%) - ATRX (14%) - PDGFRA mutations (9%) - ACVR1 (2%) |
| Treatment standard | Surgery + radiotherapy (60 Gy in 30–33 fractions of 1.8–2 Gy) + chemotherapy | Radiotherapy (54–59.4 Gy in 30–33 fractions of 1.8 Gy) | |
| Median OS | 15 months | 10.8 months | |
| References | (Louis et al., 2016) | (Cohen et al., 2017), (Mackay et al., 2017) | |

Recently, Cancer Research UK identified the challenges that must be overcome if we want to cure more effectively patients with a brain tumor (Aldape et al., 2019). Among them, a better understanding of the radioresistance and the processes that drive the development and progression of these brain tumors are essential. It is therefore crucial to model why some tumors respond better and longer to radiotherapy and how, sooner or later, all tumors will relapse.

Radiotherapy using ionizing radiation (IR) is commonly used in HGG treatment (Khan et al., 2016). IR damages the DNA directly by generating a high number of DNA double-stranded breaks (DSB) which are very toxic and can be mutagenic if erroneously repaired by the cell, and indirectly by the generation of reactive oxygen

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

species (ROS) as a result of the ionization of water (Morgan and Sowa, 2005). ROS, like hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$), can diffuse into the nucleus and are responsible of about 80% of the DNA damage, though various base alterations (Riley, 1994), (Cadet et al., 2010).

Radioresistance can be understood like an evolutionary process where the organism is submitted to a catastrophic event (*i.e.* radiation) followed by a recovery phase. This recovery phase can be called adaptation, *i.e.* the acquisition or selection of advantageous innovations allowing survival as shown for climate changes (Smit and Pilifosova, 2001). Three levels of adaptation to climate change are commonly described which we can adapt to resistance to treatment in cancer:

- i) reactive or anticipated (changes occur after the exposure or are already present in the cells before the exposure); in this case, the tumor cells are constitutively resistant to radiation therapy thanks to the innate efficacy of DNA Damage Response (DDR) for example and this capacity is expressed after exposure,
- ii) public or private (in all cell population or in specific subclones); this refers to the same kind of characteristics as in i), but it can be which ones are present in all tumor cells or restricted to some clones or cell state, *e.g.* cancer stem cells,
- iii) spontaneous or planned : changes occur randomly and the one enabling survival are favoured like in classical Darwinian evolution and in this case tumor cell heterogeneity is the defensive line for tumor maintenance whatever change occurs in the milieu. These adaptation processes can differ from one tumor to the other or even from one part of the tumor cells and the others. A simplified model is described in figure 1, considering that radioresistance can be innate, clonal or acquired (where the resistance mechanism to radiotherapy does not exist before exposure). Consequently in this later case, radioresistance is difficult to predict.

In this review, we propose a literature search comparing radioresistance mechanisms in malignant GBM occurring in adults and in pediatric DIPG.

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

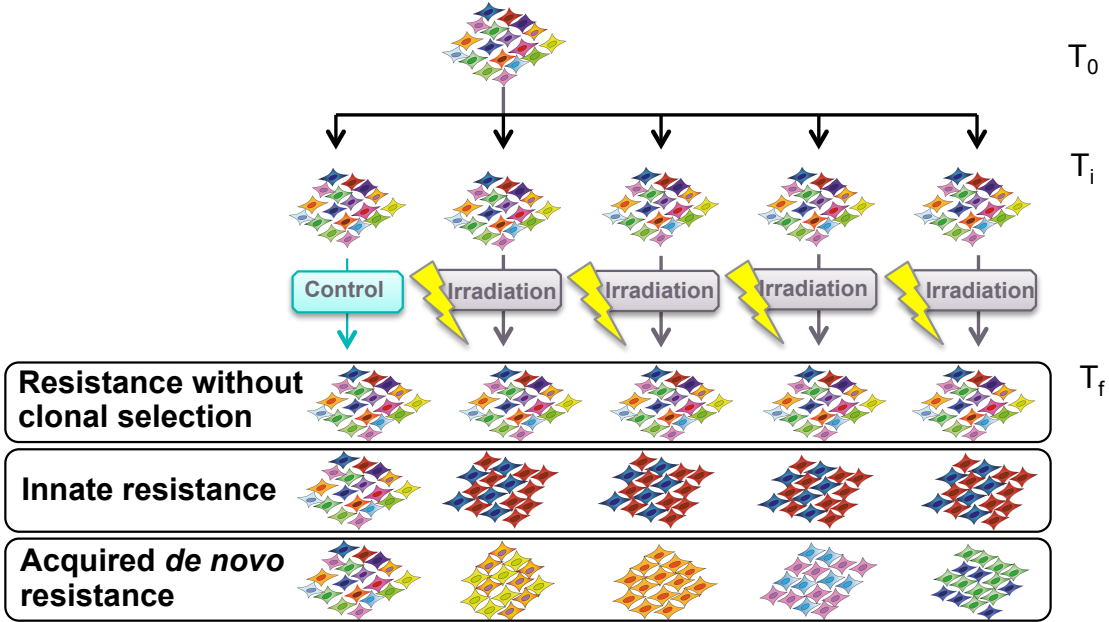


Figure 1. Innate, clonal or acquired radioresistance

For the same cell population treated by radiotherapy, all the cells can be resistant to irradiation (innate resistance without clonal selection), or just some subclones. In the resistant subclones, the radioresistance can be innate or acquired *de novo* during the treatment. If the resistance is acquired, that means it does not exist before exposure and can be acquired by all the cells.

Radioresistance mechanisms

We can divide artificially the mechanisms of resistance to ionizing radiations into cell-intrinsic or microenvironmental mechanisms. For a given tumor, one should acknowledge that many of these mechanisms could be mixed together.

1. Cell-intrinsic mechanisms of radioresistance

1.1. Stem cells properties

Stem cells (SCs) have both a self-renewal ability in order to maintain an undifferentiated state and the capacity to differentiate into cells with tissue specific functions (Blanpain et al., 2011). Until the discovery of neural stem cells (NSC) in adult, brain was considered as an organ with limited regeneration ability (Ma et al., 2009). Studies suggested that the cancer stem cells (CSC) subpopulation, intrinsically more resistant to therapies, contribute to tumor maintenance and recurrence (Schonberg et al., 2014). By definition, a few glioma stem-like cells (GSCs) can be sufficient to initiate a tumor in GBM (Singh et al., 2004) as well as we showed in DIPG, (Plessier et al., 2017). Moreover, it has been shown in adult GBM xenografts, that the fraction of tumor cells expressing CD133 (Prominin-1), a SC biomarker, is enriched after irradiation (Bao et al., 2006). CD44, another SC marker has been implicated in the promotion of radioresistance in GBM models (Liu et al., 2020). As stemness is a state and not a fate in tumors, differentiated cells can acquire SC features through the interaction with their microenvironment (Dufour et al., 2009), (Hide et al., 2019). In the case of GBM where the number of cancer SC is initially limited, tumor cells adapt to radiotherapy by increasing or selecting cells with stemness features. In DIPG however, most of the tumor cells have a stemness signature at diagnosis (Filbin et al., 2018) which could explain the high degree of radioresistance observed in these tumors. One could therefore speculate that in DIPG, high level of stemness offers an innate resistance to radiotherapy.

1.1.1. Enhanced DNA damage response

Stem cells show an enhanced DNA damage response (DDR) through a more robust activation of DNA-damage checkpoint protein (ATM, Chk1 and Chk2) and a more efficient DNA repair activity (Blanpain et al., 2011). The radioresistance due to enhanced DDR has been described for CSCs in different tumor types (Krause et al., 2017). Impairing Chk1 and Chk2 activity could reverse radioresistance of GSC (Bao et al., 2006). One of the key regulators of stemness in GBM, PAF, regulates also translesion synthesis in response to radiation therapy further linking stemness and radioresistance (Ong et al., 2017). In DIPG, we did not identify different repair capacity between GSCs and neural SC, suggesting a repair capacity at least equivalent to normal NSC repair capacity; in addition, GSC with different initial response to radiotherapy did not show differences in their DDR capacity measured with Gamma-H2AX foci kinetics (Werbrouck et al., 2019).

1.1.2. Slow rate of cell divisions

Ionizing radiation causes DNA damages, which, if not repaired will lead to cell death. Dividing cells are therefore more sensitive to radiation damage (Pawlik and Keyomarsi, 2004). In several tumor types, slow-cycling cells partly explain resistance to therapy (Moore and Lyle, 2011). In GBM, it has been shown that quiescence contributes to the recurrence after therapy (Campos et al., 2014), (Sabelström et al., 2019). DIPG stem cells have also prolonged doubling time *in vitro* (Plessier et al., 2017). In glioblastomas also, upregulation of the cell-cycle checkpoint response via overexpression of miR1, miR125a, miR150, and/or miR425 have been shown to promote radioresistance (Moskwa et al., 2014). In this case, this could be viewed as a private innate adaptive mechanism to radiation therapy.

1.1.3. ROS management

In normal cells, ROS are highly regulated by the ROS scavenging system *i.e.* antioxidant enzymes (Bigarella et al., 2014). In case of an excessive accumulation of ROS, cells contain different types of enzymes specific to different species of ROS to prevent pathological levels to be reached. Cancer SCs radioresistance seems to be related to an enhanced ROS defense (Rycaj and Tang, 2014). In gliomas for

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

example, a study on cell lines (U87, SHG44, SU-2) showed a down regulation of miR-153 that increases glutathione peroxidase 1 (GPx1) transcription via nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf-2) overexpression, which in turn decreases the ROS levels (Yang et al., 2015). Alternatively, 6PGD activity was linked to intracellular ROS detoxification via the activation of the pentose phosphate pathway. This explains why EGFR signalling which activates 6PGD through its Fyn-dependent phosphorylation is associated with radioresistance (Liu et al., 2019).

Enhanced ROS scavenging activity can therefore be considered as an adaptive physiological mechanism following irradiation.

1.2. Genomic alterations associated with radioresistance

Thanks to advances in genomics and neurosurgery, it is now possible to genotype all brain tumors at diagnosis and also at relapse. These types of resistance can be identified initially in all or part of the tumor cells (the more heterogeneous the tumor is, the higher the possibility for resistant clones to emerge), selected during tumor progression when they were initially clonal or acquired during progression.

1.2.1. Tumor suppressor protein 53 (TP53) mutations

In response to cellular stress, like ionizing radiation, TP53 is activated leading to several cellular responses that include transient cell cycle arrest, DDR, apoptosis and senescence (Joerger and Fersht, 2016). TP53 dysfunction has been linked to radioresistance in some adult cancers like in head and neck cancer (Skinner et al., 2012). In adult GBM, this finding has not been ascertained in clinical studies (Shih et al., 2005; Felsberg et al., 2009; Tanguturi et al., 2017; Romano et al., 2018), but, in preclinical models TP53 dysfunction has been associated with radioresistance (Shu et al., 1998). In DIPG, we showed a strong impact of TP53 mutational status on DIPG response to RT and marginally on survival, identifying a subset of patients with an extremely poor outcome (Werbrouck et al., 2019). In other pediatric cancers like medulloblastoma, TP53 mutations have been associated with a worse prognosis after irradiation and TP53 knock-down was associated with increased radioresistance *in vitro* (Zhukova et al., 2014). In pediatric non brainstem high grade glioma, TP53 mutations have been linked to a worse outcome (Pollack et al., 2002).

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

TP53 mutations show either high variant allele frequency (VAF) compatible with an innate resistance (most frequent case, (Werbrouck et al., 2019)) or lower VAF suggesting a later and subclonal event. *TP53* mutations have not been found in excess in autopsy samples compared to diagnostic samples (Wu et al., 2014), (Taylor et al., 2014).

1.2.2. PI3K/AKT/mTOR pathway

The PI3K/AKT/mTOR signalling pathway is activated in different cancer types. It is an important pathway regulating cell cycle mechanisms, including survival, proliferation, growth, metabolism, angiogenesis and metastasis (Ersahin et al., 2015). In adult malignant gliomas, the PI3K/AKT/mTOR pathway is commonly activated by EGFR amplification and/or by a loss of PTEN, the major brake of the pathway (Schonberg et al., 2014). This pathway is frequently altered by mutations in DIPG (Taylor et al., 2014) and may contribute to their radioresistance. Indeed, activation of PI3K/Akt/mTOR pathway has been shown to confer radioresistance in subpopulations of medulloblastoma cells (Rycaj and Tang, 2014) and inhibition of PI3K/Akt/mTOR signalling radiosensitize glioma cells (Agliaio et al., 2017), (Dadey et al., 2017), (Mehta et al., 2015), (Eshleman et al., 2002). Another study showed that after fractionated radiation of X-rays, resistant cells presented a constitutive activation of AKT and downstream cyclin D1 nuclear retention (Shimura, 2017).

1.2.3. Other pathways

Notch and Wnt/ β -Catenin pathways are activated in glioma cells and involved in radioresistance through maintenance of the stem cell phenotype (Kelley et al., 2016). The activation of the Notch pathways is correlated with EGFR activation, which occurs in adult GBM. Its activation promotes survival and self-renewal of NSC through the overexpression of *Hes1* which inhibit neuronal and glial differentiation (Liu et al., 2015). The Wnt/ β -Catenin pathways play a role in embryonic development via the regulation of stem cells population. The β -Catenin expression has been correlated with GBM malignancy (Liu et al., 2011). These two pathways are not altered by mutations neither in adults nor in pediatric HGG, this type of resistance is thus adaptive. Radioresistant glioma cells have a gene expression signature that is enriched in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) pathway (IWADATE, 2016).

1.2.4. Polyploidy

Polyploid cells contain abnormal high amount of genetic material leading to a higher metabolic activity. This process is enhanced by loss of TP53 which functions as guardian of ploidy (Aylon and Oren, 2011). It has been shown that polyploid cells provide a survival mechanism for TP53 mutant cells after DNA damage (Illidge et al., 2000). In a *TP53*-mutated DIPG cell line (JHH-DIPG-1) authors have suggested that the radioresistance could be linked to polyploidy as well (Smyth et al., 2018). This characteristic is present at diagnosis but could also evolve over time.

1.2.5 Mutation load

Well described in bacteria, hypermutability occurs by error-prone DNA double-strand break (DSB) repair under stressful conditions (Gonzalez et al., 2008). It is known that the mutation rates of cells increase after a mutagenic exposures. A recent study analyzed the mutation burden of more than 81,000 tumors (Campbell et al., 2017). Hypermutations were sometimes found in tumors without high mutation rates at diagnosis. For samples at relapse, the primary cause of hypermutation was the treatment itself. For example, recurrent GBM treated with radiotherapy and temozolomide, an alkylating agent, have a specific mutational signature on the genome and often an alteration of the MMR pathway (Shinsato et al., 2013), (Felsberg et al., 2011), (Barthel et al., 2019). The authors did not discuss the effect of radiotherapy. Interestingly, studies suggest that ionizing radiation induce a relative low number of mutations (Behjati et al., 2016), (Giordano et al., 2018), (Jonna et al., 2019). Interestingly as well, hypermutant tumours at diagnosis, e.g. in the congenital mismatch repair deficiency, are not more radioresistant. This suggests that the increase of mutations after treatment is more a consequence than a cause (Barthel et al., 2019).

1.2.6 Specific amplification or mutation enriched after irradiation

Numerous changes are observed in GBM after treatment but most of them have not been clearly associated with radioresistance. In the diffuse gliomas analyzed by the GLASS consortium, acquired aneuploidy was frequently detected in recurrent gliomas and was characterized by IDH mutation but without co-deletion of chromosome arms 1p/19q, and further converged with acquired alterations in the cell cycle and poor outcomes (Barthel et al., 2019).

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

In DIPG, mutations in *ATRX* and *PDGFRA* amplification are frequent at autopsy but rare at diagnosis (Taylor et al., 2014). Strict comparisons have not been made yet, especially in paired samples analyzed at diagnosis and at autopsy.

2. Role of the microenvironment in radioresistance

Resistance to radiation therapy is not only due to intrinsic factors in the glioma cells themselves, but also to properties of the tumor microenvironment in the brain. It has been shown that GSCs reside in specific perivascular niches and several factors of the microenvironment may influence cellular response to radiation (Mannino and Chalmers, 2011).

2.1. Hypoxia

Hypoxia, a consequence of imbalance between oxygen availability and consumption of the proliferating cancer cells, is one of the most important causes of resistance to radiotherapy (Wang et al., 2019). The role of hypoxia in the treatment failure can be explained by its direct effect on tumor microenvironment and indirectly through tumor cell modifications. Hypoxia is present in the tumor at diagnosis (innate resistance of only part of the tumor) but could also be part of the tissular response to radiotherapy, culminating with the phenomenon of radionecrosis. Radiologically, areas with low perfusion have been associated with treatment resistance in GBM (Li et al., 2019).

2.1.1. Hypoxia maintains stem cell properties

A hypoxic microenvironment maintains GSCs in a “quiescent” state preserving their potential to proliferate and differentiate, thus protecting them from the effect of ionizing radiation (Mannino and Chalmers, 2011), (Fidoamore et al., 2016). It promotes reprogramming of non-stem population towards cancer SCs and induces the expression of the stem cells factors octamer-binding transcription factor-4 (OCT4) and cellular-myelocytomatosis viral oncogene (c-MYC) (Heddleston et al., 2009).

2.1.2. Hypoxia favors resistance to ROS and promotes autophagy

ROS are the primary cause of cell death after irradiation, but hypoxic cells are considered to be resistant to ROS (Wang et al., 2019). Interestingly, ROS production is increased in hypoxic cells, which render cells adaptive to hypoxia through stimulation of antioxidant production. A higher ROS production activates also autophagy, a lysosomal degradation pathway that accelerates clearance of ROS. It has been shown in osteosarcoma (Feng et al., 2016), non-small cell lung cancer (Chen et al., 2017) and breast cancer (He et al., 2012) that hypoxia-induced autophagy confers resistance to IR. Data on gene expression indicated higher expression levels for genes involved in ROS metabolism in GBM cell lines and orthotopic xenografts (Kelley et al., 2016). In adult GBM, DDR1 (discoidin domain receptor tyrosine kinase 1) has been shown to drive radioresistance by modulating autophagy (Vehlow and Cordes, 2019).

2.1.3. Hypoxia promotes angiogenesis

The first cellular reaction to hypoxia is the promotion of angiogenesis to provide oxygen to the tumor cells, through the expression of hypoxia-inducible factors (HIFs), a highly conserved transcription factors (Liu et al., 2017). HIFs upregulate a number of genes, like vascular endothelial growth factor (VEGF), leading to endothelial cell growth and formation of new vascular structure. It has been shown that CD133+ GSCs of GBM may produce VEGF themselves (Fidoamore et al., 2016). Conversely, DIPG are histological defined by an extensive infiltration of the brain parenchyma without neovascularization in general (Plessier et al., 2017) but the H3.1-K27M subtypes shows a pro-angiogenic gene expression signature driven by HIF1alpha (Castel et al., 2015). Recent data showed that microenvironment changes, e.g. increase in vessels markers, are present when tumor grow back after radiation therapy in preclinical models (Seo et al., 2019). Angiogenesis promotion by HIF1alpha via exosomes has been recently associated with radioresistance (Dai et al., 2019). In this case, the resistance is considered adaptive and possibly constitutively present since the initiation of the tumour.

2.2. Astrocytes

Astrocytes are important regulators of neuronal activity and brain functions via secreted proteins and cell-to-cell interaction, playing an important role in the neurovascular unit of the blood-brain barrier (Jha et al., 2018), (Vasile et al., 2017). Some studies have suggested that astrocytes increase the radioresistance of GSCs. They influenced the induction and repair of DNA DSBs *i.e.* a reduction of radiation-induced γ H2AX foci in GSCs via a paracrine-based mechanism (Rath et al., 2015), (Liu et al., 2017). Jamal *et al.* confirm that GBM cells have a better capacity to repair DNA damage *in vivo* than *in vitro* (Jamal et al., 2010). This effective DDR is promoted with the secretion by astrocytes of the cytokine transforming growth factor- β (TGF- β) in the tumor microenvironment (Rycaj and Tang, 2014), (Bayin et al., 2016). After an *in vitro* co-culture with astrocytes, the JAK/STAT, MAPK/JNK, and NF κ B signaling pathways were overexpressed in GSCs (Rath et al., 2015). The JNK signaling was also described as essential for the radioresistance in GSCs (Rycaj and Tang, 2014). The pro-survival NF- κ B signaling pathway is activated in many cancers including ependymomas which are often radioresistant (Tang et al., 2001), (Danial and Korsmeyer, 2004), (Pagès et al., 2019). Recently, it has been shown that activation of *PTGS2*/NF- κ B signaling pathway enhances radioresistance of GBM cells as well (Tan et al., 2019).

2.3. Microglia

The microglia cells are the only resident immune cells in the brain (Wolf et al., 2017). They play an important role in the maintenance of CNS homeostasis. The microglia can be activated by different stresses or pathologies. Two states of activation have been described as M1 (inflammatory) and M2 (anti-inflammatory). Microglia plays a role in NF- κ B activation, that has been shown to enhance radioresistance (Rycaj and Tang, 2014). Moreover, in GBM a high density of microglia is found near GSCs niche, and it has been suggested that substances secreted by the microglia are essential for GSCs growth (Wu and Watabe, 2017). Microglia secrete IL-6, IL-10 and TGF- β 1 which have been show to promote GSC growth and resistance to radiotherapy (Wang et al., 2009), (Wu et al., 2010), (Miller et al., 2014), (Hide et al., 2018). Conversely, DIPG do not present an inflammatory tumor microenvironment (Lin et al., 2018). There are no tumor-infiltrating lymphocytes, no expression of most

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

chemokines and cytokines and no NK cell infiltration but a clear microglia infiltration has been shown in anecdotal reports (Lin et al., 2018). No data is available regarding the evolution of microglial infiltration after irradiation.

2.4. Neurons

Neurons have the ability to receive, process and transmit electrical and chemical signals. As astrocytes, neurons are more resistant to IR than other brain cells (Ivanov and Hei, 2014). The neurons have the ability to stimulate GSCs growth through the expression of fibroblast growth factor (FGF) (Pettmann et al., 1986). It has been shown that FGF receptor 1 induce GBM radioresistance through the PLC γ /Hif1 α pathway (Gouazé-Andersson et al., 2016). After silencing FGFR1 or PLC γ , the authors showed a downexpression of Hif1 α and better response *in vitro* and *in vivo* to radiotherapy in GBM models (U87 and LN18). This mechanism could be innate in some gliomas, especially when they are driven by an FGFR alteration. Recent studies from the Monje lab demonstrate that the synaptic adhesion molecule neuroligin-3 (NLGN3), a neuronal cell surface proteins that can be release in the microenvironment under a soluble form sNLGN3 by ADAM10 metalloprotease, is necessary for DIPG and GBM growth (Venkatesh et al., 2017). NLGN3 induces the expression of several synaptic genes and promoting neuron-to-glioma synaptogenesis that seems to drive DIPG progression (Venkatesh et al., 2019). NLGN3 activates the PI3K-mTOR pathway and oncogenic pathways as activation of focal adhesion kinase (FAK) on glioma cells which in turn may play a role in radioresistance but this would need further investigations.

2.5 Metabolism

Energy metabolic changes in tumour cells has been associated since several years with inherent and acquired resistance to radiotherapy (Moreno-Sánchez et al., 2007), (Barker et al., 2015). Radiotherapy requires the presence of oxygen to fix DNA radicals and cause DNA damage. In glioblastomas, oxygen gradients have been identified as in many other tumours and regions with high glycolysis and hypoxia could lead to this resistance. In some cancers, changing the glycolytic metabolism towards and oxidative metabolism was shown for years to increase radiosensitivity (Görlach and Acker, 1994). Cancer cells near the vessels have a different metabolism driven by mTOR pathway showing intense anabolism and defying the

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

Warburg principle through exercising extensive oxidative phosphorylation (Kumar et al., 2019). Gene expression changes in aerobic glycolysis, like the increased expression of glucose transporter Glut1, by AKT-mediated alterations have also been linked to acquired radioresistant cells (Shimura et al., 2014).

Fibrosis/gliosis is the response of the normal tissue to radiotherapy which can lead to radioresistance partly by contributing to cycling hypoxia (Barker et al., 2015). Cancer associated fibroblasts are instrumental in this respect as well as ECM component such as Tenascin-C or growth factors such as TGF- β .

Overcoming radioresistance with targeted therapies

Recent advanced in the understanding of the biology of these tumors and the development of pertinent models have allowed to identify promising targeted therapies in the context of irradiation (Table 2).

1. Targeting cell intrinsic vulnerabilities

1.1. Targeting DNA damage response

TP53 loss or mutations have been linked to radioresistance in gliomas *in vitro* (Shu et al., 1998) and in patients (Werbrouck et al., 2019). *TP53* is essential for G1 checkpoint cell cycle arrest. Thus, targeting the remaining S and G2/M checkpoints sensitize cells to RT (Biddlestone-Thorpe et al., 2013). Silencing ATM, CHK1, WEE1 increased radiosensitivity of glioma cells as shown in several *in vitro* studies (Li et al., 2017), (Wu et al., 2012), (Toledo et al., 2015), (Werbrouck et al., 2019). Different ATM inhibitors have been evaluated for their antitumoral effect (Jin and Oh, 2019). As example, KU60019 increased survival of GBM orthotopic *TP53* deficient mice in combination with RT (2). But pharmacokinetics revealed a very poor capacity to cross BBB (Vecchio et al., 2015). Recent ATM inhibitor from AstraZeneca AZD1390 has been designed to cross the BBB and is currently in phase I (NCT03423628) for adult GBM in combination with radiotherapy (Durant et al., 2018). We demonstrated

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

that Prexasertib (LY2606368), a CHK1 inhibitor, radiosensitize *TP53* mutant models of DIPG *in vitro* (Werbrouck et al., 2019). Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of Prexasertib in medulloblastoma-bearing mice showed its CNS penetration (Campagne et al., 2020). Prexasertib was a promising candidate under evaluation in phase I/II studies including brain tumors, but its development was however stopped by Eli-Lilly (NCT02808650). Adavosertib (AZD1775), a WEE1 inhibitor, has shown a good BBB penetration in a phase 0 study (NCT02207010) in recurrent glioblastoma patients (Sanai et al., 2018) and the combination with RT and TMZ in GMB is currently under evaluation in Phase I (NCT01849146) study. PARP is an enzyme involved in single-strand breaks and base excision repair and a promising target to radiosensitize glioma cells. Clinical trials with promising PARP inhibitors (ABT-888) have been disappointed in the treatment of GBM (Robins et al., 2016)(Gupta et al., 2019).

1.2. Targeting epigenetic changes

Epigenetic changes have been described in pHGG, especially in DIPG. Indeed DIPG harbour a H3K27M mutation and consequently a PRC2 dysfunction leading to a global loss of trimethylation at K27 residue of histone H3. Epigenetic modifiers appear interesting to overcome TMZ resistance in adult GBM, as well (Romani et al., 2018)(Banelli et al., 2015). HDAC inhibitors have already been used as radiosensitizers and cause persistent DNA double-strand breaks associated with decreased DNA damage signalling and repair (Groselj et al., 2018), (Rivera et al., 2017). Panobinostat, an HDAC inhibitor, have been first identified by a screen of 83 compounds in DIPG cells (Grasso et al., 2015) and recently by Monje group in a high-throughput combination drug screen in DIPG (Lin et al., 2019). A Phase I study as single agent is ongoing (NCT02717455). Another HDAC inhibitor, Valproic acid, has also shown activity in adult GBM and is under clinical investigation in a Phase II study (Lu et al., 2018). Targeting the histone demethylases is attractive in DIPG and GBM (Romani et al., 2019). GSKJ4, a JMJD3 inhibitor, improved survival and radiosensitized a DIPG model (Katagi et al., 2019) but has not been tested in clinic yet. Several BET bromodomain proteins inhibitors, as JQ-1 or OTX015, have show antitumor activity in DIPG and GBM (Wadhwa and Nicolaidis, 2016) and have been shown to impair DSB repair and synergize with PARP inhibitors. Unfortunately,

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

OTX015 did not show activity as single agent in recurrent GBM patients in a Phase I study (NCT02296476).

1.3. Targeting growth factor/mTOR genomic alterations

Targeting growth factor receptors, like EGFR and PDGFR, are frequently amplified or mutated in GBM and DIPG. Until now, therapies directed against EGFR (Erlotinib) or PDGFRA (Dasatinib) did not reach the expectations in the treatment of GBM (An et al., 2018), (Lassman et al., 2015). Erlotinib and Dasatinib are still under investigation in DIPG (NCT02233049). A new antibody drug-conjugate anti-EGFR (ABT-414) showed promising result in phase I/II and are currently under investigation in phase II/III (van den Bent et al., 2017).

In GBM, EGFR alterations lead to an activation of downstream proteins in the PI3K/AKT/mTOR pathway. This pathway is also often deregulated in DIPG. Unfortunately, various PI3K/AKT/mTOR inhibitors do not show any clinical benefits in GBM (Li et al., 2016). In this respect both brain penetration and residency time in the brain and tumor are critical. One mTOR inhibitor, everolimus has been approved for the treatment of brain tumors in the context of Tuberous Sclerosis Complex (Franz et al., 2015). One of the promising novel drug is ZSTK474, a pan PI3K inhibitor, where preclinical data suggest that it is brain penetrant (Lin et al., 2017).

Targeting other genomic alteration such as *ACVR1* mutations in DIPG patients with BBB penetrant ALK2 inhibitors (LDN-193189 and LDN-214117) has shown a slight benefit in preclinical vivo models (Carvalho et al., 2019). These inhibitors could be interesting for this subgroup of patients in combination with other therapeutic approaches including radiotherapy. No such combinations have been tested preclinically so far.

The biggest challenge will be to define the best combinatorial therapeutic strategies to target the heterogeneity and subclonal nature of the different alterations of these brain tumors.

1.4. Targeting the proteasome

Several studies have shown an activity of proteasome inhibitor in glioma cells (Styczynski et al., 2006)(Yin et al., 2005)(Vlashi et al., 2010). Recently, Marizomib

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

was identified by the Monje group in a screen (Lin et al., 2019) and they suggest to use it in combination with Panobinostat (HDAC inhibitor). The combination of proteasome inhibitor and HDAC inhibitor lead to mitochondrial dysfunction and an increase of ROS level which could be of interest concomitantly with irradiation (Pei et al., 2004). Marizomib is interesting due to his ability to cross the BBB (Di et al., 2016). The drug is currently in a phase III trial with GBM in combination with RT and TMZ (NCT03345095).

2. Targeting tumour-microenvironment interactions

2.1. Angiogenesis

Restoring normoxic conditions has been identified as a way to increase radiosensitivity. As tumor angiogenesis is associated with hypoxia (simultaneously cause and consequence), many anti-angiogenic have been evaluated in clinical trials of GBM. Bevacizumab (Avastin), a monoclonal antibody to VEGF, was approved by the FDA in the US in 2009 for use in patient with a GBM progression on prior therapy and improved overall survival of two to three months (4.0mo vs 6.7mo) of these patients (Ghiaseddin and Peters, 2015). In children however, at diagnosis, the addition of bevacizumab to the standard chemoradiotherapy regimen did not improve progression-free survival (Grill et al., 2018). According to Touat *et al.*, the dependence of tumor vasculature seems low in most of the patients (Touat et al., 2017). This is especially true in DIPGs that present almost no vascularity.

2.2. Secreted factors

TGF- β is a secreted cytokine, which promote glioma growth. Unfortunately, no molecules targeting TGF- β as single agents have shown significant clinical benefits (Han et al., 2015). Recently, targeting NLGN3 clivage with ADAM10 inhibitors showed promising preclinical results in terms of survival prolongation in mice models (Venkatesh et al., 2017). It has not been tested in a clinical trial yet.

2.3. Metabolism and mitochondria

After radiotherapy, there are many targets in the microenvironment that could be modulated to increase radiosensitivity. Some of them currently tested in the clinic. As examples, modulating glucose metabolism with dichloroacetate has been used to radiosensitize glioblastomas (Shen et al., 2015). The repurposing of metabolic drug like Metformin, an antidiabetic agent used in type 2 diabetes targeting the oxidative phosphorylation or Disulfiram, that inhibits the aldehyde dehydrogenase (ALDH), are under investigation several clinical trials for treatment of HGG (Seliger and Hau, 2018). Mitochondria are relevant targets to increase radiosensitivity. ONC201 is a new mitochondria-targeting drug that hyperactivate the mitochondrial protease ClpP leading to a loss of respiratory of the cells (Wang and Dougan, 2019). ONC201 is currently under evaluation in a phase II in recurrent GBM and DMG (NCT02525692). The interaction of this drug with radiotherapy has not been evaluated yet.

2.4. Fibrosis and extracellular matrix (ECM) remodelling

As cancer associated fibroblasts play a role in ECM remodelling and inflammation, which leads to radiation fibrosis/gliosis, antifibrotic agents have been tested in malignant gliomas such as perifosine in DIPG (Becher et al., 2017). It is an intense area of research that has not yet turned into clinical benefits for the patients. Others targets such as tenascin-C have been explored with radiolabeled antibodies alone (Reardon et al., 2008) but the impact was limited.

3. Immunotherapies

Immunotherapy has revolutionized the cancer care. Current state of immunotherapy for glioblastoma has already been reviewed extensively by Lim *et al.* in 2018 (Lim et al., 2018). Hypermutant HGG are the best candidates for immunotherapy with PD1 antibodies (Bouffet et al., 2016). The challenge is that most GBM and even more DIPG are considered as “cold tumors” with a very limited immune infiltration (Lin et al., 2018). In the HERBY trial, anti-VEGF therapy was suggested to improve response specifically in pHGG with more immune infiltration (Mackay et al., 2018). However, the action of the immune system relies on the identification of specific

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

antigens while GBM and DIPG do not present a high mutations burden. The combinations with radiotherapy may be associated with an immunogenic cell death that could be beneficial for immunotherapy, showing in some cases an abscopal effect (Preusser et al., 2015). It is also possible that responses to immunotherapies such as PD-1 blockade vary according to the tumour genotype (Zhao et al., 2019). Nevertheless, advances in the understanding of biology of these tumors and the immunology of brain should allow the development of effective immunotherapies.

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

Table 2. Clinical trial on going in primary high-grade gliomas

| Target | Compound | Clinical stage | Name of the study |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|---|
| <i>DNA repair</i> | | | |
| ATM | AZD1390 | Phase I (NCT03423628) | A Study to Assess the Safety and Tolerability of AZD1390 Given With Radiation Therapy in Patients With Brain Cancer |
| CHK1 | LY2606368 (Prexasertib) | Phase I (NCT02808650) | Prexasertib in Treating Pediatric Patients With Recurrent or Refractory Solid Tumors (including CNS tumors) |
| WEE1 | Adavosertib (AZD1775) | Phase I (NCT01849146) | Adavosertib, Radiation Therapy, and Temozolomide in Treating Patients With Newly Diagnosed or Recurrent Glioblastoma |
| <i>Epigenetic</i> | | | |
| HDAC | Panobinostat | Phase I (NCT02717455) | Trial of Panobinostat in Children With Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (PBTC-047) |
| | Valproic acid | Phase II (NCT00302159) | Valproic Acid With Temozolomide and Radiation Therapy to Treat Brain Tumors |
| <i>Genomic alterations</i> | | | |
| EGFR PDGFRA mTOR | Erlotinib Dasatinib Everolimus | Phase II (NCT02233049) | Biological Medicine for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG) Eradication (BIOMEDE) |
| EGFR | ABT-414 (ADC) | Phase II/III (NCT02573324) | A Study of ABT-414 in Subjects With Newly Diagnosed Glioblastoma (GBM) With Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Amplification (Intelligence1) |
| <i>Others</i> | | | |
| Proteasome | Marizomib | Phase III (NCT03345095) | A Phase III Trial of With Marizomib in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma |
| Mitochondria | ONC201 | Phase I (NCT02525692) | Oral ONC201 in Recurrent GBM, H3 K27M Glioma, and Midline Glioma |

Conclusion

HGG remains one of the biggest challenges in oncology. For decades, patients harboured very poor prognosis and at relapse, therapeutics options were limited. Tumour cells are very resistant to RT due to intrinsic tumors cells properties and particular microenvironment of the brain. Fortunately, biology of these tumors becomes clearer and many vulnerabilities have already been identified. As radiotherapy will remain the mainstay of the treatment for most of the HGG, one major future step for eradicating these tumors will be to design targeted therapies with abilities to penetrate the CNS and enhance radiosensitivity.

Acknowledgments

JG, MAD and DC acknowledge financial support from Société Française de Lutte contre les Cancers et les Leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent, The Cure Starts Now, Fédérations Enfants Et Santé and charities “The DIPG Collaborative” and “L'Etoile de Martin”. CW was supported by a fellowship from “Course of Excellence in Oncology – Fondation Philanthropia”.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Agliano, A., Balarajah, G., Ciobota, D.M., Sidhu, J., Clarke, P.A., Jones, C., Workman, P., Leach, M.O., and Al-Saffar, N.M.S. (2017). Pediatric and adult glioblastoma radiosensitization induced by PI3K/mTOR inhibition causes early metabolic alterations detected by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Oncotarget* **8**, 47969–47983.

Aldape, K., Brindle, K.M., Chesler, L., Chopra, R., Gajjar, A., Gilbert, M.R., Gottardo, N., Gutmann, D.H., Hargrave, D., Holland, E.C., et al. (2019). Challenges to curing primary brain tumours. *Nat Rev Clin Oncol* **16**, 509–520.

An, Z., Aksoy, O., Zheng, T., Fan, Q.-W., and Weiss, W.A. (2018). Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFRvIII in glioblastoma (GBM): signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene* **37**, 1561–1575.

Aylon, Y., and Oren, M. (2011). p53: guardian of ploidy. *Mol Oncol* **5**, 315–323.

Banelli, B., Carra, E., Barbieri, F., Würth, R., Parodi, F., Pattarozzi, A., Carosio, R., Forlani, A., Allemanni, G., Marubbi, D., et al. (2015). The histone demethylase KDM5A is a key factor for the resistance to temozolomide in glioblastoma. *Cell Cycle* **14**, 3418–3429.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756–760.

Barker, H.E., Paget, J.T.E., Khan, A.A., and Harrington, K.J. (2015). The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 409–425.

Barthel, F.P., Johnson, K.C., Varn, F.S., Moskalik, A.D., Tanner, G., Kocakavuk, E., Anderson, K.J., Abiola, O., Aldape, K., Alfaro, K.D., et al. (2019). Longitudinal molecular trajectories of diffuse glioma in adults. *Nature* **576**, 112–120.

Bax, D.A., Mackay, A., Little, S.E., Carvalho, D., Viana-Pereira, M., Tamber, N., Grigoriadis, A.E., Ashworth, A., Reis, R.M., Ellison, D.W., et al. (2010). A distinct spectrum of copy number aberrations in pediatric high-grade gliomas. *Clin. Cancer Res.* **16**, 3368–3377.

Bayin, N.S., Ma, L., Thomas, C., Baitalmal, R., Sure, A., Fansiwala, K., Bustoros, M., Golfinos, J.G., Pacione, D., Snuderl, M., et al. (2016). Patient-Specific Screening Using High-Grade Glioma Explants to Determine Potential Radiosensitization by a TGF- β Small Molecule Inhibitor. *Neoplasia* **18**, 795–805.

Becher, O.J., Millard, N.E., Modak, S., Kushner, B.H., Haque, S., Spasojevic, I., Trippett, T.M., Gilheeny, S.W., Khakoo, Y., Lyden, D.C., et al. (2017). A phase I study of single-agent perifosine for recurrent or refractory pediatric CNS and solid tumors. *PLoS ONE* **12**, e0178593.

Behjati, S., Gundem, G., Wedge, D.C., Roberts, N.D., Tarpey, P.S., Cooke, S.L., Van Loo, P., Alexandrov, L.B., Ramakrishna, M., Davies, H., et al. (2016). Mutational signatures of ionizing

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

radiation in second malignancies. *Nat Commun* 7.

van den Bent, M., Gan, H.K., Lassman, A.B., Kumthekar, P., Merrell, R., Butowski, N., Lwin, Z., Mikkelsen, T., Nabors, L.B., Papadopoulos, K.P., et al. (2017). Efficacy of deatuxizumab mafodotin (ABT-414) monotherapy in patients with EGFR-amplified, recurrent glioblastoma: results from a multi-center, international study. *Cancer Chemother Pharmacol* 80, 1209–1217.

Biddlestone-Thorpe, L., Sajjad, M., Rosenberg, E., Beckta, J.M., Valerie, N.C.K., Tokarz, M., Adams, B.R., Wagner, A.F., Khalil, A., Gilfor, D., et al. (2013). ATM kinase inhibition preferentially sensitizes p53-mutant glioma to ionizing radiation. *Clin. Cancer Res.* 19, 3189–3200.

Bigarella, C.L., Liang, R., and Ghaffari, S. (2014). Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development* 141, 4206–4218.

Blanpain, C., Mohrin, M., Sotiropoulou, P.A., and Passegué, E. (2011). DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 16–29.

Bouffet, E., Larouche, V., Campbell, B.B., Merico, D., de Borja, R., Aronson, M., Durno, C., Krueger, J., Cabric, V., Ramaswamy, V., et al. (2016). Immune Checkpoint Inhibition for Hypermutant Glioblastoma Multiforme Resulting From Germline Biallelic Mismatch Repair Deficiency. *JCO* 34, 2206–2211.

Braunstein, S., Raleigh, D., Bindra, R., Mueller, S., and Haas-Kogan, D. (2017). Pediatric high-grade glioma: current molecular landscape and therapeutic approaches. *J. Neurooncol.* 134, 541–549.

Cadet, J., Douki, T., and Ravanat, J.-L. (2010). Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radical Biology and Medicine* 49, 9–21.

Campagne, O., Davis, A., Maharaj, A.R., Zhong, B., Stripay, J., Farmer, D., Roussel, M.F., and Stewart, C.F. (2020). CNS penetration and pharmacodynamics of the CHK1 inhibitor prexasertib in a mouse Group 3 medulloblastoma model. *Eur J Pharm Sci* 142, 105106.

Campbell, B.B., Light, N., Fabrizio, D., Zatzman, M., Fuligni, F., de Borja, R., Davidson, S., Edwards, M., Elvin, J.A., Hodel, K.P., et al. (2017). Comprehensive Analysis of Hypermutation in Human Cancer. *Cell* 171, 1042-1056.e10.

Campos, B., Gal, Z., Baader, A., Schneider, T., Sliwinski, C., Gassel, K., Bageritz, J., Grabe, N., von Deimling, A., Beckhove, P., et al. (2014). Aberrant self-renewal and quiescence contribute to the aggressiveness of glioblastoma. *J. Pathol.* 234, 23–33.

Carvalho, D., Taylor, K.R., Olaciregui, N.G., Molinari, V., Clarke, M., Mackay, A., Ruddle, R., Henley, A., Valenti, M., Hayes, A., et al. (2019). ALK2 inhibitors display beneficial effects in preclinical models of ACVR1 mutant diffuse intrinsic pontine glioma. *Commun Biol* 2, 156.

Castel, D., Philippe, C., Calmon, R., Le Dret, L., Truffaux, N., Boddaert, N., Pagès, M., Taylor, K.R., Saulnier, P., Lacroix, L., et al. (2015). Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol.* 130, 815–827.

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

Chassot, A., Canale, S., Varlet, P., Puget, S., Roujeau, T., Negretti, L., Dhermain, F., Rialland, X., Raquin, M.A., Grill, J., et al. (2012). Radiotherapy with concurrent and adjuvant temozolomide in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma. *J. Neurooncol.* 106, 399–407.

Chen, X., Wang, P., Guo, F., Wang, X., Wang, J., Xu, J., Yuan, D., Zhang, J., and Shao, C. (2017). Autophagy enhanced the radioresistance of non-small cell lung cancer by regulating ROS level under hypoxia condition. *Int. J. Radiat. Biol.* 93, 764–770.

Cohen, K.J., Pollack, I.F., Zhou, T., Buxton, A., Holmes, E.J., Burger, P.C., Brat, D.J., Rosenblum, M.K., Hamilton, R.L., Lavey, R.S., et al. (2011). Temozolomide in the treatment of high-grade gliomas in children: a report from the Children's Oncology Group. *Neuro-Oncology* 13, 317–323.

Cohen, K.J., Jabado, N., and Grill, J. (2017). Diffuse intrinsic pontine gliomas-current management and new biologic insights. Is there a glimmer of hope? *Neuro-Oncology*.

Coutel, Y. (1959). [Infiltrating glioblastoma of the brain stem in an 8-year-old child; normalization of the pneumoencephalogram after radiotherapy]. *Rev Otoneuroophthalmol* 31, 119–123.

Dadey, D.Y.A., Kapoor, V., Hoyer, K., Khudanyan, A., Collins, A., Thotala, D., and Hallahan, D.E. (2017). Antibody Targeting GRP78 Enhances the Efficacy of Radiation Therapy in Human Glioblastoma and Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines and Tumor Models. *Clin. Cancer Res.* 23, 2556–2564.

Dai, X., Liao, K., Zhuang, Z., Chen, B., Zhou, Z., Zhou, S., Lin, G., Zhang, F., Lin, Y., Miao, Y., et al. (2019). AHIF promotes glioblastoma progression and radioresistance via exosomes. *International Journal of Oncology* 54, 261–270.

Daniel, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205–219.

Di, K., Lloyd, G.K., Abraham, V., MacLaren, A., Burrows, F.J., Desjardins, A., Trikha, M., and Bota, D.A. (2016). Marizomib activity as a single agent in malignant gliomas: ability to cross the blood-brain barrier. *Neuro-Oncology* 18, 840–848.

Dufour, C., Cadusseau, J., Varlet, P., Surena, A.-L., Faria, G.P. de, Dias-Morais, A., Auger, N., Léonard, N., Daudigeos, E., Dantas-Barbosa, C., et al. (2009). Astrocytes Reverted to a Neural Progenitor-like State with Transforming Growth Factor Alpha Are Sensitized to Cancerous Transformation. *STEM CELLS* 27, 2373–2382.

Durant, S.T., Zheng, L., Wang, Y., Chen, K., Zhang, L., Zhang, T., Yang, Z., Riches, L., Trinidad, A.G., Fok, J.H.L., et al. (2018). The brain-penetrant clinical ATM inhibitor AZD1390 radiosensitizes and improves survival of preclinical brain tumor models. *Sci Adv* 4, eaat1719.

Ersahin, T., Tuncbag, N., and Cetin-Atalay, R. (2015). The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol. Biosyst.* 11, 1946–1954.

Eshleman, J.S., Carlson, B.L., Mladek, A.C., Kastner, B.D., Shide, K.L., and Sarkaria, J.N. (2002). Inhibition of the mammalian target of rapamycin sensitizes U87 xenografts to fractionated radiation

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

therapy. *Cancer Res.* 62, 7291–7297.

Felsberg, J., Rapp, M., Loeser, S., Fimmers, R., Stummer, W., Goepfert, M., Steiger, H.-J., Friedensdorf, B., Reifenberger, G., and Sabel, M.C. (2009). Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin. Cancer Res.* 15, 6683–6693.

Felsberg, J., Thon, N., Eigenbrod, S., Hentschel, B., Sabel, M.C., Westphal, M., Schackert, G., Kreth, F.W., Pietsch, T., Löffler, M., et al. (2011). Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. *International Journal of Cancer* 129, 659–670.

Feng, H., Wang, J., Chen, W., Shan, B., Guo, Y., Xu, J., Wang, L., Guo, P., and Zhang, Y. (2016). Hypoxia-induced autophagy as an additional mechanism in human osteosarcoma radioresistance. *J Bone Oncol* 5, 67–73.

Fidoamore, A., Cristiano, L., Antonosante, A., d'Angelo, M., Di Giacomo, E., Astarita, C., Giordano, A., Ippoliti, R., Benedetti, E., and Cimini, A. (2016). Glioblastoma Stem Cells Microenvironment: The Paracrine Roles of the Niche in Drug and Radioresistance. *Stem Cells Int* 2016.

Filbin, M.G., Tirosh, I., Hovestadt, V., Shaw, M.L., Escalante, L.E., Mathewson, N.D., Neftel, C., Frank, N., Pelton, K., Hebert, C.M., et al. (2018). Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq. *Science* 360, 331–335.

Franz, D.N., Agricola, K., Mays, M., Tudor, C., Care, M.M., Holland-Bouley, K., Berkowitz, N., Miao, S., Peyrard, S., and Krueger, D.A. (2015). Everolimus for subependymal giant cell astrocytoma: 5-year final analysis. *Ann. Neurol.* 78, 929–938.

Ghaseddin, A., and Peters, K.B. (2015). Use of bevacizumab in recurrent glioblastoma. *CNS Oncol* 4, 157–169.

Giordano, F.A., Veldwijk, M.R., Herskind, C., and Wenz, F. (2018). Radiotherapy, tumor mutational burden, and immune checkpoint inhibitors: time to do the math. *Strahlenther Onkol* 194, 873–875.

Gonzalez, C., Hadany, L., Ponder, R.G., Price, M., Hastings, P.J., and Rosenberg, S.M. (2008). Mutability and importance of a hypermutable cell subpopulation that produces stress-induced mutants in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* 4, e1000208.

Görlach, A., and Acker, H. (1994). pO₂- and pH-gradients in multicellular spheroids and their relationship to cellular metabolism and radiation sensitivity of malignant human tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1227, 105–112.

Gouazé-Andersson, V., Delmas, C., Taurand, M., Martinez-Gala, J., Evrard, S., Mazoyer, S., Toulas, C., and Cohen-Jonathan-Moyal, E. (2016). FGFR1 Induces Glioblastoma Radioresistance through the PLC γ /Hif1 α Pathway. *Cancer Res.* 76, 3036–3044.

Grasso, C.S., Tang, Y., Truffaux, N., Berlow, N.E., Liu, L., Debily, M.-A., Quist, M.J., Davis, L.E., Huang, E.C., Woo, P.J., et al. (2015). Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Med* 21, 555–559.

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

Grill, J., Massimino, M., Bouffet, E., Azizi, A.A., McCowage, G., Cañete, A., Saran, F., Le Deley, M.-C., Varlet, P., Morgan, P.S., et al. (2018). Phase II, Open-Label, Randomized, Multicenter Trial (HERBY) of Bevacizumab in Pediatric Patients With Newly Diagnosed High-Grade Glioma. *J. Clin. Oncol.* *36*, 951–958.

Groselj, B., Ruan, J.-L., Scott, H., Gorrill, J., Nicholson, J., Kelly, J., Anbalagan, S., Thompson, J., Stratford, M.R.L., Jevons, S.J., et al. (2018). Radiosensitization In Vivo by Histone Deacetylase Inhibition with No Increase in Early Normal Tissue Radiation Toxicity. *Mol. Cancer Ther.* *17*, 381–392.

Gupta, S.K., Smith, E.J., Mladek, A.C., Tian, S., Decker, P.A., Kizilbash, S.H., Kitange, G.J., and Sarkaria, J.N. (2019). PARP Inhibitors for Sensitization of Alkylation Chemotherapy in Glioblastoma: Impact of Blood-Brain Barrier and Molecular Heterogeneity. *Front Oncol* *8*.

Han, J., Alvarez-Breckenridge, C.A., Wang, Q.-E., and Yu, J. (2015). TGF- β signaling and its targeting for glioma treatment. *Am J Cancer Res* *5*, 945–955.

He, W.-S., Dai, X.-F., Jin, M., Liu, C.-W., and Rent, J.-H. (2012). Hypoxia-induced autophagy confers resistance of breast cancer cells to ionizing radiation. *Oncol. Res.* *20*, 251–258.

Heddleston, J.M., Li, Z., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., and Rich, J.N. (2009). The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* *8*, 3274–3284.

Hide, T., Komohara, Y., Miyasato, Y., Nakamura, H., Makino, K., Takeya, M., Kuratsu, J.-I., Mukasa, A., and Yano, S. (2018). Oligodendrocyte Progenitor Cells and Macrophages/Microglia Produce Glioma Stem Cell Niches at the Tumor Border. *EBioMedicine* *30*, 94–104.

Hide, T., Shibahara, I., and Kumabe, T. (2019). Novel concept of the border niche: glioblastoma cells use oligodendrocytes progenitor cells (GAOs) and microglia to acquire stem cell-like features. *Brain Tumor Pathol* *36*, 63–73.

Illidge, T.M., Cragg, M.S., Fringes, B., Olive, P., and Erenpreisa, J.A. (2000). Polyploid giant cells provide a survival mechanism for p53 mutant cells after DNA damage. *Cell Biol. Int.* *24*, 621–633.

Ivanov, V.N., and Hei, T.K. (2014). Radiation-induced glioblastoma signaling cascade regulates viability, apoptosis and differentiation of neural stem cells (NSC). *Apoptosis* *19*, 1736–1754.

IWADATE, Y. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett* *11*, 1615–1620.

Jamal, M., Rath, B.H., Williams, E.S., Camphausen, K., and Tofilon, P.J. (2010). Microenvironmental regulation of glioblastoma radioresponse. *Clin. Cancer Res.* *16*, 6049–6059.

Jha, M.K., Kim, J.-H., Song, G.J., Lee, W.-H., Lee, I.-K., Lee, H.-W., An, S.S.A., Kim, S., and Suk, K. (2018). Functional dissection of astrocyte-secreted proteins: Implications in brain health and diseases. *Prog. Neurobiol.* *162*, 37–69.

Jin, M.H., and Oh, D.-Y. (2019). ATM in DNA repair in cancer. *Pharmacology & Therapeutics* *203*, 107391.

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

Joerger, A.C., and Fersht, A.R. (2016). The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 375–404.

Jonna, S., Vanderwalde, A.M., Nieva, J.J., Poorman, K.A., Saul, M., von Buttlar, X., Hu, J.Y., and Liu, S.V. (2019). Impact of prior chemotherapy or radiation therapy on tumor mutation burden in NSCLC. *JCO* 37, 2627–2627.

Katagi, H., Louis, N., Unruh, D., Sasaki, T., He, X., Zhang, A., Ma, Q., Piunti, A., Shimazu, Y., Lamano, J.B., et al. (2019). Radiosensitization by Histone H3 Demethylase Inhibition in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Clin. Cancer Res.* 25, 5572–5583.

Kelley, K., Knisely, J., Symons, M., and Ruggieri, R. (2016). Radioresistance of Brain Tumors. *Cancers (Basel)* 8.

Khan, M.N., Sharma, A.M., Pitz, M., Loewen, S.K., Quon, H., Poulin, A., and Essig, M. (2016). High-grade glioma management and response assessment—recent advances and current challenges. *Curr Oncol* 23, e383–e391.

Krause, M., Dubrovskaya, A., Linge, A., and Baumann, M. (2017). Cancer stem cells: Radioresistance, prediction of radiotherapy outcome and specific targets for combined treatments. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 109, 63–73.

Kumar, S., Sharife, H., Kreisel, T., Mogilevsky, M., Bar-Lev, L., Grunewald, M., Aizenshtein, E., Karni, R., Paldor, I., Shlomi, T., et al. (2019). Intra-Tumoral Metabolic Zonation and Resultant Phenotypic Diversification Are Dictated by Blood Vessel Proximity. *Cell Metabolism* 30, 201-211.e6.

Lassman, A.B., Pugh, S.L., Gilbert, M.R., Aldape, K.D., Geinoz, S., Beumer, J.H., Christner, S.M., Komaki, R., DeAngelis, L.M., Gaur, R., et al. (2015). Phase 2 trial of dasatinib in target-selected patients with recurrent glioblastoma (RTOG 0627). *Neuro-Oncology* 17, 992–998.

Li, C., Yan, J.-L., Torheim, T., McLean, M.A., Boonzaier, N.R., Zou, J., Huang, Y., Yuan, J., Dijken, B.R.J. van, Matys, T., et al. (2019). Low perfusion compartments in glioblastoma quantified by advanced magnetic resonance imaging and correlated with patient survival. *Radiotherapy and Oncology* 134, 17–24.

Li, X., Wu, C., Chen, N., Gu, H., Yen, A., Cao, L., Wang, E., and Wang, L. (2016). PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget* 7, 33440–33450.

Li, Y., Li, L., Wu, Z., Wang, L., Wu, Y., Li, D., Ma, U., Shao, J., Yu, H., and Wang, D. (2017). Silencing of ATM expression by siRNA technique contributes to glioma stem cell radiosensitivity in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* 38, 325–335.

Lim, M., Xia, Y., Bettegowda, C., and Weller, M. (2018). Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 422–442.

Lin, F., Gooijer, M.C. de, Hanekamp, D., Chandrasekaran, G., Buil, L.C.M., Thota, N., Sparidans, R.W., Beijnen, J.H., Würdinger, T., and Tellingan, O. van (2017). PI3K–mTOR Pathway Inhibition Exhibits Efficacy Against High-grade Glioma in Clinically Relevant Mouse Models. *Clin Cancer Res*

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

23, 1286–1298.

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

Lin, G.L., Wilson, K.M., Ceribelli, M., Stanton, B.Z., Woo, P.J., Kreimer, S., Qin, E.Y., Zhang, X., Lennon, J., Nagaraja, S., et al. (2019). Therapeutic strategies for diffuse midline glioma from high-throughput combination drug screening. *Sci Transl Med* 11.

Liu, R., Li, W., Tao, B., Wang, X., Yang, Z., Zhang, Y., Wang, C., Liu, R., Gao, H., Liang, J., et al. (2019). Tyrosine phosphorylation activates 6-phosphogluconate dehydrogenase and promotes tumor growth and radiation resistance. *Nature Communications* 10, 1–14.

Liu, W.-H., Lin, J.-C., Chou, Y.-C., Li, M.-H., and Tsai, J.-T. (2020). CD44-associated radioresistance of glioblastoma in irradiated brain areas with optimal tumor coverage. *Cancer Medicine* 9, 350–360.

Liu, X., Wang, L., Zhao, S., Ji, X., Luo, Y., and Ling, F. (2011). β -Catenin overexpression in malignant glioma and its role in proliferation and apoptosis in glioblastoma cells. *Med. Oncol.* 28, 608–614.

Liu, Y., Shen, Y., Sun, T., and Yang, W. (2017). Mechanisms regulating radiosensitivity of glioma stem cells. *Neoplasma* 64, 655–665.

Liu, Z.-H., Dai, X.-M., and Du, B. (2015). Hes1: a key role in stemness, metastasis and multidrug resistance. *Cancer Biol Ther* 16, 353–359.

Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 131, 803–820.

Lu, V.M., Texakalidis, P., McDonald, K.L., Mekary, R.A., and Smith, T.R. (2018). The survival effect of valproic acid in glioblastoma and its current trend: a systematic review and meta-analysis. *Clin Neurol Neurosurg* 174, 149–155.

Ma, D.K., Bonaguidi, M.A., Ming, G., and Song, H. (2009). Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Res* 19, 672–682.

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

Mackay, A., Burford, A., Molinari, V., Jones, D.T.W., Izquierdo, E., Brouwer-Visser, J., Giangaspero, F., Haberler, C., Pietsch, T., Jacques, T.S., et al. (2018). Molecular, Pathological, Radiological, and Immune Profiling of Non-brainstem Pediatric High-Grade Glioma from the HERBY Phase II Randomized Trial. *Cancer Cell* 33, 829-842.e5.

Mannino, M., and Chalmers, A.J. (2011). Radioresistance of glioma stem cells: Intrinsic characteristic or property of the ‘microenvironment-stem cell unit’? *Mol Oncol* 5, 374–386.

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

Mehta, M., Khan, A., Danish, S., Haffty, B.G., and Sabaawy, H.E. (2015). Radiosensitization of Primary Human Glioblastoma Stem-like Cells with Low-Dose AKT Inhibition. *Mol. Cancer Ther.* *14*, 1171–1180.

Miller, I.S., Didier, S., Murray, D.W., Turner, T.H., Issaivanan, M., Ruggieri, R., Al-Abed, Y., and Symons, M. (2014). Semapimod sensitizes glioblastoma tumors to ionizing radiation by targeting microglia. *PLoS ONE* *9*, e95885.

Moore, N., and Lyle, S. (2011). Quiescent, Slow-Cycling Stem Cell Populations in Cancer: A Review of the Evidence and Discussion of Significance.

Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., and Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS Journal* 1393–1418.

Morgan, W.F., and Sowa, M.B. (2005). Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 14127–14128.

Moskwa, P., Zinn, P.O., Choi, Y.E., Shukla, S.A., Fendler, W., Chen, C.C., Lu, J., Golub, T.R., Hjelmeland, A., and Chowdhury, D. (2014). A Functional Screen Identifies miRs That Induce Radioresistance in Glioblastomas. *Mol Cancer Res* *12*, 1767–1778.

Ong, D.S.T., Hu, B., Ho, Y.W., Sauv e, C.-E.G., Bristow, C.A., Wang, Q., Multani, A.S., Chen, P., Nezi, L., Jiang, S., et al. (2017). PAF promotes stemness and radioresistance of glioma stem cells. *PNAS* *114*, E9086–E9095.

Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Truitt, G., Boscia, A., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J.S. (2018). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro Oncol* *20*, iv1–iv86.

Pag es, M., Pajtler, K.W., Puget, S., Castel, D., Boddaert, N., Tauzi ede-Espariat, A., Picot, S., Debily, M.-A., Kool, M., Capper, D., et al. (2019). Diagnostics of pediatric supratentorial RELA ependymomas: integration of information from histopathology, genetics, DNA methylation and imaging. *Brain Pathol.* *29*, 325–335.

Paugh, B.S., Qu, C., Jones, C., Liu, Z., Adamowicz-Brice, M., Zhang, J., Bax, D.A., Coyle, B., Barrow, J., Hargrave, D., et al. (2010). Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *J. Clin. Oncol.* *28*, 3061–3068.

Pawlik, T.M., and Keyomarsi, K. (2004). Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *59*, 928–942.

Pei, X.-Y., Dai, Y., and Grant, S. (2004). Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors. *Clin. Cancer Res.* *10*, 3839–3852.

Pettmann, B., Labourdette, G., Weibel, M., and Sensenbrenner, M. (1986). The brain fibroblast growth factor (FGF) is localized in neurons. *Neuroscience Letters* *68*, 175–180.

Plessier, A., Le Dret, L., Varlet, P., Beccaria, K., Lacombe, J., M eriaux, S., Geffroy, F., Fiette, L.,

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

Flamant, P., Chrétien, F., et al. (2017). New in vivo avatars of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) from stereotactic biopsies performed at diagnosis. *Oncotarget* 8, 52543–52559.

Pollack, I.F., Finkelstein, S.D., Woods, J., Burnham, J., Holmes, E.J., Hamilton, R.L., Yates, A.J., Boyett, J.M., Finlay, J.L., Sposto, R., et al. (2002). Expression of p53 and prognosis in children with malignant gliomas. *N. Engl. J. Med.* 346, 420–427.

Preusser, M., Lim, M., Hafler, D.A., Reardon, D.A., and Sampson, J.H. (2015). Prospects of immune checkpoint modulators in the treatment of glioblastoma. *Nat Rev Neurol* 11, 504–514.

Rasmussen, B.K., Hansen, S., Laursen, R.J., Kosteljanetz, M., Schultz, H., Nørgård, B.M., Guldberg, R., and Gradel, K.O. (2017). Epidemiology of glioma: clinical characteristics, symptoms, and predictors of glioma patients grade I–IV in the the Danish Neuro-Oncology Registry. *J Neurooncol* 135, 571–579.

Rath, B.H., Wahba, A., Camphausen, K., and Tofilon, P.J. (2015). Coculture with astrocytes reduces the radiosensitivity of glioblastoma stem-like cells and identifies additional targets for radiosensitization. *Cancer Med* 4, 1705–1716.

Reardon, D.A., Zalutsky, M.R., Akabani, G., Coleman, R.E., Friedman, A.H., Herndon, J.E., McLendon, R.E., Pegram, C.N., Quinn, J.A., Rich, J.N., et al. (2008). A pilot study: 131I-antitennascin monoclonal antibody 81c6 to deliver a 44-Gy resection cavity boost. *Neuro-Oncology* 10, 182–189.

Rechberger, J.S., Lu, V.M., Zhang, L., Power, E.A., and Daniels, D.J. (2019). Clinical trials for diffuse intrinsic pontine glioma: the current state of affairs. *Childs Nerv Syst.*

Riley, P.A. (1994). Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation. *International Journal of Radiation Biology* 65, 27–33.

Rivera, S., Leteur, C., Mégnin, F., Law, F., Martins, I., Kloos, I., Depil, S., Modjtahedi, N., Perfettini, J.L., Hennequin, C., et al. (2017). Time dependent modulation of tumor radiosensitivity by a pan HDAC inhibitor: abexinostat. *Oncotarget* 8, 56210–56227.

Robins, H.I., Zhang, P., Gilbert, M.R., Chakravarti, A., de Groot, J.F., Grimm, S.A., Wang, F., Lieberman, F.S., Krauze, A., Trotti, A.M., et al. (2016). A Randomized Phase I/II Study of ABT-888 in Combination with Temozolomide in Recurrent Temozolomide Resistant Glioblastoma: An NRG Oncology RTOG Group Study. *J Neurooncol* 126, 309–316.

Romani, M., Pistillo, M.P., and Banelli, B. (2018). Epigenetic Targeting of Glioblastoma. *Front. Oncol.* 8.

Romani, M., Daga, A., Forlani, A., Pistillo, M.P., and Banelli, B. (2019). Targeting of Histone Demethylases KDM5A and KDM6B Inhibits the Proliferation of Temozolomide-Resistant Glioblastoma Cells. *Cancers (Basel)* 11.

Romano, F.J., Guadagno, E., Solari, D., Borrelli, G., Pignatiello, S., Cappabianca, P., and Del Basso De Caro, M. (2018). ATM and p53 combined analysis predicts survival in glioblastoma multiforme patients: A clinicopathologic study. *J. Cell. Biochem.* 119, 4867–4877.

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

Rycaj, K., and Tang, D.G. (2014). Cancer stem cells and radioresistance. *Int. J. Radiat. Biol.* *90*, 615–621.

Sabelström, H., Quigley, D.A., Fenster, T., Foster, D.J., Fuchshuber, C.A.M., Saxena, S., Yuan, E., Li, N., Paterno, F., Phillips, J.J., et al. (2019). High density is a property of slow-cycling and treatment-resistant human glioblastoma cells. *Exp. Cell Res.* *378*, 76–86.

Sanai, N., Li, J., Boerner, J., Stark, K., Wu, J., Kim, S., Derogatis, A., Mehta, S., Dhruv, H.D., Heilbrun, L.K., et al. (2018). Phase 0 Trial of AZD1775 in First-Recurrence Glioblastoma Patients. *Clin. Cancer Res.* *24*, 3820–3828.

Schonberg, D.L., Lubelski, D., Miller, T.E., and Rich, J.N. (2014). Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy. *Mol. Aspects Med.* *39*, 82–101.

Seliger, C., and Hau, P. (2018). Drug Repurposing of Metabolic Agents in Malignant Glioma. *Int J Mol Sci* *19*.

Seo, Y.-S., Ko, I.O., Park, H., Jeong, Y.J., Park, J.-A., Kim, K.S., Park, M.-J., and Lee, H.-J. (2019). Radiation-Induced Changes in Tumor Vessels and Microenvironment Contribute to Therapeutic Resistance in Glioblastoma. *Front. Oncol.* *9*.

Shen, H., Hau, E., Joshi, S., Dilda, P.J., and McDonald, K.L. (2015). Sensitization of Glioblastoma Cells to Irradiation by Modulating the Glucose Metabolism. *Mol. Cancer Ther.* *14*, 1794–1804.

Shih, H.A., Betensky, R.A., Dorfman, M.V., Louis, D.N., Loeffler, J.S., and Batchelor, T.T. (2005). Genetic analyses for predictors of radiation response in glioblastoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *63*, 704–710.

Shimura, T. (2017). Targeting the AKT/cyclin D1 pathway to overcome intrinsic and acquired radioresistance of tumors for effective radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* *93*, 381–385.

Shimura, T., Noma, N., Sano, Y., Ochiai, Y., Oikawa, T., Fukumoto, M., and Kunugita, N. (2014). AKT-mediated enhanced aerobic glycolysis causes acquired radioresistance by human tumor cells. *Radiother Oncol* *112*, 302–307.

Shinsato, Y., Furukawa, T., Yunoue, S., Yonezawa, H., Minami, K., Nishizawa, Y., Ikeda, R., Kawahara, K., Yamamoto, M., Hirano, H., et al. (2013). Reduction of MLH1 and PMS2 confers temozolomide resistance and is associated with recurrence of glioblastoma. *Oncotarget* *4*, 2261–2270.

Shu, H.K., Kim, M.M., Chen, P., Furman, F., Julin, C.M., and Israel, M.A. (1998). The intrinsic radioresistance of glioblastoma-derived cell lines is associated with a failure of p53 to induce p21(BAX) expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 14453–14458.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* *432*, 396–401.

Skinner, H.D., Sandulache, V.C., Ow, T.J., Meyn, R.E., Yordy, J.S., Beadle, B.M., Fitzgerald, A.L.,

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

Giri, U., Ang, K.K., and Myers, J.N. (2012). TP53 disruptive mutations lead to head and neck cancer treatment failure through inhibition of radiation-induced senescence. *Clin. Cancer Res.* 18, 290–300.

Smit, B., and Pilifosova, O. (2001). Adaptation to Climate Change in the Context of Sustainable Development and Equity. In *Climate Change 2001: Impacts, Adaptation, and Vulnerability*, (Cambridge University Press), pp. 877–912.

Smyth, L.M., Rogers, P. a. W., Crosbie, J.C., and Donoghue, J.F. (2018). Characterization of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Radiosensitivity using Synchrotron Microbeam Radiotherapy and Conventional Radiation Therapy In Vitro. *Radiat. Res.* 189, 146–155.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 352, 987–996.

Styczynski, J., Olszewska-Slonina, D., Kolodziej, B., Napieraj, M., and Wysocki, M. (2006). Activity of bortezomib in glioblastoma. *Anticancer Res.* 26, 4499–4503.

Tan, C., Liu, L., Liu, X., Qi, L., Wang, W., Zhao, G., Wang, L., and Dai, Y. (2019). Activation of PTGS2/NF- κ B signaling pathway enhances radiation resistance of glioma. *Cancer Med* 8, 1175–1185.

Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B., Purcell, N.H., Li, Z., Karin, M., and Lin, A. (2001). Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* 414, 313–317.

Tanguturi, S.K., Trippa, L., Ramkissoon, S.H., Pelton, K., Knoff, D., Sandak, D., Lindeman, N.I., Ligon, A.H., Beroukhim, R., Parmigiani, G., et al. (2017). Leveraging molecular datasets for biomarker-based clinical trial design in glioblastoma. *Neuro-Oncology* 19, 908–917.

Taylor, K.R., Mackay, A., Truffaux, N., Butterfield, Y.S., Morozova, O., Philippe, C., Castel, D., Grasso, C.S., Vinci, M., Carvalho, D., et al. (2014). Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Genet.* 46, 457–461.

Toledo, C.M., Ding, Y., Hoellerbauer, P., Davis, R.J., Basom, R., Girard, E.J., Lee, E., Corrin, P., Hart, T., Bolouri, H., et al. (2015). Genome-wide CRISPR-Cas9 Screens Reveal Loss of Redundancy between PKMYT1 and WEE1 in Glioblastoma Stem-like Cells. *Cell Rep* 13, 2425–2439.

Touat, M., Idbaih, A., Sanson, M., and Ligon, K.L. (2017). Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Ann Oncol* 28, 1457–1472.

Vasile, F., Dossi, E., and Rouach, N. (2017). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct* 222, 2017–2029.

Vecchio, D., Daga, A., Carra, E., Marubbi, D., Raso, A., Mascelli, S., Nozza, P., Garrè, M.L., Pitto, F., Ravetti, J.L., et al. (2015). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy on pediatric tumors of the glioma radiosensitizer KU60019. *International Journal of Cancer* 136, 1445–1457.

Vehlow, A., and Cordes, N. (2019). DDR1 (discoidin domain receptor tyrosine kinase 1) drives glioblastoma therapy resistance by modulating autophagy. *Autophagy* 15, 1487–1488.

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

Venkatesh, H.S., Tam, L.T., Woo, P.J., Lennon, J., Nagaraja, S., Gillespie, S.M., Ni, J., Duveau, D.Y., Morris, P.J., Zhao, J.J., et al. (2017). Targeting neuronal activity-regulated neuroligin-3 dependency in high-grade glioma. *Nature* 549, 533–537.

Venkatesh, H.S., Morishita, W., Geraghty, A.C., Silverbush, D., Gillespie, S.M., Arzt, M., Tam, L.T., Espenel, C., Ponnuswami, A., Ni, L., et al. (2019). Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature* 573, 539–545.

Vlashi, E., Mattes, M., Lagadec, C., Donna, L.D., Phillips, T.M., Nikolay, P., McBride, W.H., and Pajonk, F. (2010). Differential Effects of the Proteasome Inhibitor NPI-0052 against Glioma Cells. *Transl Oncol* 3, 50–55.

Wadhwa, E., and Nicolaidis, T. (2016). Bromodomain Inhibitor Review: Bromodomain and Extra-terminal Family Protein Inhibitors as a Potential New Therapy in Central Nervous System Tumors. *Cureus* 8, e620.

Wang, S., and Dougan, D.A. (2019). The Direct Molecular Target for Imipridone ONC201 Is Finally Established. *Cancer Cell* 35, 707–708.

Wang, H., Lathia, J.D., Wu, Q., Wang, J., Li, Z., Heddleston, J.M., Eyler, C.E., Elderbroom, J., Gallagher, J., Schuschu, J., et al. (2009). Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. *Stem Cells* 27, 2393–2404.

Wang, H., Jiang, H., Van De Gucht, M., and De Ridder, M. (2019). Hypoxic Radioresistance: Can ROS Be the Key to Overcome It? *Cancers (Basel)* 11.

Werbrouck, C., Evangelista, C.C.S., Lobón-Iglesias, M.-J., Barret, E., Le Teuff, G., Merlevede, J., Brusini, R., Kergrohen, T., Mondini, M., Bolle, S., et al. (2019). TP53 pathway alterations drive radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG). *Clin. Cancer Res.*

Wolf, S.A., Boddeke, H. w. g. m., and Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 619–643.

Wu, S.-Y., and Watabe, K. (2017). The roles of microglia/macrophages in tumor progression of brain cancer and metastatic disease. *Front Biosci (Landmark Ed)* 22, 1805–1829.

Wu, A., Wei, J., Kong, L.-Y., Wang, Y., Priebe, W., Qiao, W., Sawaya, R., and Heimberger, A.B. (2010). Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro-Oncology* 12, 1113–1125.

Wu, G., Diaz, A.K., Paugh, B.S., Rankin, S.L., Ju, B., Li, Y., Zhu, X., Qu, C., Chen, X., Zhang, J., et al. (2014). The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat. Genet.* 46, 444–450.

Wu, J., Lai, G., Wan, F., Xiao, Z., Zeng, L., Wang, X., Ye, F., and Lei, T. (2012). Knockdown of checkpoint kinase 1 is associated with the increased radiosensitivity of glioblastoma stem-like cells. *Tohoku J. Exp. Med.* 226, 267–274.

Yang, W., Shen, Y., Wei, J., and Liu, F. (2015). MicroRNA-153/Nrf-2/GPx1 pathway regulates

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

radiosensitivity and stemness of glioma stem cells via reactive oxygen species. *Oncotarget* 6, 22006–22027.

Yin, D., Zhou, H., Kumagai, T., Liu, G., Ong, J.M., Black, K.L., and Koeffler, H.P. (2005). Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM). *Oncogene* 24, 344–354.

Zhao, J., Chen, A.X., Gartrell, R.D., Silverman, A.M., Aparicio, L., Chu, T., Bordbar, D., Shan, D., Samanamud, J., Mahajan, A., et al. (2019). Immune and genomic correlates of response to anti-PD-1 immunotherapy in glioblastoma. *Nat. Med.* 25, 462–469.

Zhukova, N., Ramaswamy, V., Remke, M., Martin, D.C., Castelo-Branco, P., Zhang, C.H., Fraser, M., Tse, K., Poon, R., Shih, D.J.H., et al. (2014). WNT activation by lithium abrogates TP53 mutation associated radiation resistance in medulloblastoma. *Acta Neuropathol Commun* 2, 174.

INTRODUCTION - Radioresistance of pediatric high-grade gliomas: a comparative study with their adult counterparts (review in preparation)

OBJECTIFS INITIAUX DU PROJET DOCTORAL

Nous venons de voir en introduction que les gliomes infiltrants du tronc cérébral (DIPG) ou plus largement les gliomes diffus de la ligne médiane sont des tumeurs avec une oncogénèse unique dont l'évènement initiateur est la mutation H3-K27M. Ces tumeurs demeurent incurables avec une médiane de survie inférieure à un an.

Mon projet doctoral a été fondé sur la description en 2015 par le laboratoire des deux sous-groupes de DIPG définis selon le variant d'histone H3 muté (H3.1/2-K27M vs. H3.3-K27M), chacun présentant notamment une évolution clinique et une réponse à la radiothérapie différente (Castel et al., 2015). Les mécanismes de radiorésistance n'ayant jamais été étudiés dans les DIPG, il est pour nous apparu décisif de comprendre pourquoi certaines tumeurs répondaient mieux et plus longtemps à la radiothérapie et comment, tôt ou tard, tous les patients rechutaient.

Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons donc initialement élucider les points suivants :

- ❖ Étudier l'origine de la radiorésistance des tumeurs mutées H3.1-K27M vs. H3.3-K27M. Nous souhaitons ainsi identifier pourquoi les patients, selon l'histone H3 mutée, présentent des réponses à la radiothérapie différentes. Les propriétés différentes des variants d'histones H3.1 ou H3.3 comme la cinétique d'expression pendant le cycle cellulaire (Szenker et al., 2011), la localisation sur le génome (Goldberg et al., 2010) ou encore le rôle du variant d'histone H3.3 dans la réparation aux dommages à l'ADN (Luijsterburg et al., 2016) laissent imaginer une possible différence de capacités de réparation sous-jacents à la différence de réponse à la radiothérapie observée chez les patients (*i.e.* les patients H3.3 sont de mauvais répondeurs à la radiothérapie). Dans ce contexte, des résultats très préliminaires obtenus au laboratoire sur deux modèles cellulaires de DIPG (GSC), confirmaient une résistance à l'irradiation plus importante de la GSC présentant une mutation dans le variant d'histone H3.3. Nous souhaitons donc dans un premier temps étendre ces analyses au panel de GSC présent au laboratoire et ainsi corrélérer la radiosensibilité aux altérations génomiques identifiées par WES. De plus, dans ce contexte différentiel de la réponse à l'irradiation nous souhaitons étudier les cinétiques de réparation des cassures double brin, étudier le cycle cellulaire ainsi

que le stress oxydant par la quantification de la production d'espèce réactive de l'oxygène.

- ❖ Evaluer l'effet synergique de la combinaison de l'irradiation (qui constituait le traitement de référence) avec différentes drogues "épigénétiques" compte tenu de l'oncogenèse des DMG liée aux mutations de l'histone H3.
- ❖ Etudier la contribution clonale à la croissance de ces tumeurs. Est-ce que toutes les cellules se développent de manière similaire ou est-ce que la résistance à la radiothérapie est préexistante ou acquise pendant le traitement ? Notre hypothèse de départ était qu'il y a une combinaison de deux types de résistance : une résistance intrinsèque qui diffère selon le fond génétique des patients, qui expliquerait pourquoi certains patients répondent à la radiothérapie et une résistance acquise ou sélectionnée (oligoclonale ou polyclonale) qui serait à l'origine de la rechute des patients même après une première réponse à l'irradiation. Pour cela, nous souhaitons étudier la dynamique clonale des cellules tumorales par un suivi unicellulaire en utilisant plusieurs rapporteurs fluorescents (Cornils et al., 2014).
- ❖ Comment évoluent les cellules tumorales après un traitement par radiothérapie ? Afin de répondre à cette question très ouverte, nous souhaitons modéliser la rechute à la radiothérapie dans des modèles murins et ainsi étudier l'impact du traitement sur le microenvironnement de la tumeur et ainsi sur la capacité d'invasion de ces cellules tumorales.

RESULTATS

1. Etude des déterminants moléculaires de la résistance à l'irradiation

1.1. TP53 pathway alterations drive radioresistance in diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) (Werbrouck *et al. Clin Cancer Res*, 2019)

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'un article scientifique publié en septembre 2019 dans le journal *Clinical Cancer Research*. Cet article est inclus à la suite de la présentation des résultats en français ci-dessous.

La réponse à la radiothérapie des DIPG n'est pas uniforme et elle n'est que transitoire (Castel *et al.*, 2015). Afin d'identifier les processus moléculaires sous-jacents à cette hétérogénéité de réponse à la radiothérapie, nous avons évalué les conséquences cellulaires de l'irradiation *in vitro* à l'aide de modèles cellulaires de DIPG (GSC). Dans un premier temps, nous avons réalisé des tests de sensibilité par suivi de la prolifération cellulaire post-irradiation par vidéomicroscopie afin d'inférer les fractions survivantes à partir des délais de prolifération observés dans les courbes de croissance. La dose induisant une létalité de 50% des cellules (DL50) a ainsi été définie pour un panel de 13 GSC ainsi que pour 3 lignées contrôle hNSC (human Neural Stem Cells). Les 13 GSC ont été sélectionnées pour couvrir la plupart des combinaisons des altérations principales rencontrées lors du diagnostic, incluant de rares associations comme H3.1/2-K27M et *TP53*^{MUT}. De ce fait, le panel de GSC est exhaustif mais n'est pas représentatif de la fréquence relative des altérations observées chez les patients. Les résultats ont confirmé des réponses des cellules à l'irradiation très variables avec des DL50 allant de 0,5 à 7,4 Gy.

Comme condition préalable à notre approche explicative de la radiorésistance *in vitro*, nous avons corrélé la DL50 des GSC au délai de première progression post-radiothérapie (TTP1) observé chez les patients dont les GSC dérivait. Ces TTP1 étaient également variables, allant de 1,5 à 17 mois. Les DL50 *in vitro* des GSC sont

négativement corrélées avec les TTP1 : les patients de DIPG présentant une réponse clinique plus longue ont conduit à des modèles de GSC plus sensibles à l'irradiation (coefficient de corrélation de Spearman -0,71, $p=0,0086$). Ce résultat confirme la pertinence de nos modèles cellulaires *in vitro* de DIPG pour modéliser la réponse initiale à la radiothérapie des patients qui semble principalement définie par un processus cellulaire autonome sans interaction avec le microenvironnement.

Afin d'identifier l'origine moléculaire de la différence de radiosensibilité des GSC étudiées, les résultats ont été confrontés aux principales altérations génomiques identifiées par WES. Nous avons constaté que toutes les GSC avec une DL50 inférieure à 2 Gy étaient $TP53^{WT}$ et inversement, toutes les $TP53^{MUT}$ appartenait au sous-groupe des radiorésistantes, avec une DL50 moyenne significativement différente de $1,1 \text{ Gy} \pm 0,5$ et de $5,5 \text{ Gy} \pm 1,7$, respectivement ($p < 0,0001$). Malgré une certaine hétérogénéité dans la DL50, aucune altération génétique autre que la mutation $TP53$ ne semble corrélée avec les valeurs de DL50 ou entraîner une augmentation de la radiorésistance. Enfin, les trois témoins hNSC inclus dans l'analyse présentent une DL50 moyenne de $0,58 \text{ Gy} \pm 0,22$, proche des GSC $TP53^{WT}$.

Pour évaluer spécifiquement l'influence de l'inactivation de la voie $TP53$ sur la réponse cellulaire des GSC à l'irradiation, nous avons ensuite mesuré la DL50 dans des cellules isogéniques présentant ou non une inactivation de $TP53$. Pour cela, nous avons transduit 2 GSC H3.1-K27M et 2 H3.3-K27M associées à une DL50 basse avec des constructions lentivirales permettant l'expression de deux shARN indépendants ciblant $TP53$, ou un shARN contrôle. La réponse à l'irradiation de ces cellules a été analysée comme précédemment par suivi de la prolifération, et les 4 GSC testées présentaient une augmentation significative de leur DL50 après extinction de $TP53$. La comparaison de la LD50 dans les cellules isogéniques $TP53^{WT}$ et $TP53^{KD}$ a donc confirmé le rôle central de l'inactivation de $TP53$ dans l'induction de la radiorésistance des DIPG, et ceci quelle que soit l'histone H3 mutée. Compte tenu de l'influence des mutations de $TP53$ sur la radiorésistance identifiée *in vitro* dans les cellules de DIPG, mais également de l'association préférentielle des mutations $TP53$ & H3.3-K27M dans ces tumeurs (Castel et al., 2015, Taylor et al., 2014), nous avons ensuite évalué en détail les réponses cliniques et radiologiques à la radiothérapie, TTP1 et survie (OS) en fonction de ces marqueurs dans une cohorte rétrospective de 73 patients. Nous avons identifié que les patients $TP53^{WT}$

étaient principalement de bons répondeurs cliniques, par opposition aux patients $TP53^{MUT}$ avec 86% et 44%, respectivement ($p=0,0030$). Nous avons également comparé la réponse radiologique, c'est-à-dire l'évolution du volume tumoral en IRM après radiothérapie. De nouveau, le sous-groupe $TP53^{WT}$ comprenait presque exclusivement de bons répondeurs radiologiques à la radiothérapie, avec une différence encore plus grande avec les patients $TP53^{MUT}$ (92% et 39%, respectivement ; $p=0,0003$). À l'inverse, il n'y avait pas de différence significative entre la réponse clinique et radiologique lors de la comparaison de patients en fonction du statut mutationnel de leur tumeur (H3.1-K27M vs. H3.3-K27M) ($p=0,1543$ et $p=0,2018$, respectivement). Une régression logistique multivariée incluant l'âge au diagnostic, les statuts mutationnels de $TP53$ et de l'histone H3 a confirmé les résultats précédents. Pour chaque facteur, nous avons mesuré l'odds ratio (OR), ou rapport de cotes, avec un intervalle de confiance de 95% (IC95%). Les résultats confirment que seules les altérations de $TP53$, mais pas le type d'histone H3 muté, ni l'âge au diagnostic, conditionnent les réponses clinique et radiologique à la radiothérapie chez les patients atteints de DIPG avec respectivement un $OR^{MUT/WT} = 0,137$ (IC95% [0,028-0,679], $p=0,0150$) et un $OR^{MUT/WT} = 0,023$ (IC95% [0,001-0,458], $p=0,0133$).

Pour terminer cette corrélation clinico-moléculaire, nous avons finalement analysé la survie des patients (OS) et montré que les patients H3.3-K27M, $TP53^{MUT}$ avaient un moins bon pronostic (OS = 8,5 mois), suivis des H3.3-K27M, $TP53^{WT}$ (OS = 12,1 mois) et des H3.1-K27M, $TP53^{WT}$ (OS = 15,1 mois ; $p=0,0005$, test global du log-rank). L'analyse multivariée par un modèle de Cox, incluant comme covariables l'âge au diagnostic, l'état mutationnel de $TP53$ et de l'histone H3, a montré que la mutation H3.3-K27M était associée de manière significative à la survie avec un Hazards ratio (HR) de 2,290 (IC95% [1,171-4,477] $p=0,0154$), et que le statut $TP53$ n'était que marginalement associé à la survie avec un HR de 1,69 (IC95% [0,945 à 3,020] $p=0,0766$). Contrairement aux réponses cliniques et radiologiques à la radiothérapie, le statut mutationnel de l'histone H3 est donc significativement associé à un mauvais pronostic. Ceci indique que des processus de développement tumoral autre que la réponse à l'irradiation (tel que l'apparition de métastases par exemple) pourraient influencer la survie globale des patients et sont différents entre les patients mutés H3.1 et H3.3-K27M.

Après avoir identifié les altérations de *TP53* comme le principal facteur influençant la radiorésistance dans les DIPG, nous avons pensé identifier les gènes dont l'extinction pourrait sensibiliser les cellules de DIPG à la radiothérapie. À cette fin, nous avons effectué un crible de létalité synthétique dans 3 modèles H3.3-K27M & *TP53^{MUT}* en utilisant une librairie de 7450 shARN ciblant le kinome humain afin d'identifier ceux qui altèrent sélectivement la survie cellulaire en association avec une irradiation à la DL25 (4 Gy). Huit jours après la transduction à faible M.O.I. (<0,3), la moitié des cellules ont été irradiées et amplifiées. La fréquence de chaque shARN a été évaluée par séquençage 64 jours après la transduction. Les gènes dont la fréquence d'au moins 3 shARN différents étaient associées à une diminution spécifique dans les cellules irradiées par rapport aux cellules non-traitées ($\text{Log}(\text{Fold Change}) \leq -2$) ont été sélectionnées. Nous nous sommes ensuite concentrés sur les 36 kinases candidates communes aux 3 GSC étudiées. Parmi celles-ci, nous avons identifié plusieurs gènes impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN, tels que *ATM*, *CHK1*, *PLK1* ou *WEE1*. Nous avons choisi de nous concentrer sur *CHK1*, puisqu'un inhibiteur efficace et spécifique, le Prexasertib (LY2606368) a montré une bonne pénétration dans le cerveau d'après les premiers essais cliniques. Nous avons d'abord évalué l'effet de Prexasertib *in vitro* sur la prolifération de modèles de DIPG mutés H3-K27M \pm *TP53^{MUT}* et avons observé un effet dose-dépendant dans toutes les cellules avec des IC50 comprises entre 7,9 et 22,7 nM. Ensuite, nous avons traité les cellules avec le Prexasertib en association avec une irradiation à leur DL50 respective. En tenant compte de l'effet l'irradiation, nous avons observé une diminution de l'IC50 du Prexasertib spécifiquement dans les GSC *TP53^{MUT}* lors de la combinaison entre le Prexasertib et l'irradiation. En outre, lorsque nous avons analysé les conséquences du traitement avec le YOYO-3, un colorant imperméable aux cellules vivantes, nous avons observé un effet cytotoxique spécifiquement dans les cellules de DIPG *TP53^{MUT}*, tandis que leur contrepartie *TP53^{WT}* n'ont pas accumulé le colorant.

En conclusion, nous avons montré que les mutations de *TP53* expliquent la plupart des différences de radiosensibilité entre les GSC et leur présence peut servir de biomarqueur pour prédire la radiorésistance chez les patients atteints de DIPG. Nous suggérons que ces mutations soient prises en compte lors de la conception des plans de radiothérapie. Comme la ré-irradiation est de plus en plus utilisée lors des

rechutes (Janssens et al., 2017), il semble possible d'adapter cette approche aux patients les plus susceptibles d'en bénéficier, c'est-à-dire ceux ayant initialement répondu avec un intervalle prolongé d'au moins trois à six patients sans progression. Nous avons ensuite examiné la létalité synthétique induite par l'irradiation dans le sous-groupe le plus agressif de DIPG : H3.3-K27M et $TP53^{MUT}$ et identifié CHK1 comme une vulnérabilité. La combinaison irradiation et Prexasertib a montré un effet supra-additif et une induction de la cytotoxicité spécifiquement dans les GSC $TP53^{MUT}$. Cette association semble cliniquement prometteuse, en particulier dans le cas des $TP53^{MUT}$, qui pourrait servir de biomarqueur de son efficacité.

TP53 pathway alterations are driving radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG)

Coralie Werbrouck¹; Cláudia C.S. Evangelista¹; María J. Lobón-Iglesias¹; Emilie Barret¹; Gwénaél Le Teuff^{2,3}; Jane Merlevede¹; Romain Brusini¹; Thomas Kergrohen^{1,4}; Michele Mondini⁵; Stéphanie Bolle⁶; Pascale Varlet⁷; Kevin Beccaria⁸; Nathalie Boddaert⁹; Stéphanie Puget⁸; Jacques Grill^{1,4}; Marie-Anne Debily^{1,10} & David Castel^{1,4}

1 UMR8203, "Vectorologie & Thérapeutiques Anticancéreuses", CNRS, Gustave Roussy, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Villejuif, 94805, France

2 Biostatistical and Epidemiological Division, Institut Gustave Roussy, Villejuif, 94805, France

3 Université Paris-Saclay, Université Paris-Sud, UVSQ, CESP, INSERM U1018, Villejuif, 94805, France

4 Département de Cancérologie de l'Enfant et de l'Adolescent, Gustave Roussy, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Villejuif, 94805, France

5 INSERM U1030, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, SIRIC SOCRATE, Villejuif, 94805, France

6 Département de Radiothérapie, Gustave Roussy, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Villejuif, 94805, France

7 Département de Neuropathologie, Hôpital Sainte-Anne, Université Paris V Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, 75015, France

8 Département de Neurochirurgie, Hôpital Necker-Enfants Malades, Université Paris V Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, 75015, France

9 Department of Pediatric Radiology, and IMAGINE Institute, INSERM UMR 1163 and INSERM U1000, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Hôpital Necker-Enfants Malades, 75015 Paris, France

10 Université d'Evry-Val d'Essonne, Boulevard François Mitterrand, Evry, 91057, France

Running Title: TP53 pathway alterations are driving radioresistance in DIPG

Corresponding author's: David Castel, Pavillon de Recherche 2 – UMR8203, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif Cedex, France, david.castel@gustaveroussy.fr

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abstract

Purpose:

Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPGs) are the most severe pediatric brain tumors. While accepted as the standard therapeutic, radiotherapy is only efficient transiently and not even in every patient. The goal of the study was to identify the underlying molecular determinants of response to radiotherapy in DIPG.

Experimental Design:

We assessed *in vitro* response to ionizing radiations in 13 different DIPG cellular models derived from treatment-naïve stereotactic biopsies reflecting the genotype variability encountered in patients at diagnosis and correlated it to their principal molecular alterations. Clinical and radiological response to radiotherapy of a large cohort of 73 DIPG was analysed according to their genotype. Using a kinome-wide synthetic lethality RNAi screen, we further identified target genes that can sensitize DIPG cells to ionizing radiations.

Results:

We uncover *TP53* mutation as the main driver of increased radioresistance and validated this finding in 4 isogenic pairs of *TP53^{WT}* DIPG cells with or without *TP53* knockdown. In an integrated clinical, radiological and molecular study, we show that *TP53^{MUT}* DIPG patients respond less to irradiation, relapse earlier after radiotherapy and have a worse prognosis than their *TP53^{WT}* counterparts. Finally, a kinome-wide synthetic lethality RNAi screen identifies *CHK1* as a potential target, whose inhibition increases response to radiation specifically in *TP53^{MUT}* cells.

Conclusion:

Here we demonstrate that *TP53* mutations are driving DIPG radioresistance both in patients and corresponding cellular models. We suggest alternative treatment strategies to mitigate radioresistance with *CHK1* inhibitors. These findings will allow to consequently refine radiotherapy schedules in DIPG.

Translational Relevance

Diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPGs) are the most severe and common form of malignant brain tumors in children and adolescents. Radiotherapy is the only proven efficient treatment, albeit only bringing a transient response followed by a constant progression within a few months. Our study identifies the inactivation of *TP53* as the main driver of resistance to radiation in DIPG cells and *TP53* mutation status as a biomarker of poor response to radiotherapy in patients both in terms of magnitude and duration. These results could be used to tailor radiotherapy schedules (including re-irradiation) in DIPG patients depending on their *TP53* status. Finally, we suggest the potential of mitigating radioresistance with CHK1 inhibitors in this setting.

Introduction

Brain tumors represent the first cause of death from cancer in children to young adults. High-grade gliomas are the most frequent and aggressive forms. Diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPGs) are the most severe of these high-grade gliomas and have been recently associated with other diffuse midline gliomas sharing the same driving histone H3 K27M mutation (1). With respect to treatment, DIPGs are not resectable due to their deep-seated location in a sensible area of the brainstem as well as their infiltrative nature, which precludes any surgical attempt. Since the discovery of the effect of radiation therapy (RT) on brainstem tumors (2), this therapeutic modality has remained the only validated treatment for DIPG. This usually consists in 3D conformal photon-based radiotherapy to a range of 54–59.4Gy given in 30–33 fractions of 1.8Gy daily (3). Changes in fractionation, cumulative dose as well as the use of various radiosensitizers have failed to improve its efficacy (4). No progress has been made since then despite the concomitant and adjuvant use of various drugs in more than 200 trials (5). Prognosis has not significantly changed and most children die within the first two years after diagnosis (6). Besides, resistance to standard chemotherapy has been well demonstrated *in vitro* in DIPG cells derived from both diagnostic and autopsy samples (7,8).

The K27M somatic mutation described in DIPG occurs in *H3F3A*, encoding the histone variant H3.3, or *HIST1H3B/C* and more rarely *HIST2H3A/C*, encoding canonical histones H3.1 and H3.2, respectively (9–11). Clinical work from our group has suggested that response to RT, albeit transient, was not uniform and could be associated with the type of histone H3 harbouring the K27M mutation (11,12) but resistance to ionizing radiation (IR) has not been explained so far. It seems therefore important to explore resistance to RT in DIPG and its determinants in order to invent efficient therapeutic combinations with irradiation.

We thus hypothesized the existence of molecular determinants of the response to radiation, considering histones H3 mutations but also alterations in other genes. Indeed, analysis of DIPG mutational landscape by next generation sequencing (NGS) has shown additional recurrent genetic changes such as *PDGFRA* amplification (13), mutations in *ACVR1*, *TP53* and components of the PI3K/mTOR pathway (14–18). Cosegregation of *ACVR1* mutation with H3.1-K27M on one hand and *TP53* alteration with H3.3-K27M on another hand were also reported (15).

First, we used a variety of cellular models of DIPG derived from stereotactic biopsies at diagnosis (*i.e.* treatment naive) to evaluate their radiosensitivity according to their molecular profile. Then, we extended our preclinical findings to patients by correlating their clinico-radiological response to RT with their genomic profiling according to these *in vitro* findings. Finally, we identified for the time with a kinome-wide shRNA screen synthetic lethalties with ionizing radiation in DIPG cells.

Material & methods

Cells and culture

Glioma Stem-like Cells (GSCs) derived from stereotactic biopsies at diagnosis (19). Control human Neural Stem Cells hNSC1 were from commercial origin (Applied Stem Cells, ASE-5001) and hNSC2-3 were derived from human embryo of Carnegie stages 18 and 22 obtained following voluntary abortions (20). Tissue collection and use were performed as previously described (21). All cells were maintained at 37°C, 5% CO₂, used at less than 20 passages and tested monthly for mycoplasma contamination (22).

Determination of cell survival post-irradiation *in vitro*

Cells were plated at 10,000-30,000 cells/cm² and were irradiated one day after at indicated doses (320kV, 4mA, 1.03Gy/min) with X-ray ionizing radiation (X-RAD 320 Biological Irradiator, Precision X-Ray Inc.) at 20°C under normoxic atmosphere. Cell growth was monitored daily by videomicroscopy (Incucyte[®] ZOOM, Essen bioscience) over 3 weeks. Half of the medium was renewed every 3-4 days. For each dose the surviving fraction was calculated as described by Buch *et al.* (23) based on the delay required by irradiated cells to reach a specific relative confluence (usually 3) compared to non-irradiated cells taking into account the doubling time of each GSC (Fig. 1A). The confluence threshold was chosen so all considered cells were in exponential growing phase.

Lentiviral shRNA cloning

Two shRNAs targeting *TP53*, shTP53-1 and shTP53-2, were cloned in a pLKO.1 lentiviral vector (Supplementary Table S1). Oligonucleotides (Eurofins) were annealed and cloned according to the Broad Institute shRNA cloning protocol (GPP Web Portal N0000003755).

As negative controls, two non-targeting shRNAs were used: shCTL-1, a vector containing a non-hairpin insert (Addgene #10879) and shCTL-2, a non-mammalian targeting shRNA (SHC002, Sigma-Aldrich). The puromycin resistance gene downstream the human PGK promoter was replaced by the NLS-tagged fluorescent protein mTagGFP.

Lentiviral production and transduction

Lentiviral particles were produced in HEK293T cells using psPax2 and pMD2.g second-generation packaging plasmids (Addgene #12260, #12259) with jetPRIME[®] Polyplus transfection reagent and lentiviral titers were determined by fluorescence assay (24). GSCs were transduced at a multiplicity of infection (M.O.I.) of 0.3 and mTagGFP-positive cells were sorted by FACS (FACSAria III, BD Biosciences) after 5-7 days. mCitrine-NLS cells were transduced at a M.O.I. of 3.

Protein extraction and immunoblotting

Proteins were extracted as described previously (25), separated on a 4–20% polyacrylamide gel (Biorad) and transferred to PVDF membrane (Biorad) with a

Trans-Blot Turbo system (Bio-Rad). Membranes were incubated at 4°C overnight with TP53 (#sc-126; Santa Cruz, 1/500) and Cyclophilin A (Bio-Rad, 1/1000) antibodies in 5% bovine serum albumin in TBS-Tween20 and with HRP-linked secondary antibody 1h at 20°C (#7076, Cell Signalling, 1/5000), enhanced by chemiluminescence reagent (#34095, Thermo Scientific) and analysed with ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) with ImageLab 4.1 software.

Clinical samples and data

Clinical samples (n=79) were retrieved from three retrospective cohorts fully characterized previously (11,14,15) and we performed a retrospective analysis of medical and imaging records of these 79 DIPG patients followed at Gustave Roussy between 1996 and 2016. We completed genotyping for *H3F3A*, *HIST1H3B/C*, *TP53*, *ACVR1* and *PPM1D* by targeted-sequencing of DNA for samples not evaluated by NGS. Patients without H3-K27M mutation were excluded since they do not represent a homogenous category of tumors according to the WHO 2016 update (1). We focused on a cohort of 73 H3-K27M mutated patients with corresponding full clinical record: age, signs, symptoms at diagnosis, MRI scans, treatment, response and evolution over time.

Clinical response to RT was defined into 3 classes: worse as appearance of new symptoms or significant increase of the severity of an existing symptom, stable as lack of positive clinical response and absence of new symptoms and improvement as disappearance of two or more main initial clinical symptoms leading to a general clinical improvement lasting more than 2 months concurrent with steroids weaning. Radiological response was evaluated on MRI scans performed within 6 weeks after completion of RT compared to pre-radiotherapy MRI scans and defined into 4 classes: worse with evidenced tumor growth, stable in case of volume changes inferior to 30% without appearance of new lesions, improvement when the tumor volume shrank by more than 30% and pseudo-progression in case of radiological findings suspicious of tumor progression with a new or enlarging area of contrast agent enhancement which decreased or stabilized without a change in anti-cancer therapy. When these radiological changes were symptomatic, subsequent clinical improvement was necessary to consider this event as pseudo-progression. Functional imaging criteria were also considered as previously described (26). Assessments were made blindly by two independent reviewers. The time to first

progression (TTP1) was defined as the time from RT start to first progression post-RT based on imaging and overall survival (OS) as the time from diagnosis to death.

Statistical analysis

For clinical data, we described and compared the clinical, radiological response according to H3-K27M status or *TP53* mutational status by a Fisher's exact test. A multivariable logistic model (Firth's approach) was performed by including age at diagnosis, histone H3 mutational status and *TP53*. We used a Kruskal-Wallis test to compare the distribution of TTP1 across histone H3 and *TP53* genotypes. OS was estimated by using the Kaplan-Meier method and compared with a log-rank test. Multivariable Cox regression model on TTP1 and OS (with Firth's approach) were performed by including age at diagnosis, histone H3 and *TP53* mutational status. For TTP1 and OS, sex was not considered of interest. Statistical analyses were performed using PRISM software v7 (GraphPad) and SAS (version 9.4). All tests were two-sided and considered significant with a $p \leq 0.05$.

Targeted DNA sequencing

Targeted-sequencing was performed by the Biology and Medical Pathology platform of Gustave Roussy on an Ion-PGM System (Life technologies). Libraries were generated using the Ion AmpliSeq Library kit 2.0 (Life Technologies). The custom designed ampliseq primer pools covered 100% of *PPM1D* and 99.8% of *TP53* coding sequences, as well as hotspot loci in *ACVR1*, *HIST1H3A-J*, *H3F3A*, *H3F3B*, *H3F3C* and *HIST2H3A-D*. Data were analyzed with the Torrent Suite Variant Caller software and annotated using hg19 (GRCh37). Variants were visualized using Alamut Visual version 2.9 (Interactive Biosoftware). An average of 7,535X coverage depth was obtained in all samples.

Kinome-wide shRNA screen

Fifteen millions of GSC7-8-9 were transduced with the MISSION[®] human kinase lentiviral shRNA pooled library containing 7,450 shRNAs targeting 642 genes (Sigma-Aldrich) at a M.O.I. of 0.3 in order to get an average 600-fold shRNA representation. Eight days after transduction and antibiotic selection, cells were irradiated at 4Gy (LD25) and amplified during 64 days before gDNA extraction (QIAmp DNA Blood Maxi Kit, Qiagen). shRNA constructs were PCR amplified

following the Broad/GPP protocol, purified (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter) and sequenced (1,000X depth, HiSeq4000, Illumina). Reads were mapped to shRNA library with bowtie v1.1.2. Read count per shRNA was normalized using the following equation:

$$\text{Normalized read count per shRNA} = \frac{\text{read count per shRNA}}{\text{total number of reads per sample}} \times 10^6 + 1$$

A multi-level selection criteria was applied for candidate gene identification: (i) shRNAs with more than 50 reads in raw data of untreated cells; (ii) shRNAs with a fold-change decrease equal or superior to 2 in irradiated compared to untreated cells; (iii) selection of candidate genes with at least 3 distinct shRNAs decreasing following irradiation.

Evaluation of drug effect *in vitro*

Cells stably expressing mCitrine-NLS were plated at 20,000 cells/cm² (n = 6 for each condition). The day after, cells were treated with concentrations of CHK1 inhibitor Prexasertib (LY2606368, Selleckchem) as indicated, with or without IR_{LD50} 5h post-Prexasertib treatment. Cell growth was monitored by videomicroscopy for 120h. To assess viability, medium was supplemented with 80nM of YOYO-3 Iodide (#Y3606, ThermoFisher scientific). The fraction of image area occupied by cells in phase, mCitrine-NLS (green fluorescence) or YOYO-3 positive nuclei (red fluorescence) was determined with CellPlayer Analysis software (Essen Bioscience) and expressed as a percentage of confluence.

Immunofluorescence

Cells were plated the day before treatment on coverslips coated with 0.1mg/mL Matrigel (Corning), fixed at the indicated time 5min with 1X PBS/4% paraformaldehyde, permeabilized 5min with 0.5% Triton X-100 and blocked 30min in 1X PBS/5% Normal Goat Serum (NGS) (ThermoFisher). Cells were incubated overnight at 20°C with anti-γH2AX (#05-636, clone JBW301, Merck, 1:10000) and anti-53BP1 (#ab172580, Abcam, 1:1000) and 45min with secondary antibodies (Alexa fluor, Invitrogen, 1:500) and Hoechst 33342 (#H3570, ThermoFisher, 10μg/mL). Slides were mounted with Fluoromount-G (SouthernBiotech). Images were acquired with a Leica SP8 confocal microscope. Foci were count using ImageJ

software. For combination treatment, drug was added to the medium and cells were immediately (<30 min) irradiated.

Cell cycle analysis by flow cytometry

For Propidium Iodide (PI) staining, cells were harvested and stained according to the manufacturer's instructions (#P1304MP, ThermoScientific). Samples were analyzed on a C6 BD Accuri flow cytometer. Cell-cycle profiles were generated using ModFitLT 5.0.9 software. For dual staining with EdU and PI, cells were exposed during 1h to 10 μ M of EdU supplied with Click-iT™ Flow Cytometry Assay Kit (#C10419, ThermoScientific). Samples were acquired using an LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) and analysis was performed in Kaluza 2.1 software.

For treatments combination, drug was added to the medium and cells were immediately (<30min) irradiated.

Results

Distribution of DIPG stem cells radiosensitivity *in vitro*

In order to decipher the underlying molecular basis of the variable clinical response of DIPG patients to RT, we assessed the cellular consequences of IR *in vitro* using DIPG cellular models deriving from primary tumors at diagnosis (19). We could not perform in all cell cultures classical clonogenic assays commonly used to evaluate radiosensitivity. Indeed, GSCs presented a high motility when cultured as adherent monolayers in laminin coated flasks, or presented highly heterogeneous and most often poor survival in semi-solid culture as single cells in collagen gel, soft agar, matrigel or methylcellulose (Fig. S1). We thus decided to follow proliferation of GSCs treated or not with IR over 3 weeks by videomicroscopy, in order to mathematically infer the surviving fractions from the growth curves (Fig. 1A). This alternative assay was previously shown to provide comparable information to clonogenic studies in several cell lines (23). Irradiation of H3.1-K27M GSC5 with doses ranging from 0.25 to 4Gy induced a dose-dependent latency in cell growth kinetics (Fig. 1B and Supplementary Fig. S2). In contrast, H3.3-K27M GSC8 showed very mild alteration of its proliferation for such doses, requiring 6-8Gy to observe a significant decrease

of the relative confluence (Fig. 1C). These experiments were repeated 4 times and led to similar results allowing to calculate surviving fractions at each dose for all the cellular models, representative results of two GSCs being represented in Fig. 1D. The Lethal Dose 50% (LD50) was then defined on these survival fraction curves, *i.e.* 0.70 and 5.95Gy for GSC5 and GSC8, respectively.

The radioresistance of *in vitro* avatars correlates with the time to first progression post-RT in patients

We extended our analysis to a total of 13 GSCs with K27M mutations in H3.1/H3.2 canonical histones H3 or in the H3.3 variant, and confirmed the wide spectrum of response to radiation in the cells with LD50 ranging from 0.5 to 7.4Gy (Fig. 1E). We then compared the cellular response to IR *in vitro* to the time to first progression post-RT (TTP1) observed in the corresponding patient from which the tumor models were derived. TTP1 also vary importantly ranging from 1.5 to 17 months, and GSCs LD50 *in vitro* negatively correlated with TTP1. Patients presenting a longer clinical response led to GSC models with lower LD50 to radiotherapy, confirming the relevance of our *in vitro* results of radiosensitivity (Fig. 1E; Spearman correlation coefficient -0.71, $p = 0.0086$).

In this large dataset, radiosensitivity was not significantly correlated to the type of histone H3 mutated. Eighty-five percent of the models had LD50 below 2 or above 6, with only two GSCs presenting an intermediate radiosensitivity, the H3.2-K27M cellular model and one H3.3-K27M (GSC12). Indeed, although 4 out of the 5 H3.1-mutated cells were associated with LD50 around or below 2Gy, the last one presented the highest LD50 (7.4Gy) (Fig. 2A). Similarly, H3.3-mutated cells spanned highly variable LD50 suggesting the existence of additional determinant affecting the intrinsic radiosensitivity in DIPG.

Analysis of secondary driver mutations in GSCs identifies *TP53* alteration as a molecular determinant of radioresistance in DIPG

In order to identify the molecular origin of the difference of radiosensitivity in these GSCs, we profiled the most common recurrent mutations found in DIPG: *AVCR1*, *TP53*, *PPM1D*, *ATRX* or in genes belonging to the *PI3K/AKT/MTOR* pathway. Our selected panel of GSCs contained the canonical H3.1-K27M & *ACVR1* or H3.3-K27M & *TP53* double-mutated samples (n=4 for both; Fig. 2A). It was also enriched for less

frequent genotypes with H3.3-K27M & $TP53^{WT}$ or $PPM1D^{MUT}$ GSCs, and even rarer genotypes such as H3.1/2-K27M & $TP53^{MUT}$ (Fig. 2A). Alterations in the *PI3K/AKT/MTOR* pathway were found in 4/5 H3.1-K27M and 3/7 H3.3-K27M mutated samples and included mutations of *PIK3CA*, *PIK3R1* and *AKT3*.

DIPG cells appeared to separate mainly into two main groups according to their LD50. All GSCs with a LD50 below 2Gy were $TP53^{WT}$, and conversely all $TP53^{MUT}$ belonged to the radioresistant subgroup, with significantly different average LD50 of $1.1\text{Gy} \pm 0.5$ and $5.5\text{Gy} \pm 1.7$, respectively (Fig. 2B and Table S2; $p < 0.0001$). Despite some heterogeneity in the LD50, none of the most frequent genetic alterations studied here aside from *TP53*-mutation seemed to correlate with LD50 values of irradiation.

Three control hNSCs were included in the analysis. Their average LD50, *i.e.* $0.58\text{Gy} \pm 0.22$, was close to $TP53^{WT}$ GSCs associated with the lowest LD50. In contrast, *TP53*-mutant cells proved to be more resistant to radiations ($p = 0.0015$, Fig. 2B). With respect to *PPM1D* mutant GSCs, their radiosensitivity was not significantly higher than NSCs and $TP53^{WT}$ GSCs (Fig. 2A).

***TP53* knock-down increases *In vitro* radioresistance of $TP53^{WT}$ DIPG cells**

In order to specifically evaluate the influence of the *TP53*-pathway inactivation on response to radiation, we measured LD50 in isogenic cells with inactivation of *TP53*. For this, we transduced 2 H3.1-K27M and 2 H3.3-K27M GSCs associated with low LD50 with lentiviral constructs leading to the expression of two independent shRNAs targeting *TP53*, or negative control shRNAs. As expected, *TP53* protein level increased following a 4Gy irradiation in both non-transduced and cells transduced with control shRNAs (Fig. 3A-B). Cells showed decreased *TP53* levels, even greater post-IR, following *TP53*-shRNAs introduction. Next, the response to IR of these cells was analysed as previously, and all 4 GSCs tested exhibited a significantly increased LD50 after *TP53*-KD (Fig. 3C). Interestingly, this increase was overall higher in all sh*TP53*-2 transduced cells in accordance with the more efficient repression of *TP53*, excepted for GSC6 which displayed important variation among replicates in LD50 evaluation (Fig. 3B-C). Similar results were observed after *TP53* inhibition in both $TP53^{WT}$ & $PPM1D^{WT}$ (GSC4-6) and $TP53^{WT}$ & $PPM1D^{MUT}$ models (GSC11). The comparison of LD50 in isogenic $TP53^{WT}$ and *TP53*-KD cells thus confirmed the pivotal role of *TP53* in inducing DIPG radioresistance whichever the histone H3

mutated. As a control, we introduced the shRNAs in hNSC1 and also in two GSCs $TP53^{MUT}$, and shTP53 increased radioresistance of hNSC1 (Fig. 3D). Conversely, the KD of $TP53$ sensitised $TP53^{MUT}$ GSCs thus indicating a contribution of the mutated TP53 isoforms to the radioresistance beyond a loss of function (Fig. 3E).

Patients with a $TP53^{MUT}$ DIPG do not respond to radiotherapy

Given the central role of $TP53$ mutations identified on *in vitro* radioresistance of DIPG cells, but also the preferential association of $TP53$ & H3.3-K27M mutations in these tumors (11,15), we evaluated in detail the clinical & radiological responses to RT, TTP1 and OS according to these markers (Table S3).

We first analysed the clinical response to radiation according to the $TP53$ status, and identified that $TP53^{WT}$ patients responded better, as opposed to $TP53^{MUT}$ patients with 86% and 44% good clinical responders, respectively (Fig. 4A; $p = 0.0030$). Thus, we compared the radiological response, *i.e.* the evolution of the tumor volume after RT followed by MRI. Again, the $TP53^{WT}$ subgroup comprised almost exclusively good radiological responders to RT, with an even stronger difference with $TP53^{MUT}$ patients (92% and 39%, respectively; Fig. 4B; $p = 0.0003$). Conversely, there was no significant difference in the clinical and radiological response when comparing patients according to the H3 mutational status of their tumor (H3.1-K27M and H3.3-K27M) (Fig. 4C-D; $p = 0.1543$ and $p = 0.2018$, respectively). Similar results were observed after regrouping the clinical and radiological responses into 2 classes of response/no response (Supplementary Fig. S3 A-B for $TP53$; $p = 0.0014$ and $p \leq 0.0001$ and Supplementary Fig. S3C-D for H3 mutational status; $p = 0.0958$ and $p = 0.1429$, respectively).

Since we observed a correlation between H3.3-K27M and $TP53$ mutations in our cohort with more $TP53^{MUT}$ in H3.3 K27M (75.5%) compared to H3.1-K27M (13.6%) ($p < 0.0001$; Chi-Square test), we decided to analyze concomitantly the contribution of these alterations to the response to RT. Because of the low headcounts and multiple genotypes, we used the clinical and radiological response in 2 classes (response, no response). A multivariable logistic regression including age at diagnosis, $TP53$ and H3 mutational status confirmed the previous analyses with an $OR_{MUT/WT} = 0.14$ (95%[0.03-0.68], $p = 0.015$) and $OR_{MUT/WT} = 1.17$ (95%[0.20-6.90], $p = 0.864$), respectively for $TP53$ and H3 for predicting a clinical response, and $OR_{MUT/WT} = 0.02$ (95%[0.001-0.46], $p = 0.013$) and $OR_{MUT/WT} = 8.24$ (95%[0.36-190.04], $p = 0.188$) for

TP53 and H3 for predicting a radiological response, respectively (Table S4). For the latter, the large variability was explained by the small number of patients.

Altogether, this confirmed that *TP53* alterations but not the type of mutated histone H3, are theranostic biomarkers of the response to RT in patients.

Histone H3.3 and *TP53* mutated DIPG patients display a worse prognosis

We next thought to study the disease course in patients and analysed TTP1 after RT. Univariate analysis showed both a significantly earlier relapse for *TP53*^{MUT} patients compared to *TP53*^{WT} (median of 4.4 vs 8.3 months, $p = 0.0003$; Kruskal-Wallis test) and for H3.3-K27M patients compared to H3.1-K27M (median 4.5 vs 9.6 months, $p = 0.0001$; Kruskal-Wallis test). We further found significant differences according to the combination of the *TP53* and H3-K27M status: 9.8 months for H3.1-K27M, *TP53*^{WT} vs 5.8 months for H3.3-K27M, *TP53*^{WT} vs 4.0 months for H3.3-K27M, *TP53*^{MUT} (Fig. 4E; $p = 0.0369$ and $p < 0.0001$, respectively; Kruskal-Wallis test). The multivariable analysis, including age at diagnosis, *TP53* and histone H3 mutational status showed that only histone H3.3-K27M mutation was marginally associated with TTP1 (HR, 1.83; 95% CI, 0.95 to 3.53; $p = 0.0701$) (Table 1). We next analysed OS and showed that H3.3-K27M, *TP53*^{MUT} patients have the worse prognosis with a median OS of 8.5 months, followed by H3.3-K27M, *TP53*^{WT} with 12.1 months, and H3.1-K27M, *TP53*^{WT} with 15.1 months (Fig. 4F, $p = 0.0005$, global log-rank test). The multivariable analysis including age at diagnosis, *TP53* and histone H3 mutational status, showed that H3.3-K27M mutation was significantly associated with OS (HR, 2.29; 95% CI, 1.17 to 4.48; $p = 0.0154$) but *TP53* mutational status was only marginally associated with OS (HR, 1.69; 95% CI, 0.94 to 3.02; $p = 0.0766$) (Table 1). As opposed to the clinical and radiological responses to RT, H3 mutational status was thus the better predictor for worse prognosis.

Kinome-wide RNAi screen identifies targets sensitizing *TP53*-mutated DIPG to IR.

Having identified *TP53*^{MUT} as the main driver of radioresistance in H3 K27M-mutated DIPG, we thought of identifying genes which extinction sensitize DIPG cells to radiotherapy. To this end, we performed a synthetic lethality RNAi screen in 3 H3.3-K27M GSC models with *TP53*^{MUT} using shRNAs targeting the human kinome to

identify those that selectively impair cell survival in combination with IR at LD25 (4Gy) (Fig. 5A).

Deep sequencing assessed the frequency of each shRNA 64 days after transduction and those associated with a specific decrease in irradiated cells ($\log_{2}FC < -2$) were selected. We then focused on the 36 candidate kinases common to the 3 GSCs. Among these, several genes are involved in DNA-damage response such as *ATM*, *CHK1*, *PLK1*, or *WEE1*. We first evaluated ATM (AZD1390), WEE1 (MK-1775), and CHK1 (Prexasertib, LY2606368) inhibitors on two GSCs. It was possible to determine an IC₅₀ only for Prexasertib, but for ATM and WEE1 inhibitors IC₅₀ these were out of the range of tested concentration ($>400\text{nM}$; Supplementary Fig. S4-5). We chose therefore to focus on Prexasertib as it also showed a good brain penetrance in orthotopic mice xenografts (27).

We evaluated the effect of Prexasertib *in vitro* on proliferation of H3-K27M \pm *TP53*^{MUT} GSCs and hNSC1, with or without IR at LD50. Without IR, we observed a dose-dependent effect in all cells with IC₅₀ ranging from 11.2 to 20.6nM (Fig. 5C). We observed a shift towards lower IC₅₀ of Prexasertib in Dose-Response curves specifically in irradiated *TP53*^{MUT} GSCs (Fig. 5C). Further, we measured the consequence of the treatment with the cell impermeant dye YOYO-3 on mCitrine-NLS expressing cells (Supplementary Fig. S6). We observed a higher cytotoxic effect and a significant difference between Prexasertib vs Prexasertib/IR combination specifically in *TP53*^{MUT} DIPG cells (Fig. 5D, Supplementary Fig. S7). To get more mechanistic insight, we then studied post-IR double-strand breaks (DSB) repair kinetics using γ H2AX and 53BP1 stainings. The repair kinetics were mostly identical for the different GSCs analysed independently of their genotypes (Supplementary Fig. S8A-B). After 4Gy, *TP53*^{MUT} GSC8 had significantly more unrepaired DSBs at 24h compared to non-irradiated cells as opposed to *TP53*^{WT} GSC5 (Fig. 5E). Accordingly, GSC5 transduced with shTP53-2 showed more DSB after 4h than cells with shCTL-2 (Supplementary Fig. S8C-D). Cell cycle analysis at different time points after 2Gy showed an important increase of cells in G1 and to a lesser extent in G2/M in *TP53*^{WT} GSCs together with a strong decrease in S phase. In contrast, *TP53*^{MUT} GSCs did not display a G1 block, but rather accumulated in S and G2 (Supplementary Fig. S9A). In both cases, the effect was observed 6 to 48 hours post-IR. Based on these results, we to perform a more detailed analysis of the cell-cycle at 8 hours post-IR by using an EdU pulse in order to precisely evaluate replicating cells

(Fig. 5F). In $TP53^{WT}$ GSCs, the G1 block was confirmed with the decrease EdU positive cells in early S as well as an accumulation in G2 whereas $TP53^{MUT}$ GSCs did not show a G1 block but accumulated in S and G2 (Fig. 5G & Supplementary Fig. S10B-C). The same influence of the TP53 pathway inactivation was observed in GSC5 after introduction of shCTL or shTP53 (Supplementary Fig. S10D). Treatment of cells with Prexasertib alone only induced a slight reduction of the proportion of cells in S-phase in some GSCs, irrespective of their $TP53$ status, possibly mirroring a reduction of this phase of the cell-cycle (Fig. 5G & Supplementary Fig. S10). Additionally, GSC6 and other $TP53^{WT}$ GSCs appeared insensitive to the addition of Prexasertib to IR and remained blocked in G1 (Fig. 5G & Supplementary Fig. S10B). This contrasted with GSC8 and other $TP53^{MUT}$ cells, that showed after IR/Prexasertib combination a reduced proportion of cells in S-phase, but without a G1 block as assessed by the presence of cells in early S, and correspondingly more cells in G1 and G2. Again, the same results were observed GSC5 with shTP53 vs shCTL (Supplementary Fig. S10D). Finally, we examined γ H2AX staining by immunofluorescence and observed a higher level of strong the pan-nuclear positive staining with the Prexasertib/IR combination 8h post-treatment in $TP53^{MUT}$ vs $TP53^{WT}$ GSCs (Supplementary Fig. S11). This was in line with the aforementioned data showing higher cytotoxicity in $TP53^{MUT}$ GSCs (Fig. 5D). The mechanism of action of Prexasertib in this setting could therefore be to enforce DNA replication despite the presence of DSB specifically in $TP53^{MUT}$ GSCs due to the absence of TP53 activity at the G1/S and CHK1 activity at the S-phase and G2/M DNA damage checkpoints, eventually leading to cell death.

Discussion

Response to radiotherapy in DIPG is not uniform and unequivocally only transient (9). In this work, we demonstrate that it relates to the heterogenous mutational landscape of the disease and specifically the presence or not of $TP53$ mutations. Despite their high frequency in DIPG, around 42%, mutations in $TP53$ are not initiating this disease (15). Patients harboring germline $TP53$ mutations (Li-Fraumeni Syndrome) rather develop H3-K27 WT high-grade gliomas and rarely in the

brainstem (28). The panel of 13 GSCs analyzed was selected to cover most combinations of the principal alterations encountered in DIPG at diagnosis including rare $TP53^{MUT}$ H3.1/2-K27M associations, without reflecting their relative frequencies in the DIPG population. This allowed us to assess *in vitro* DIPG radioresistance and screen for the contribution of the distinct genomic alterations. As a pre-requisite to our explanatory experiments, we correlated LD50 in GSCs to TTP1 in patients and showed therefore that the heterogeneous response to RT observed in DIPG patients seems mostly defined by a cell-autonomous response to radiation that can be evaluated *in vitro* in a microenvironment-free system. The role of the stroma would deserve further studies in different settings. We demonstrated through a molecular analysis that the main driver of resistance to IR in DIPG cells is the alteration of the TP53 pathway in H3.3- and H3.1-mutated cells as well. In apparent contradiction, we previously found that histone H3.3-K27M mutations were associated with a worse response to RT (11), but we show in the present study that it does not impact radioresistance by itself neither *in vitro* nor *in vivo*. The discrepancy between these two studies likely results from a confounding effect as the majority of H3.3-K27M samples are also $TP53^{MUT}$ whereas H3.1-K27M samples rarely are (29). TP53 dysfunction has been linked to radioresistance in various adult cancers and some pediatric models like neuroblastoma (30). Shown in a few clinical studies like in head and neck cancer (31), this finding has not been ascertained in clinical studies of glioblastoma (32–35). In preclinical models of glioblastoma however, TP53 dysfunction has been associated with radioresistance (36). In medulloblastomas, TP53 mutations have been associated with a worse prognosis after irradiation and TP53 knock-down was associated with increased radioresistance *in vitro* (37). In pediatric non brainstem high grade glioma, TP53 mutations have been linked to a worse outcome (38). We show here a strong impact of TP53 mutational status on DIPG response to radiotherapy and marginally on survival, identifying a subset of patients with extremely poor outcome.

PPM1D truncating mutations causing the loss of its regulatory domain were reported to negatively regulate TP53 activity through increased phosphatase activity at Ser15 of TP53 (39,40). Unexpectedly, the two $PPM1D^{MUT}$ GSCs tested did not show a marked elevated LD50 for irradiation *in vitro* albeit their radiosensitivity was slightly lower than most $TP53^{WT}$ GSCs. Moreover, the increase in LD50 following TP53 inhibition was similar in $PPM1D^{MUT}$, $TP53^{WT}$ and $PPM1D^{WT}$, $TP53^{WT}$ GSCs.

Phosphorylation at Ser15 by PPM1D is stimulating transactivation of TP53 responsive promoters (41) but since the transactivating role of TP53 is not its only mechanism of action, it cannot be expected to phenocopy completely the consequences of *TP53* mutations or loss. Additionally, the relative radiosensitivity of the two GSCs with *PPM1D* mutations may be explained by the conservation of the phosphatase activity of the protein since the mutations are at the C-terminus of the protein, *i.e.* downstream of the phosphatase domain. These two *PPM1D* mutant could therefore still inhibit CHK1 and even more since they lose only the degradation signal as shown previously (40). Thus, these cells could present an intermediate phenotype with respect to radiosensitivity because of simultaneous TP53 and CHK1 inactivation. Similarly, activating mutations in the *PI3K/AKT/MTOR* pathway did not overtly impact radioresistance *in vitro* whereas mTOR inhibitors were shown to radiosensitize DIPG cells (42). In a recent study, *PI3K/AKT/MTOR* activation assessed through *PTEN* loss of expression however appeared as a common feature in DIPG, not restricted to tumors with mutations in genes of the pathway (43). One can therefore consider that the effect of mTOR inhibitors could be independent of genomic alteration of components of *PI3K/AKT/MTOR* pathway. Anyhow, only a slight difference in term of radiosensitivity was observed between NSCs and H3-K27M/*TP53*^{WT} tumors suggesting that most of radioresistance in DIPG could be caused by TP53 dysfunction. Interestingly, two *TP53*^{MUT} GSCs displayed an intermediate LD50 compared to other *TP53*-mutated and *WT* GSCs. GSC13 presented no LOH but two mutations (p.W146* and c.919+1G>T splice donor) outside hotspots and associated with neutral or unknown FATHMM pathogenic prediction in the COSMIC database (Table S1). For GSC12, the *TP53* mutation was more canonical (p.G266R), but cells however harbored a mutation in *ATRX*, and these were recently reported to increase sensitivity of gliomas cells to DSB inducing agents by impairing nonhomologous end joining DNA repair (44).

Using univariate analysis, our study confirms that mutations in *TP53* identify DIPG patients with the worst prognosis. This is in line with our previous report showing that patients with LOH at *TP53* locus identified by CGH-array of the tumor had a worse outcome with a median survival of 7 vs 12 months (13), recently confirmed by a meta-analysis of K27M-mutated gliomas (45). However, our multivariate analysis identifies the type of mutated histone H3 (*i.e.* H3.1 or H3.3) as a stronger predictor of survival in DIPG, despite not influencing the response to RT, whereas mutations in

TP53 were only marginally associated with a worse prognosis, likely because low headcount in the H3.3-K27M, *TP53*^{WT} subgroup. Thus, the prognosis in DIPG appears to be partly linked to the response to radiotherapy, but also to the differences in disease evolution between H3.3- and H3.1-K27M, such as the rate of metastasis development or more generally differences in tumor-stroma interactions as previously shown (11).

The correlation of *in vitro* radioresistance and clinical response to IR indicated that *in vitro* GSCs mirror the bulk of tumor cells *in vivo*. This confirmed the relevance of using stem-like models of DIPG to study the disease *in vitro*, in accordance with recent results from Filbin *and coll.* showing that most DIPG cells *in vivo* display a stem-like profile (46).

We subsequently screened for IR-induced synthetic lethality in the more aggressive H3-K27M, *TP53*^{MUT} subgroup of DIPG and identified CHK1 as vulnerability. Treatment with Prexasertib together with IR shifted the growth inhibition curves to lower doses only in *TP53*^{MUT} cells (Fig. 5C). Also, combining Prexasertib and irradiation was more cytotoxic than each treatment alone only in *TP53*^{MUT} GSC (Fig. 5D). In this latter subgroup, radioresistance was not associated with increased DNA repair efficiency, but rather an escape from the G1/S checkpoint. The combination of IR with Prexasertib in this *TP53*^{MUT} context, induced a faster progression from S phase to G2 through abrogation of the S-phase and G2/M CHK1-dependent checkpoints without repair of DNA damage, that led to an increased cell death. Prexasertib was previously shown to be brain penetrant in mice bearing orthotopic medulloblastomas (27). It reaches a free brain extracellular fluid concentration of 10ng/ml (corresponding to 22nM) as measured using microdialysis, thus in the range of the IC50 we measured in our models. As Prexasertib also inhibits other kinases, such as CHK2 and RSK, although only ten times less effectively (47), we cannot exclude that part of the effect on survival evidenced in our experiments could not be mediated by their inhibition as well, albeit none of these kinases were identified in the shRNA screen. In cellular assays, CHK2 was however the only additional kinase significantly inhibited by Prexasertib (47). This combination appears clinically promising especially in case of *TP53*^{MUT} which could be used as a theranostic biomarker. In a previous study showing the role of BMI1 inhibition in the response to the radiomimetic drug bleocin in DIPG cell lines, CHK1 downregulation has been postulated as one of the downstream effectors (48). However, no information on the

TP53 status of the cell lines was given. Interestingly, a clinical Phase I/II study (NCT02808650) opened recently to evaluate Prexasertib efficiency in refractory pediatric tumors including brain tumors, but without combination with RT.

In conclusion, we showed that *TP53* mutations explain most of the differences in radiosensitivity between DIPG GSCs and NSCs and can serve as a biomarker to predict radioresistance in DIPG patients. We suggest that these mutations should be considered when designing radiotherapy plans. As reirradiation is progressively becoming more frequently used at relapse (49), it seems to be possible to tailor this approach to patients most likely to benefit from it, *i.e.* those who responded initially with a prolonged progression-free interval of at least three to six months and who did not have a *TP53*^{MUT}. The underlying mechanisms of DIPG radioresistance downstream and eventually beyond *TP53* dysfunction will require further elucidations. However, *CHK1* inhibition in combination with RT may offer new opportunities to overcome this resistance in DIPG with *TP53* mutations.

Acknowledgments

DC, JG and MAD acknowledge financial support from Société Française de Lutte contre les Cancers et les leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent, Fédérations Enfants Et Santé, INCa (Grant PLBIO-14-253) and charities "The DIPG Collaborative", "The Cure Starts Now" and "L'Etoile de Martin". CW was supported by a fellowship from "Course of Excellence in Oncology – Fondation Philanthropia" and CSE by a fellowship from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) Program "Science without borders" in Brazil.

The authors are grateful to the Necker Imagine DNA biobank (BB-033-00065) and tumor bank, to the Necker operating room nurses/assistants for their technical assistance, to L. Lacroix and P. Saulnier from the Translational Research Platform of Gustave Roussy, Y. Lecluse and F. De Leeuw from the PFIC core cytometry and microscopy platforms of Gustave Roussy.

References

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016 Jun;131(6):803–20.
2. Coutel Y. [Infiltrating glioblastoma of the brain stem in an 8-year-old child; normalization of the pneumoencephalogram after radiotherapy]. *Rev Otoneuroophthalmol.* 1959;31:119–23.
3. Cohen KJ, Jabado N, Grill J. Diffuse intrinsic pontine gliomas-current management and new biologic insights. Is there a glimmer of hope? *Neuro-oncology.* 2017 Mar 24;
4. Warren KE. Diffuse intrinsic pontine glioma: poised for progress. *Front Oncol* [Internet]. 2012 Dec 28 [cited 2016 Feb 17];2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531714/>
5. Hargrave D, Bartels U, Bouffet E. Diffuse brainstem glioma in children: critical review of clinical trials. *The Lancet Oncology.* 2006 Mar;7(3):241–8.
6. Warren KE, Killian K, Suuriniemi M, Wang Y, Quezado M, Meltzer PS. Genomic aberrations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro Oncol.* 2012 Mar 1;14(3):326–32.
7. Veringa SJE, Biesmans D, van Vuurden DG, Jansen MHA, Wedekind LE, Horsman I, et al. In vitro drug response and efflux transporters associated with drug resistance in pediatric high grade glioma and diffuse intrinsic pontine glioma. *PLoS ONE.* 2013;8(4):e61512.
8. Grasso CS, Tang Y, Truffaux N, Berlow NE, Liu L, Debily M-A, et al. Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Med.* 2015 Jun;21(6):555–9.
9. Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfors J, et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet.* 2012 Mar;44(3):251–3.
10. Schwartzenuber J, Korshunov A, Liu X-Y, Jones DTW, Pfaff E, Jacob K, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature.* 2012 février;482(7384):226–31.
11. Castel D, Philippe C, Calmon R, Le Dret L, Truffaux N, Boddaert N, et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol.* 2015;130(6):815–27.
12. Castel D, Grill J, Debily M-A. Histone H3 genotyping refines clinico-radiological diagnostic and prognostic criteria in DIPG. *Acta Neuropathol.* 2016 May;131(5):795–6.
13. Puget S, Philippe C, Bax DA, Job B, Varlet P, Junier M-P, et al. Mesenchymal Transition and PDGFRA Amplification/Mutation Are Key Distinct Oncogenic Events in Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas. *PLoS ONE.* 2012 février;7(2):e30313.
14. Grill J, Puget S, Andreiuolo F, Philippe C, MacConaill L. Critical oncogenic mutations in newly diagnosed pediatric diffuse intrinsic pontine glioma. *Pediatric Blood & Cancer.* 2012 Apr 1;58(4):489–91.
15. Taylor KR, Mackay A, Truffaux N, Butterfield YS, Morozova O, Philippe C, et al. Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Genet.* 2014 May;46(5):457–61.

16. Fontebasso AM, Papillon-Cavanagh S, Schwartzentruber J, Nikbakht H, Gerges N, Fiset P-O, et al. Recurrent somatic mutations in ACVR1 in pediatric midline high-grade astrocytoma. *Nat Genet.* 2014 May;46(5):462–6.
17. Wu G, Diaz AK, Paugh BS, Rankin SL, Ju B, Li Y, et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet.* 2014 May;46(5):444–50.
18. Buczkowicz P, Hoeman C, Rakopoulos P, Pajovic S, Letourneau L, Dzamba M, et al. Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nat Genet.* 2014 May;46(5):451–6.
19. Plessier A, Le Dret L, Varlet P, Beccaria K, Lacombe J, Mériaux S, et al. New in vivo avatars of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) from stereotactic biopsies performed at diagnosis. *Oncotarget.* 2017 Aug 8;8(32):52543–59.
20. O'Rahilly R, Müller F, Hutchins GM, Moore GW. Computer ranking of the sequence of appearance of 73 features of the brain and related structures in staged human embryos during the sixth week of development. *Am J Anat.* 1987 Sep;180(1):69–86.
21. Silva-Evangelista C, Barret E, Ménez V, Merlevede J, Kergrohen T, Saccasyn A, et al. A kinome-wide shRNA screen uncovers vaccinia-related kinase 3 (VRK3) as an essential gene for diffuse intrinsic pontine glioma survival. *Oncogene.* 2019 Jul 19;1.
22. Young L, Sung J, Stacey G, Masters JR. Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nat Protoc.* 2010 May;5(5):929–34.
23. Buch K, Peters T, Nawroth T, Sängler M, Schmidberger H, Langguth P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay--a comparative study. *Radiat Oncol.* 2012;7:1.
24. Barde I, Salmon P, Trono D. Production and Titration of Lentiviral Vectors. In: *Current Protocols in Neuroscience* [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2001 [cited 2015 Jul 23]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1002/0471142301.ns0421s53/abstract>
25. Truffaux N, Philippe C, Paulsson J, Andreiuolo F, Guerrini-Rousseau L, Cornilleau G, et al. Preclinical evaluation of dasatinib alone and in combination with cabozantinib for the treatment of diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro-oncology.* 2015 Jul;17(7):953–64.
26. Calmon R, Puget S, Varlet P, Dangouloff-Ros V, Blauwblomme T, Beccaria K, et al. Cerebral blood flow changes after radiation therapy identifies pseudoprogression in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro-oncology.* 2018 Jun 18;20(7):994–1002.
27. Zhong B, Maharaj A, Davis A, Roussel MF, Stewart CF. Development and validation of a sensitive LC MS/MS method for the measurement of the checkpoint kinase 1 inhibitor prexasertib and its application in a cerebral microdialysis study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2018 Jul 15;156:97–103.
28. Gröbner SN, Worst BC, Weischenfeldt J, Buchhalter I, Kleinheinz K, Rudneva VA, et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature.* 2018 Mar;555(7696):321–7.
29. Mackay A, Burford A, Carvalho D, Izquierdo E, Fazal-Salom J, Taylor KR, et al. Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell.* 2017 Oct 9;32(4):520–537.e5.
30. Yogev O, Barker K, Sikka A, Almeida GS, Hallsworth A, Smith LM, et al. p53 Loss in MYC-

RESULTATS - Etude des déterminants moléculaires de la résistance à l'irradiation

Driven Neuroblastoma Leads to Metabolic Adaptations Supporting Radioresistance. *Cancer Res.* 2016 15;76(10):3025–35.

31. Skinner HD, Sandulache VC, Ow TJ, Meyn RE, Yordy JS, Beadle BM, et al. TP53 disruptive mutations lead to head and neck cancer treatment failure through inhibition of radiation-induced senescence. *Clin Cancer Res.* 2012 Jan 1;18(1):290–300.

32. Shih HA, Betensky RA, Dorfman MV, Louis DN, Loeffler JS, Batchelor TT. Genetic analyses for predictors of radiation response in glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005 Nov 1;63(3):704–10.

33. Felsberg J, Rapp M, Loeser S, Fimmers R, Stummer W, Goeppert M, et al. Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res.* 2009 Nov 1;15(21):6683–93.

34. Tanguturi SK, Trippa L, Ramkissoon SH, Pelton K, Knoff D, Sandak D, et al. Leveraging molecular datasets for biomarker-based clinical trial design in glioblastoma. *Neuro-oncology.* 2017 Jul 1;19(7):908–17.

35. Romano FJ, Guadagno E, Solari D, Borrelli G, Pignatiello S, Cappabianca P, et al. ATM and p53 combined analysis predicts survival in glioblastoma multiforme patients: A clinicopathologic study. *J Cell Biochem.* 2018;119(6):4867–77.

36. Shu HK, Kim MM, Chen P, Furman F, Julin CM, Israel MA. The intrinsic radioresistance of glioblastoma-derived cell lines is associated with a failure of p53 to induce p21(BAX) expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 Nov 24;95(24):14453–8.

37. Zhukova N, Ramaswamy V, Remke M, Martin DC, Castelo-Branco P, Zhang CH, et al. WNT activation by lithium abrogates TP53 mutation associated radiation resistance in medulloblastoma. *Acta Neuropathol Commun.* 2014 Dec 24;2:174.

38. Pollack IF, Finkelstein SD, Woods J, Burnham J, Holmes EJ, Hamilton RL, et al. Expression of p53 and prognosis in children with malignant gliomas. *N Engl J Med.* 2002 Feb 7;346(6):420–7.

39. Kleiblova P, Shaltiel IA, Benada J, Ševčík J, Pecháčková S, Pohleisch P, et al. Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint. *J Cell Biol.* 2013 May 13;201(4):511–21.

40. Zhang L, Chen LH, Wan H, Yang R, Wang Z, Feng J, et al. Exome sequencing identifies somatic gain-of-function *PPM1D* mutations in brainstem gliomas. *Nature Genetics.* 2014 Jul;46(7):726–30.

41. Loughery J, Cox M, Smith LM, Meek DW. Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jul;42(12):7666–80.

42. Miyahara H, Yadavilli S, Natsumeda M, Rubens JA, Rodgers L, Kambhampati M, et al. The dual mTOR kinase inhibitor TAK228 inhibits tumorigenicity and enhances radiosensitization in diffuse intrinsic pontine glioma. *Cancer Lett.* 2017 01;400:110–6.

43. Varlet P, Debily M-A, Teuff GL, Tauziède-Espariat A, Pages M, Andreiuolo F, et al. DIPG-20. PRE-RANDOMISATION CENTRAL REVIEW AND REAL-TIME BIOMARKERS SCREENING IN THE MULTICENTRE BIOLOGICAL MEDICINE FOR DIPG ERADICATION (BIOMEDE) TRIAL: LESSONS LEARNT FROM THE FIRST 120 BIOPSIES. *Neuro-Oncology.* 2018 juin;20(suppl_2):i52–3.

44. Koschmann C, Calinescu A-A, Nunez FJ, Mackay A, Fazal-Salom J, Thomas D, et al. ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma. *Sci Transl*

Med. 2016 Mar 2;8(328):328ra28.

45. Dong C, Yuan Z, Li Q, Wang Y. The clinicopathological and prognostic significance of TP53 alteration in K27M mutated gliomas: an individual-participant data meta-analysis. *Neurol Sci.* 2018 Jul 1;39(7):1191–201.

46. Filbin MG, Tirosh I, Hovestadt V, Shaw ML, Escalante LE, Mathewson ND, et al. Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq. *Science.* 2018 20;360(6386):331–5.

47. King C, Diaz HB, McNeely S, Barnard D, Dempsey J, Blosser W, et al. LY2606368 Causes Replication Catastrophe and Antitumor Effects through CHK1-Dependent Mechanisms. *Mol Cancer Ther.* 2015 Sep;14(9):2004–13.

48. Kumar SS, Sengupta S, Lee K, Hura N, Fuller C, DeWire M, et al. BMI-1 is a potential therapeutic target in diffuse intrinsic pontine glioma. *Oncotarget.* 2017 May 19;8(38):62962–75.

49. Janssens GO, Gandola L, Bolle S, Mandeville H, Ramos-Albiac M, van Beek K, et al. Survival benefit for patients with diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG) undergoing re-irradiation at first progression: A matched-cohort analysis on behalf of the SIOP-E-HGG/DIPG working group. *Eur J Cancer.* 2017;73:38–47.

Tables

Table 1: Multivariable Cox proportional hazards regression model (Firth's approach) for the risk of progression (TTP1) and overall survival (OS)

| Characteristics | Time to first progression (TTP1) | | | Overall Survival | | |
|------------------|----------------------------------|---------------|---------|------------------|---------------|---------|
| | Hazard Ratio | 95% CI | p-value | Hazard Ratio | 95% CI | p-value |
| Age at diagnosis | 1.009 | 0.908 - 1.120 | 0.8745 | 0.927 | 0.845 - 1.017 | 0.1090 |
| H3 status | | | 0.0701 | | | 0.0154 |
| H3.1-K27M | 1 | | | 1 | | |
| H3.3-K27M | 1.833 | 0.951 - 3.532 | | 2.290 | 1.171 - 4.477 | |
| TP53 status | | | 0.3936 | | | 0.0766 |
| TP53 wild-type | 1 | | | 1 | | |
| TP53 mutated | 1.289 | 0.719 - 2.312 | | 1.690 | 0.945 - 3.020 | |

CI: Confidence interval

Figures

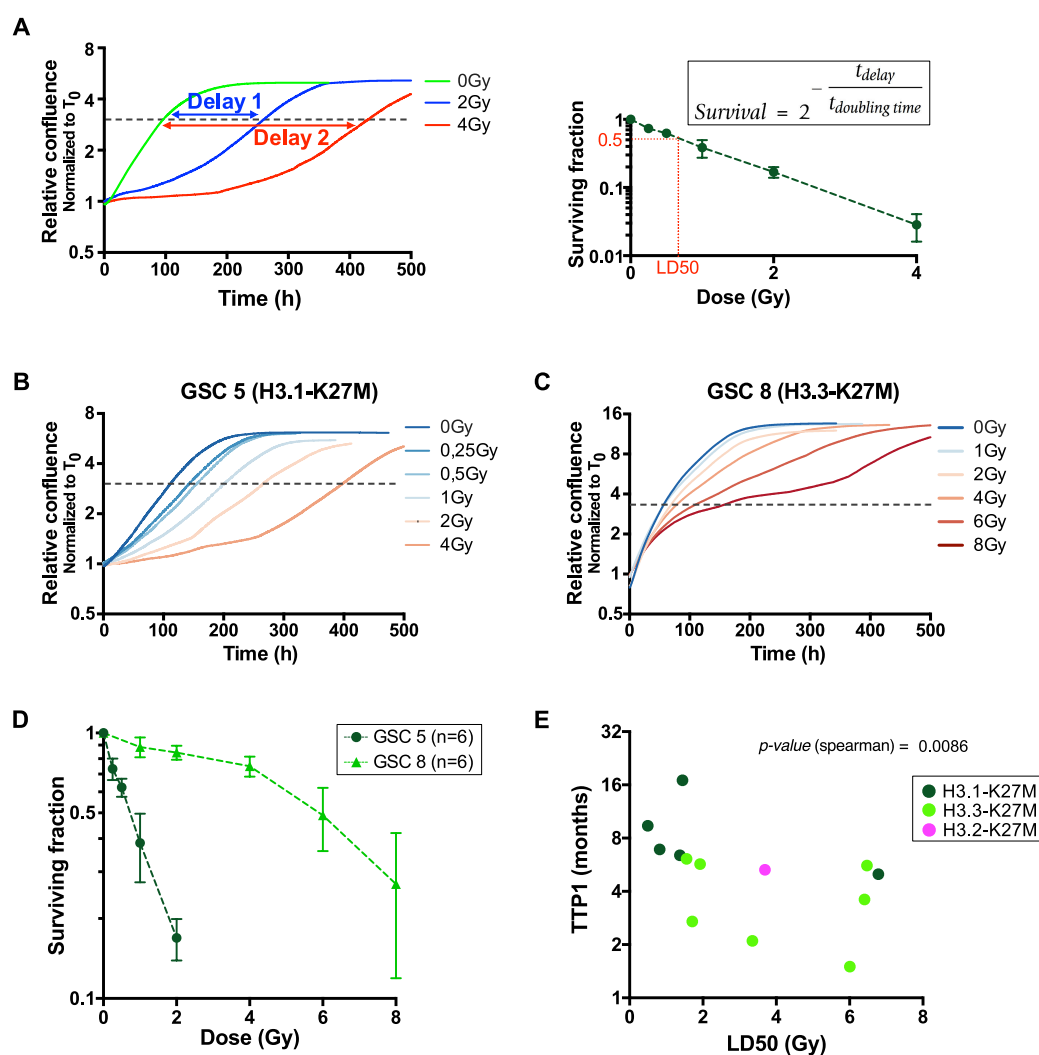


Figure 1. *In vitro* GSCs response to radiotherapy correlates with the heterogeneous patient clinical response. **A**, Method to calculate the surviving fraction post-irradiation. The evolution of confluence is followed post-irradiation by videomicroscopy in comparison to irradiation time ($T = 0$ h). For each dose, the delay required for irradiated cells to reach a certain confluence compared to control cells is measured (left). For each GSC line, the surviving fraction post-irradiation is then calculated for each dose by considering the delay in confluence and the doubling-time of non-irradiated cells (right). **B-C**, Post-irradiation proliferation assay was performed on GSCs harbouring either H3.1- (GSC5), or H3.3-K27M (GSC8) alteration. Escalation of single dose ranging from 0 to 4 Gy or from 0 to 8 Gy were tested in GSC5 and GSC8, respectively, were applied at $T = 0$ h. Curves represent the average relative confluence from four technical replicates measured during 500 h. **D**, Six independent assays were performed to compute the surviving fraction and determine the radiation dose response. Average surviving fractions are represented with standard deviation (SD). **E**, Plot representing the time to first progression in patients (TTP1, time between the first day of radiotherapy to progression post-RT) according to the *in vitro* LD50 of the corresponding GSC. GSCs associated with a high *in vitro* radioresistance derive from patients presenting shorter TTP1 (Spearman correlation coefficient, $r = -0.7088$; $n = 13$ patients/GSC).

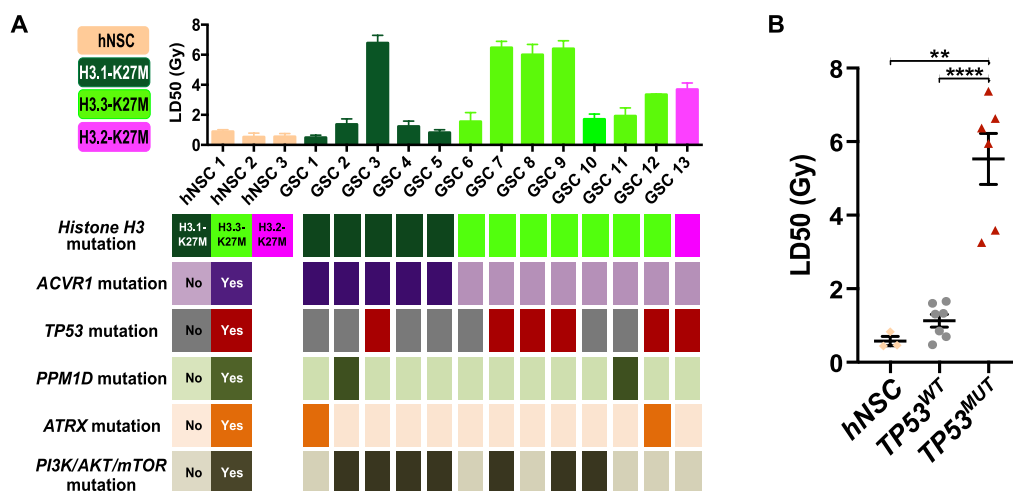


Figure 2. Correlation of the mutational landscape of DIPG cellular models to *in vitro* radiosensitivity. **A**, Average LD50 were determined *in vitro* in 3 NSCs and 13 DIPG GSCs from at least 3 independent assays (top). Genomic alterations detected in histone H3 (*H3F3A*, *HIST1H3B/C*, *HIST2H3A/C*), *ACVR1*, *TP53*, *PPM1D*, *ATRX* as well as components of the PI3K/AKT/mTOR pathway in the corresponding GSCs are indicated (bottom). **B**, Measured LD50 (Gy) were stratified according to human neural stem cells (hNSC), *TP53*^{WT} GSCs and *TP53*^{MUT} GSCs (Student's t-test, **, $p = 0.0015$; ****, $p < 0.0001$). Results are expressed as mean \pm SD.

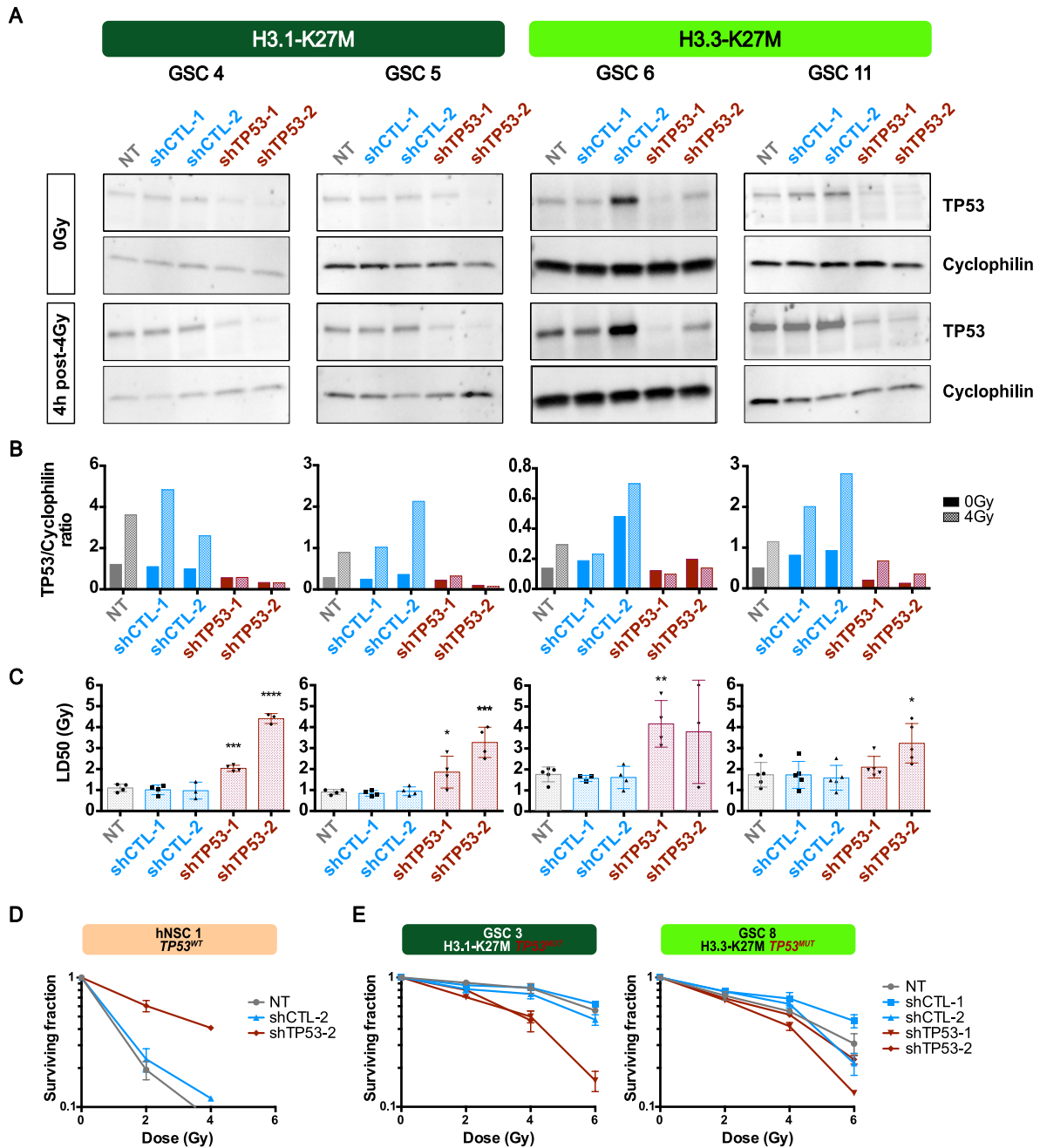


Figure 3. *In vitro* radioresistance of *TP53*-Wild-Type GSC is increased following *TP53* knockdown. **A**, Western blot analysis showing expression of *TP53* in non-transduced GSCs (NT) or GSCs transduced with negative control shRNAs (shCTL-1, shCTL-2) or shRNAs targeting *TP53* (shTP53-1, shTP53-2) irradiated or not at 4 Gy. Cyclophilin was used as loading control. **B**, Densitometric quantification of western blots presented in **(A)**. *TP53* protein level was normalized to cyclophilin expression. **C**, The LD50 was calculated by determining the surviving fraction by proliferation assay in untreated cells (NT) and cells transduced with a control shRNA (shCTL1-2) or two different shTP53. Bar graphs represent the mean \pm SD from separate experiments (Student's t-test vs NT *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$). **D**, Surviving fraction of hNSC1 transduced with shCTL2 or shTP53-2. **E**, Surviving fraction of GSC3 and GSC8 (*TP53*^{MUT}) transduced with shCTL-1 & -2 and shTP53-1 & -2. Bar graphs represent the mean \pm SD from 5 replicates in **(D)** and **(E)**.

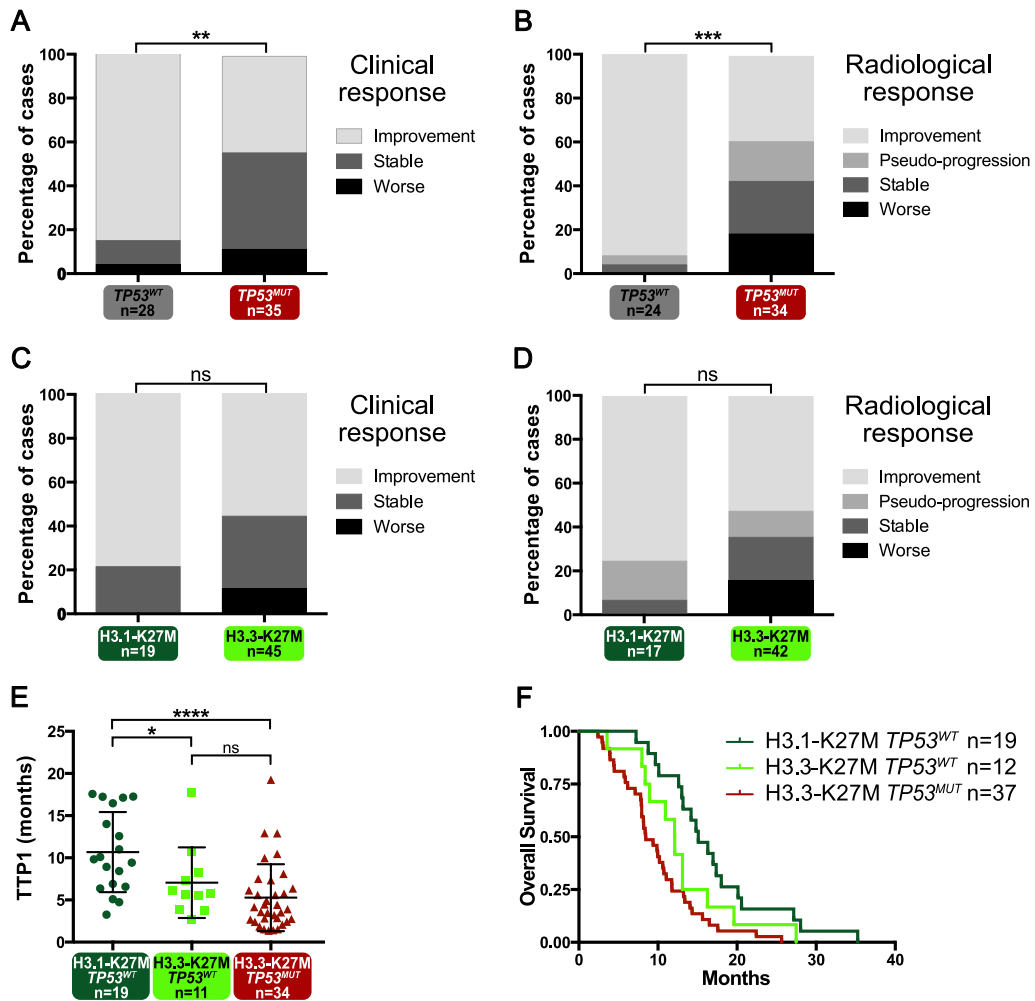


Figure 4. *TP53* mutations are associated with a low response rate to RT and worse prognosis in DIPG patients. **A**, Comparison of the clinical response to RT into 3 classes and **(B)** radiological response to RT into 4 classes in DIPG patients according to *TP53* mutational status (Fisher's exact test, **, $p = 0.003$ and ***, $p = 0.0003$, respectively). **C**, Comparison of the clinical response to RT into 3 classes and **(D)** radiological response to RT into 4 classes in patients according to H3-K27M mutational status (Fisher's exact test, $p = 0.1543$ and $p = 0.2018$, respectively). **E**, Comparison of time to first progression after RT (TTP1) according to the combination of H3-K27M and *TP53* mutational status, (Kruskal-Wallis test, $p = 0.0002$ (global test); ns, $p = 0.0836$; *, $p = 0.0369$; **** $p < 0.0001$). **F**, Comparison of overall survival estimated by using the Kaplan-Meier method according to H3-K27M and *TP53* combination (log rank test, $p = 0.0005$). Due to the low headcounts of patients with H3.1-K27M, *TP53^{MUT}* (n = 3), this class was not considered in the analysis in **(E)** and **(F)**.

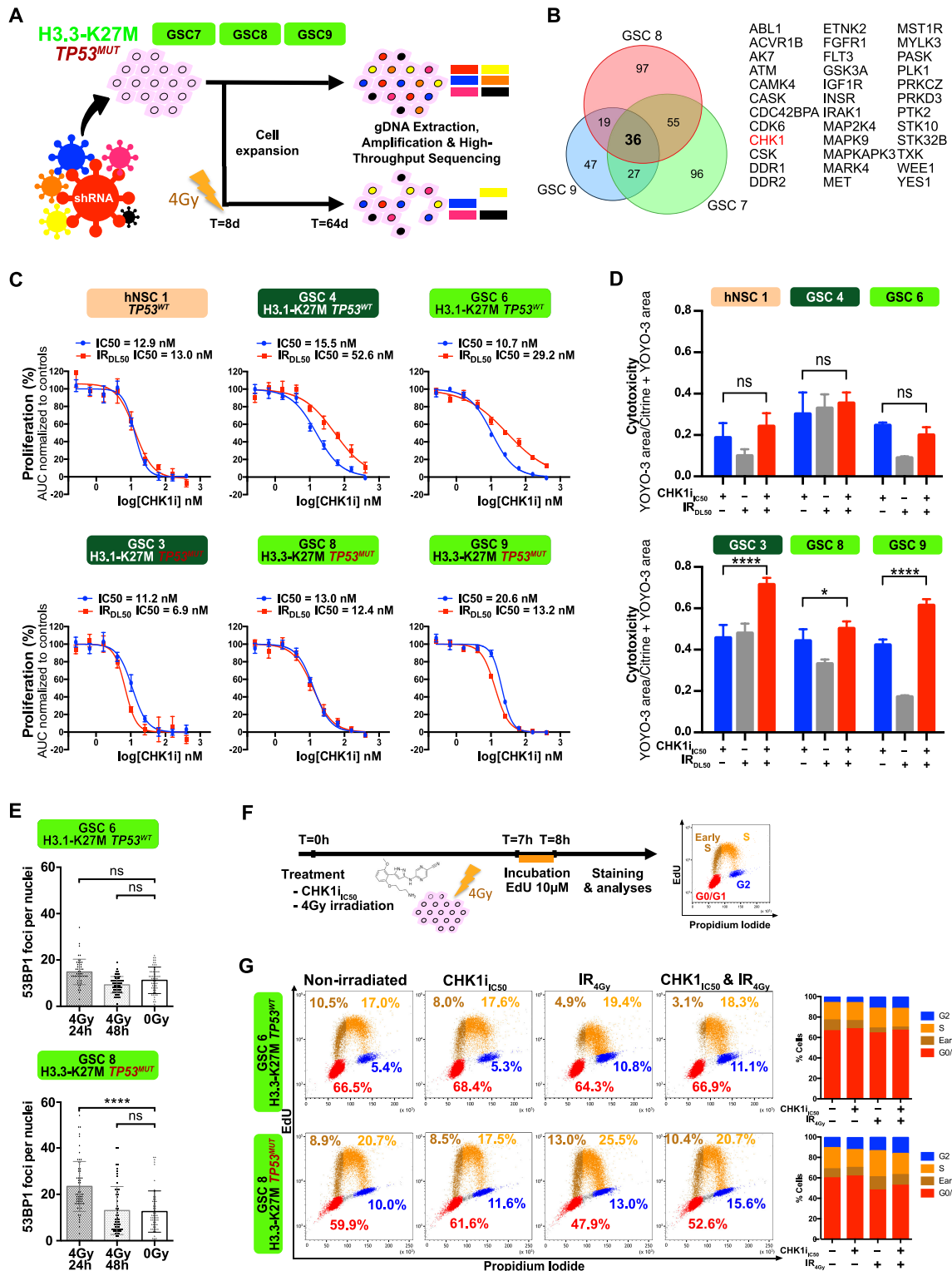


Figure 5. A kinome-wide RNAi screen identifies CHK1 as a vulnerability in irradiated DIPG cells. **A**, Experimental design of the kinome-wide screen conducted using shRNA gene extinction strategy in radioresistant DIPG cells. Three GSCs models H3-K27M, TP53-mutated were individually transduced with an integrative lentiviral library containing 7,450 pooled shRNAs at a multiplicity of infection of 0.3 to ensure the integration of a single shRNA per cell. Half of cells were irradiated 8 days post-transduction at 4 Gy and maintained in culture for 56 additional days. The entire set of integrated constructs containing the shRNA sequences present in the samples were amplified by PCR and then identified by next-

generation sequencing (NGS). This loss-of-function screen allowed the identification of genes that are important for DIPG cell survival following irradiation. The constructs with a significant reduction of their abundance at 64 days in comparison with the non-irradiated cells were selected. **B**, List of genes identified in the screen with at least 3 shRNAs showing a decrease in frequency after IR with $\text{Log}_2(\text{FoldChange}) \leq -2$. The Venn diagram displays the overlap of candidates identified between the 3 GSCs, and the 36 common genes are detailed below. **C**, Proliferation assays were performed on hNSC1 and GSC harbouring either H3.1- (GSC3-4), or H3.3-K27M (GSC6-8-9) alteration, and *TP53* mutation (GSC3-8-9). Cells were treated with increasing concentrations of CHK1 inhibitor (Prexasertib HCl) in the presence or absence of irradiation (LD50). Normalized areas under the curve (AUC) were plotted according to the logarithmic concentration of the CHK1 inhibitor to determine the half maximal inhibitory concentration (IC50). **D**, Cytotoxicity was measured by computing the ratio of the area occupied by YOYO-3 positive dead cells over the area occupied by the total number of cells (*i.e.* live cells expressing the fluorescent protein mCitrine-NLS and dead cells stained with YOYO-3). It was calculated for the DIPG models treated with Prexasertib at their respective IC50 ($\text{CHK1}_{\text{IC50}}$), with their respective irradiation LD50 (IR_{LD50}) and for the combination of Prexasertib and irradiation. **E**, Double-Strand Breaks repair kinetics obtained by counting 53BP1 foci at 24h and 48h after 4Gy irradiation in GSC6 (*TP53*^{WT}) and GSC8 (*TP53*^{MUT}). Bar graphs represent the mean \pm SD from at least 70 counted nuclei (Tukey's multiple comparison test; ns. $p > 0.05$; **** $p < 0.0001$). **F**, Experimental design of cell cycle analyses using Click-iT/EdU and PI. Cells were exposed to EdU (10 μ M) for 1h at T=7h post-treatment (*i.e.* CHK1 inhibitor at IC50, 4Gy irradiation or both). EdU was incorporated into cellular DNA during replication to tag cells in S phase. Total DNA was stained with PI. **G**, Two-dimensional plot (EdU vs PI) of GSC6 (*TP53*^{WT}) & GSC8 (*TP53*^{MUT}) after 8h of indicated treatment and quantification of the different cell cycle population. 30 000 cells were recorded.

Supplementary tables

Supplementary Table S1: TP53 shRNA hairpin and oligos sequences

| shRNA name | Sigma Aldrich reference | Hairpin sequence (5' to 3') | Forward oligo (5' to 3') | Reverse oligo (5' to 3') |
|------------|-------------------------|--|--|--|
| shTP53-1 | TRCN0000003755 | CCGGGTCCAGATGAA GCTCCCAGA AACTCGA GTTCTGGGAGCTTCA TCTGGACTTTTT | CCGGGTCCAGATGAA GCTCCCAGA AACTCGA GTTCTGGGAGCTTCA TCTGGACTTTTTG | AATTCAAAAAGTCCAG ATGAAGCTCCCAGAA CTCGAGTTCTGGGAG CTTCATCTGGAC |
| shTP53-2 | TRCN0000003756 | CCGGCACCATCCACT ACA AACTACATCTCGA GATGTAGTTGTAGTG GATGGTGT TTTT | CCGGCACCATCCACT ACA AACTACATCTCGA GATGTAGTTGTAGTG GATGGTGT TTTT | AATTCAAAAACACCAT CCACTACA AACTACATC TCGAGATGTAGTTGTA GTGGATGGTG |

Supplementary Table S2: TP53 mutations of the GSCs studied

| #GSC | LD50 <i>in vitro</i> | TP53 mutation | LOH | Effect | FATHMM prediction (COSMIC database) |
|------|----------------------|-----------------------|-----|----------------------------------|-------------------------------------|
| 3 | 6.8 Gy | p.R175C | Yes | Missense | Pathogenic (score 0.97) |
| 7 | 6.5 Gy | p.A159V | Yes | Missense | Pathogenic (score 0.99) |
| 8 | 6.0 Gy | p.A159V | Yes | Missense | Pathogenic (score 0.99) |
| 9 | 6.4 Gy | p.P151T | Yes | Missense | Pathogenic (score 0.99) |
| 12 | 3.4 Gy | p.G266R | Yes | Missense | Pathogenic (score 1.00) |
| 13 | 3.7 Gy | p.W146* c.919+1G>T | No | Nonsense Splice Donor Variant | Neutral (score 0.17) n/a |

LOH: Loss of heterozygosity

Supplementary Table S3: Clinical data overview

| | H3.1-K27M (n=22) | | H3.3-K27M (n=51) | | | Overall (n=73) |
|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------|
| | TP53 ^{WT} (n=19) | TP53 ^{MUT} (n=3) | TP53 ^{WT} (n=12) | TP53 ^{MUT} (n=37) | TP53 ^{NK} (n=2) | |
| Age — years | | | | | | |
| Median (range) | 4.9 (3.3-8.6) | 5.2 (4.5-5.8) | 6.3 (3.9-15.2) | 9.2 (3.6-14.6) | 5.1 (4.4-5.7) | 6.6 (3.3-15.2) |
| Gender — males | | | | | | |
| n (%) | 9 (47.3) | 1 (33.3) | 5 (41.6) | 18 (48.6) | 2 (100) | 35 (47.9) |
| Clinical response | | | | | | |
| n (%) | n=17 | n=2 | n=11 | n=33 | n=1 | |
| worse | 0 (0) | 0 (0) | 1 (9.0) | 4 (12.1) | 0 (0) | 5 (7.8) |
| stable | 2 (11.7) | 2 (100) | 1 (9.0) | 13 (39.4) | 1 (100) | 19 (29.6) |
| improvement | 15 (88.2) | 0 (0) | 9 (81.8) | 16 (48.5) | 0 (0) | 40 (62.5) |
| Radiological response | | | | | | |
| n (%) | n=15 | n=2 | n=9 | n=32 | n=1 | |
| worse | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 6 (18.7) | 0 (0) | 6 (10.1) |
| stable | 1 (6.6) | 0 (0) | 0 (0) | 8 (25) | 0 (0) | 9 (15.2) |
| pseudo-progression | 1 (6.6) | 2 (100) | 0 (0) | 5 (15.6) | 1 (100) | 9 (15.2) |
| improvement | 13 (86.6) | 0 (0) | 9 (100) | 13 (40.6) | 0 (0) | 35 (59.3) |
| TTP1 (months) | | | | | | |
| Median (range) | n=19 9.8 (3.3-17.6) | n=3 5.3 (4.9-18.5) | n=11 5.8 (2.7-17.7) | n=34 4.0 (1.4-19.3) | n=2 (4.0-7.9) | 5.8 (1.4-19.3) |
| OS (months) | | | | | | |
| Median (range) | 15.1 (7.2-35.3) | 9.1 (9.1-26.4) | 12.1 (3.6-27.5) | 8.5 (2.4-25.6) | 10.5 (10.2-10.8) | 10.8 (2.4-35.3) |

WT: Wild-type, MUT: mutated, NK: Not know, TTP1: the time to first progression, OS: Overall survival

Supplementary Table S4: Multivariable logistic regression (Firth's approach) for predicting the clinical and radiological responses

| Characteristics | Clinical Response | | | Radiological Response | | |
|------------------|-------------------|---------------|---------|-----------------------|-----------------|---------|
| | Odds ratio | 95% CI | p-value | Odds ratio | 95% CI | p-value |
| Age at diagnosis | 1.045 | 0.834 - 1.310 | 0.6995 | 0.895 | 0.694 - 1.154 | 0.3936 |
| H3 status | | | 0.8637 | | | 0.1877 |
| H3.1-K27M | 1 | | | 1 | | |
| H3.3-K27M | 1.168 | 0.198 - 6.894 | | 8.242 | 0.357 - 190.042 | |
| TP53 status | | | 0.0150 | | | 0.0133 |
| TP53 wild-type | 1 | | | 1 | | |
| TP53 mutated | 0.137 | 0.028 - 0679 | | 0.023 | 0.001 - 0.458 | |

CI: Confidence interval

Supplementary figures

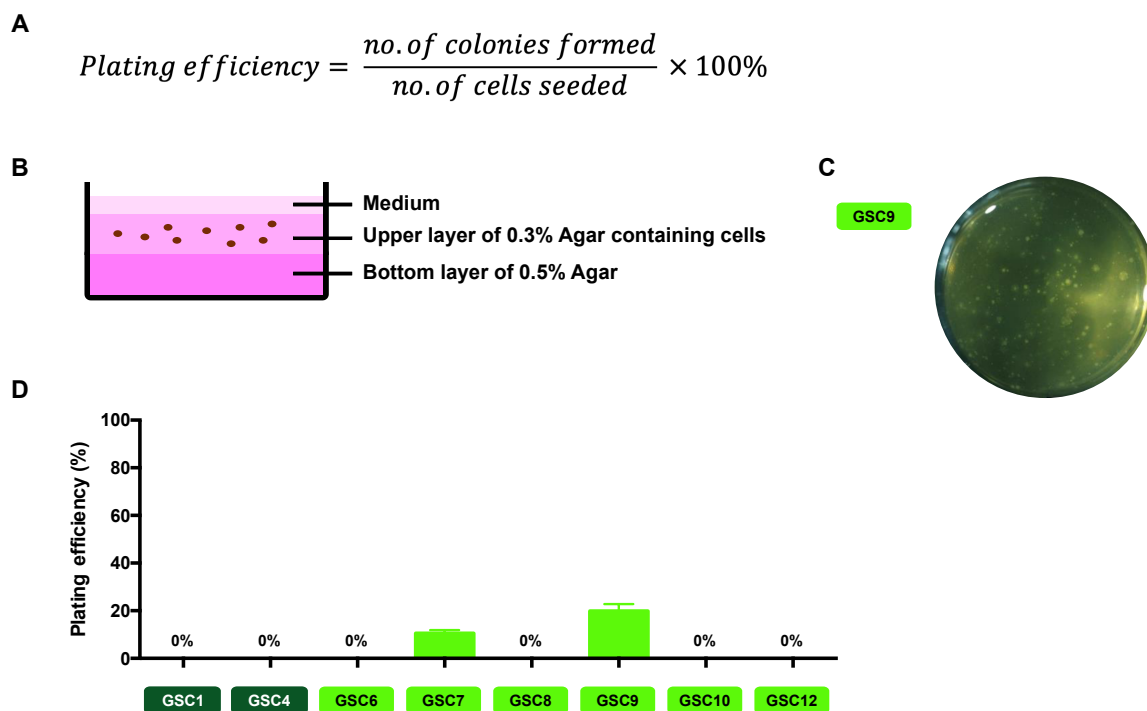


Figure S1. GSCs colony formation assay.

A, Formula used to calculate the plating efficiency expressed as a percentage of plated single cells that give rise to colonies. **B**, Diagram of soft agar colony forming assay. P12 plate was first coated with 0.5% of agar (Ozyme #LON50101) in the medium. The day after, 2000 cells were plated in 0.3% of agar. Medium was added on the top and was changed every 2-3 days. **C**, Examples of colonies observed after 30 days (GSC9). **D**, Results of soft agar colony forming assay for the different GSC tested. Only two GSC were able to form colonies: GSC7 and GSC9. All experiments were at least performed twice.

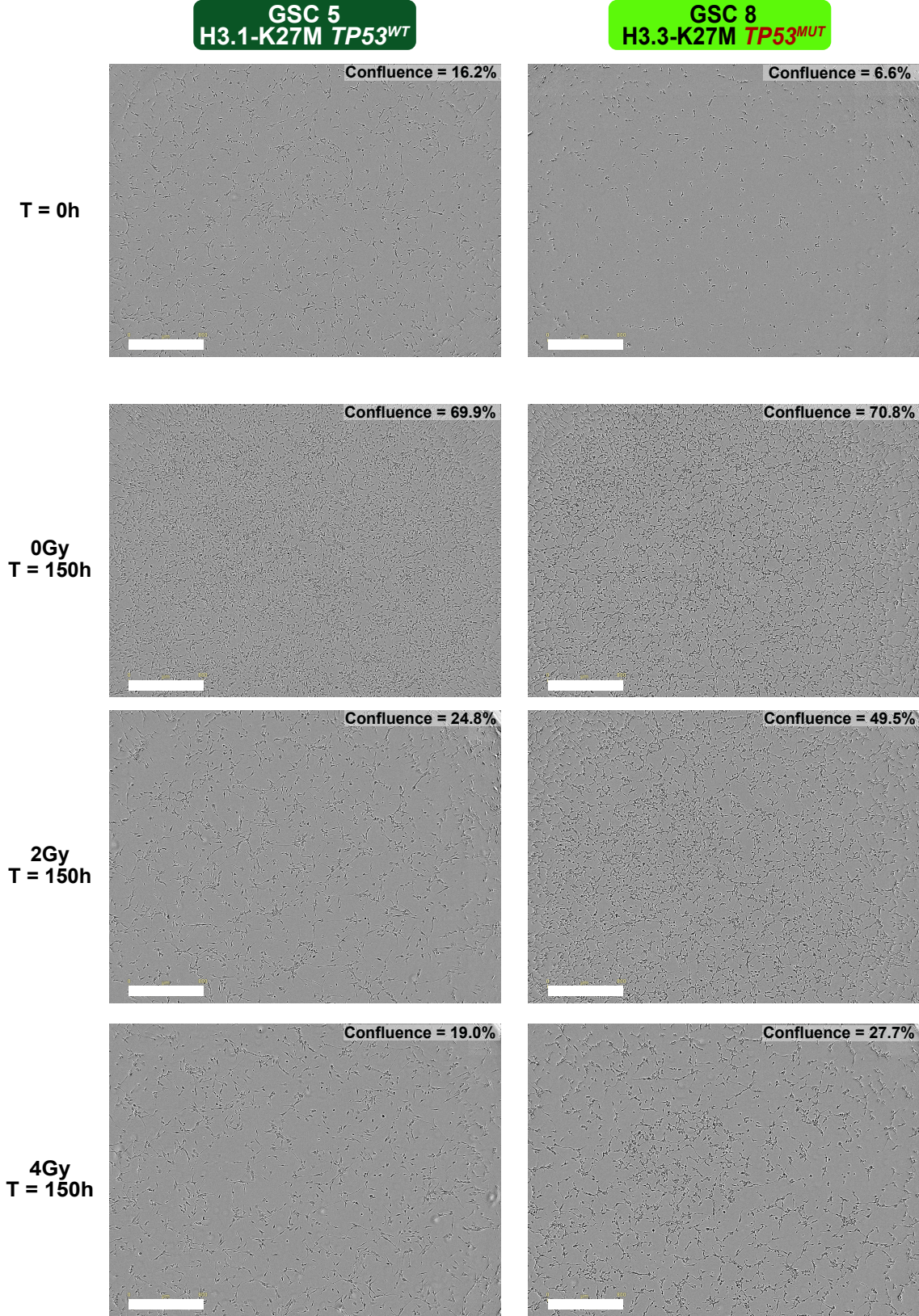


Figure S2. Representative images of GSC at T = 0h and at T = 150h for different irradiation doses. Images were acquired at 4X objective using an Incucyte ZOOM video-microscope. Scale bar = 800 µm

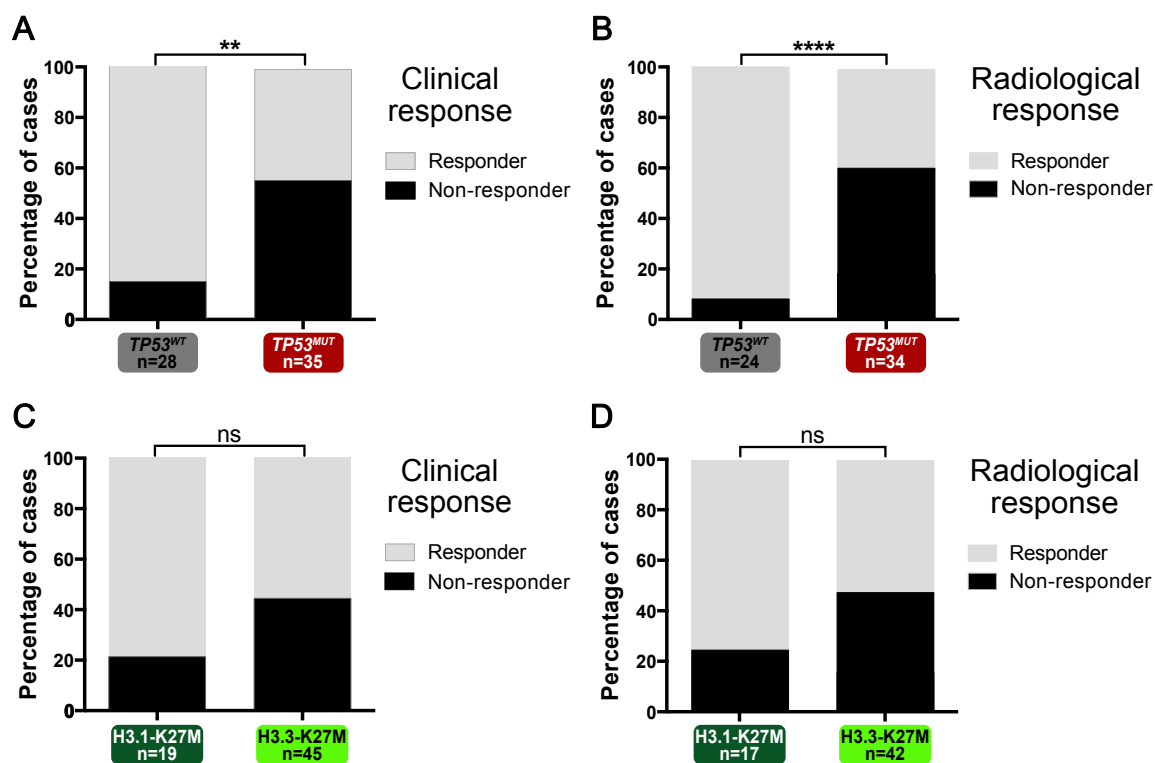


Figure S3. *TP53* mutations are associated with a worse clinical and radiological response to radiotherapy. **A**, Comparison of clinical response to RT into 2 classes (obtained by regrouping worse and stable response into non-responders) according to *TP53* mutational status (Fisher's exact test, $p=0.0014$). **B**, Comparison of radiological response to RT into 2 classes (obtained by regrouping worse, stable response and pseudo-progression in non-responders) according to *TP53* mutational status (Fisher's exact test, $p \leq 0.0001$). **C**, Comparison of clinical response to RT into 2 classes according to H3-K27M mutational status (Fisher's exact test, $p = 0.0958$). **D**, Comparison of radiological response to RT into 2 classes according to H3-K27M mutational status (Fisher's exact test, $p = 0.1429$).

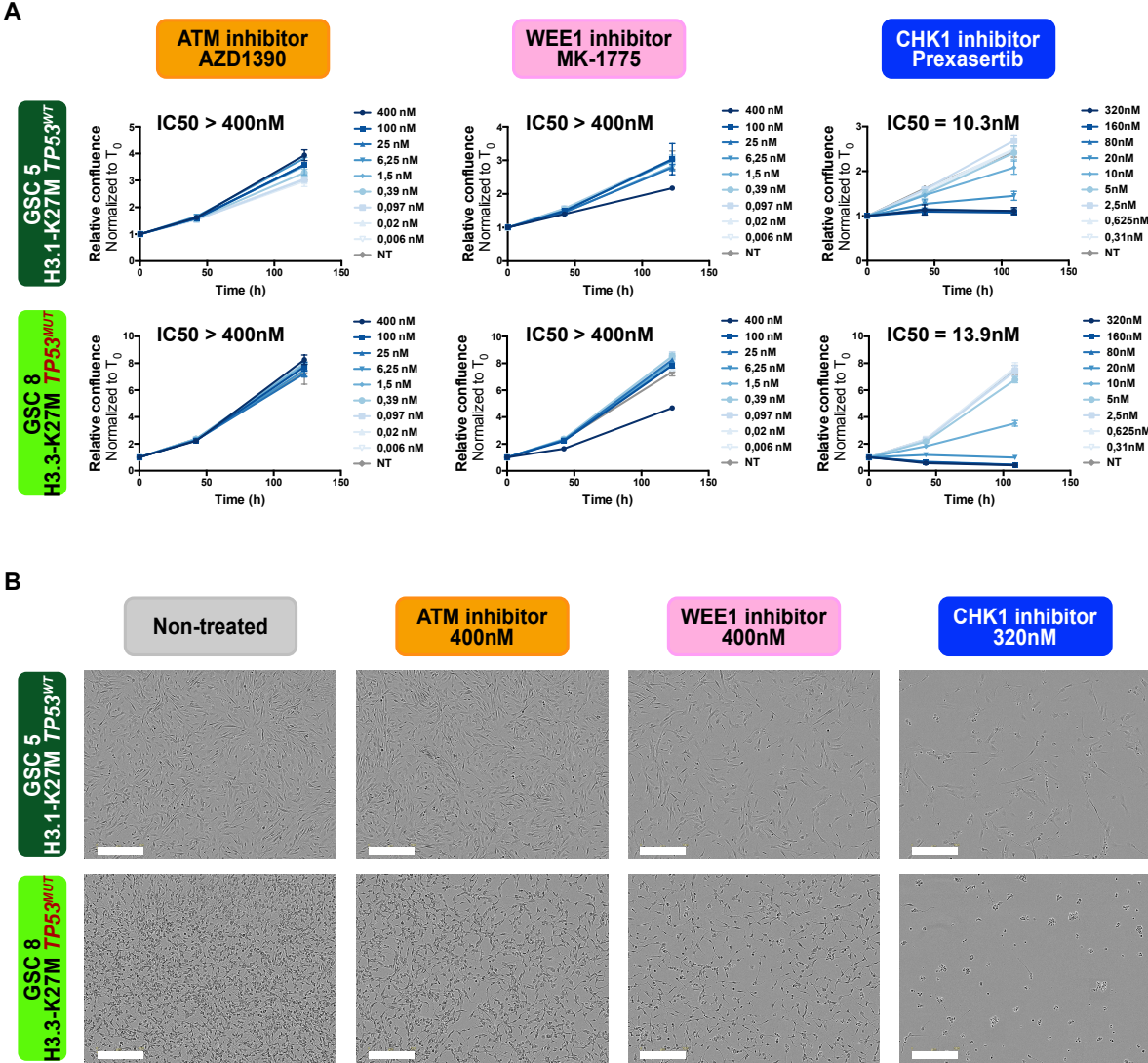


Figure S4. Evaluation of ATM, WEE1 and CHK1 inhibitors using time-lapse videomicroscopy on GSC5 & GSC8 **A**, Relative confluence (Tx/T0) for each concentration of drug. **B**, Representative phase-contrast images of GSCs at T=120h post-treatment at the highest concentration acquired at 10X objective . Scale bar = 300 μ m.

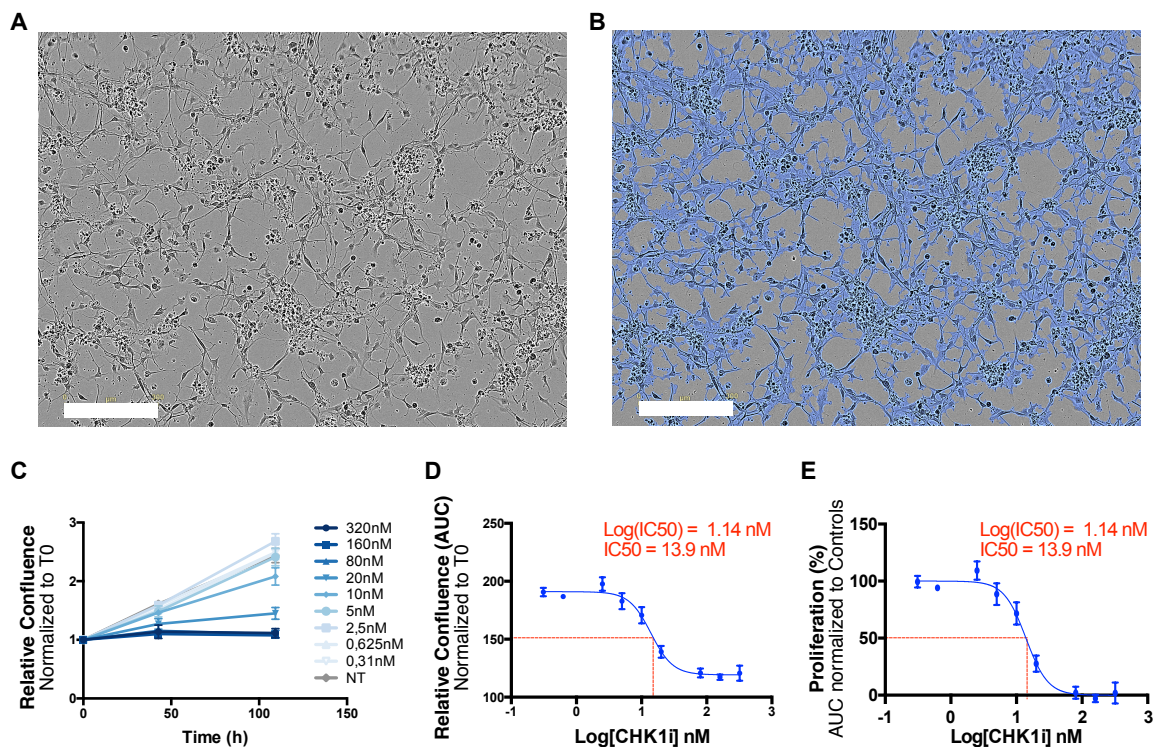


Figure S5. Determination of drug response curves of CHK1 inhibitor Prexasertib using time-lapse videomicroscopy. **A**, Example of phase-contrast image acquired at 10X objective using a Incucyte ZOOM video-microscope and **(B)** segmentation of the image to determine the area occupied by cells (highlighted in blue) using the CellPlayer Analysis software to compute the confluence (occupied area/total area). Scale bar = 300 μ m. **C**, Relative confluence (Tx/T0) for each concentration of drug. **D**, For each concentration, Area Under the Curve (AUC) of the relative confluence were plotted according to the logarithm of the CHK1 inhibitor concentrations. Sigmoid drug response curves were used to determine the IC50. **E**, The AUC of the Relative Confluence (Tx/T0) can be normalized to control samples to express cell proliferation as a percentage.

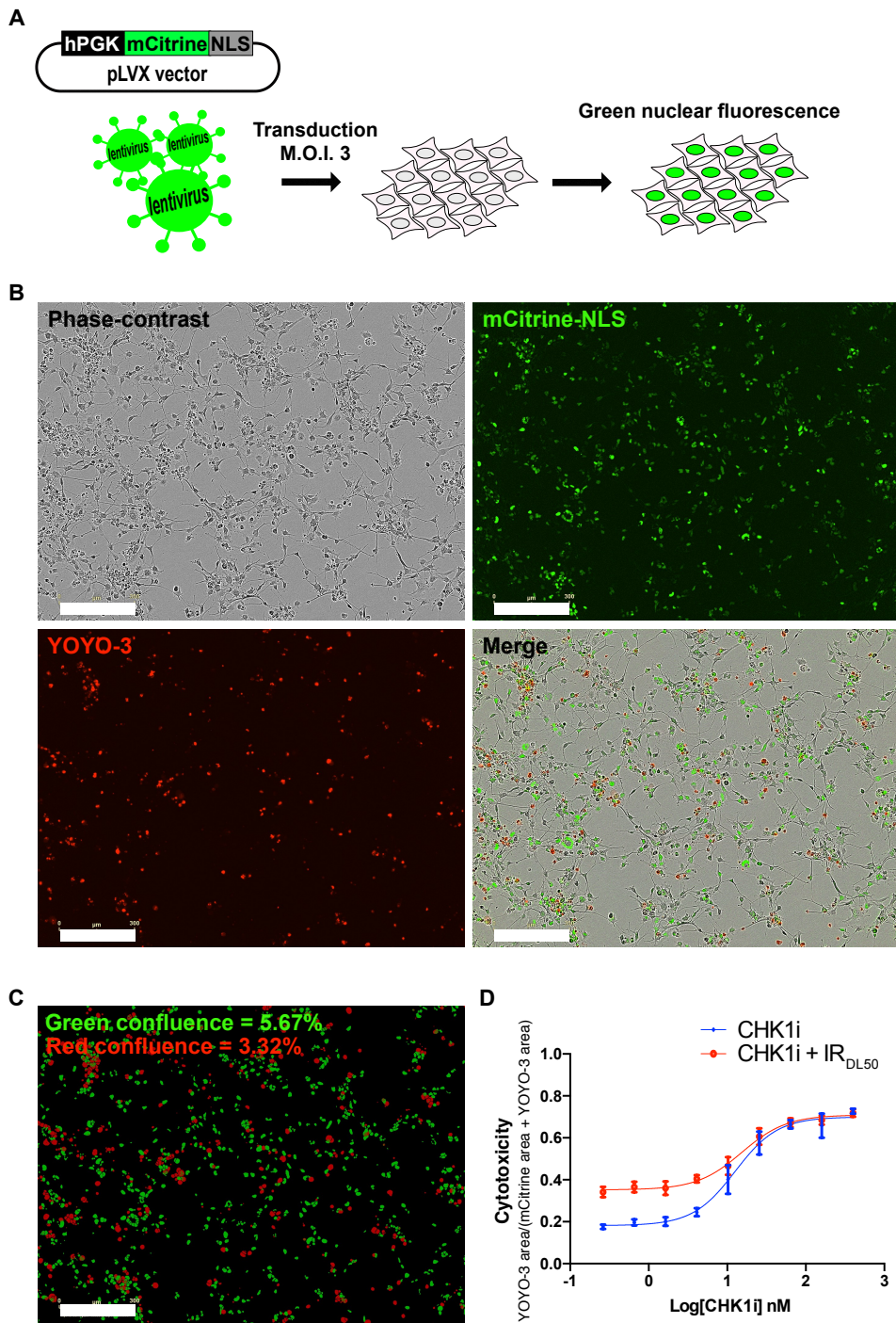


Figure S6. Evaluation of cytotoxicity using YOYO-3 and mCitrine-NLS fluorescence. **A**, Cells were transduced at a M.O.I. 3 with a lentivirus to express a green nuclear fluorescent protein (mCitrine-NLS). **B**, Phase-contrast, green and red fluorescence images were collected to detect cell morphological changes and plasma membrane permeability. Living cells present a green nuclear fluorescence whereas nuclear red staining with YOYO-3 indicates loss of membrane integrity, a hallmark of cell death. Scale bar = 300 μ m. **C**, Percentage of the image area occupied by the green and red fluorescence confluence was determined after images segmentation using the CellPlayer Analysis software. Scale bar = 300 μ m. **F**, For each concentration, cytotoxicity was expressed as a ratio of the dead cells (YOYO-3 positive) area, to the total cells area (living mCitrine-NLS positive cells + YOYO-3 positive dead cells). Results were fit with a four-parameter logistic curve, and cytotoxicity was determined for the IC₅₀_{CHK1i} concentration.

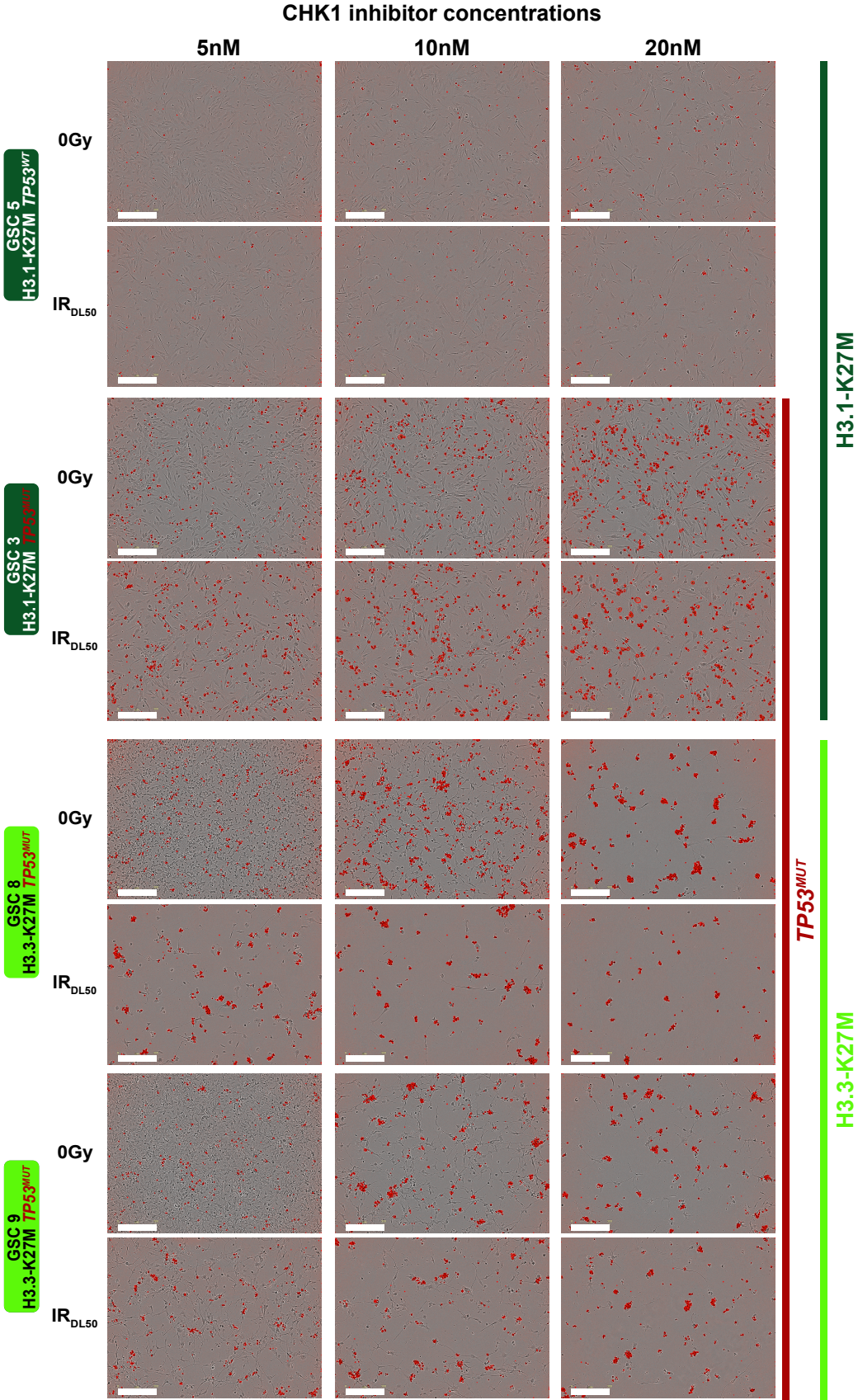


Figure S7. Representative phase-contrast and red fluorescence (Yoyo-3) image overlays of GSCs at T=150h post-treatment with CHK1 inhibitor prexasertib with or without irradiation. Images were acquired at 10X objective using a Incucyte ZOOM video-microscope. Scale bar = 300 μ m

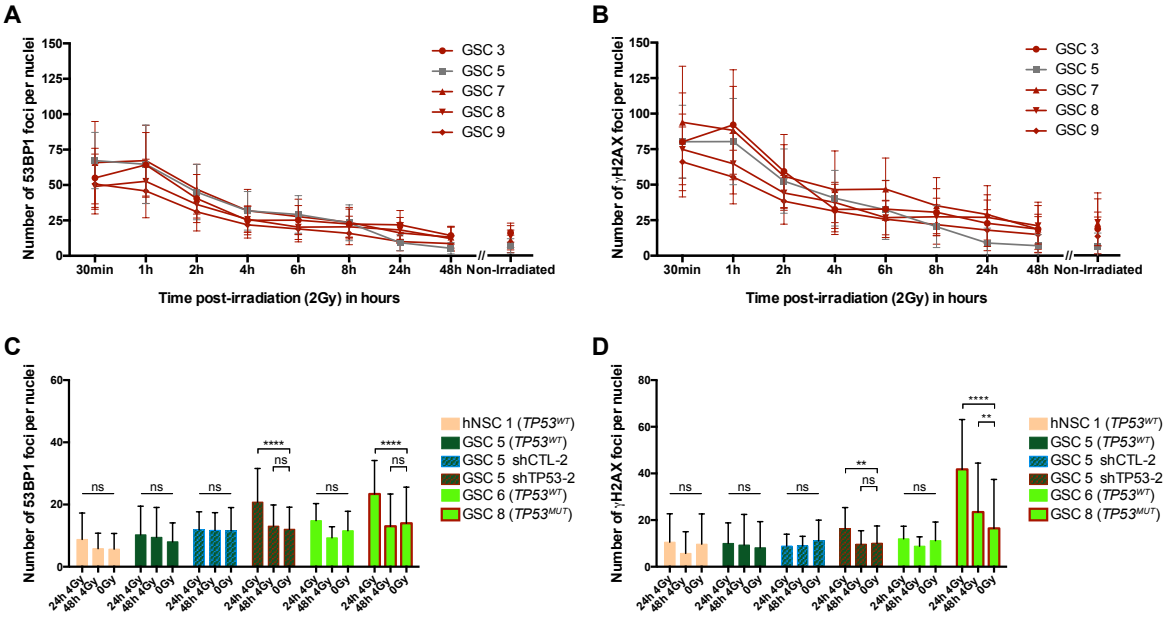


Figure S8. Repair kinetics of DNA double-strand breaks in NSCs and GSCs after irradiation. **A-B**, Number of foci per nuclei after 53BP1 (**A**) and γ H2AX stainings (**B**) for the indicated times post-irradiation at 2 Gy. At least 70 cells per condition were analyzed. Bar graphs represent the mean \pm SD. **C-D**, Number of foci per nuclei after 53BP1 (**C**) and γ H2AX stainings (**D**) for the indicated times post-irradiation (4 Gy). At least 70 cells per condition were analyzed. Bar graphs represent the mean \pm SD (Tukey's multiple comparison test ns. $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

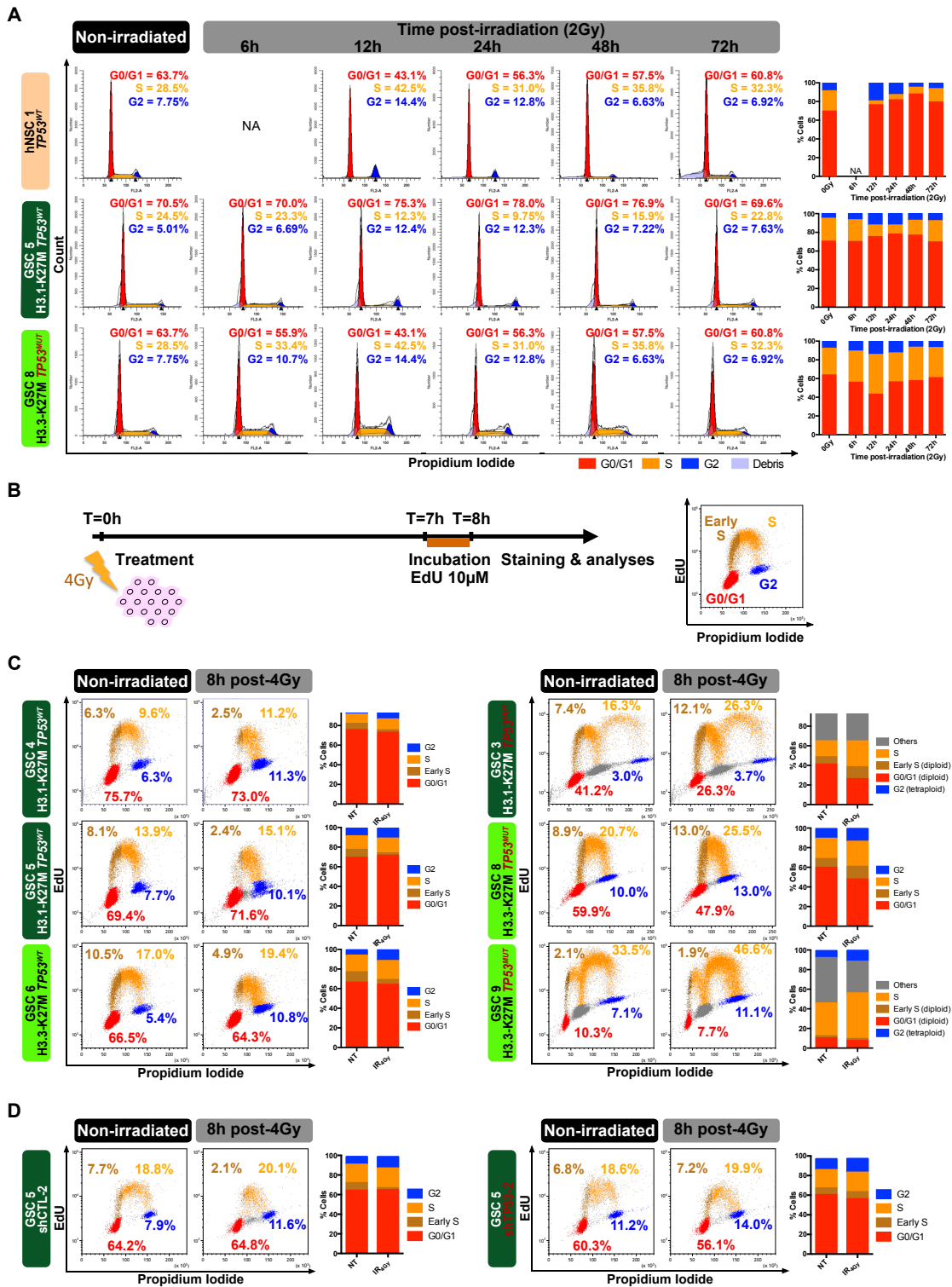


Figure S9. Effect of irradiation on hNSC and GSCs cell cycles

A. DNA content profiles after Propidium Iodide (PI) staining of hNSC 1 (control), GSC5 ($TP53^{WT}$) and GSC8 ($TP53^{MUT}$) at different time post-2Gy irradiation (IR) were evaluated by flow cytometry. For each condition, 20 000 cells were gated and modeled using ModFitLT. **B.** Experimental design of analyses of cell cycle using Click-iT technology. Cells were exposed to EdU (10µM) for 1h at T=7h post-4Gy. EdU was incorporated into cellular DNA during replication to tag cells in S phase. Total DNA was stained with PI. **C.** Two-dimensional plot (EdU vs PI) of 6 GSCs (3 $TP53^{WT}$ and 3 $TP53^{MUT}$) 8h post 0Gy or 4Gy irradiation. 30 000 cells recorded. **D.** Two-dimensional plot (EdU vs PI) of isogenic GSC5 with or without $TP53$ knockdown, 8h post 0Gy or 4Gy irradiation. 10 000 cells recorded.

RESULTATS - Etude des déterminants moléculaires de la résistance à l'irradiation

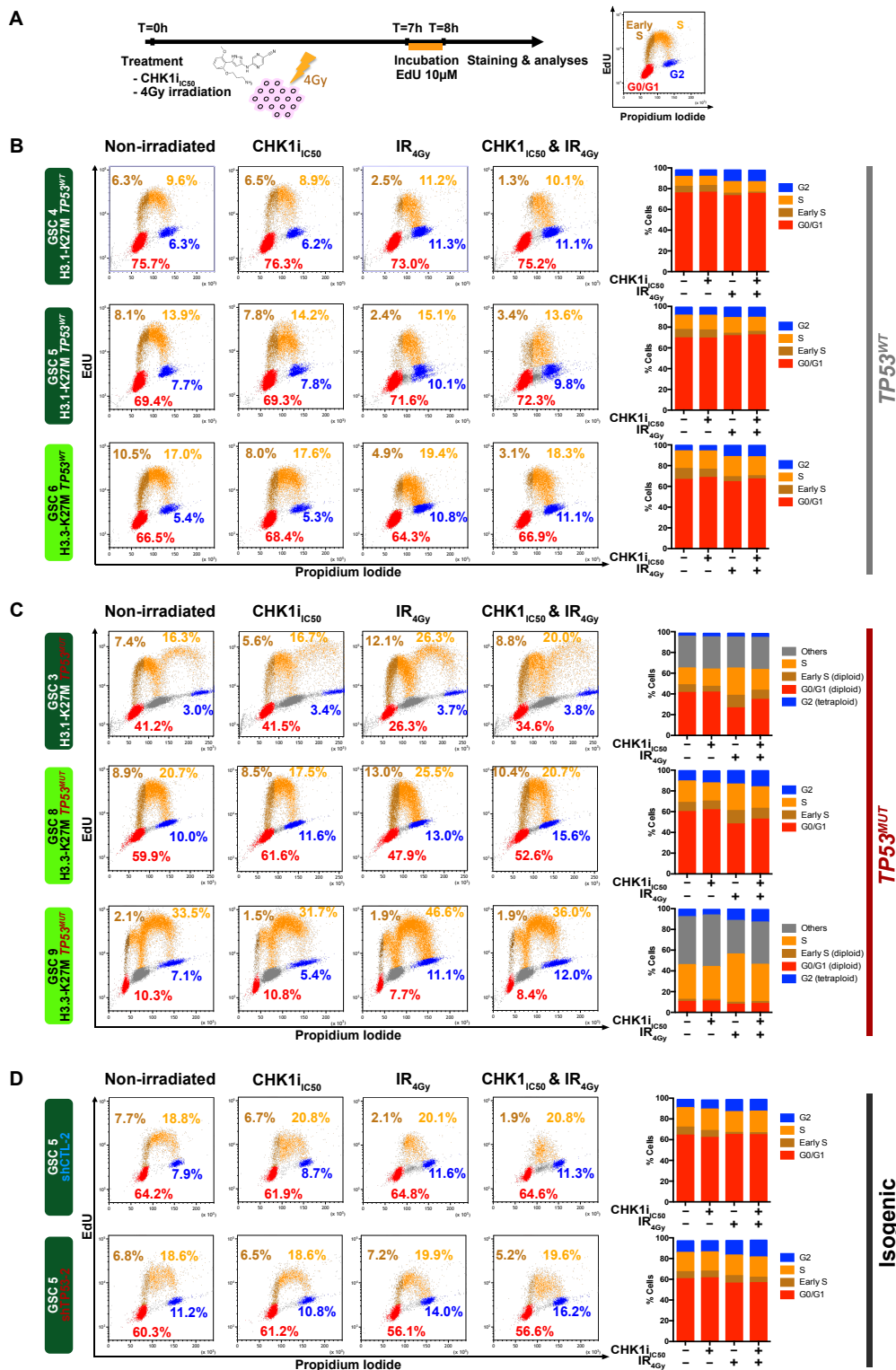


Figure S10. Effect of Prexasertib (CHK1 inhibitor) and irradiation on GSCs cell cycle
A. Experimental design of analyses of cell cycle using Click-iT technology. Cells were exposed to EdU (10 μ M) for 1h at T=7h post-treatment (*i.e.* CHK1 inhibitor at IC₅₀ and/or 4Gy irradiation). EdU was incorporated into cellular DNA during replication to tag cells in S phase. Total DNA was stained with PI. **B.** Two-dimensional plot (EdU vs PI) of 3 TP53^{WT} GSCs 8h post-treatment. 30 000 cells recorded. **C.** Two-dimensional plot (EdU vs PI) of 3 TP53^{MUT} GSCs 8h post-treatment. 30 000 cells recorded. **D.** Two-dimensional plot (EdU vs PI) of isogenic GSC5 with or without TP53 knockdown, 8h post-treatment. 10 000 cells recorded.

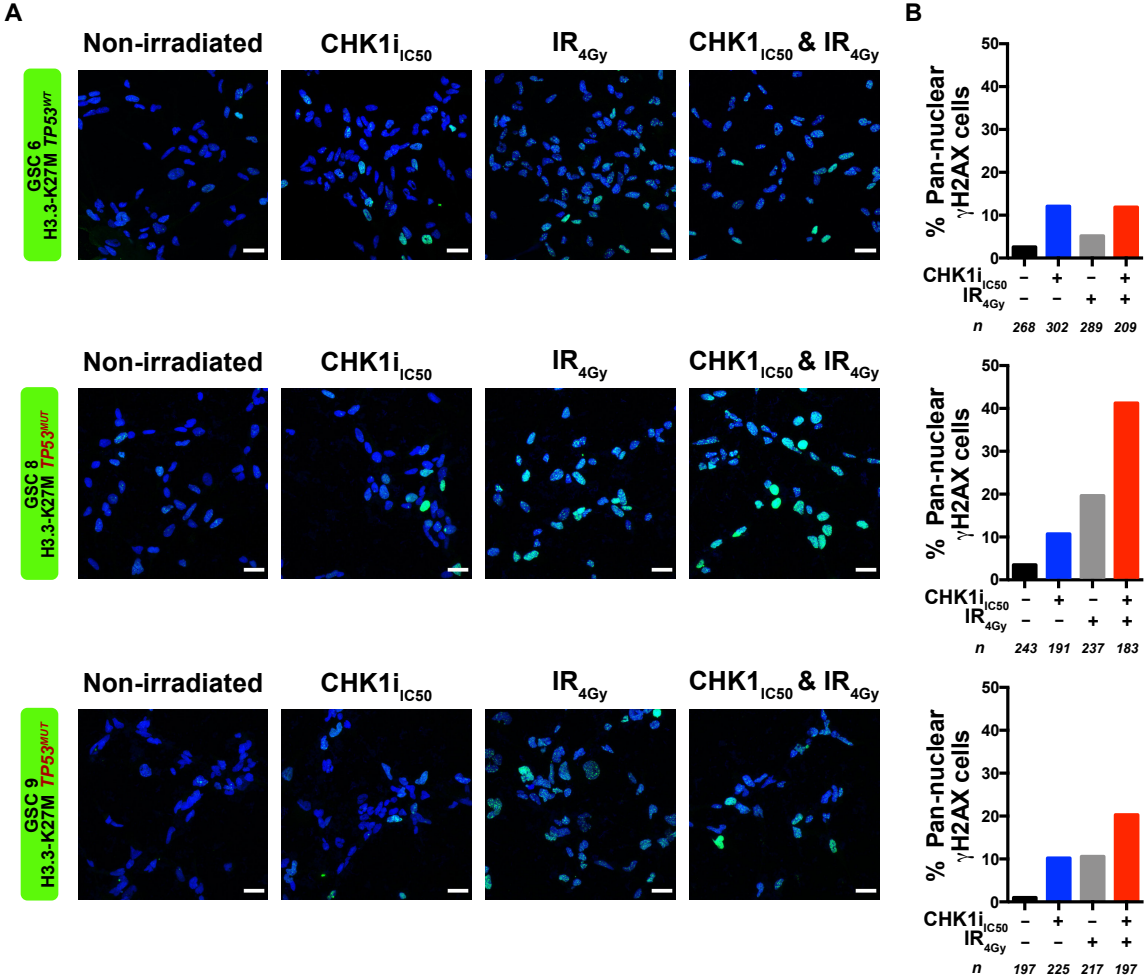


Figure S11. γ H2AX staining by immunofluorescence and quantification of the pan-nuclear positive staining after 8h of treatment.
A, Representative images of γ H2AX stainings of GSC6 (TP53^{WT}) & GSC8-9 (TP53^{MUT}) and quantification of pan-nuclear γ H2AX positive cells after 8h of indicated treatment. Scale bar = 20 μ m.

1.2. Résultats complémentaires à la publication

Le crible de létalité synthétique réalisé sur 3 GSC résistantes à l'irradiation a identifié CHK1 comme une cible thérapeutique potentielle. Un inhibiteur spécifique de CHK1, le Prexasertib s'est révélé efficace à des concentrations submicromolaires *in vitro* sur différentes GSC, notamment en combinaison avec l'irradiation pour les GSC présentant une mutation de *TP53*.

Afin d'approfondir ces résultats et de pouvoir soutenir un éventuel transfert vers la clinique, nous avons réalisé une évaluation thérapeutique *in vivo* sur un modèle de xénogreffe orthotopique de DIPG. Ces modèles permettent de recréer un microenvironnement multicellulaire pour la tumeur et ainsi mimer la physiopathologie des DIPG. En effet, le phénotype d'infiltration et la capacité d'invasion des structures normales du cerveau des DIPG résultent d'interactions avec le stroma qui ne peut être reproduit *in vitro*. De plus, la barrière hémato-encéphalique intacte de ces tumeurs est une limitation très importante dans leur traitement, ainsi il est nécessaire d'évaluer les traitements *in vivo* sur des modèles orthotopiques afin de pouvoir prétendre à une nouvelle médication pour les phases cliniques. La mise en place de ces modèles ainsi que leurs caractérisations exhaustives ont fait l'objet d'un article scientifique publié en 2017 (Plessier et al., 2017).

Pour cela, la mise au point du protocole d'irradiation de souris porteuse de tumeur était essentielle afin de réaliser des évaluations précliniques en combinaison avec la radiothérapie ou pour étudier la biologie de ses tumeurs *in vivo* post-traitement. Un long travail a donc été initié dès le début de mon doctorat pour déterminer les doses et fractions à administrer aux souris. Notre objectif étant de modéliser la progression tumorale chez les patients, à savoir une réponse transitoire suivi d'une nouvelle progression, par conséquent déterminer les doses qui induisent une diminution de la masse tumorale puis une rechute (Fig. 33).

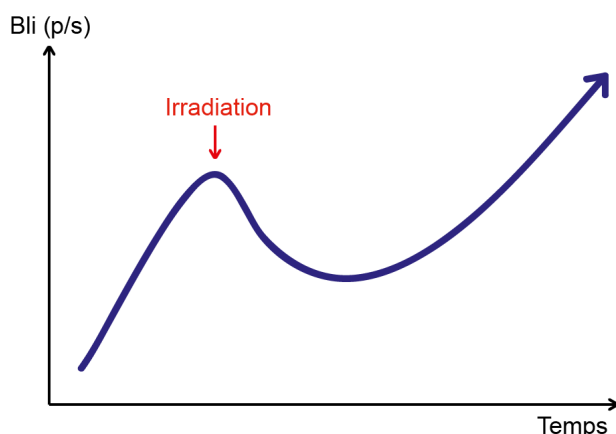


Figure 33. Modélisation *in vivo* de la réponse à la radiothérapie

Réponse théorique à la radiothérapie. La mesure de la bioluminescence (Bli) permet d'extrapoler le volume tumoral. L'objectif est de déterminer le plan de radiothérapie qui engendrera une réponse, à savoir une diminution de la masse tumorale puis une rechute et une nouvelle progression de la tumeur.

L'ensemble de ses résultats sur les souris ont été générés avec l'aide de Ludivine Le Dret (assistante-ingénieur) et Manon Lancien (technicienne) qui ont réalisé les xénogreffes et le suivi longitudinal des souris et les conseils du Dr Michele Mondini (chercheur au sein de l'unité U1030 de radiothérapie moléculaire à Gustave Roussy).

1.2.1. Matériels et méthodes

1.2.1.1. CDOX : modèles orthotopiques murins de DIPG

Dans le cadre du projet doctoral d'Alexandre Plessier et du mémoire EPHE de Ludivine Le Dret, des modèles de xénogreffes orthotopiques de DIPG ont été développés au laboratoire à partir de biopsies de patients prélevées au diagnostic (Plessier et al., 2017).

Brièvement, des GSC préalablement transduites par un vecteur lentiviral contenant le gène *LUC* codant la Firefly Luciférase et le gène codant la protéine fluorescente mKate2 sont greffées dans le tronc cérébral de souris Nude atymique (immunodéficiente). La boîte crânienne des souris est immobilisée à l'aide d'un cadre de stéréotaxie sous anesthésie générale à l'isoflurane et 300 000 cellules resuspendues dans 3 μ L de milieu de culture sont injectées à un débit de 1 μ L/min. La croissance de la tumeur est par la suite suivie de manière longitudinale en utilisant un système IVIS 50 avec caméra CCD (PerkinElmer) de mesure de la bioluminescence après injection péritonéale de luciférine (150 mg/kg de masse corporelle, Promega). Le suivi de bioluminescence est effectué toutes les 2-3 semaines à partir d'un mois post-greffe jusqu'à la fin du protocole ou l'apparition des points limites. Ce suivi longitudinal non invasif permet d'extrapoler le volume tumoral sans avoir besoin de sacrifier des animaux.

L'ensemble des procédures a été réalisé après la validation d'un protocole éthique (APAFIS#675).

1.2.1.2. Mise au point du protocole d'irradiation des modèles *in vivo*

Nous avons utilisé différents modèles de CDOX. Le traitement par radiothérapie des souris commençait lorsque le niveau de bioluminescence correspondant à la masse tumorale était multiplié par 3 par rapport au premier point de mesure post-greffe. Les souris étaient ensuite randomisées selon leur valeur de bioluminescence et divisées en différents groupes. Le traitement est réalisé avec un irradiateur à rayons X Varian Ndi 226 X-ray tube (200 kV, 15 mA, filtration 0,2 mm Cu) avec un débit de dose de 1,08 Gy/min. Les différents plans de traitements utilisés sont indiqués dans le tableau 1 ci-dessous. Pendant le protocole d'irradiation les souris sont sous anesthésie générale à l'isoflurane (3% avec un débit d'air de 1,5 L/min). Le champ d'irradiation est déterminé par le placement d'une plaque en plomb avec une fente de 2 cm positionné de manière à irradier l'arrière du crâne des animaux. Pendant toute la durée de l'expérimentation, une attention particulière est portée au poids des animaux afin d'évaluer une éventuelle toxicité de l'irradiation dans un premier temps et une perte de poids associée au développement tumorale. En cas de faiblesse et perte de poids (sans dépassement des points limites définis dans le protocole éthique), la nourriture est présentée sous forme broyée et/ou un complément alimentaire (Dietgel recovery) leur est proposé avec facilité d'accès.

L'ensemble des procédures a été réalisé après la validation d'un protocole éthique (APAFIS#14237).

Tableau 1. Les différents régimes de radiothérapie utilisés et leurs doses biologiquement efficaces (BED) correspondantes

| Modèle CDOX | Nombre de fractions | Dose par fraction (Gy) | Dose totale (Gy) | BED* (Gy) | Durée de traitement |
|-------------|---------------------|------------------------|------------------|-----------|-------------------------|
| NEM285 | 1 | 10 | 10 | 20 | 1 jours |
| NEM285 | 1 | 15 | 15 | 37,5 | 1 jours |
| NEM290 | 5 | 6 | 30 | 48 | 1 semaine (L-M-Me-J-V) |
| NEM292 | 4 | 3.7 | 14,8 | 20,3 | 1 semaine (L-M-Me-J) |
| NEM292 | 4 | 5.9 | 23,6 | 37,5 | 1 semaine (L-M-Me-J) |
| NEM289 | 10 | 2 | 20 | 24 | 2 semaines (L-M-Me-J-V) |
| NEM289 | 10 | 3 | 30 | 39 | 2 semaines (L-M-Me-J-V) |
| NEM292 | 4 | 4 | 16 | 22,4 | 1 semaine (L-M-Me-J) |
| NEM292 | 4 | 6 | 24 | 38,4 | 1 semaine (L-M-Me-J) |
| NEM292 | 6 | 4 | 24 | 33,6 | 2 semaines (L-Me-V) |
| NEM292 | 8 | 4 | 32 | 44,8 | 2 semaines (L-M-Me-J) |
| NEM292 | 6 | 6 | 36 | 57,6 | 2 semaines (L-Me-V) |
| NEM290 | 8 | 4 | 32 | 44,8 | 2 semaines (L-M-Me-J) |
| NEM290 | 6 | 6 | 36 | 57,6 | 2 semaines (L-Me-V) |
| NEM292 | 4 | 4 | 16 | 22,4 | 1 semaine (L-M-Me-J) |

*BED (dose biologiquement efficace) calculé selon la formule suivante :

$$BED = D \left[1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right] \quad \text{avec } D = \text{dose totale et } d = \text{dose par fraction avec } \alpha/\beta = 10$$

d'après Jones et al., 2001.

1.2.1.3. Evaluation in vivo du Prexasertib en combinaison avec l'irradiation

Nous avons réalisé l'évaluation du Prexasertib dans le model CDOX NEM292 (H3.3-K27M, $TP53^{MUT}$) comportant 4 groupes composés de 10 souris porteuses de tumeur :

- Véhicule (composé de 20% de Captisol dilué dans de l'eau pour injection pH 4)
- Médicament seul : Prexasertib 10mg/kg
- Irradiation seule : 4 x 4 Gy
- Combinaison : Prexasertib 10mg/kg + irradiation 4 x 4 Gy

Le Prexasertib a été administré 2 fois par jours (minimum 8h entre les deux injections) par voie sous-cutanée pendant 3 jours consécutifs par semaine pendant 16 semaines avec une dose de 10mg/kg dans un volume de 5mL/kg. Les souris traitées par irradiation ont reçu une dose totale de 16 Gy en 4 fractions de 4 Gy soit une fraction de 4 Gy par jour pendant 4 jours consécutifs la première semaine de traitement.

Le suivi de bioluminescence a été effectué tous les 15 jours à partir de 3 semaines post-greffe. Le traitement a commencé à partir du jour 22 post-greffe.

L'ensemble des procédures a été réalisé après la validation d'un protocole éthique (APAFIS#19054).

1.2.2. Résultats

1.2.2.1. *Etablissement du protocole d'irradiation des modèles in vivo*

Les premières expériences ont été réalisées sur de faibles effectifs dans l'objectif d'identifier les doses nécessaires pour induire une réponse au traitement (Fig. 34). Le traitement des animaux avec une seule dose de 10 ou 15 Gy a montré toxicité aiguë avec un réveil difficile post-irradiation et le décès d'une des deux souris traitées avec 10 Gy et deux des trois souris traitées avec 15 Gy. Le suivi de la bioluminescence de la souris survivante à 10 Gy semble indiquer une diminution maximale d'un facteur 2 du volume tumoral trois semaines après l'irradiation avant une nouvelle progression de la tumeur. Le suivi de bioluminescence de la souris survivante à 15 Gy semble quant à lui indiquer une diminution durable d'un facteur >1000 du signal de bioluminescence (Fig. 34A). Une deuxième expérience a donc été réalisée en réalisant 5 fractions de 6 Gy correspondant à une dose biologiquement efficace (BED) de 48 Gy. Cette dose a induit une diminution de la bioluminescence d'un facteur 3 et 7 pour, respectivement, une et deux des souris traitées, puis une stagnation du signal pendant 100 jours suggérant un arrêt totale de la progression tumorale (Fig. 34B). Suite à ces résultats, nous avons choisi de diminuer les doses totale et BED en réalisant cette fois-ci 4 x 3,7 Gy (BED = 20,3 Gy) ou 4 x 5,9 Gy (BED = 37,5 Gy). Ces doses ont induit une réponse chez les souris traitées avec une diminution de la bioluminescence d'environ un facteur 2 dont l'effet maximal est observable 3 et 4 semaines après le début du traitement, pour respectivement les groupes 4 x 3,7 Gy (BED = 20,3 Gy) et 4 x 5,9 Gy (BED = 37,5 Gy) (Fig. 34C). Enfin nous avons souhaité fractionner davantage afin de nous

rapprocher des fractions utilisées en clinique tout en restant dans des BED similaires. Pour cela nous avons traité le modèle CDOX NEM289 avec 10 x 2 Gy (BED = 24 Gy) ou 10 x 3 Gy (BED = 39 Gy), sur deux semaines, et cette fois-ci de façon surprenante, nous n'avons pas observé de réponse chez les animaux traités.

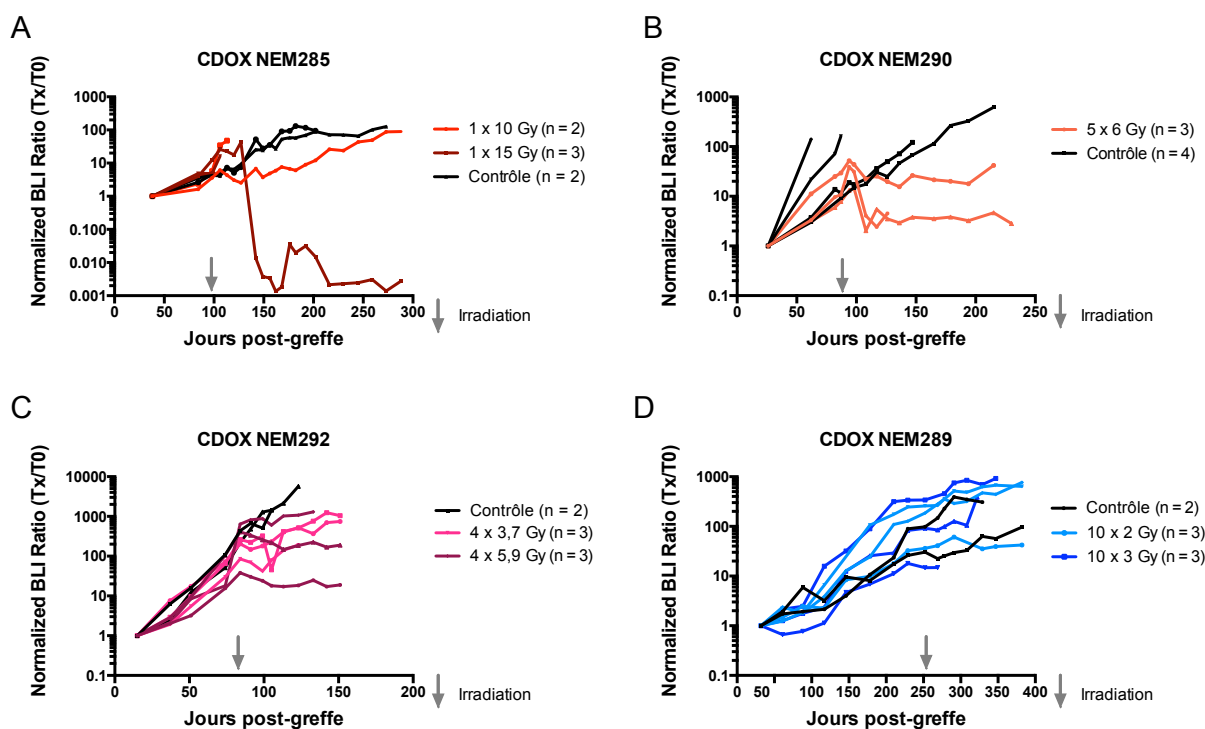


Figure 34. Évaluation de l'effet de différents protocoles d'irradiation des modèles murins de DIPG

Le suivi longitudinal de la croissance tumorale post-irradiation est présenté dans 4 modèles CDOX de DIPG : NEM285 (H3.3-K27M $TP53^{MUT}$) (A) ; NEM290 (H3.3-K27M $TP53^{MUT}$) (B) ; NEM292 (H3.3-K27M $TP53^{MUT}$) (C) et NEM289 (H3.2-K27M $TP53^{MUT}$) (D). Chaque courbe représente le suivi de la bioluminescence (BLI) d'un animal normalisé par rapport à la première mesure (Tx/T0). Chaque groupe est composé de 2-4 animaux. La flèche grise représente la date du début du protocole d'irradiation. Les résultats montrent que les doses 1 x 15 Gy (A) et 5 x 6 Gy (BED = 48 Gy) (B) induisent des réponses durables suggérant un arrêt total de la progression tumorale. Les doses 1 x 10 Gy (BED = 20 Gy) (A), 4 x 3,7 Gy (BED = 20,3 Gy) et 4 x 5,9 Gy (BED = 37,5 Gy) (C) entraîne une diminution de la bioluminescence d'environ un facteur 2 dont l'effet maximal est observable 3-4 semaines après le début du traitement avant une nouvelle progression de la tumeur. Les plans de traitement 10 x 2 Gy (BED = 24 Gy) et 10 x 3 Gy (BED = 39 Gy) (D) n'ont pas eu d'effet sur la croissance tumorale.

A la suite des ces premiers résultats nous avons réalisé de nouvelles expériences en utilisant des effectifs plus importants dans chaque groupe (n = 9) pour les différentes doses utilisées (Fig. 35).

Sur la première évaluation réalisée sur le modèle CDOX NEM292, les plans de traitements 4 x 4 Gy (BED = 22,4 Gy) ou 6 x 4 Gy (BED = 33,6 Gy) ou 4 x 6 Gy (BED = 38,4 Gy) n'ont pas pour conséquences d'entraîner une diminution de la bioluminescence mais sont à l'origine d'une phase de latence de 20 à 60 jours après le début de l'irradiation avant une nouvelle progression tumorale (Fig. 35A). Ces résultats montrent en revanche assez peu de différences en termes de médiane de survie avec un bénéfice d'environ 45 jours pour toutes les souris traitées (Fig. 35B). Ces doses n'entraînant pas une diminution très marquée de la bioluminescence, une nouvelle évaluation sur le modèle CDOX NEM292 a été réalisée avec des doses plus importantes : 8 x 4 Gy (BED = 44,8 Gy) et 6 x 6 Gy (BED = 57,7 Gy) (Fig. 35C). Cette fois-ci, une diminution d'un facteur 2 de la bioluminescence est observable 30 à 40 jours après le 1^{er} jour de traitement. Une nouvelle progression de la tumeur est observable à partir de 60 jours de traitement. Les souris traitées par irradiation ont une médiane de survie supérieure de 100 jours par rapport aux souris contrôles (Fig. 35D). Ces mêmes doses (8 x 4 Gy et 6 x 6 Gy) ont ensuite été évaluées sur un second modèle : CDOX NEM290 (Fig. 35E). Ce modèle présente une croissance plus lente que le modèle CDOX NEM292. Les souris contrôles sont mortes environ 230-250 jours post-greffe, au lieu de 65 jours pour le modèle CDOX NEM292. Comme pour le modèle CDOX NEM292, les groupes traités présentent une diminution d'un facteur 2 de la bioluminescence 30 à 40 jours post-traitement. Le modèle ayant une croissance plus lente, une longue phase de latence de 100 jours est ensuite observée avant une nouvelle progression de la tumeur au niveau du tronc cérébral. Les souris des deux groupes irradiés ont des médianes de survie similaires d'environ 300 jours post-greffe soit un bénéfice de 50-60 jours par rapport aux souris contrôles (Fig. 35F). A noter, ces souris traitées (CDOX NEM290) ont développé des problèmes dentaires nécessitant une nourriture sous forme de gel (Dietgel) suggérant l'atteinte de la dose maximale tolérée.

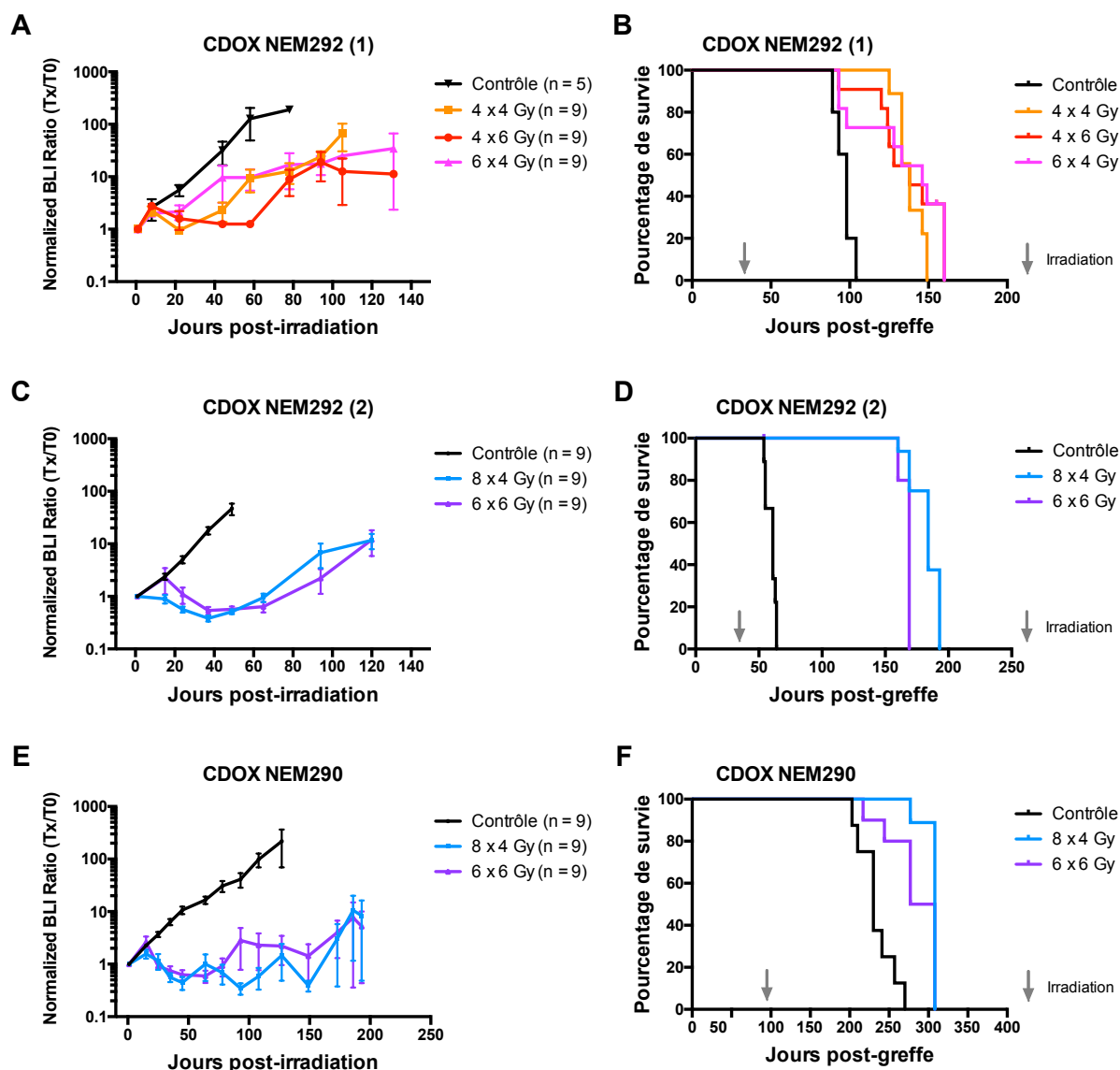


Figure 35. Evaluation de différents plans d'irradiation de modèles murins de DIPG

Pour les modèles CDOX étudiés : NEM290 (H3.3-K27M *TP53*^{MUT}) et NEM292 (H3.3-K27M *TP53*^{MUT}), les animaux ont été randomisés dans différents groupes de 5-9 individus en fonction de leur mesure de bioluminescence (BLI) au premier jour du traitement. Chaque courbe (A, C, E) représente le suivi de la bioluminescence (BLI) pour le groupe représenté (moyenne + SEM). Sur les courbes de survie (B, D, F), la flèche grise représente la date du début du protocole d'irradiation.

Une analyse plus fine du suivi de bioluminescence de chaque animal indique que plus de la moitié des souris (CDOX NEM292 et NEM290) traités par irradiation (6 x 6 Gy et 8 x 4 Gy) présente un signal de bioluminescence dans le bulbe olfactif (Fig. 36). Ce signal est largement supérieur au signal de bioluminescence présent dans le tronc cérébral et suggère que les souris sont mortes dues au développement d'une tumeur en dehors de la zone d'irradiation.

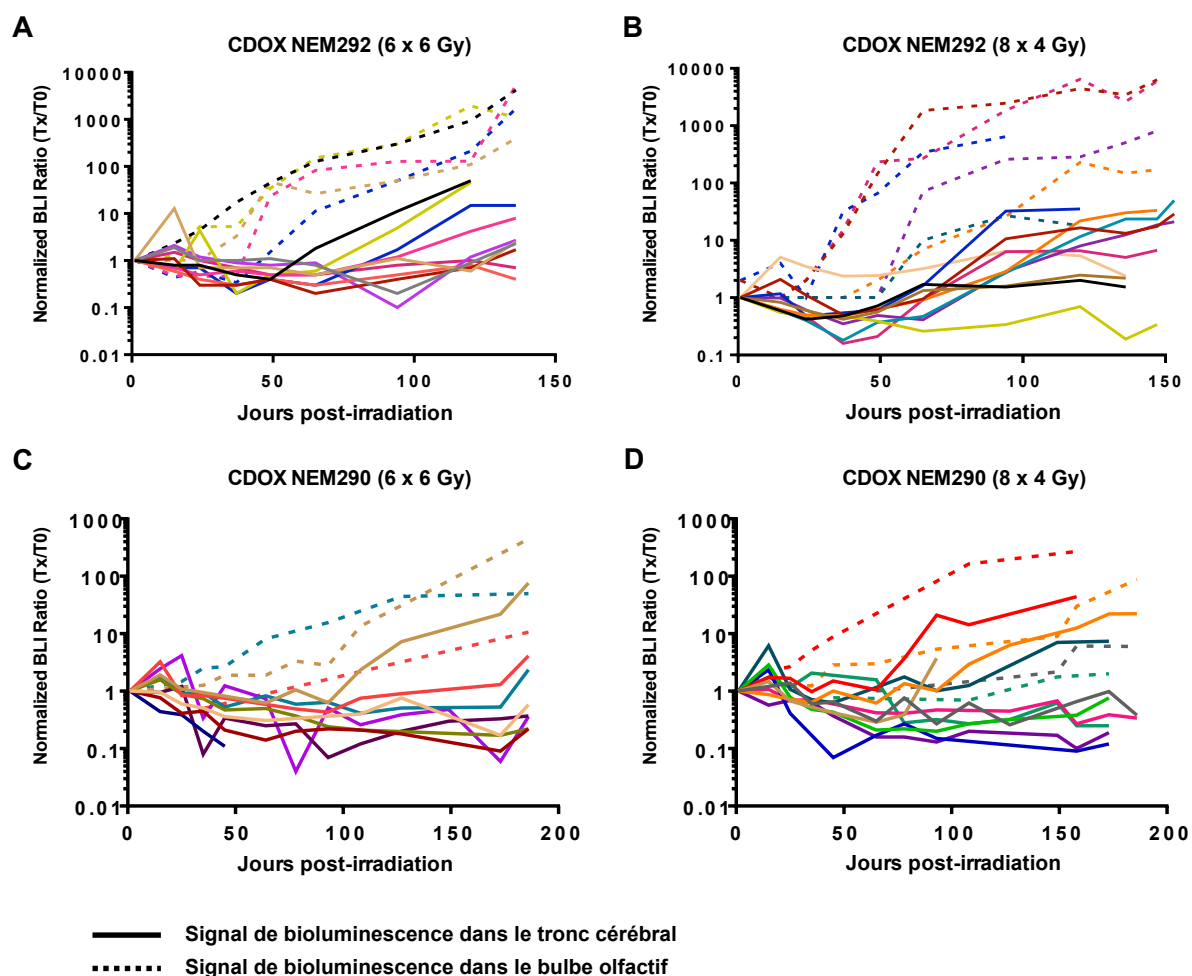


Figure 36. Suivi individuel du signal de bioluminescence dans le tronc cérébral et dans le bulbe olfactif des CDOX NEM292 et NEM290 traités irradiation par 6 x 6 Gy et 8 x 4 Gy

Suivi longitudinal de la croissance tumorale post-irradiation dans le tronc cérébral (trait plein) et le bulbe olfactif (pointillé) pour les CDOX NEM292 traité par 6 x 6 Gy (A) et 8 x 4 Gy (B) ainsi que les CDOX NEM290 traité par 6 x 6 Gy (C) et 8 x 4 Gy (D). Pour chaque groupe, respectivement, 5, 6, 3 et 4 animaux présentent un signal de bioluminescence dans le bulbe olfactif suggérant une croissance de la tumeur en dehors de la zone irradiée (partie postérieure du cerveau).

1.2.2.2. Evaluation in vivo du Prexasertib en combinaison avec l'irradiation

Afin d'étudier l'effet anti-tumoral du Prexasertib, un inhibiteur de CHK1, seul ou en combinaison avec la radiothérapie, 4 groupes de 10 souris CDOX NEM292 (H3.3-K27M, $TP53^{MUT}$) ont été traités avec soit Prexasertib seul (10 mg/kg), soit le véhicule du médicament (groupe contrôle), soit 4 fractions de 4 Gy (BED = 22,4 Gy) ou soit la combinaison du Prexasertib et de l'irradiation. Les courbes de bioluminescence correspondant au suivi de la progression tumorale ne montrent aucune différence significative entre le groupe de souris ayant reçu le Presasertib seul et le groupe véhicule (Fig. 37A). Les souris traitées par radiothérapie montrent une réponse au traitement associée à une diminution de la bioluminescence et d'un plateau, suivi par une rechute avec nouvelle progression tumorale après 7 semaines post-radiothérapie. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus préalablement. Aucune différence significative n'est observable entre le groupe ayant reçu une irradiation seule et le groupe ayant reçu la combinaison Prexasertib et radiothérapie. Les courbes de survie des différents groupes sont à l'image des résultats obtenus par suivi de bioluminescence (Fig. 37B). Aucune différence en terme de médiane de survie n'est observable entre les groupes Prexasertib et contrôle, ni entre les groupes traités par radiothérapie et la combinaison Prexasertib/radiothérapie. Il est à noter qu'aucune toxicité n'a été observée pour les différents groupes de souris traitées.

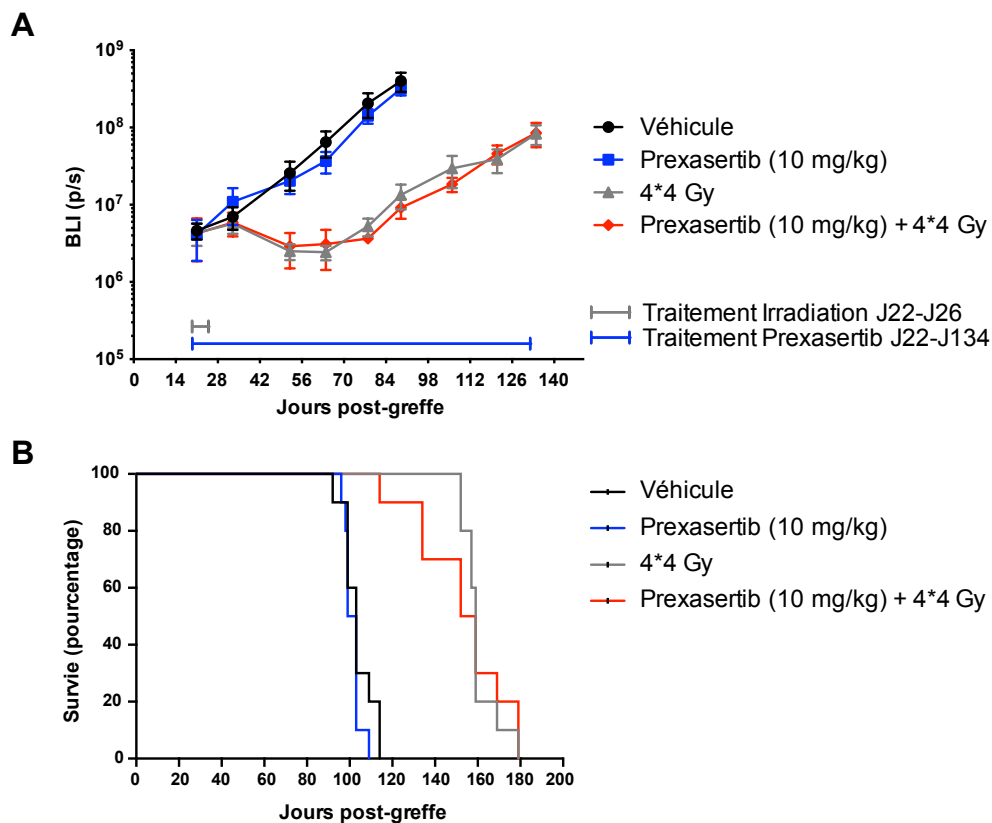


Figure 37. Evaluation préclinique du Prexasertib en combinaison avec l'irradiation dans le modèle murin CDOX NEM 292

A. Suivi de la croissance tumorale par bioluminescence (BLI) au cours du temps pour les différents groupes de souris traités (n = 10). Le traitement a débuté 22 jours après la greffe. B. Courbe de survie en pourcentage pour les différents schémas thérapeutiques. Aucune différence de survie n'est observée dans le cas des souris traitées par Prexasertib seul en comparaison des souris traitées avec le véhicule, ou traitées en combinaison en comparaison des souris traitées par RT seule.

1.3. Discussion & perspectives

L'étude *in vitro* de la radiosensibilité des modèles cellulaires de DIPG (GSC) a nécessité la mise en place d'une méthode permettant de mesurer des fractions survivantes. La méthode standard généralement utilisée par la communauté scientifique est la réalisation de tests de clonogénicité. Malgré de nombreux essais en utilisant différents protocoles, la plupart des GSC ne forme pas de colonies, et l'utilisation de cette technique aurait pu introduire un biais de sélection des lignées. Ainsi, nous avons choisi d'utiliser une méthode de calcul de la fraction survivante à partir de test de prolifération (Buch et al., 2012). Cette méthode repose sur la mesure d'un temps de retard de la prolifération des cellules traitées par rapport à la prolifération des cellules contrôles afin de calculer la fraction survivante correspondant à la dose étudiée (cf. Fig. 1 ; Werbrouck et al., 2019). Ainsi, contrairement aux tests de clonogénicité qui permettent de discriminer les cellules mortes, qui n'ont pas fait de colonies, des cellules survivantes à l'irradiation, mais également de pouvoir identifier d'éventuels retards/arrêt de prolifération de certains clones *via* un différentiel de taille des colonies, les tests de prolifération intègrent l'ensemble de ces composantes (mort cellulaire, ralentissement de la prolifération). Selon les indications des auteurs à l'origine de cette méthode, le temps de retard doit se mesurer en phase exponentielle. Or, selon les modèles de GSC étudiés, les phases exponentielles des courbes de prolifération pour les différentes doses étudiées n'étaient pas toujours parallèles, ainsi selon l'ordonnée choisie pour mesurer le temps de retard, la fraction survivante calculée pouvait varier. Donc pour éviter toutes variations entre les réplicats biologiques et avoir des résultats comparables entre les modèles, le choix a été de mesurer l'ensemble des temps de retard pour une même ordonnée correspondant à un triplement de la confluence de la culture. Néanmoins, cette valeur est totalement arbitraire. Le choix était d'utiliser une valeur au niveau des phases exponentielles pour l'ensemble des modèles étudiés. Ainsi, les comparaisons de DL50 entre les modèles sont possibles puisqu'elles sont déterminées de la même manière, en revanche, les valeurs absolues de DL50 ne sont pas comparables au DL50 mesurée par test de clonogénicité classiquement puisque les deux méthodes ne mesure par les mêmes facteurs (mort cellulaire et ralentissement de la prolifération).

Nos résultats de cinétique de réparation, par quantification des foci γ H2AX et 53BP1, indique une réparation plus rapide dans les modèles de GSC sensibles à l'irradiation ($TP53^{WT}$) en comparaison aux cellules $TP53^{MUT}$ (Fig. S8; Werbrouck et al., 2019). En parallèle, les résultats d'études du cycle cellulaire montrent que les cellules $TP53^{WT}$ bloquent leur cycle cellulaire en phase G0/G1 alors que les cellules $TP53^{MUT}$ ne présentent pas d'arrêt en phase G0/G1 mais une accumulation en phase S et G2/M (Fig. S9A; Werbrouck et al., 2019). De ce fait, on peut faire l'hypothèse que les cellules $TP53^{MUT}$ réparent leurs dommages en phase G0/G1 par la voie de réparation NHEJ alors que les cellules $TP53^{MUT}$ en phase S/G2-M utilisent le brin d'ADN néosynthétisé comme matrice pour une réparation par la voie HR. Ce différentiel de cinétique de réparation peut donc s'expliquer par le fait que la voie NHEJ de réparation des dommages est plus rapide et plus efficace que la voie HR (Mao et al., 2008). De plus, après une irradiation de 4 Gy, l'ensemble des dommages est réparé en 48h qui est une durée inférieure au temps de doublement de ces cellules. On peut donc penser que ces dommages ne sont pas à l'origine de nouvelles mutations. En revanche, l'observation des courbes de prolifération à forte dose (6-8 Gy) des cellules $TP53^{MUT}$ indique un ralentissement de la population environ 300 heures après l'irradiation (Fig. 1C; Werbrouck et al., 2019), ce qui suggère des conséquences à plus long terme de l'irradiation (accumulations de mutations, catastrophes mitotiques...). Une hypothèse pour expliquer ce phénomène serait que ces cellules aient cyclé sans avoir réparé l'ensemble de leurs dommages. Il apparait donc que la vitesse de réparation ne soit pas un facteur expliquant la différence de radiorésistance au sein des GSC contrairement à notre hypothèse de départ qui était que les cellules résistantes à l'irradiation avait une capacité de réparation plus rapide.

Il a été montré dans les glioblastomes que les cellules résistantes à l'irradiation étaient des cellules avec des mécanismes des réparations plus efficaces et présentant des marqueurs de cellules souches (CD133) (Bao et al., 2006). Cette population cellulaire CD133+ est enrichie après irradiation. Chez les DIPG, la plupart des cellules tumorales au diagnostic présentent une signature moléculaire caractéristique des cellules souches (Filbin et al., 2018). Nos résultats sont cohérents avec cette observation, les cellules de DIPG présentent des cinétiques de réparation comparables au modèle de hNSC étudié. Cela suggèrent que ces

caractéristiques souches contribuent au caractère innée de la résistance à la radiothérapie des DIPG.

De plus, nous avons vu dans l'introduction que le microenvironnement via notamment la sécrétion de TGF- β par les astrocytes pouvait augmenter la capacité de réparation des dommages à l'ADN dans les GSC de glioblastomes (Jamal et al., 2010). Il serait intéressant de confronter ces résultats à des marquages γ H2AX et 53BP1 réalisé en immunohistochimie sur des organoïdes ou des cerveaux de souris greffés par des GSC et traité par irradiation afin d'étudier le rôle du microenvironnement dans la réparation des dommages à l'ADN.

La mise en place des plans d'irradiation des souris a nécessité beaucoup de temps. Nos modèles de CDOX étant déjà des modèles avec une croissance lente, les réponses induites par le traitement ont entraîné des délais compris entre 3 mois et 6 mois selon les modèles étudiés. Les modèles murins de DIPG utilisés sont tous des modèles présentant des mutations de *TP53*, responsable de la radioresistance des cellules de DIPG. Ces souris ont nécessité de fortes doses d'irradiation pour observer une réponse au traitement (8 x 4 Gy (BED = 44,8 Gy) et 6 x 6 Gy (BED = 57,7 Gy)). Ces résultats sont en accord avec les doses importantes utilisées en clinique *i.e.* 30-33 fraction de 1,8 Gy (BED = 63,7-70 Gy). Il est intéressant de noter que plus de la moitié des souris traitées présentaient un développement tumoral dans le bulbe olfactif et ce signal était présent avant même le début du protocole de traitement. Une croissance tumorale en dehors du champ d'irradiation est donc logique. Des statistiques réalisées sur l'ensemble des modèles CDOX développés au laboratoire indiquent que 60% des animaux vont présenter un signal dans le bulbe olfactif en plus du signal dans le tronc cérébral. A ce jour, nous expliquons ce phénomène par une dissémination des cellules dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) au moment de la xénogreffe.

Ces fortes doses ont causé des pertes de poids des animaux pendant le traitement et des problèmes dentaires plusieurs mois après l'irradiation dans un des modèles de DIPG à croissance lente suggérant l'atteinte des doses maximales tolérées par les animaux. Ceci peut s'expliquer par un champ d'irradiation relativement large de l'irradiateur et donc de l'irradiation des tissus sains de la bouche. Pour ces raisons, mais aussi pour pouvoir observer un éventuel bénéfice de la combinaison Prexasertib et irradiation, et de surcroît dans un délai raisonnable, nous avons choisi

une dose plus faible (4 x 4 Gy) pour réaliser l'évaluation préclinique de la combinaison entre le Prexasertib et l'irradiation.

Dans ce travail, parmi les 36 kinases identifiées par le crible de létalité synthétique dont l'inhibition altère sélectivement la survie cellulaire en association avec une irradiation, nous avons choisi d'étudier trois cibles : ATM, WEE1 et CHK1. Dans un premier temps, les IC50 pour trois inhibiteurs de ces cibles, AZD1390, MK-17775 et le Prexasertib respectivement, ont été déterminées sur deux modèles de GSC (cf. Fig. S4 ; Werbrouck et al., 2019). Les IC50 ont été déterminées pour la molécule seule sans combinaison avec l'irradiation. Cela était peut-être un erreur de se concentrer sur la molécules présentant l'IC50 la plus faible (i.e. l'inhibiteur de CHK1, le Prexasertib) sans prendre en compte le potentiel effet synergique des différentes molécules avec l'irradiation, qui est, ce que nous avons recherché dans le crible de létalité synthétique. Nous avons donc choisi de nous concentrer sur CHK1 et de réaliser une évaluation préclinique du Prexasertib pour un transfert en clinique. Les résultats *in vitro* ont montré une induction de cytotoxicité spécifiquement dans les GSC $TP53^{MUT}$. Malheureusement, la première évaluation *in vivo* dans des modèles de xénogreffes orthotopiques n'a montré aucun bénéfice pour les souris traitées avec le Prexasertib en agent seul ou en combinaison avec la radiothérapie. Ce résultat *in vivo*, certes très décevant au vu des résultats *in vitro*, nous conforte dans l'importance de réaliser des évaluations précliniques dans des modèles *in vivo* pertinents. En effet, les modèles de xénogreffes orthotopiques sont la seule possibilité de représenter la complexité d'un organisme entier (métabolisation de la molécule, toxicité, passage de la barrière hémato-encéphalique) et ainsi d'évaluer l'activité antitumorale d'une molécule pour justifier l'administration d'un nouveau médicament à des patients en clinique. Ce résultat est très étonnant car les données de la littérature disponibles au moment de l'étude indiquaient une pénétration intracérébrale/tumorale importante du Prexasertib dans des modèles orthotopiques de médulloblastome avec des concentrations de 10 ng/mL de drogues mesurées par microdialyse dans le LCR. Cette concentration, correspondant à 27 nM, étant supérieur aux IC50 déterminés *in vitro* dans les GSC laissait espérer un bénéfice pour les souris traitées par le Prexasertib.

Néanmoins, plusieurs aspects doivent être étudiés avant de renoncer à l'utilisation du Prexasertib et plus généralement à la cible CHK1. Tout d'abord, le schéma thérapeutique était issu des informations de la littérature (Lowery et al., 2017). La dose évaluée de 10 mg/kg est inférieure à la dose maximale tolérée chez l'homme, 70mg/kg, et les souris ont très bien supporté le traitement. Dans un premier temps, une étude de pharmacocinétique/pharmacodynamique est à réaliser afin de déterminer la quantité de Prexasertib présent dans le tronc cérébral de souris porteuses de tumeurs et vérifier l'inhibition de la cible CHK1. A ce jour, une nouvelle étude, publiée après notre évaluation, a été réalisée par la même équipe dans des souris porteuses de médulloblastome et des souris saine présentant une barrière hémato-encéphalique intacte (Campagne et al., 2020). Leurs études pharmacocinétiques indique un maximal de concentration une heure après l'injection de 10 mg/kg par voie sous-cutanée. Ce maximal de concentration est compris entre 6,7 et 24,4 ng/mL (soit 18 nM et 66 nM) pour les souris porteuses de tumeurs et entre 1,5 et 9,6 ng/mL (soit 4 nM et 29 nM) pour les souris saines. Les auteurs observent également l'inhibition de CHK1 en immunohistochimie au niveau du tissu tumoral entre 2h et 6h après une injection à 20mg/kg. Les résultats de pharmacocinétique de Campagne et al, montrent de fortes différences allant jusqu'à un facteur 16 entre la concentration de Prexasertib retrouvée dans un modèle murin porteur de tumeur (24,4 ng/mL) et un modèle sain (1,5 ng/mL). Par conséquent, une étude pharmacocinétique et pharmacodynamique est indispensable afin de déterminer la concentration de médicament dans le tissus tumoral de souris porteuses de DIPG avant une nouvelle évaluation avec des doses plus importantes dans l'hypothèse d'un résultat satisfaisant (i.e. concentrations retrouvées supérieurs aux IC50 déterminées *in vitro*) De plus, nous avons choisi arbitrairement de commencer les traitements (Prexasertib et radiothérapie) en même temps 3 semaines post-greffe. Il serait intéressant d'optimiser le schéma thérapeutique. Par exemple, traiter les souris avec le Prexasertib pendant quelques jours avant d'utiliser la radiothérapie afin d'accumuler la molécule au niveau du tissu et ainsi potentialiser l'effet de la radiothérapie. Enfin, d'autres inhibiteurs de CHK1 existent comme le SRA737 de Sierra Oncology actuellement en essai clinique en phase I/II pour le traitement de tumeurs solides avancées (NCT02797964, NCT02797977), et le CASC-578 de Seattle Genetics actuellement en évaluation pré-clinique (Vo et al., 2017).

RESULTATS - Etude des déterminants moléculaires de la résistance à l'irradiation

Ces inhibiteurs pourraient être étudiés, d'autant plus que le développement du Prexasertib vient d'être arrêté par Eli-Lilly (source: [Evaluate Pharma 2019](#)).

2. Evaluation de l'effet synergique de combinaison de différents médicaments candidats avec l'irradiation

Les DIPG sont caractérisés par la présence de mutations H3-K27M dans les gènes codant pour les histones canoniques H3.1/2 ou pour le variant H3.3. La découverte de ces mutations a permis d'individualiser les DIPG d'un point de vue moléculaire par rapport aux autres gliomes malins et a conduit à une meilleure compréhension des dysfonctionnements épigénétiques sous-jacents.

Le deuxième objectif de mon projet consistait à réaliser des évaluations précliniques *in vitro* de différents agents thérapeutiques en combinaison avec l'irradiation afin de mettre en évidence des synergies susceptibles d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie. Pour cela, des médicaments influant sur l'épigénétiques mais également d'autres candidats médicaments ont été évalués dans nos modèles de DIPG.

Nous avons vu dans l'introduction que les histones ont un rôle fondamental dans la structure et la régulation de la chromatine. Leurs queues N- et C-terminales sont le siège de modifications post-traductionnelles à l'origine du contrôle de la dynamique de la chromatine et de l'expression des gènes en regard (Furey and Sethupathy, 2013). Ces marques épigénétiques (méthylation, phosphorylation, acétylation, ubiquitinylation) sont catalysées par des enzymes "*writers*", comme les histones méthyltransférases, lues par des enzymes "*readers*", comme les protéines à bromodomain impliqué dans le recrutement d'autres facteurs modifiant la chromatine et retirées par des enzymes "*erasers*" comme les histones désacétylases (Tollervey and Lunyak, 2012).

Dans les DIPG, les mutations H3-K27M sont à l'origine d'une perte globale de di- et tri-méthylation en position H3K27 (H3K27me_{2/3}) et de gains focaux de H3K27me₃ sur certains loci associés à la tumorigenèse comme *CDKN2A* codant INK4A (p16) et ARF (p14), deux protéines "suppressives" de tumeur (Bender et al., 2013), (Chan et al., 2013). Cette mutation H3-K27M a donc pour conséquence une activation et une répression aberrante de la transcription.

Dans ce contexte, la compréhension de la biologie des DIPG a conduit à l'étude de médicaments ciblant des régulateurs épigénétiques afin de réverter les conséquences transcriptionnelles induites par la protéine mutée H3-K27M (Hashizume, 2017).

Pour cela, différents types de stratégies peuvent être utilisées : (i) inactiver globalement la transcription des gènes qui se trouvent dérégulés dans les cellules mutées ou (ii) réactiver la transcription des loci présentant des gains focaux de H3-K27me3 et ainsi l'expression de certains gènes suppresseurs de tumeurs.

L'activation de la transcription est une conséquence de la perte globale de H3-K27me3 due à l'inhibition du complexe PRC2 par les histones mutées H3-K27M. Il apparaît donc intéressant de restaurer la méthylation des histones H3K27. Pour cela, l'inhibition de l'histone déméthylase KDM6 en charge de la déméthylation de la position H3K27 via l'inhibition des sous-unités JMJD3 et UTX est une première stratégie possible (Ezponda and Licht, 2014), (Kruidenier et al., 2012) (Fig. 38). L'activation de la transcription des cellules de DIPG est également associée à une augmentation de l'acétylation de H3K27 (Lewis et al., 2013). Ainsi, la formation de nucléosomes hétérotypiques contenant une histone H3-K27M et une histone H3-K27ac co-localise avec des protéines à bromodomaine au niveau des loci transcriptionnellement actifs dans les régions de type super-enhancers (Piunti et al., 2017). Cette marque épigénétique est reconnue par BRD4, une protéine à bromodomaine, afin de recruter des facteurs d'initiation et d'élongation de la transcription (Popovic and Licht, 2012). Ainsi, cibler les protéines à bromodomaine BET a pour conséquence une inactivation de la transcription.

A l'inverse, si l'objectif est de restaurer la transcription des loci présentant des gains de H3-K27me3, cela peut se faire par l'inhibition d'EZH2, la sous-unité catalytique du complexe PRC2 (Mohammad et al., 2017). Il a en effet été démontré par deux travaux distincts que PRC2 restait nécessaire à la prolifération des DIPG malgré son inhibition par la mutation H3K27M (Mohammad et al., 2017 ; Piunti et al., 2017). Une autre stratégie possible est d'inhiber les histones désacétylases (HDAC). L'inhibition des HDAC a pour conséquence une augmentation de l'acétylation des résidus lysine des queues N-terminales des histones (Grasso et al., 2015). Cette acétylation des

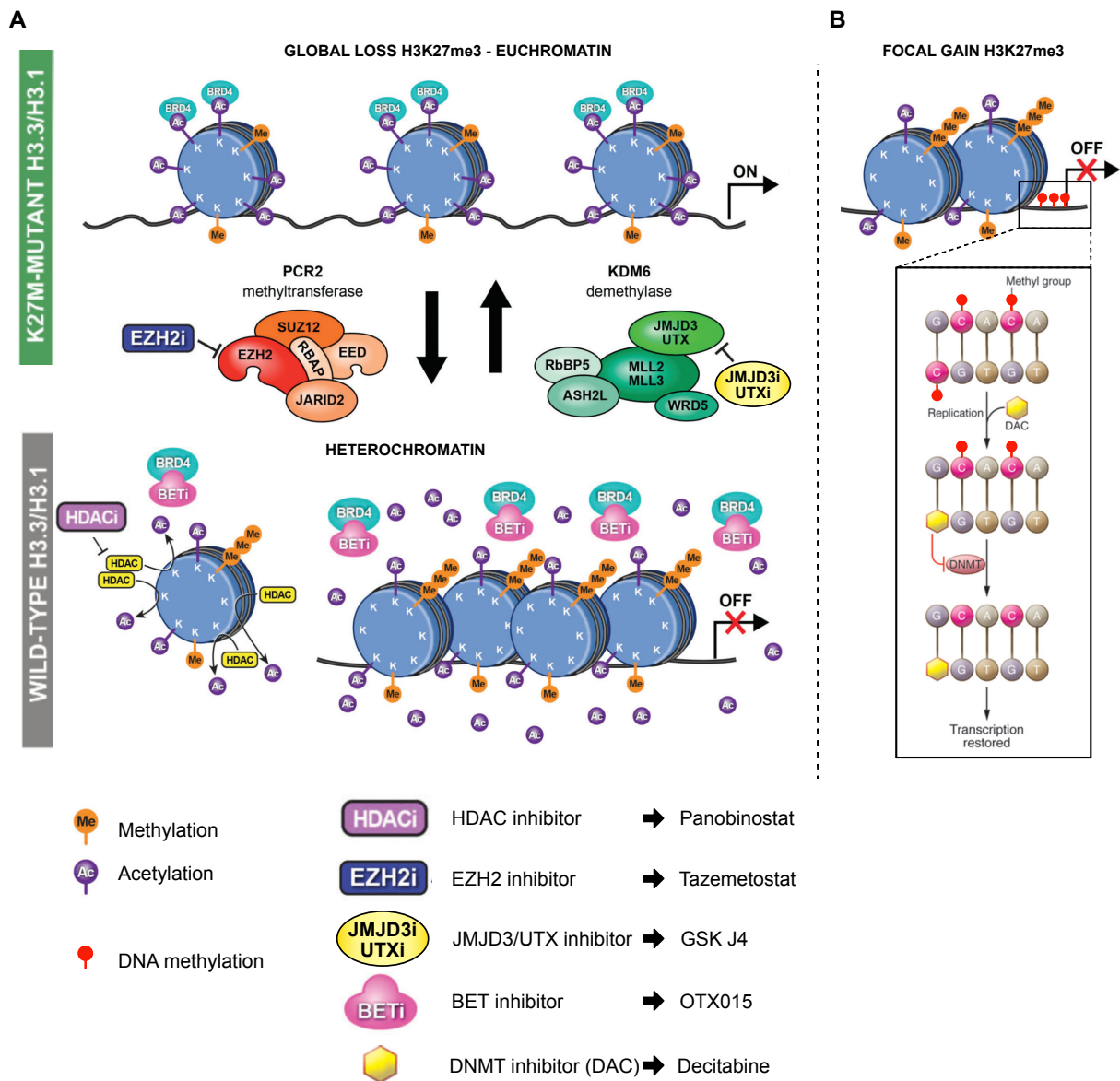


Figure 38. Médicaments épigénétiques pour le traitement des DIPG

La mutation H3-K27M entraîne une perte globale de di- et tri-méthylation au niveau de la lysine 27 (H3K27me2/3) de l'histone H3 (A) et des gains focaux de H3K27me3 (B). PRC2 (méthytransférase) appose les marques H3K27me2/3. KDM6 (déméthylase) retire les marques H3K27me2/3. HDAC retire les groupements acétyl des histones. L'augmentation du niveau de H3K27me2/3 et donc l'inactivation de la transcription peut se faire par l'inhibition de KDM6 par GSK-J4 ou par l'inhibition des BRD4 par OTX015, un inhibiteur compétitif. L'activation de la transcription des loci présentant des gains focaux peut se faire par l'inhibition d'EZH2 (Tazemetostat), l'inhibition des HDAC (Panobinostat) ou par l'inhibition des DNMT (Decitabine) responsable de la méthylation de l'ADN. La Décitabine est un analogue du nucléoside cytidine. Pendant la réplication, la Décitabine va être incorporé dans l'ADN et inhiber les DNMT (B).

BET, Bromodomain and extraterminal domain; BRD4, Bromodomain-containing protein 4; DNMT, DNA methyltransferase; HDAC, Histone deacetylases; KDM6, lysine demethylase 6; PRC2, Polycomb Repressive Complex 2.

Modifié de Hashizume, 2017 et Navada et al., 2014

RESULTATS - Evaluation de l'effet synergique de combinaison de différents médicaments candidats avec l'irradiation

histones entraîne une décondensation de la chromatine et une activation de la transcription. Enfin, les gains focaux H3K27me3 sont associés à une hyperméthylation de l'ADN au niveau des promoteurs des gènes (Bender et al., 2013). L'addition d'un groupement méthyle est effectuée par les enzymes DNMT (DNA methyl-transferase). Ainsi l'inhibition des DNMT entraîne une hypométhylation de l'ADN a pour conséquence une réactivation de leur transcription.

En outre, afin d'identifier de nouveaux médicaments candidats pour le traitement des DIPG, notre équipe a réalisé des cribles pharmacologiques dans le cadre de collaboration internationale. Cette approche de criblage fonctionnel permet d'identifier sans a priori des médicaments efficaces pour le traitement de modèles cellulaires de DIPG.

Outre l'identification de médicaments épigénétiques, présenté ci-dessus, un premier crible pharmacologique de 80 molécules sélectionnés pour leur efficacité potentielle a été réalisé sur un panel de 14 modèles cellulaires de DIPG ; il a identifié parmi les dix médicaments les plus prometteurs le Carfilzomib, un inhibiteur du protéasome, comme efficace à des concentrations submicromolaires (Grasso et al., 2015). En 2016, un nouvel inhibiteur du protéasome, le Marizomib, s'est révélé efficace pour le traitement de modèles cellulaire et murin de glioblastomes avec une capacité à passer la barrière hémato-encéphalique (Manton et al., 2016 ; Di et al., 2016). Un autre crible pharmacologique réalisé en collaboration avec une équipe du DKFZ sur une chimiothèque de 80 000 composés a confirmé l'efficacité des inhibiteurs du protéasome et identifié le Mebendazole, une molécule initialement utilisée comme antihelminthique, comme efficace pour le traitement de cellules de DIPG (données non publiées). Le Mebendazole a également montré un bénéfice dans le traitement des modèles précliniques murins de glioblastomes et de médulloblastomes (Bai et al., 2011 ; Bai et al., 2015). Il nous ait donc apparu pertinent d'évaluer ces deux molécules sur nos modèles de DIPG.

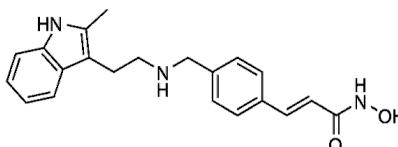
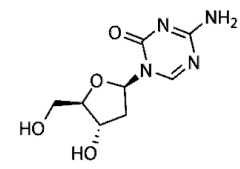
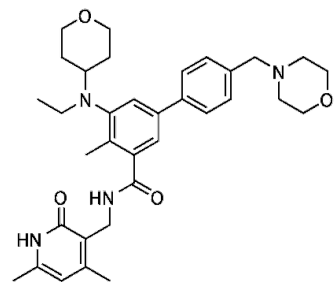
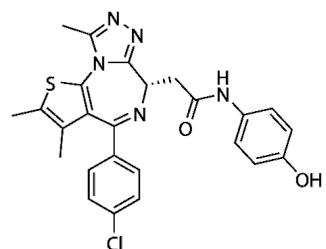
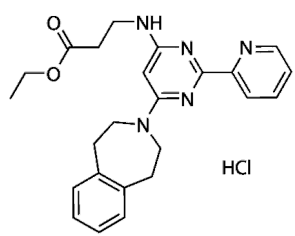
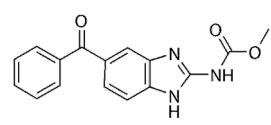
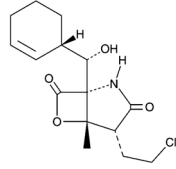
2.1. Matériels et méthodes

2.1.1. Les médicaments candidats évalués

Pour chaque molécule, sa formule chimique, son poids moléculaire ainsi que le fournisseur, la référence et la concentration de la solution stock réalisée dans du dimethyl sulfoxyde (DMSO) conservée à -20°C sont reportés dans le tableau 2.

Le Panobinostat est un inhibiteur des histones désacétylases (HDAC). Le Décitabine ou 5-aza-2'-deoxycytidine est un analogue du nucléoside cytidine, qui va être incorporé dans l'ADN pendant la réplication et inhiber les méthyltransférases (DNMT). Le Tazemetostat (EPZ-6438) est un inhibiteur d'EZH2, la sous unité catalytique du complexe PRC2. OTX015 est un inhibiteur des protéines à bromodomains de la famille BET (BRD2, BRD3 et BRD4). GSK J4 est une prodrogue de GSK J1, un inhibiteur sélectif des histones déméthylases JMJD3 et UTX qui catalyse la deméthylation de la position H3K27. Le Mebendazole est agent antihelminthique interférant avec la reproduction et la survie des helminthes en inhibant la formation de leurs microtubules, bloquant ainsi l'absorption de glucose (source d'énergie nécessaire à leur survie). Enfin, le Marizomib inhibe l'activité du protéasome en modifiant de manière covalente les résidus de thréonine du site actif du protéasome 20S.

Tableau 2. Informations sur les candidats médicaments évalués

| Molécules | | Fournisseur et références | Concentration stock (DMSO) |
|--|---|------------------------------------|----------------------------|
| Panobinostat C ₂₁ H ₂₃ N ₃ O ₂ M.W. 349.43 g/mol |  | LC Laboratories #P-3703 | 10 mM |
| Décitabine C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₄ M.W. 228.21g/mol |  | Selleckchem S1200 | 10 mM |
| Tazemetostat (EPZ-6438) C ₃₄ H ₄₄ N ₄ O ₄ M.W. 572.74 g/mol |  | Selleckchem S7128 (batch no. 4) | 10 mM |
| OTX015 C ₂₅ H ₂₂ ClN ₅ O ₂ S M.W. 491.99 g/mol |  | Selleckchem S7360 | 10 mM |
| GSK J4 C ₂₄ H ₂₇ N ₅ O ₂ .HCl M.W. 491.99 g/mol |  | Selleckchem S7070 (batch no. 5) | 10 mM |
| Mebendazole C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₃ M.W. 295.3 g/mol |  | Cayman #18872 | 10 mM |
| Marizomib C ₁₅ H ₂₀ ClNO ₄ M.W. 313.8 g/mol |  | Cayman #10007311 | 5 mM |

2.1.2. Réalisation de courbes de dose-réponse *in vitro* par suivi de la prolifération

Les cellules de DIPG sontensemencées à 20 000 cellules/cm² dans des plaques 96 puits préalablement recouvert avec 100 µL à 10 mg/L de laminine (Gibco). Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture composé de NeuroCult NS-A supplémenté avec un supplément de prolifération (Stemcell technologies), de l'héparine (2 µg/mL, Stemcell technologies) et les facteurs de croissance human-basic FGF (20 ng/mL, Peprotech), human-EGF (20 ng/mL, Peprotech), PDGF-AA (10 ng/mL, Peprotech), et PDGF-BB (10 ng/mL, Perprotech). Le lendemain, une gamme de concentration de drogue est ajouté aux cellules (T0) avec un minimum de 3 réplicats techniques par concentration. Les plaques 96 puits sont ensuite scannées quotidiennement pendant 6 jours par vidéomicroscopie (INCUCyte ZOOM) afin de suivre la confluence des cellules en fonction du temps pour évaluer leur prolifération. Le logiciel d'analyse (Essen Bioscience) permet de déterminer la surface occupée par les cellules et ainsi l'exprimer en pourcentage de confluence.

Afin de déterminer les courbes de dose réponse, les aires sous la courbe (AUC, Area Under Curve) pour chaque concentration sont calculées à l'aide du logiciel Prism. Les AUC en fonction du logarithme de la concentration de médicament sont ensuite modélisées par une fonction à quatre paramètres afin de déterminer les IC50 pour chaque molécule.

2.1.3. Ajout des drogues avec un pico-distributeur

Les drogues ont été ajoutées avec un pico-distributeur automatique (TECAN D300). Pour cela, les plans de plaque ont été renseignés dans le logiciel puis randomisés. La randomisation permet d'éviter d'éventuels effets de bord. La solution stock des médicaments étant le DMSO, un solvant toxique pour les cellules à forte concentration (supérieur à 1% dans le milieu), nous avons distribué du DMSO afin d'avoir la même concentration de DMSO dans l'ensemble des conditions dont la condition contrôle.

2.1.4. Irradiation *in vitro*

Dans le cadre de l'évaluation de la combinaison entre une molécule chimique et l'irradiation, les cellules ont été irradiées 48h après l'ajout de la drogue évaluée. Les plaques 96 puits ont donc été irradiées à la DL50 soit 0,7 Gy et 5,95 Gy pour NEM328 (H3.1-K27M, *TP53^{WT}*) et NEM290 (H3.3-K27M, *TP53^{MUT}*), respectivement. L'irradiation a été réalisée en utilisant un irradiateur X-RAD 320 Biological Irradiator (Precision X-Ray Inc.) à 320 kV, 4 mA et un débit de dose de 1,03 Gy/min.

2.2. Résultats

2.2.1. Évaluation de l'efficacité *in vitro* des inhibiteurs en agent seul

Les courbes de dose-réponse ainsi que les IC50 calculées sont représentés dans la figure 39.

Parmi les médicaments « épigénétique », le Panobinostat a une efficacité similaire sur les deux GSC avec des IC50 d'environ 20 nM (Fig. 39A). Les IC50 ne sont pas déterminables pour le Décitabine et le Tazemetostat malgré des concentrations importantes de 2,5 µM et 100 µM respectivement (Fig. 39C). L'IC50 de GSK J4 est d'environ 1,8 µM pour les deux GSC étudiés (Fig. 39D). Pour OXT015, la gamme utilisée ne permet pas d'identifier clairement le plateau inférieur de la sigmoïde (Fig. 39E). Les valeurs d'IC50, certes moins robustes, d'OTX015 sont d'environ de 0,5-1 µM. Le Marizomib et le Mebendazole ont des IC50 de 0,5 µM et 6-7 nM, respectivement (Fig. 39F-G).

RESULTATS - Evaluation de l'effet synergique de combinaison de différents médicaments candidats avec l'irradiation

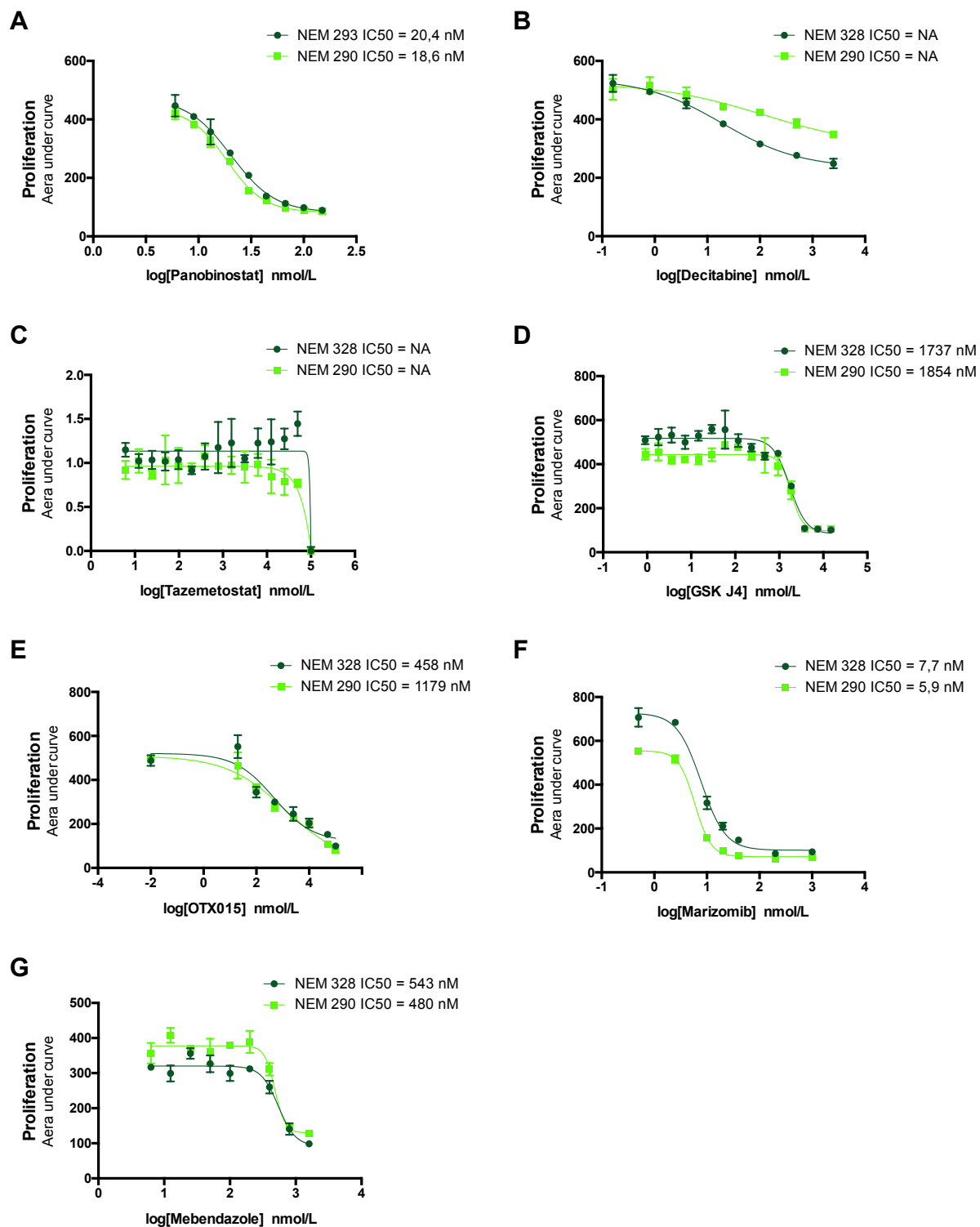


Figure 39. Dose réponse des inhibiteurs en mono-agent pour 2 GSC : NEM328 et NEM290

Pour chaque inhibiteur, l'aire sous la courbe est représentée en fonction du logarithme de la concentration et modélisée afin de déterminer l'IC50. Pour chaque inhibiteur, les IC50 sont indiqués pour les deux modèles cellulaires de DIPG : NEM328 (H3.1-K27M, *TP53*^{WT}) et NEM290 (H3.3-K27M, *TP53*^{MUT}). Les IC50 ne sont pas déterminables pour la Décitabine (B), le Tazemetostat (C) avec les gammes de concentration utilisées.

2.2.2. Évaluation de l'efficacité préclinique *in vitro* des médicaments en combinaison avec la radiothérapie

L'efficacité anti-tumorale des inhibiteurs ont ensuite été évalués en combinaison avec l'irradiation sur les GSCs (Fig. 40). Nous avons choisi de ne pas poursuivre l'évaluation du Tazemetostat à la vue de l'inefficacité de ces molécules à induire une réponse des cellules de DIPG lorsqu'il est utilisé seul.

La combinaison drogue/irradiation a été considérée comme intéressante lorsque l'IC50 diminue par rapport à l'utilisation de la drogue seule. Ceci est observable pour la combinaison entre le Panobinostat et irradiation dans les deux modèles de DIPG testés (Fig. 40A-B). Pour la Décitabine, le GSK J4, l'OTX015 et le Mebendazole, les courbes des drogues seules (en bleu) sont confondues avec les courbes correspondant à la combinaison (en rouge), ne suggérant aucun bénéfice de la combinaison dans les deux GSCs étudiés. Enfin la combinaison Marizomib/irradiation semble sensibiliser les cellules par rapport au Marizomib seul, pour une concentration donnée, les AUC de la combinaison sont plus faibles que l'agent seul (Fig. 40K-L).

RESULTATS - Evaluation de l'effet synergique de combinaison de différents médicaments candidats avec l'irradiation

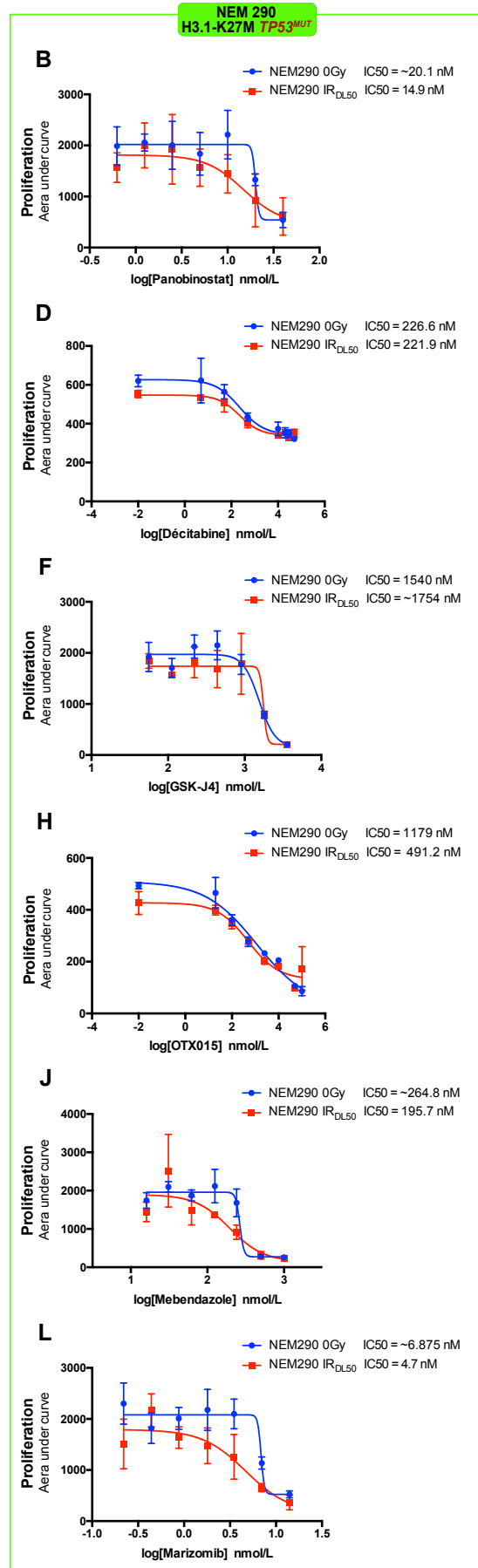
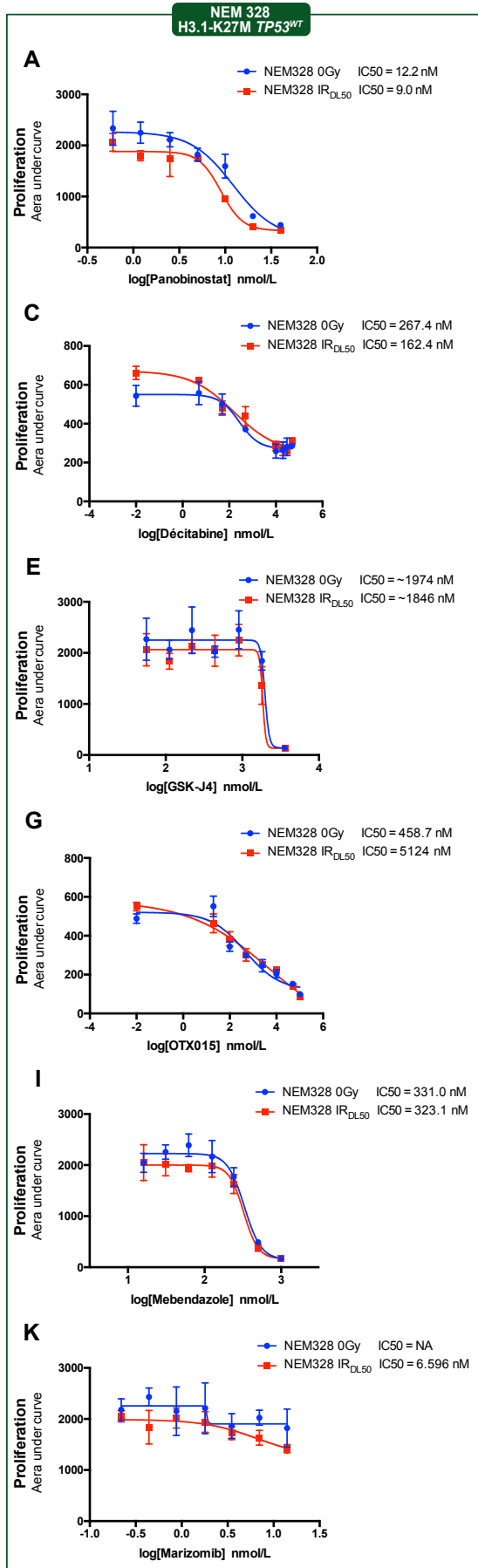


Figure 40. Courbes de dose-réponse des combinaisons d'inhibiteurs avec irradiation (DL50) pour NEM328 et NEM290

Pour chaque panel, la courbe bleue correspond à la dose-réponse de l'inhibiteur seul et la courbe rouge à la combinaison inhibiteur-irradiation. Seul le Panobinostat (A-B) et le Marizomib (K-L) montrent une combinaison avec l'irradiation intéressante en comparaison avec l'inhibiteur utilisé en agent seul pour les deux modèles cellulaires de DIPG étudiés. Pour l'ensemble des autres molécules, Décitabine (C-D), GSK J4 (E-F), OTX015 (G-H) et Mebendazole (I-J) aucune différence n'est observable entre l'IC50 de l'agent seul et l'IC50 obtenue en combinaison avec une irradiation à la DL50.

2.3. Discussion & perspectives

L'évaluation *in vitro* de combinaisons thérapeutiques est complexe. Pour l'étude de la combinaison de deux drogues, des applications comme CompuSyn permettent de calculer un indice combiné par la méthode de Chou-Talalay (Chou and Talalay, 1984). Les courbes de dose-réponse à la radiothérapie n'étant pas modélisables par une sigmoïde, nous n'avons pas pu utiliser CompuSyn pour analyser les combinaisons. Traditionnellement, l'étude des combinaisons avec l'irradiation se fait par des tests de clonogénicité, or la majorité de nos modèles de DIPG ne forment pas de colonies (Werbrouck et al., 2019). Ceci explique le choix de déterminer les IC50 pour les inhibiteurs en présence ou non d'irradiation. L'erreur réalisée dans ces expériences a été de choisir des gammes de concentrations trop étroites ne permettant pas toujours d'avoir une bonne modélisation de la courbe de dose-réponse et donc de ne pas pouvoir déterminer les IC50 précisément. D'autre part, lors de l'étude d'une combinaison, le choix de la séquence de traitement est essentiel. Nous avons choisi d'irradier les cellules après 72 h de traitement avec l'inhibiteur afin de potentialiser au maximum les effets de l'irradiation. Les inhibiteurs épigénétiques choisis ayant un effet attendu sur la dynamique de la chromatine, il est probable que cet effet ne soit pas immédiat. Une étude a d'ailleurs récemment comparée 4 différentes séquences de traitement entre GSK J4 et la radiothérapie par tests de clonogénicité sur des modèles cellulaires de DIPG : inhibiteur ajouté 72 h ou 24 h avant l'irradiation ou 24 h ou 72 h après l'irradiation (Katagi et al., 2019). L'effet le plus important de la combinaison été observé lorsque le médicament été ajouté 72 h avant la radiothérapie. Néanmoins, nous n'avons pas utilisé une méthode d'analyse à long terme comme les tests de clonogénicité mais un suivi de la

prolifération pendant 6 jours à partir de l'ajout de l'inhibiteur. Cette méthode est donc critiquable pour l'étude des effets à long terme de l'irradiation. Il aurait peut-être été plus intéressant de calculer des dose-réponses à l'irradiation, comme précédemment décrit dans la partie I des résultats (Werbrouck et al., 2019), en présence ou non d'inhibiteur.

Le Panobinostat (inhibiteur HDAC) utilisé en agent seul a prouvé une certaine efficacité *in vitro* (IC50 comprises entre 10-100 nM) sur différents modèles cellulaires de DIPG (Grasso et al., 2015). Nos résultats d'IC50 d'environ 20 nM sont donc en accord avec ces résultats. En revanche, l'évaluation de l'activité anti-tumorale du Panobinostat en agent unique sur un modèle de xénogreffe orthotopique de DIPG au laboratoire a montré une efficacité limitée (Plessier et al., 2017) probablement due à une faible capacité de la drogue à passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) (El-Khouly et al., 2017). Une autre étude n'a montré aucune amélioration de la survie de souris traitée avec le Panobinostat (Hennika et al., 2017). Par conséquent, nous n'avons pas réalisé d'évaluation *in vivo* de la combinaison Panobinostat/radiothérapie. Le Panobinostat est néanmoins actuellement évalué dans un essai clinique en Phase I (NCT02717455) pour des patients atteints de DIPG.

GSK J4 un inhibiteur de l'histone déméthylase JMJD3 a montré des IC50 comprise entre 1,3 et 3 μ M en agent seul sur des modèles cellulaires de DIPG (Hashizume et al., 2014). Ces résultats sont également comparables à nos IC50 de 1,7-1,8 μ M. Plus récemment, une étude a démontré que l'inhibiteur de GSK J4 radiosensibilise des cellules de DIPG avec un effet *in vivo* dans des modèles de xénogreffes orthotopiques (Katagi et al., 2019). Les auteurs ne présentent pas de données d'IC50 de GSK J4. Ils utilisent une dose fixe de 2,5 μ M pour l'étude de la combinaison avec différentes doses d'irradiation. Ils ont également montré que GSK J4 entraînait une diminution significative de l'expression de gènes impliqués dans la voie de réparation des cassures double brin spécifiquement dans les cellules de DIPG par RNAseq après un traitement à 6 μ M. La molécule semble donc radiosensibiliser les cellules des DIPG en diminuant l'accessibilité de la chromatine (via une augmentation de la marque H3K27me3) et ainsi l'expression des gènes

impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN. Il est intéressant d'observer une différence de réponse à l'irradiation de nos modèles *in vivo*. En effet, ils induisent une réponse après seulement une dose totale de 3 Gy (6 fractions de 0,5 Gy pendant 2 semaines) alors que nos modèles sont beaucoup plus réfractaires à l'irradiation et nécessitent plusieurs fractions de 6 Gy en accord avec la résistance à la radiothérapie observée chez les patients de DIPG (cf. Résultats Partie I). Cette différence de radiosensibilité pourrait s'expliquer par le statut mutationnel de *TP53*, mais celui-ci n'est pas communiqué. Une deuxième hypothèse est que la lignée cellulaire SF8628 utilisée pour la xénogreffe des animaux a été établie en immortalisant des cellules par surexpression du gène de la télomérase hTERT (Chan et al., 2013 ; Hashizume et al., 2012). Cette immortalisation permet de cultiver les cellules pendant de très nombreux passages, il est donc possible que les cellules dérivent et ne correspondent plus au modèle cellulaire original. De plus, il a été montré que cela peut entraîner des changements profonds de réponse à la radiothérapie (Serakinci et al., 2018). Néanmoins, cette cible reste intéressante pour le traitement des DIPG. A ce jour aucun essai clinique n'est en cours pour l'évaluation de GSK J4.

Nos résultats montrent une inefficacité du Tazemetostat (inhibiteur d'EZH2) sur nos modèles de DIPG et sont en accord avec les résultats de Wiese et al., 2016. En revanche, les résultats de Mohammad et al., montraient un arrêt de la prolifération de plusieurs modèles cellulaires de DIPG avec 3 μ M de Tazemetostat à partir de 5-10 jours de traitement (Mohammad et al., 2017). Notre méthode d'analyse par suivi de prolifération pendant 6 jours ne semble donc pas adapté pour identifier un effet, une étude à plus long terme serait intéressante.

Le Marizomib, un inhibiteur du protéasome, semble également très prometteur pour le traitement des DIPG. Il a très récemment été identifié par un nouveau crible à haut débit parmi 20 000 agents thérapeutiques pour le traitement de DIPG (Lin et al., 2019). D'autant plus que le Marizomib semble capable de passer la barrière hémato-encéphalique (Di et al., 2016). Le Marizomib est actuellement évalué en Phase III pour le traitement de GBM en combinaison avec l'irradiation (NCT03345095).

RESULTATS - Evaluation de l'effet synergique de combinaison de différents médicaments candidats avec l'irradiation

Plusieurs inhibiteurs des protéines à bromodomain (BET) ont montré une activité antitumorale sur des cellules de GBM et de DIPG (Berenguer-Daizé et al., 2016 ; Piunti et al., 2017). Nos résultats ne semblent pas indiquer de diminution de l'IC50 en combinaison avec l'irradiation par rapport à l'IC50 de la molécule seule. A ce jour, il semblerait qu'une synergie soit observée dans les tumeurs présentant des déficiences dans la voie HR (homologous recombination) de réparation des dommages à l'ADN, ce qui n'est pas le cas des cellules de DIPG (Yang et al., 2017). Malheureusement, OTX015 n'a pas montré d'activité dans un essai de phase I chez des patients en rechute atteints de GBM (NCT02296476). La molécule n'a pas encore été évalué dans un essai clinique pour le traitement de tumeurs cérébrales pédiatriques.

Enfin, les réponses au Mébendazole en présence ou non d'irradiation ne semblent pas différentes pour nos deux modèles cellulaires de DIPG testés. A ce jour, les seules données disponibles dans la littérature semblent indiquer un bénéfice de la combinaison Mebendazole et irradiation dans des modèles murins de méningiome malins (Skibinski et al., 2018). Au laboratoire, une évaluation du Mebendazole en agent unique sur deux modèles de CDOX (NEM290 et NEM292) de DIPG n'a montré que peu d'effet sur la croissance tumorale *in vivo* (Manon Lancien, donnée non publiées).

3. Modélisation de la rechute post-irradiation dans les DIPG

Lorsqu'un patient atteint de DIPG est traité par radiothérapie, une réponse transitoire est observée dans 60% des cas environ (Castel et al., 2015 ; Werbrouck et al., 2019). Cette réponse est définie à la fois cliniquement (amélioration des symptômes) et radiologiquement (diminution volumétrique). Cependant, même lorsqu'un patient répond à la radiothérapie, cette réponse est constamment suivie par une rechute ou une nouvelle progression. Notre hypothèse est qu'il existe une combinaison de deux types de résistance : une résistance intrinsèque qui diffère selon le sous-groupe de patients et une résistance acquise ou sélectionnée qui peut être oligoclonale ou polyclonale.

Nous avons démontré dans ce travail de thèse que la présence d'une mutation délétère de *TP53* conditionne la réponse initiale à l'irradiation chez les patients dans le cas des DIPG ainsi que dans les cultures primaires de cellules souches de DIPG. Ce résultat a été validé *in vitro* à l'aide de cellules de DIPG isogéniques, où l'expression des gènes *TP53* sauvages ont été inhibé par un shRNA (Werbrouck et al., 2019). De cette partie du travail, nous pouvons donc conclure que la mutation délétère de *TP53* joue un rôle majeur mais pas unique dans la résistance intrinsèque (innée) à l'irradiation.

Dans cette troisième partie du projet doctoral, nous nous sommes attachés à développer des outils méthodologiques et approfondir la caractérisation des processus moléculaires de résistance et d'échappement à la radiothérapie.

Pour cela, notre stratégie était de réaliser un suivi de lignage afin d'étudier la dynamique clonale post-radiothérapie. Le principe du suivi de lignage consiste à marquer de façon unique et stable chaque cellule d'une population cellulaire de façon que les cellules filles aient le même marquage que la cellule mère. Ceci est obtenu par la combinaison de trois gènes fluorescents (RVB) transduits à des MOI (multiplicity of infection) élevées. Une fois la population marquée, les cellules sont amplifiées et différents réplicats sont réalisés. Parmi ces réplicats, on traite alors certains de ces réplicats par irradiation dans le cadre du projet. A la fin de

l'expérience, les clones restants sont analysés et plusieurs scénarios sont possibles (Fig. 41).

Un premier scénario est que toutes les cellules sont résistantes intrinsèquement au traitement. Ainsi, il n'y a pas de sélection clonale et toutes les cellules sont retrouvées dans l'ensemble des réplicats. Ceci peut survenir même s'il existe une diminution transitoire de la prolifération tumorale. La résistance peut être due à l'expression d'une protéine mutée (ex *TP53*) ou par des capacités innées d'adaptation au stress de l'irradiation.

Un deuxième scénario est que la résistance au traitement est due à la résistance innée de quelques clones dans la population initiale. Dans ce cas, les cellules résistantes présentes dans les réplicats traités sont identiques, ce sont les cellules aux propriétés particulières qui leurs confèrent la résistance au traitement. On observe donc une diminution de la diversité de couleurs obtenues qui restent les mêmes dans chacun des réplicats.

Enfin, le dernier scénario est que la résistance est acquise pendant le traitement de façon stochastique. La radiothérapie cause des dommages à l'ADN qui peuvent être à l'origine de nouvelles mutations en cas de mauvaise réparation. Ces nouvelles mutations peuvent être à l'origine de la radioresistance. Une résistance acquise est donc caractérisée par la présence de clones résistants différents en fonction des différents réplicats traités. Mais dans chaque réplicat on observe la diminution de la diversité des couleurs obtenues.

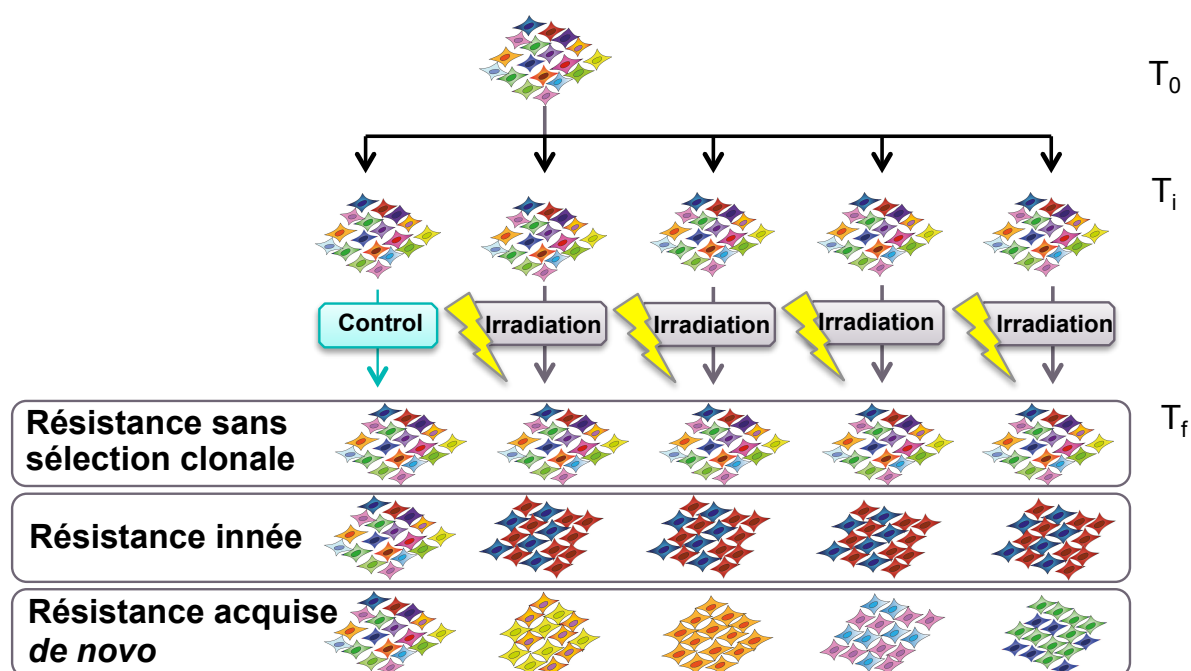


Figure 41. Principe du suivi de lignage pour l'étude de la résistance aux traitements

A T_0 , une population cellulaire est marquée puis amplifiée. Le principe du suivi de lignage repose sur l'utilisation d'un marquage unique et héréditaire de chaque cellule. A T_i , une partie des répliquats sont traités par irradiation puis à T_f les différentes populations sont analysées. Dans le cas d'une résistance sans sélection clonale, l'ensemble des cellules sont retrouvées dans les différents répliquats. Une résistance innée est caractérisée par la présence de clones particuliers identiques dans les différents répliquats traités. Une résistance acquise *de novo* pendant le traitement est quant à elle caractérisée par la présence de clones résistants différents dans les différents répliquats.

3.1. Matériels et méthodes

Les matériels et méthodes correspondant aux modèles cellulaires et murins de DIPG, aux protocoles d'irradiation *in vitro* et *in vivo* ainsi qu'à la détermination des dose-réponses *in vitro* par tests de prolifération et à l'étude du cycle cellulaire ont déjà été présenté dans la partie 1 des résultats de ce manuscrit.

3.1.1. Suivi de lignage et de la dynamique clonale par marquage RVB

Le marquage RVB (Rouge, Vert, Bleu) consiste à marquer des cellules, et leur descendance, de manière stable en combinant les fluorescences de 3 couleurs à des niveaux variables. Pour cela, les cellules sont transduites de façon aléatoire par trois vecteurs codant différentes protéines fluorescentes (mRuby2, mCitrine, mTFP1). Les

intégrations multiples de l'une ou l'autre des constructions permet ainsi de générer des niveaux d'expression de ces protéines variables et donc des couleurs différentes. Une M.O.I. de 0,7 correspondant à 50% de cellules fluorescentes par vecteur sont les conditions optimales pour obtenir la diversité maximale de couleurs. (Weber et al., 2011 ; Weber et al., 2012) (Fig. 42).

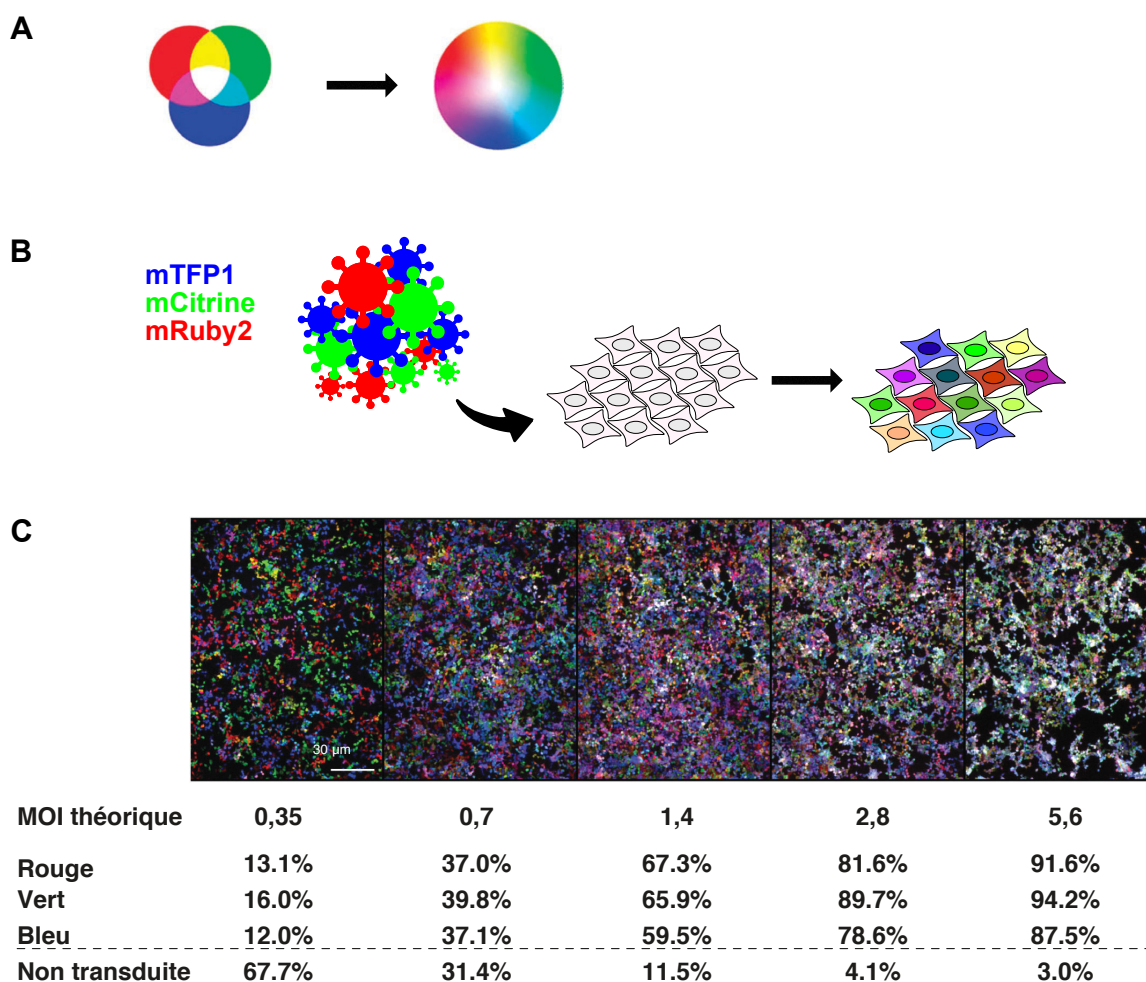
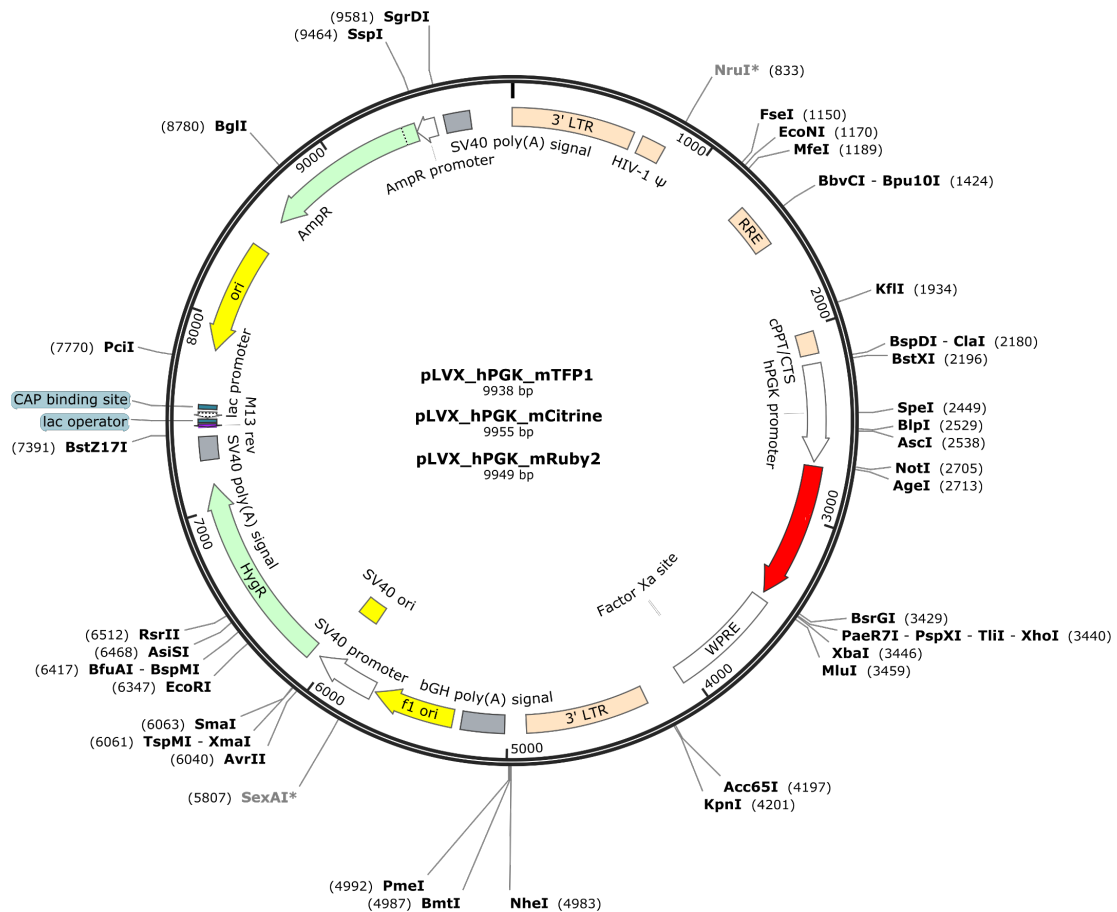


Figure 42. Principe du marquage multicolore RVB

A. Le marquage RVB repose sur la synthèse additive des couleurs, le mélange des 3 couleurs primaires permet d'obtenir toutes les autres couleurs. B. En pratique, cela consiste à transduire aléatoirement des cellules avec 3 vecteurs lentiviraux codant 3 protéines fluorescentes émettant à différentes longueurs d'onde. C. Exemple de marquage RVB réalisé sur des HEK293T. Pour chaque condition définie par une MOI (multiplicity of infection) théorique par vecteur, les pourcentages de cellules transduites sont indiqués en dessous des images. Lorsque le pourcentage de cellules transduites par vecteur est inférieur à 30%, la majorité des cellules sont marquées par un seul vecteur et donc expriment seulement une seule couleur. Un taux de transduction compris entre 40 et 70% pour chaque vecteur est optimal avec une large diversité de couleur et un faible taux de cellules non-marquées. Au-delà, la diversité va de nouveau baisser avec davantage de couleurs dans les tons pastel, gris blanc et davantage de toxicité associé à la transduction. Modifié de Weber et al., 2011 ; Weber et al., 2012

Pour réaliser le marquage RVB, nous avons choisi 3 protéines fluorescentes, la mTFP1, la mCitrine et la mRuby2 issues respectivement de *Clavularia sp.*, *Aequorea victoria* et *Entacmaea quadricolor*, trois espèces différentes afin de pouvoir réaliser des immunomarquages avec des anticorps différents, si besoin. Des plasmides contenant les séquences codants ces trois protéines fluorescentes ont été commandées chez Addgene (#55481, #56558, #55901) et nous les avons clonées dans un vecteur lentiviral pLVX (Clontech) en aval d'un promoteur PGK humain (Fig. 43). Pour cela, des amorces de PCR permettant d'amplifier les protéines fluorescentes et contenant une région d'homologie du plasmide de destination ont été utilisées. Les inserts obtenus par PCR ont ensuite été purifiés (Nucleospin PCR clean up, Macherey-Nagel) et intégrés dans le vecteur final par Gibson Assembly (New England Biolabs). Toutes les séquences ont été validées par séquençage Sanger (Eurofins Genomics).

Pour chaque protéine fluorescente, les particules lentivirales ont été produites et le titre (nombre de particules virales/ μ L) déterminé comme décrit précédemment en partie 1 (Werbrouck et al., 2019).



➡ Protéine fluorescente = TFP1 ou mCitrine ou mRuby2

Figure 43. Cartes des plasmides du marquage RVB

Les cartes des 3 plasmides sont identiques, seul la séquence codant les protéines fluorescentes (mTFP1, mCitrine et mRuby), représenté par la flèche rouge en aval d'un promoteur PGK humain est différente.

Dans le cadre de ce projet doctoral, nous avons choisi d'identifier les cellules par marquage RVB précédemment décrit à l'aide de lentivirus intégratifs. Des GSC NEM292 RVB ont été amplifiés et 8 réplicats de 500 000 cellules ont été réalisés. Parmi les 8 réplicats, 5 réplicats ont été traités par irradiation (1 x 8 Gy). Les cellules ont ensuite été maintenues en culture cellulaire pendant 20 jours avant d'être étudié par microscopie.

3.1.2. Imagerie *in vitro* et analyse par ImageJ

Les GSC ont été transduites avec une M.O.I. de 0,7 par vecteur dans l'objectif d'avoir environ 50% de cellules transduites. Afin d'être analysées, les GSC RVB sont

ensemencées sur des lamelles en verre préalablement recouvertes avec 0,1 mg/mL de Matrigel (Corning). Le lendemain, les cellules sont fixées pendant 5 min avec une solution de PFA 4% dilué dans du PBS 1X (paraformaldéhyde, Electron Microscopy Sciences). Les lames et lamelles sont ensuite montées avec du Fluoromount-G (SouthernBiotech). Les images ont été acquises avec un microscope confocale Leica SP8 et les paramètres d'acquisitions sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous (Fig. 44).

Tableau 3. Propriétés des protéines fluorescentes et paramètres d'acquisition

| Protéines fluorescentes | | | Paramètres d'acquisition | |
|-------------------------|------------|----------|--------------------------|------------|
| Nom | Excitation | Emission | Laser | Détecteur |
| mTFP1 | 462 nm | 492 nm | 448 nm | 480-515 nm |
| mCitrine | 516 nm | 529 nm | 488 nm | 530-540 nm |
| mRuby2 | 559 nm | 600 nm | 552 nm | 565-675 nm |

La représentation de la diversité de couleurs a été réalisée avec le module Color Inspector 3D (v.2.3) d'ImageJ (Fig. 44H). Les spectres sous forme de disque RVB représentent chaque pixel de l'image selon sa teinte. Pour la comparaison de deux conditions, les spectres monochromatiques ont été superposés avec Affinity Photo (v.1.6.9).

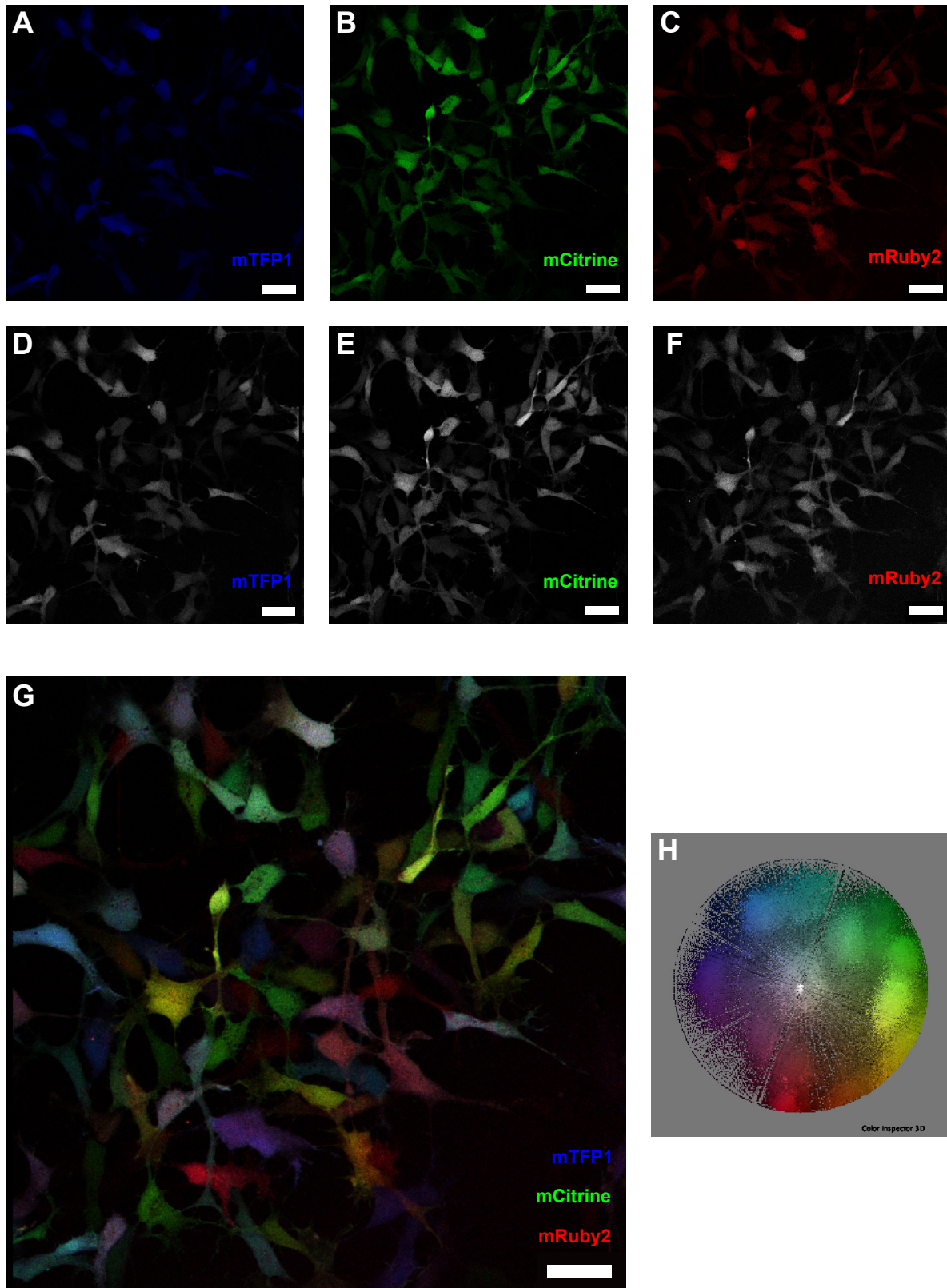


Figure 44. Exemple d'image RVB de la GSC NEM328 marquée

Images individuelles de mTFP1 (A-D), mCitrine (B-E) et mRuby2 (C-F) respectivement en couleur et en niveau de gris. Les trois images monochromatiques (A-B-C) sont ensuite fusionnées pour l'obtention de l'image RGB (G). (H) Représentation des pixels de l'image sur un disque chromatique obtenue avec Color Inspector 3D (H). Bar d'échelle = 30 μ m

3.1.3. Transparisation d'échantillons et imagerie en 3D de cerveau entier

Les organes comme les cerveaux de souris ne sont pas transparents. Ceci est dû à la densité de lipides des cellules et l'hétérogénéité des tissus qui entraîne la diffusion de la lumière (Fig. 45A). La transparisation par la technique de 3DISCO (3D imaging of solvent-cleared organs) (Ertürk et al., 2014) consiste à déshydrater le tissu et remplacer les lipides par un solvant optique avec un indice de réfraction identique aux protéines. C'est le fait que le solvant ait le même indice de réfraction des protéines qui est à l'origine de la transparence du tissu.

Les techniques de transparisation permettent ainsi aux tissus d'être imagés entiers par un ultramicroscope à feuille de lumière (« Light Sheet » en anglais) (Fig. 54B).

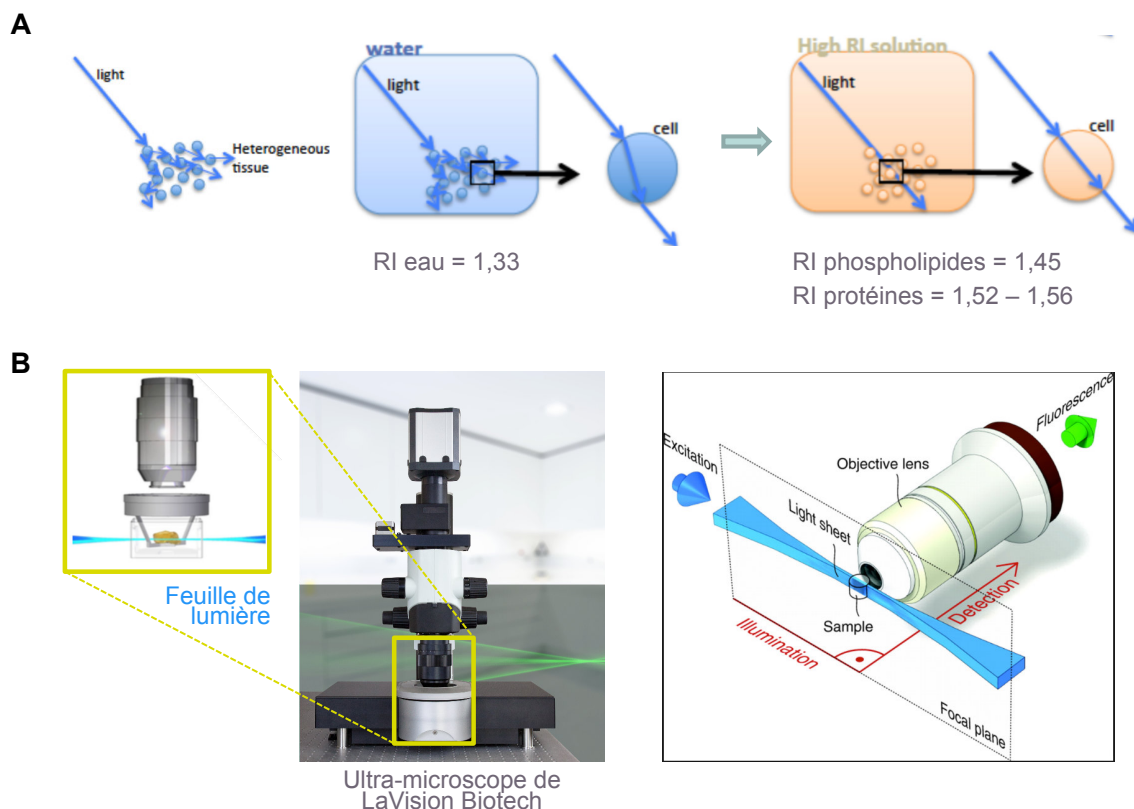


Figure 45. Principe de la transparisation d'organe et l'imagerie par microscope à feuille de lumière

A. L'hétérogénéité des tissus et la composition des cellules notamment en lipide sont à l'origine de la diffusion de la lumière. Lorsque l'indice de réfraction (RI) du milieu et des cellules est identique, la lumière ne se disperse plus et l'organe apparaît transparent. B. Le principe d'un ultramicroscope est l'illumination d'un plan de l'échantillon par une feuille de lumière. Les fluorophores situés dans le plan illuminé sont excités et la fluorescence est collectée par l'objectif.

Un des principaux inconvénients des techniques 3DISCO est la perte de la fluorescence intrinsèque des protéines fluorescentes et donc la nécessité de réaliser

des immunomarquages. Afin de détecter les cellules tumorales transduites préalablement par un vecteur codant la Luciférase et la protéine fluorescente mKate2, un immunomarquage a été réalisé avec un anticorps primaire anti-mKate2 (Guinea Pig) (1/1000^e, EMU108, Kerablast) et un anticorps secondaire Donkey Anti-Guinea Pig couplé au fluorophore Alexa 647 (1/500^e, 706-605-148, Jackson ImmunoResearch).

Le marquage et la transparisation des échantillons ont été réalisés en suivant le protocole proposé par le laboratoire d'Alain Chédotal (Institut de la Vision, Paris, France) (Ertürk et al., 2014). Brièvement, les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane à 2.5% (1.5 L O₂/min), puis perfusée par voie intracardiaque en utilisant une pompe péristaltique à un débit de 7-8 mL/min avec 10 mL d'une solution de PBS suivi de 10 mL d'une solution de PFA 4% dans du PBS (paraformaldéhyde, Electron Microscopy Sciences). Le cerveau est ensuite prélevé dans son intégralité et post-fixé dans une solution de PFA 4% sur la nuit. L'échantillon est ensuite stocké dans du PBS 1X à 4°C (contenant 0.1g/L de thimérosal, Sigma-Aldrich). L'échantillon est ensuite bloqué et perméabilisé dans du PBSG-T (PBS 1X, 0.2% gélatine, 0.5% Triton X100, 0.1g/L de thimérosal, Sigma-Aldrich) pendant 4 jours à 37°C sous agitation (20 rpm). Puis il est soumis à un immuno-marquage par incubation à 37°C toujours sous agitation avec l'anticorps primaire pendant 2 semaines, puis avec l'anticorps secondaire pendant 48 heures, entrecoupées de périodes de lavages dans du PBSG-T (6 lavages d'environ 1h).

La transparisation proprement dite a été réalisée en suivant le protocole 3DISCO (Ertürk et al. 2014). Cela consiste à réaliser des bains successifs de THF (tétrahydrofurane, Sigma-Aldrich) afin de déshydrater l'échantillon, puis de le délipider avec du DCM (dichlorométhane, Sigma-Aldrich) et enfin le transférer et le stocker jusqu'à l'imagerie dans le solvant optique, le DBE (dibenzyléther, Sigma-Aldrich). Les échantillons sont incubés sous agitation par rotation verticale à 12 rpm dans : 50% THF pendant la nuit, puis 80% THF pendant 2 heures, puis 2 bains successifs de 2 heures dans du THF (100%), les échantillons sont ensuite transférés dans le DCM (100%) pendant 30 min puis dans le DBE (100%). Les dilutions du THF se font dans de l'eau distillée.

Enfin les échantillons ont été imagés par microscopie à feuille de lumière sur un Ultramicroscope II (LaVision Biotech) situé sur la plateforme d'imagerie de l'Institut de la Vision (Paris, France) et les images analysées avec le logiciel Imaris (Bitplane).

3.2. Résultats

3.2.1. Caractérisation de modèles *in vitro* résistant à l'irradiation de DIPG : dose réponse et cycle cellulaire

Afin d'étudier les processus moléculaires d'échappement à la radiothérapie, des modèles *in vitro* de GSC résistantes à l'irradiation ont été développés (Fig. 46A). Pour établir ces modèles de DIPG résistants à l'irradiation, deux GSC, NEM292 (H3.3-K27M $TP53^{MUT}$) et NEM328 (H3.1-K27M $TP53^{WT}$), ont été irradiées *in vitro* avec une fraction de 4, 6, 8 ou 10 Gy. Une mortalité dépendante de la dose a été observée dans les flasques de culture, et les cellules survivantes à l'irradiation ont ensuite été amplifiées pendant 28 jours. Une condition contrôle non-irradiée (0 Gy) a été cultivée dans les mêmes conditions. Un mois après leur première irradiation, les courbes de dose-réponses à l'irradiation déterminer par le calcul des fractions survivantes pour différentes doses d'irradiation ainsi que le cycle cellulaire pour ces différentes conditions ont été analysées et comparées.

Les résultats montrent des fractions survivantes similaires aux doses appliquées entre cellules préalablement irradiées et cellules naïves à l'irradiation (contrôles) pour les deux modèles de GSC étudiés (Fig. 46B-C). De même, les cellules présentent des pourcentages de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire similaires. Aucune augmentation de nombre de cellules tétraploïdes n'est observable dans les conditions résistantes à l'irradiation (Fig. 46D-E). A la vue de ces résultats, les cellules résistantes à l'irradiation *in vitro* semblent similaires aux cellules naïves.

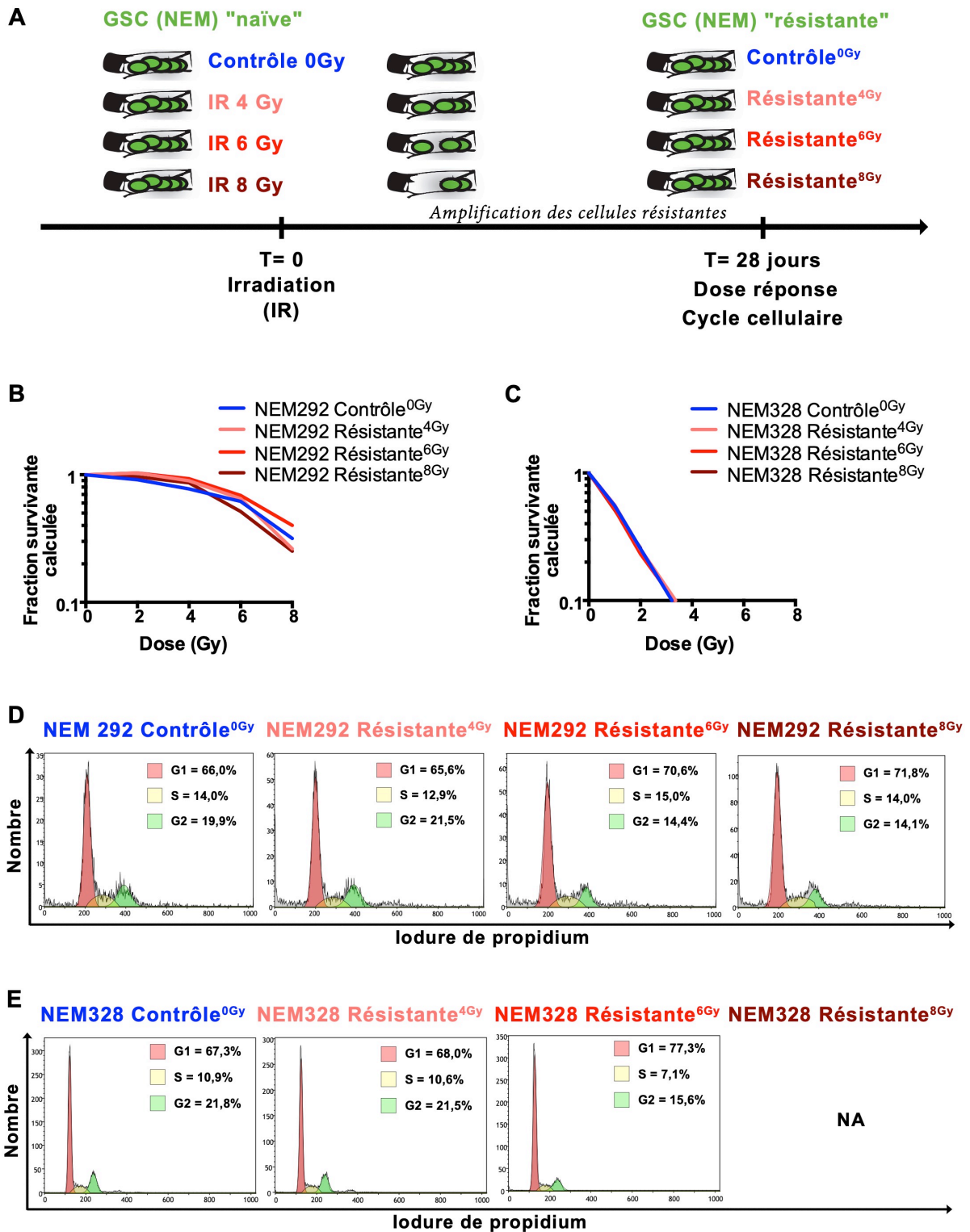


Figure 46. Caractérisations de GSC « naïves » et « résistantes » à l'irradiation

A. Design expérimental utilisé : des GSC ont été traités à T0 à différentes doses d'irradiation. Les cellules survivantes ont été amplifiées pendant 28 jours, puis la réponse à l'IR pour les différentes conditions ont été évaluées pour les deux modèles étudiés NEM292 (H3.3-K27M $TP53^{MUT}$) (B) et NEM328 (H3.1-K27M $TP53^{WT}$) (C). A 28 jours, le cycle cellulaire à l'état basal pour les différentes conditions a également été étudié par marquage de l'ADN par iodure de propidium pour les deux modèles NEM292 (H3.3-K27M $TP53^{MUT}$) (D) et NEM328 (H3.1-K27M $TP53^{WT}$) (E). Les pourcentages de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire ont été calculés par le logiciel d'analyse Kaluza.

3.2.2. Suivi de lignage *in vitro* par marquage RVB

Comme condition préalable à l'analyse de suivi de lignage, j'ai vérifié que la transduction par 3 lentivirus différents n'entraînait pas de différence de prolifération des GSC. Pour cela, la prolifération de deux GSC a été évaluée dans les conditions suivantes : GSC non-transduites (NT) ou GSC transduites par les 3 vecteurs (RVB) (Fig. 47). Les résultats ne montrent aucune différence de prolifération pour les deux modèles de DIPG testés : NEM292 (H3.3-K27M $TP53^{MUT}$) et NEM328 (H3.1-K27M $TP53^{WT}$).

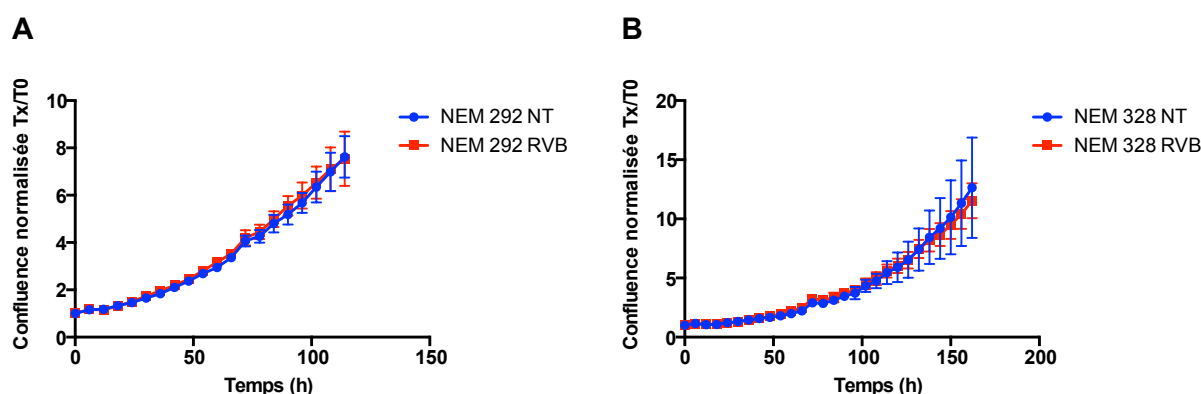


Figure 47. Comparaison de la prolifération de GSC non-transduites et de GSC RVB

Pour les deux modèles de DIPG : NEM292 (A) et NEM328 (B), la transduction réalisée pour le marquage RVB n'a aucun impact sur la prolifération des GSC.

Les résultats du suivi de lignage réalisé sur la GSC NEM292 (H3.3-K27M $TP53^{MUT}$) sont présentés dans la figure 48. Dans l'ensemble, les distributions spectrales présentent une large gamme de couleurs à l'exception des nuances de violets qui sont sous-représentées dans les différents réplicats. Parmi, les réplicats contrôles, le réplicat 2 est de façon surprenante moins riche en terme de diversité, malgré des paramètres identiques d'acquisition. La comparaison des spectres des réplicats non-traités et traités ne montre pas de réduction importante de la diversité clonale (Fig. 49). Ces résultats suggèrent une résistance à l'irradiation de l'ensemble de la population cellulaire.

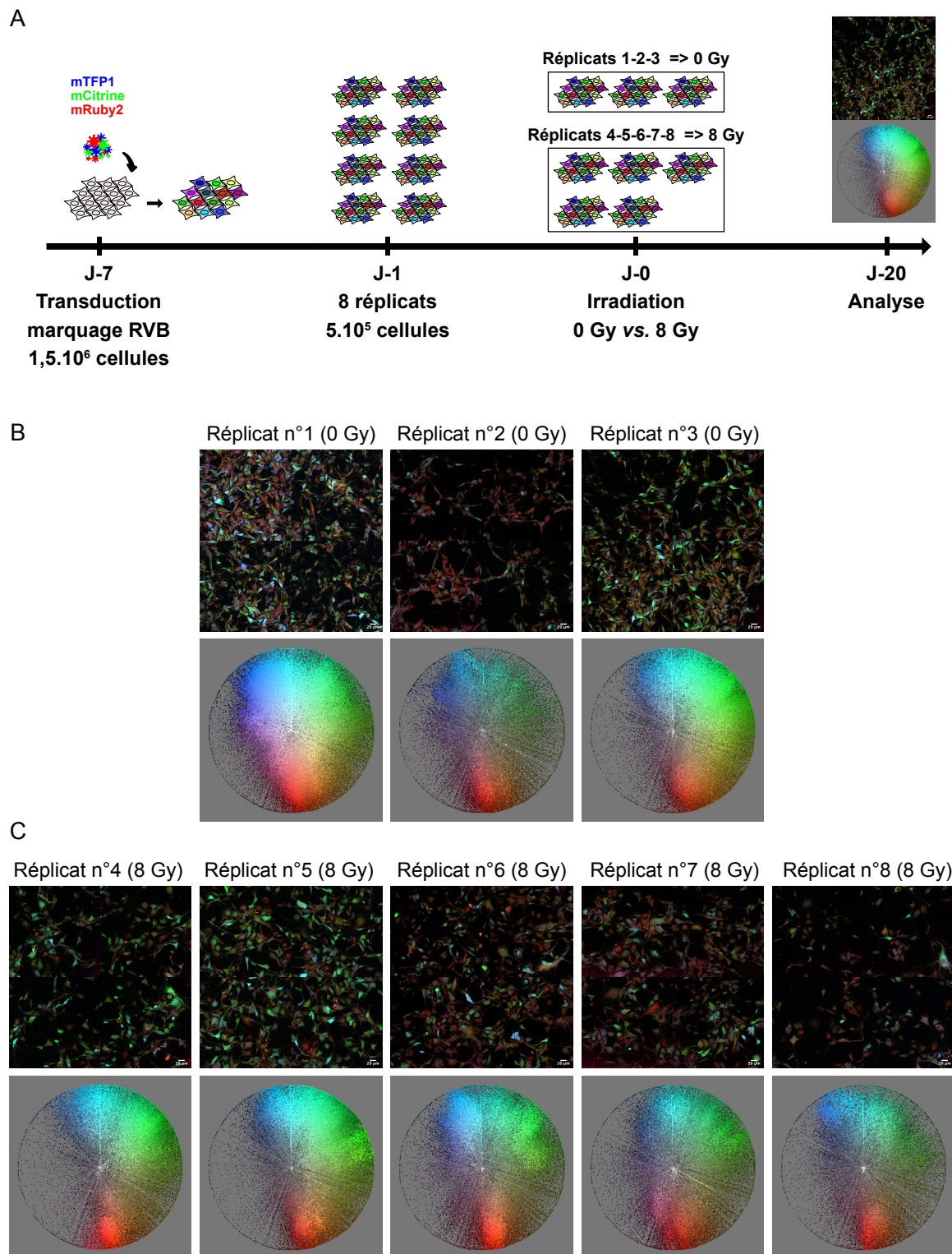


Figure 48. Suivi de lignage par marquage RVB après irradiation NEM292

A. Design expérimental utilisé pour le suivi de lignage : 6 jours après le marquage RVB par transduction, 8 réplacats identiques ont été réalisés. Le lendemain de l'ensemencement des cellules, 5 réplacats sont traités par irradiation (8 Gy). Après 20 jours, les cellules sont imagées. Pour chaque condition, 4 images ont été combinées et analysées. Les résultats des conditions contrôles et irradiés sont représentés respectivement dans les panels (B) et (C).

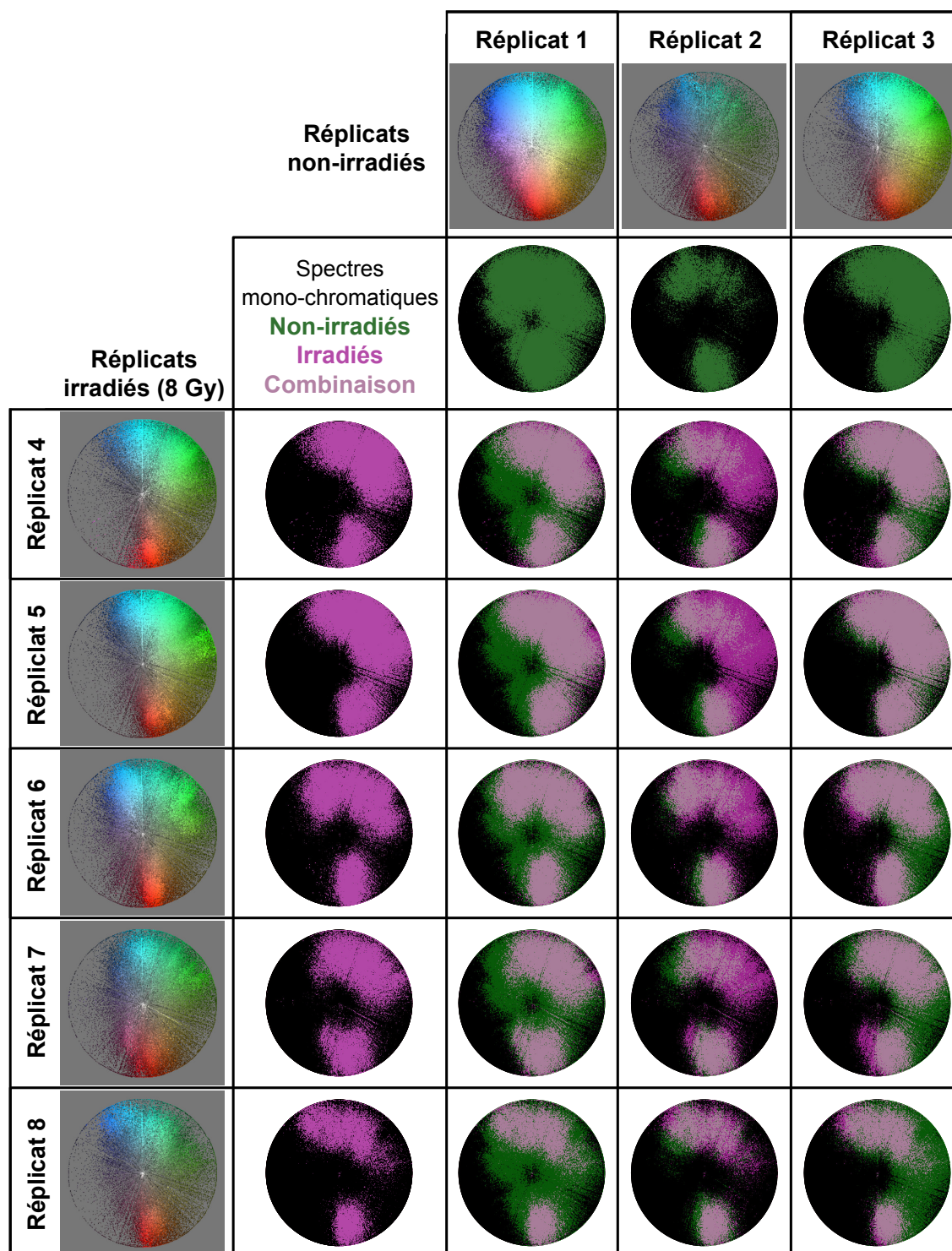


Figure 49. Comparaison des spectres monochromatiques des réplicats contrôles et traités par irradiation pour NEM292

Les spectres monochromatiques des réplicats non-irradiés et irradiés sont représentés respectivement en vert et en rose foncé. La superposition exacte de deux pixels identiques est représentée en rose pâle.

3.2.3. Mise au point du protocole de transparisation de cerveau de souris

Le protocole de 3DISCO consiste à déshydrater les tissus, retirer les lipides, et les remplacer par un liquide qui possède le même indice de réfraction que les protéines afin de rendre le tissu transparent. Un immunomarquage peut être réalisé après la fixation, la fluorescence intrinsèque étant perdue lors du protocole de 3DISCO.

L'évolution d'un cerveau au cours des différentes étapes est présentée ci-dessous (Fig. 50). Une diminution de la taille de l'organe d'environ 30 à 50% par rapport à sa taille initiale est caractéristique du protocole. Celui-ci se rigidifie après l'étape de déshydratation. Le cerveau devient transparent dans le solvant optique. La mise au point de l'immunomarquage et du protocole de transparisation a nécessité plusieurs essais (concentrations d'anticorps, durée d'incubation, temps de fixation). Ceci a en partie été réalisé avec l'aide de Romain Brusini dans le cadre de son stage de fin d'études (Ingénieur AgroParisTech).

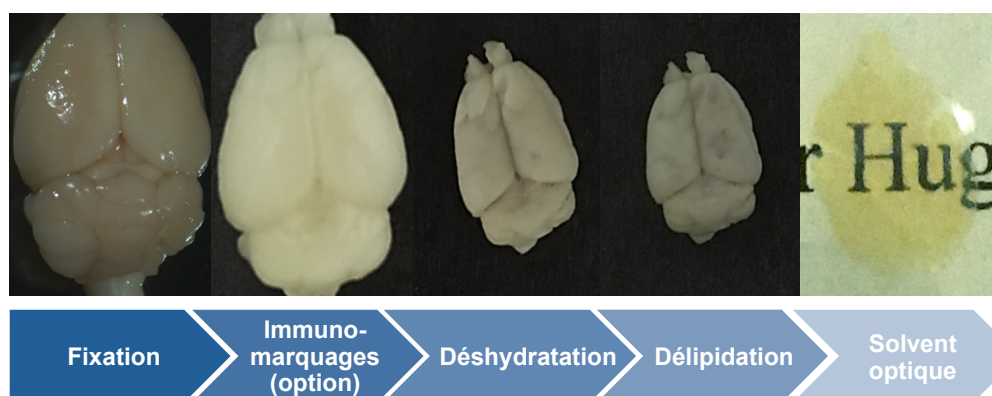


Figure 50. Evolution d'un cerveau de souris au cours du protocole d'immunomarquage et de transparisation par 3DISCO

Au cours de l'étape de déshydratation, la taille du cerveau diminue entre 30 et 50%. C'est seulement au bout de 2-3h dans le DBE (solvant optique) que le cerveau est transparent. Images réalisées par Romain Brusini

Les modèles de xénogreffes de DIPG ayant une croissance très lente (plusieurs mois), la mise au point du protocole de transparisation a été réalisée sur des cerveaux de souris xénogreffé par des cellules de Glioblastomes (U87) exprimant la protéines mKate2. Les tumeurs de glioblastomes ont une croissance beaucoup plus rapide. Les souris sont symptomatiques 20-30 jours après la greffe des cellules.

L'image 3D d'un cerveau de souris présentant après xénogreffe de U87 dans le thalamus est présentée dans la figure 51, montrant le développement d'une tumeur compacte.

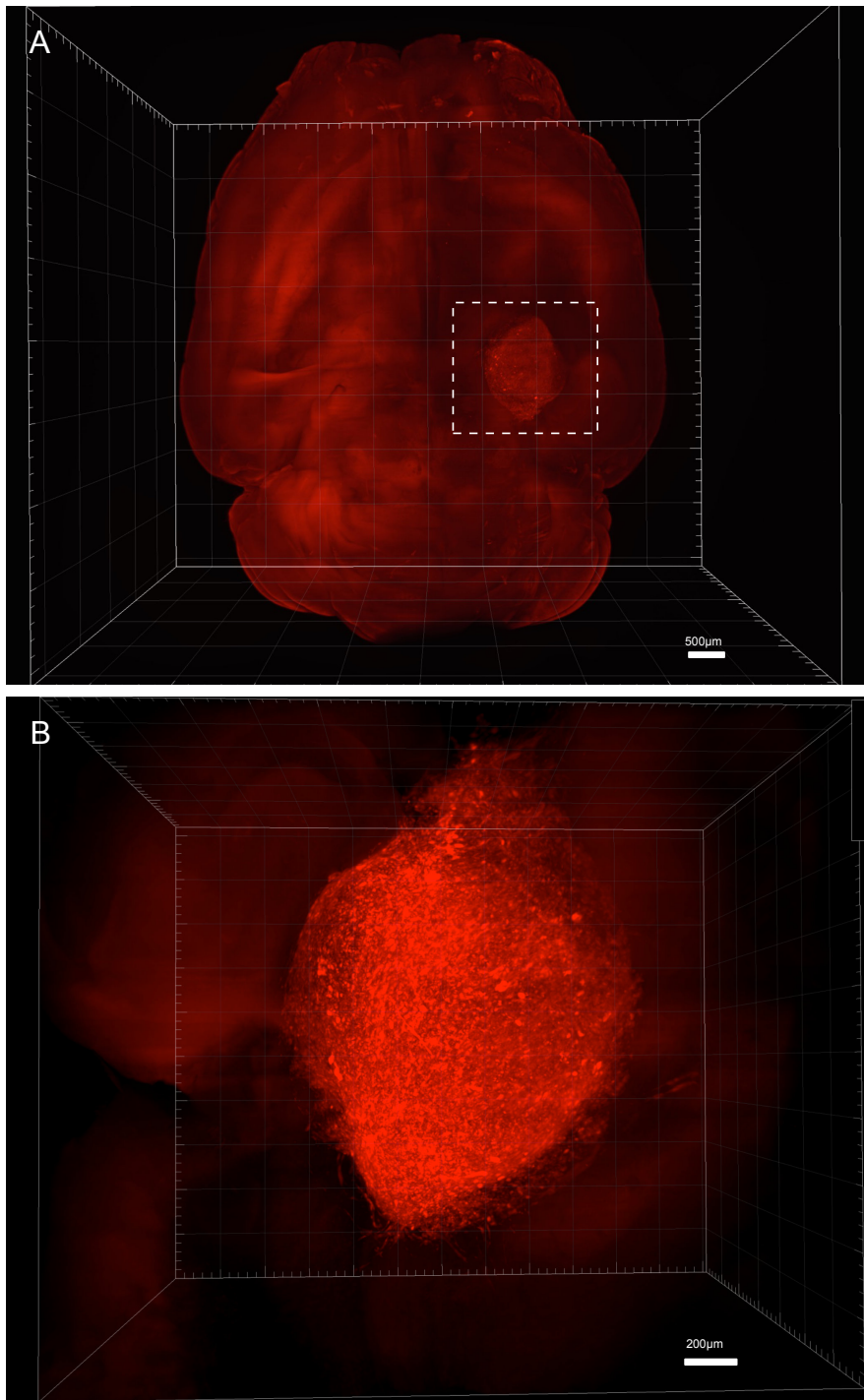


Figure 51. Images 3D d'un cerveau de souris adulte xénogreffé par U87-mKate2

A. Cerveau entier de souris adulte possédant une tumeur de U87 (lignée de Glioblastome) encadré par des pointillés blancs et zoom sur la tumeur (B). Contrairement au DIPG, la tumeur induite par la xénogreffe de cellules U87 induit une masse tumorale bien distincte. Imagerie réalisée par un ultramicroscope à feuille de lumière à 640 nm LaVision BioTec à l'Institut de la Vision.

3.2.4. Imagerie 3D d'un cerveau CDOX NEM289 après irradiation

L'imagerie 3D d'un cerveau transparasé de souris xéno greffé par NEM289 (H3.2-K27M *TP53^{MUT}*) ayant été traité par 10 fractions d'irradiation de 2 Gy est présentée dans la figure 52. L'immunomarquage anti-mKate2 est fortement présent au niveau du tronc cérébral. On observe également une dissémination préférentielle dans l'hémisphère droit des cellules de DIPG qui correspond au côté d'injection des cellules lors de la xenogreffe (Fig. 52B). Cette capacité d'infiltration est un trait caractéristique des cellules de DIPG. Malheureusement, l'immuno-marquage est seulement observable en surface suggérant une mauvaise perméabilisation du tissu (Fig. 52C).

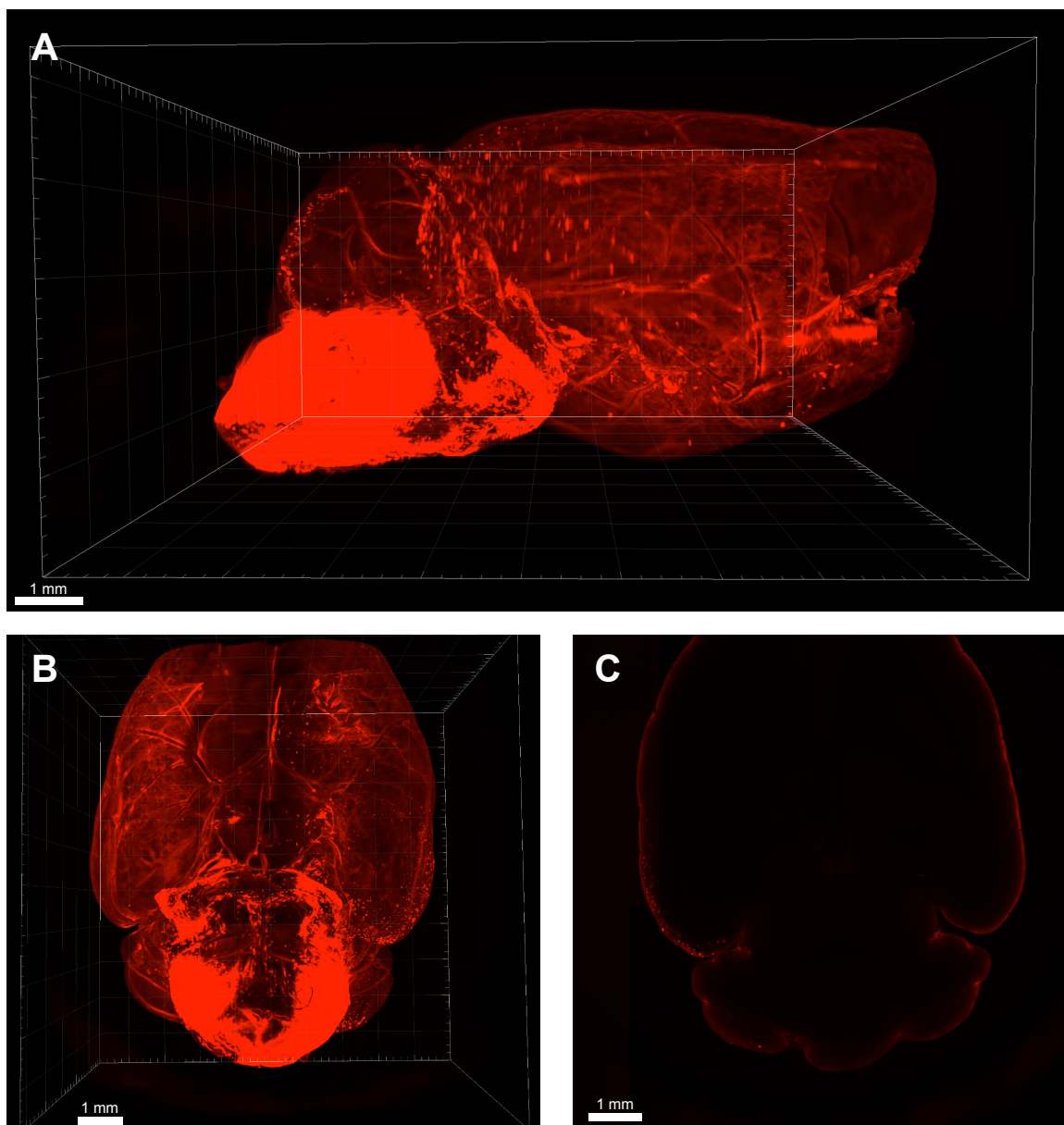


Figure 52. Imagerie 3D d'un cerveau transparentisé de CDOX NEM289 et traité par irradiation (10 x 2 Gy)

Vue latérale droite (A) vue de dessus (B) et coupe coronale (C) d'un cerveau xenogreffé par NEM289 (H3.2-K27M $TP53^{MUT}$). L'immunomarquage anti-mKate2 signale la présence de cellules tumorales. Les cellules tumorales sont davantage présentes dans le tronc cérébral avec une dissémination préférentielle dans l'hémisphère droit. L'immunomarquage ne semble pas avoir pénétré le tissu un profondeur (C).

3.3. Discussion & perspectives

L'efficacité des protocoles de radiothérapie dépend de la présence ou non de cellules résistantes à l'irradiation. Afin de mieux comprendre les processus d'échappement au traitement ainsi que les caractéristiques spécifiques des cellules résistantes, la mise en place de modèles cellulaires isogéniques présentant ou non une résistance à l'irradiation est essentielle (Kuwahara et al., 2017).

L'établissement de modèle d'étude résistant aux traitements peut se faire de différentes manières. Dans tous les cas, un temps de récupération des cellules est nécessaire afin d'identifier d'éventuels changements biologiques induits par le traitement et ainsi s'affranchir des conséquences à court terme de l'irradiation.

Notre choix de réaliser une seule dose d'irradiation était d'obtenir des premiers résultats très préliminaires dans les conditions expérimentales les plus simples. Les deux GSC étudiés ne montrent pas de divergence de radiorésistance entre les cellules naïves et résistantes à l'irradiation. Ceci n'est pas très surprenant pour NEM292 qui présente des mutations de *TP53* et qui est donc intrinsèquement résistante à la radiothérapie (cf. première partie des résultats). En revanche, NEM328 est un modèle sensible à l'irradiation et nous aurions pu nous attendre à une augmentation de la DL50 dans les cellules résistantes puisque les données cliniques suggèrent des mutations plus fréquentes à l'autopsie qu'au diagnostic (*ATRX/DAXX*, *TP53*) et donc d'une certaine manière des modifications des tumeurs. Toutefois, ces résultats constituent une première évaluation qui doit être confirmée. De plus, nous avons choisi d'irradier les cellules avec une seule forte dose afin d'entraîner une sélection clonale importante. L'établissement de lignée résistante peut également se faire en réalisant plusieurs petites fractions afin de se rapprocher des plans de radiothérapie utilisés en clinique. De plus, il nous semblerait intéressant, de remettre en culture des cellules ayant été irradiées *in vivo* et les comparer aux cellules issues de souris contrôles ainsi qu'aux modèles établis *in vitro*. Des comparaisons *in vitro vs. in vivo* permettraient d'identifier le rôle du microenvironnement dans la mise en place de la radiorésistance.

La caractérisation des cellules résistantes peut également se faire par suivi de lignage afin de déterminer le caractère inné ou acquis de la radiorésistance. Pour cela, nous avons mis en place un marquage RVB au laboratoire. Ce marquage est

faisable et non toxique pour nos modèles cellulaires de DIPG. L'avantage principal du marquage RVB est la possibilité d'isoler des clones résistants par tri cellulaire par cytométrie en flux et ainsi réaliser une analyse plus fine des altérations génomiques et de l'expression des gènes des clones résistants par WES/RNAseq ou séquençage ciblé. Le second avantage du marquage RVB est la possibilité d'étudier la régionalité des cellules à la rechute *in vivo*. Pour cela, une visualisation 3D de la distribution des différents clones résistants après transparisation et imagerie par ultramicroscope à feuille de lumière est envisageable. Le premier essai de suivi de lignage *in vitro* par marquage RVB révèle que l'ensemble des cellules NEM292 présente une résistance à l'irradiation. Ce résultat est en accord avec la présence de mutations de *TP53* que nous avons montré être responsables de la radiorésistance dans les DIPG. Cette analyse serait très intéressante à réaliser par la suite sur des modèles cellulaires présentant des fonds génétiques différents.

DISCUSSION GENERALE

Les gliomes infiltrants du tronc cérébral (DIPG) ou plus largement les gliomes diffus de la ligne médiane (DMG) sont des tumeurs inopérables dont le traitement conventionnel repose presque exclusivement sur la radiothérapie focale (54-59,4 Gy délivré en 30-33 fractions de 1,8 Gy) (Cohen et al., 2017). Malgré plus de nombreux essais cliniques, très peu de progrès n'ont été réalisés dans la mise en place d'un traitement efficace contre les DMG/DIPG qui demeurent universellement incurables.

Avant le début de ce projet doctoral, les mécanismes de radiorésistance n'avaient jamais été étudiés dans ces tumeurs. Il était selon nous décisif de comprendre pourquoi certains patients présentent une amélioration clinique après radiothérapie, pourquoi des patients répondent mieux et plus longtemps à la radiothérapie et comment, tôt ou tard, tous les patients vont rechuter.

L'objectif de ce projet doctoral était d'étudier la résistance à la radiothérapie des cellules de DIPG à l'aide de modèles cellulaires *in vitro* de la maladie développés au laboratoire à partir de biopsies de patients au diagnostic.

1. Mutations de *TP53* : un marqueur théranostique

L'étude *in vitro* de modèles cellulaires dérivés de biopsies au diagnostic de DIPG a révélé que les mutations de *TP53* étaient le principal facteur de radiorésistance (Werbrouck et al., 2019). Nous avons montré que les mutations de *TP53* expliquent la plupart des différences de radiosensibilité entre les modèles cellulaires de DIPG et que leur présence peut servir de biomarqueur pour prédire la radiorésistance chez les patients.

Cette découverte est également importante du point de vue de la prise en charge des patients. Nous suggérons que ces mutations soient prises en compte lors de la conception des plans de radiothérapie. Comme la ré-irradiation est de plus en plus utilisée lors des rechutes (Janssens et al., 2017), il semble possible d'adapter cette

approche aux patients les plus susceptibles d'en bénéficier, c'est-à-dire ceux ayant initialement répondu avec un intervalle prolongé d'au moins trois à six patients sans progression (Lobon-Iglesias et al., 2018).

La présence ou non d'une mutation de *TP53* pourra également être prise en compte dans la stratification des modèles dans des études précliniques ainsi que des patients lors de l'évaluation d'un médicament radiosensibilisant par exemple. Le nombre de patients atteints de DIPG étant faible, il est par conséquent indispensable d'avoir une bonne homogénéité entre les groupes de patients lors de l'évaluation d'un nouveau traitement dans le cadre d'un essai clinique.

Ces résultats constituent une première étape dans la compréhension des mécanismes de résistance à la radiothérapie. A ce jour, nous n'avons établi qu'une corrélation entre la présence de la mutation et la radiorésistance, une compréhension des mécanismes sous-jacents reste à élucider. Enfin, malgré une représentativité importante des mutations de *TP53* dans les cancers (*i.e.* gène le plus fréquemment muté) et de nombreuses recherches, les mutations de *TP53* ont pendant longtemps été considérées comme impossibles à cibler. Néanmoins, ces dernières années, des molécules qui ont pour fonction de réactiver des mutants *TP53* sont en cours d'évaluation préclinique (Bykov et al., 2018). Cela pourrait constituer de nouvelles opportunités thérapeutiques à étudier.

2. Potentielles cibles thérapeutiques radiosensibilisantes

Dans le cadre de ce projet, nous avons choisi de réaliser un crible de létalité synthétique en utilisant une librairie de 7450 shARN ciblant le kinome humain afin d'identifier des kinases dont l'inhibition altère sélectivement la survie cellulaire en association avec une irradiation. Cette étude fonctionnelle à haut débit permet d'identifier sans a priori des potentiels cibles thérapeutiques qui radiosensibiliseraient ces cellules de DIPG résistantes à l'irradiation. Les résultats du crible de létalité synthétique induite par l'irradiation ont identifié 36 kinases comme vulnérabilités communes à 3 GSC appartenant au sous-groupe le plus agressif de DIPG : H3.3-K27M et *TP53*^{MUT}.

DISCUSSION GENERALE

Parmi les résultats, plusieurs d'entre elles ont un rôle dans les voies de réponse aux dommages à l'ADN, tels que *ATM*, *CHK1*, *PLK1* ou *WEE1*. Il apparaît donc que les cellules déficientes pour le checkpoint G1/S à cause des mutations de *TP53* soient particulièrement sensibles à une altération des voies de signalisation des checkpoints S et G2/M. Outre le Prexasertib (NTC02808650), plusieurs inhibiteurs ciblant les voies de réponse aux dommages de l'ADN sont en cours d'évaluation en phase I dans les glioblastomes comme AZD1390 un inhibiteur d'ATM (NCT03423628), AZD1775 un inhibiteur de WEE1 (NCT01849146). Les données de la littérature indiquent que ces inhibiteurs traversent la barrière hémato-encéphalique (Durant et al., 2018; Sanai et al., 2018; Campagne et al., 2019). Nous avons évalué ces trois inhibiteurs sur des cellules de DIPG (Fig. S4; Werbrouck et al., 2019). Les IC50 du Prexasertib étant de l'ordre de 10 nM sur les deux modèles de DIPG étudiés, contre des IC50 supérieurs à 400 nM pour les inhibiteurs de ATM et WEE1, nous avons donc choisi de nous concentrer sur l'inhibiteur de CHK1 (Prexasertib). Malheureusement, le développement du Prexasertib a été arrêté par Eli-Lilly à l'automne 2019 et fait suite à l'abandon en 2018 de l'inhibiteur de CHK1 (RG7741) développé par Roche. A ce jour, les inhibiteurs de CHK1 en cours de développement sont le SRA737 de Sierra Oncology et le CASC-578 de Seattle Genetics. Mais ces deux inhibiteurs n'ont pas encore été évalués dans le cas de tumeurs cérébrales, et il serait donc intéressant de réaliser une évaluation de ces molécules sur nos modèles de DIPG. De plus, si les inhibiteurs d'ATM et de WEE1 présentent des IC50 supérieures à 400 nM en agent seul, la combinaison avec l'irradiation n'a pas été étudiée, et ils pourraient potentiellement montrer une synergie avec les rayons. Enfin, l'inhibiteur de PLK1, le Volasertib (BI6727) développé par Boehringer Ingelheim, semble également très prometteur pour le traitement des glioblastomes en combinaison avec l'irradiation selon des données précliniques (Dong et al., 2018). Parmi les autres cibles potentielles identifiées, nous retrouvons les gènes *DDR1* et *FGFR1* dont nous avons déjà montré dans l'introduction l'importance dans les mécanismes de radiorésistance des glioblastomes notamment (Vehlow and Cordes, 2019; Gouazé-Andersson et al., 2016). Ces résultats confirment la pertinence des approches de cribles de létalité synthétique pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

La capacité d'une molécule à passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) est essentielle pour le traitement des tumeurs cérébrales. La BHE est l'une des causes principales de l'échec des traitements utilisés car elle limite la diffusion des molécules vers la tumeur. Des algorithmes qui permettent de mesurer un score de prédiction de passage de la BHE sont aujourd'hui disponibles (Wager et al., 2016). A l'avenir, il serait intéressant de prendre en compte ce score de prédiction lors du choix d'une molécule pour une cible thérapeutique.

3. Plan de radiothérapie des modèles murins de DIPG

La mise au point la plus longue de ce projet de thèse est très certainement la mise au point du plan de traitement des modèles murins de DIPG. La croissance des xénogreffes orthotopique de cellules de DIPG dans le tronc cérébral de souris est très longue (minimum 2-3 mois) et les plans de traitement utilisés ont parfois induit une réponse de plus de 6 mois chez les animaux. Néanmoins, le laboratoire a pu montrer que ces modèles sont pertinents de la maladie, et ils récapitulent en outre le processus d'échappement au traitement. Ils apparaissent donc essentiels pour étudier les processus moléculaires de résistance spécifiques à ces tumeurs mais également pour l'évaluation de nouveaux traitements en combinaison avec la radiothérapie.

Par exemple, une étude *in vivo* par suivi de lignage multicolore (marquage RVB) permettrait d'étudier l'hétérogénéité tumorale et l'organisation spatiale des cellules de DIPG à la rechute ainsi que l'invasion tumorale observée à la rechute après irradiation.

Une des limites principales dans notre étude a été l'utilisation d'un irradiateur Varian Ndi 226 dont la délimitation de la zone irradiée est réalisée à l'aide d'une plaque de plomb placée entre les animaux et la source des rayons. Une irradiation plus précise avec un irradiateur de type SARRP, permettant des irradiations ciblées sur de petits animaux (rats, souris), permettrait une plus grande précision dans la délimitation des volumes et doses d'irradiations. Outre une toxicité réduite due à la préservation des tissus sains, le contrôle du volume d'irradiation ouvrirait de nouvelles perspectives d'études comme la comparaison de la migration des cellules selon si le microenvironnement de la tumeur a été irradié ou non.

4. Modélisation par suivi de lignage

Le développement du marquage RVB ainsi que la mise au point du protocole de transparisation ont été initiés dès le début du projet doctoral. L'objectif initial consistait à modéliser *in vitro* et *in vivo* les processus moléculaires de résistance et d'échappement à la radiothérapie par suivi unicellulaire de la dynamique clonale des cellules tumorales et ainsi définir la part de cellules résistantes, le mode de rechute (oligoclonale ou polyclonale) ainsi que la nature de la résistance (préexistante ou acquise pendant le traitement). Malheureusement cette partie du projet n'a pas bénéficié du temps nécessaire. Les premiers résultats sont très préliminaires qui devront être confirmés et aussi étendus, puisqu'ils ne concernent que des cellules *TP53^{MUT}*. Dans le cas d'une résistance oligoclonale, nous souhaitons réaliser une analyse plus fine des altérations génomiques et de l'expression des gènes sur les clones résistants par WES/RNAseq ou séquençage ciblé afin d'identifier d'éventuels changements biologiques. Et ainsi confronter les résultats obtenus à des résultats cliniques dans le but d'identifier des modifications des tumeurs après traitement par radiothérapie entre le diagnostic et l'autopsie.

Quoi qu'il en soit, le marquage RVB et la transparisation par méthode 3DISCO sont développés et pourront bénéficier à d'autres projets au sein du laboratoire.

En conclusion, ce projet doctoral a permis d'identifier que le statut mutationnel du gène *TP53* était un marqueur théranostique pour prédire la réponse à la radiothérapie des patients. Un crible de létalité synthétique utilisant une librairie de 7450 shARN ciblant le kinome humain a identifié 36 kinases comme potentielles cibles thérapeutiques pour radiosensibiliser les cellules de DIPG. Afin de pouvoir réaliser des évaluations précliniques de traitements en combinaison avec la radiothérapie dans des modèles murins de DIPG et étudier la réponse à l'irradiation *in vivo*, une longue optimisation des plans de radiothérapie a été réalisée afin d'obtenir une réponse chez les animaux. Enfin des développements technologiques comme la mise en place du marquage RVB et le protocole de transparisation et d'imagerie 3D de cerveaux entiers de souris pourront bénéficier à différents projets au laboratoire et cela contribuera à aller plus loin dans la compréhension et la prise en charge de cette maladie pédiatrique qui demeure incurable.

PRESENTATION EN CONGRES

POSTERS

- ❖ **2nd EARC Conference** : Radiation Break-through, from DNA damage responses to precision cancer therapy, 12-14 Mars 2018, Oxford, UK

Kinome-wide synthetic lethality screen to identify the genetic dependencies in DIPG survival to irradiation

Evangelista, CCS ; Barret, E ; Werbrouck, C; Merlevede, J; Saccasyn, A ; Puget, S ; Grill, J; Castel, D & Debily MA

- ❖ **14^{èmes} Journées Scientifiques de l'Ecole Doctorale de Cancérologie**
22-24 Mai 2018, Roscoff, France

Modélisation in vitro & in vivo de la résistance à la radiothérapie dans les gliomes infiltrants du tronc cérébral

Werbrouck, C; Evangelista, CCS; Lobón, MJ; Barret, E; Saccasyn, A; Puget, S; Grill, J; Debily MA & Castel, D

- ❖ **18th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology (ISPNO 2018)**
30 Juin - 3 Juillet 2018, Denver, USA

Molecular determinants of response to radiotherapy in DIPG: a clinical and in vitro study

Werbrouck, C; Evangelista, CCS; Lobón, MJ; Barret, E; Saccasyn, A; Puget, S; Grill, J; Debily MA & Castel, D

- ❖ **5th Biennial Conference on Pediatric Neuro-Oncology, basic and translational research (SNOped 2019)**

3-4 Mai 2019, San Francisco, USA

TP53 pathway alteration is driving radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG)

Werbrouck, C; Evangelista, CCS; Lobón-Iglesias, MJ; Barret, E; Le Teuff, G; Merlevede, J; Brusini R; Kergrohen T; Bolle, S; Varlet, P; Beccaria, K; Boddaert, N; Puget, S; Grill, J; Debily MA & Castel, D

- ❖ **The 51th Congress of the Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique (SIOP) will be held in October 23-26, 2019, in Lyon, France.**

23-26 Octobre 2019, Lyon, France

TP53 pathway alteration is driving radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG)

Werbrouck, C; Evangelista, CCS; Lobón-Iglesias, MJ; Barret, E; Le Teuff, G; Merlevede, J; Brusini R; Kergrohen T; Bolle, S; Varlet, P; Beccaria, K; Boddaert, N; Puget, S; Grill, J; Debily MA & Castel, D

PRESENTATIONS ORALES

- ❖ **15^{èmes} Journées Scientifiques de l'Ecole Doctorale de Cancérologie**

27-29 Mai 2019, Roscoff, France

Modélisation in vitro & in vivo de la résistance à la radiothérapie dans les gliomes infiltrants du tronc cérébral

Werbrouck, C; Evangelista, CCS; Lobón, MJ; Barret, E; Saccasyn, A; Puget, S; Grill, J; Debily MA & Castel, D

REFERENCES

- Allen, A.M., Pawlicki, T., Dong, L., Fourkal, E., Buyyounouski, M., Cengel, K., Plastaras, J., Bucci, M.K., Yock, T.I., Bonilla, L., et al. (2012). An evidence based review of proton beam therapy: the report of ASTRO's emerging technology committee. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 103, 8–11.
- Allen, C., Her, S., and Jaffray, D.A. (2017). Radiotherapy for Cancer: Present and Future. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 109, 1–2.
- van Attikum, H., and Gasser, S.M. (2009). Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol.* 19, 207–217.
- Bai, R.-Y., Staedtke, V., Aprhys, C.M., Gallia, G.L., and Riggins, G.J. (2011). Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncol.* 13, 974–982.
- Bai, R.-Y., Staedtke, V., Rudin, C.M., Bunz, F., and Riggins, G.J. (2015). Effective treatment of diverse medulloblastoma models with mebendazole and its impact on tumor angiogenesis. *Neuro-Oncol.* 17, 545–554.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756–760.
- Baskar, R., Lee, K.A., Yeo, R., and Yeoh, K.-W. (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int. J. Med. Sci.* 9, 193–199.
- Bender, S., Tang, Y., Lindroth, A.M., Hovestadt, V., Jones, D.T.W., Kool, M., Zapatka, M., Northcott, P.A., Sturm, D., Wang, W., et al. (2013). Reduced H3K27me3 and DNA Hypomethylation Are Major Drivers of Gene Expression in K27M Mutant Pediatric High-Grade Gliomas. *Cancer Cell* 24, 660–672.
- Bennetzen, M.V., Kosar, M., Bunkenborg, J., Payne, M.R., Bartkova, J., Lindström, M.S., Lukas, J., Andersen, J.S., Bartek, J., and Larsen, D.H. (2018). DNA damage-induced dynamic changes in abundance and cytosol-nuclear translocation of proteins involved in translational processes, metabolism, and autophagy. *Cell Cycle* 17, 2146–2163.
- Berenguer-Daizé, C., Astorgues-Xerri, L., Odore, E., Cayol, M., Cvitkovic, E., Noel, K., Bekradda, M., MacKenzie, S., Rezai, K., Lokiec, F., et al. (2016). OTX015 (MK-8628), a novel BET inhibitor, displays in vitro and in vivo antitumor effects alone and in combination with conventional therapies in glioblastoma models. *Int. J. Cancer* 139, 2047–2055.
- Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., Goodarzi, A.A., Krempler, A., Jeggo, P.A., and Löbrich, M. (2009). ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J.* 28, 3413–3427.
- Biegging, K.T., Mello, S.S., and Attardi, L.D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 14, 359–370.
- Blackford, A.N., and Jackson, S.P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* 66, 801–817.
- Boileau, M., Shirinian, M., Gayden, T., Harutyunyan, A.S., Chen, C.C.L., Mikael, L.G., Duncan, H.M., Neumann, A.L., Arriba-Tutusaus, P., De Jay, N., et al. (2019). Mutant H3 histones drive human pre-

REFERENCES

- leukemic hematopoietic stem cell expansion and promote leukemic aggressiveness. *Nat. Commun.* 10, 2891.
- Braun, S.A., Panzeter, P.L., Collinge, M.A., and Althaus, F.R. (1994). Endoglycosidic cleavage of branched polymers by poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Eur. J. Biochem.* 220, 369–375.
- Braunstein, S., Raleigh, D., Bindra, R., Mueller, S., and Haas-Kogan, D. (2017). Pediatric high-grade glioma: current molecular landscape and therapeutic approaches. *J. Neurooncol.* 134, 541–549.
- Buch, K., Peters, T., Nawroth, T., Sanger, M., Schmidberger, H., and Langguth, P. (2012). Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay—a comparative study. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 7, 1.
- Buczkwicz, P., Hoeman, C., Rakopoulos, P., Pajovic, S., Letourneau, L., Dzamba, M., Morrison, A., Lewis, P., Bouffet, E., Bartels, U., et al. (2014). Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nat. Genet.* 46, 451–456.
- Burkart, W., Jung, T., and Frasc, G. (1999). Damage pattern as a function of radiation quality and other factors. *C. R. Acad. Sci. III* 322, 89–101.
- Bykov, V.J.N., Eriksson, S.E., Bianchi, J., and Wiman, K.G. (2018). Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 18, 89–102.
- Campagne, O., Davis, A., Maharaj, A.R., Zhong, B., Stripay, J., Farmer, D., Roussel, M.F., and Stewart, C.F. (2019). CNS penetration and pharmacodynamics of the CHK1 inhibitor prexasertib in a mouse Group 3 medulloblastoma model. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 142, 105106.
- Campagne, O., Davis, A., Maharaj, A.R., Zhong, B., Stripay, J., Farmer, D., Roussel, M.F., and Stewart, C.F. (2020). CNS penetration and pharmacodynamics of the CHK1 inhibitor prexasertib in a mouse Group 3 medulloblastoma model. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 142, 105106.
- Canoll, P., and Goldman, J.E. (2008). The interface between glial progenitors and gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 116, 465–477.
- Castel, D., Philippe, C., Calmon, R., Le Dret, L., Truffaux, N., Boddaert, N., Pagès, M., Taylor, K.R., Saulnier, P., Lacroix, L., et al. (2015). Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 130, 815–827.
- Castel, D., Philippe, C., Kergrohen, T., Sill, M., Merlevede, J., Barret, E., Puget, S., Sainte-Rose, C., Kramm, C.M., Jones, C., et al. (2018). Transcriptomic and epigenetic profiling of “diffuse midline gliomas, H3 K27M-mutant” discriminate two subgroups based on the type of histone H3 mutated and not supratentorial or infratentorial location. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 117.
- Chan, K.-M., Fang, D., Gan, H., Hashizume, R., Yu, C., Schroeder, M., Gupta, N., Mueller, S., James, C.D., Jenkins, R., et al. (2013). The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev.* 27, 985–990.
- Chapman, J.D., and Nahum, A.E. (2016). *Radiotherapy Treatment Planning: Linear-Quadratic Radiobiology* (CRC Press).
- Choi, W.H., and Cho, J. (2016). Evolving Clinical Cancer Radiotherapy: Concerns Regarding Normal Tissue Protection and Quality Assurance. *J. Korean Med. Sci.* 31, S75–S87.

REFERENCES

- Chou, T.-C., and Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22, 27–55.
- Cohen, K.J., Jabado, N., and Grill, J. (2017). Diffuse intrinsic pontine gliomas-current management and new biologic insights. Is there a glimmer of hope? *Neuro-Oncol.*
- Cornils, K., Thielecke, L., Hüser, S., Forgber, M., Thomaschewski, M., Kleist, N., Hussein, K., Riecken, K., Volz, T., Gerdes, S., et al. (2014). Multiplexing clonality: combining RGB marking and genetic barcoding. *Nucleic Acids Res.* 42, e56.
- Corre, I., Niaudet, C., and Paris, F. (2010). Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation. *Mutat. Res.* 704, 61–67.
- Coutel, Y. (1959). [Infiltrating glioblastoma of the brain stem in an 8-year-old child; normalization of the pneumoencephalogram after radiotherapy]. *Rev. Otoneuroophthalmol.* 31, 119–123.
- Dabin, J., Fortuny, A., and Polo, S.E. (2016). Epigenome maintenance in response to DNA damage. *Mol. Cell* 62, 712–727.
- Di, K., Lloyd, G.K., Abraham, V., MacLaren, A., Burrows, F.J., Desjardins, A., Trikha, M., and Bota, D.A. (2016). Marizomib activity as a single agent in malignant gliomas: ability to cross the blood-brain barrier. *Neuro-Oncol.* 18, 840–848.
- Dimou, L., and Götz, M. (2014). Glial Cells as Progenitors and Stem Cells: New Roles in the Healthy and Diseased Brain. *Physiol. Rev.* 94, 709–737.
- Dong, J., Park, S.Y., Nguyen, N., Ezhilarasan, R., Martinez-Ledesma, E., Wu, S., Henry, V., Piao, Y., Tiao, N., Brunell, D., et al. (2018). The polo-like kinase 1 inhibitor volasertib synergistically increases radiation efficacy in glioma stem cells. *Oncotarget* 9, 10497–10509.
- Durant, S.T., Zheng, L., Wang, Y., Chen, K., Zhang, L., Zhang, T., Yang, Z., Riches, L., Trinidad, A.G., Fok, J.H.L., et al. (2018). The brain-penetrant clinical ATM inhibitor AZD1390 radiosensitizes and improves survival of preclinical brain tumor models. *Sci. Adv.* 4, eaat1719.
- El-Khouly, F.E., van Vuurden, D.G., Stroink, T., Hulleman, E., Kaspers, G.J.L., Hendrikse, N.H., and Veldhuijzen van Zanten, S.E.M. (2017). Effective Drug Delivery in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: A Theoretical Model to Identify Potential Candidates. *Front. Oncol.* 7.
- Ersahin, T., Tuncbag, N., and Cetin-Atalay, R. (2015). The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol. Biosyst.* 11, 1946–1954.
- Ertürk, A., Lafkas, D., and Chalouni, C. (2014). Imaging cleared intact biological systems at a cellular level by 3DISCO. *J. Vis. Exp. JoVE.*
- Ezponda, T., and Licht, J.D. (2014). Molecular pathways: deregulation of histone h3 lysine 27 methylation in cancer-different paths, same destination. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 20, 5001–5008.
- Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448–453.
- Filbin, M.G., Tirosh, I., Hovestadt, V., Shaw, M.L., Escalante, L.E., Mathewson, N.D., Neffel, C., Frank, N., Pelton, K., Hebert, C.M., et al. (2018). Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq. *Science* 360, 331–335.

REFERENCES

- Fontebasso, A.M., Papillon-Cavanagh, S., Schwartzenuber, J., Nikbakht, H., Gerges, N., Fiset, P.-O., Bechet, D., Faury, D., De Jay, N., Ramkissoon, L.A., et al. (2014). Recurrent somatic mutations in ACVR1 in pediatric midline high-grade astrocytoma. *Nat. Genet.* 46, 462–466.
- Furey, T.S., and Sethupathy, P. (2013). Genetics Driving Epigenetics. *Science* 342, 705–706.
- Gallitto, M., Lazarev, S., Wasserman, I., Stafford, J.M., Wolden, S.L., Terezakis, S.A., Bindra, R.S., and Bakst, R.L. (2019). Role of Radiation Therapy in the Management of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: A Systematic Review. *Adv. Radiat. Oncol.* 4, 520–531.
- Goldberg, A.D., Banaszynski, L.A., Noh, K.-M., Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., et al. (2010). Distinct Factors Control Histone Variant H3.3 Localization at Specific Genomic Regions. *Cell* 140, 678–691.
- Gouazé-Andersson, V., Delmas, C., Taurand, M., Martinez-Gala, J., Evrard, S., Mazoyer, S., Toulas, C., and Cohen-Jonathan-Moyal, E. (2016). FGFR1 Induces Glioblastoma Radioresistance through the PLC γ /Hif1 α Pathway. *Cancer Res.* 76, 3036–3044.
- Grasso, C.S., Tang, Y., Truffaux, N., Berlow, N.E., Liu, L., Debily, M.-A., Quist, M.J., Davis, L.E., Huang, E.C., Woo, P.J., et al. (2015). Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Med.* 21, 555–559.
- Grill, J., Puget, S., Andreiuolo, F., Philippe, C., and MacConaill, L. (2012). Critical oncogenic mutations in newly diagnosed pediatric diffuse intrinsic pontine glioma. *Pediatr. Blood Cancer* 58, 489–491.
- HASHIZUME, R. (2017). Epigenetic Targeted Therapy for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 57, 331–342.
- Hashizume, R., Smirnov, I., Liu, S., Phillips, J.J., Hyer, J., McKnight, T.R., Wendland, M., Prados, M., Banerjee, A., Nicolaidis, T., et al. (2012). Characterization of a diffuse intrinsic pontine glioma cell line: implications for future investigations and treatment. *J. Neurooncol.* 110, 305–313.
- Hashizume, R., Andor, N., Ihara, Y., Lerner, R., Gan, H., Chen, X., Fang, D., Huang, X., Tom, M.W., Ngo, V., et al. (2014). Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat. Med.* 20, 1394–1396.
- Hennika, T., Hu, G., Olaciregui, N.G., Barton, K.L., Ehteda, A., Chitranjan, A., Chang, C., Gifford, A.J., Tsoli, M., Ziegler, D.S., et al. (2017). Pre-Clinical Study of Panobinostat in Xenograft and Genetically Engineered Murine Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Models. *PLoS One* 12, e0169485.
- Huse, J.T., and Holland, E.C. (2010). Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat. Rev. Cancer* 10, 319–331.
- Jamal, M., Rath, B.H., Williams, E.S., Camphausen, K., and Tofilon, P.J. (2010). Microenvironmental regulation of glioblastoma radioresponse. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 6049–6059.
- Janssens, G.O., Gandola, L., Bolle, S., Mandeville, H., Ramos-Albiac, M., van Beek, K., Benghiat, H., Hoeben, B., Morales La Madrid, A., Kortmann, R.-D., et al. (2017). Survival benefit for patients with diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG) undergoing re-irradiation at first progression: A matched-cohort analysis on behalf of the SIOP-E-HGG/DIPG working group. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 73, 38–47.
- Joerger, A.C., and Fersht, A.R. (2016). The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 375–404.

REFERENCES

- Jones, D.T.L. (1999). Present Status and Future Trends of Heavy Particle Radiotherapy. *A02*.
- Jones, B., Dale, R.G., Deehan, C., Hopkins, K.I., and Morgan, D.A.L. (2001). The Role of Biologically Effective Dose (BED) in Clinical Oncology. *Clin. Oncol.* 13, 71–81.
- Kam, W.W.-Y., and Banati, R.B. (2013). Effects of ionizing radiation on mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 607–619.
- Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316–323.
- Katagi, H., Louis, N., Unruh, D., Sasaki, T., He, X., Zhang, A., Ma, Q., Piunti, A., Shimazu, Y., Lamano, J.B., et al. (2019). Radiosensitization by Histone H3 Demethylase Inhibition in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 25, 5572–5583.
- Khuong-Quang, D.-A., Buczkowicz, P., Rakopoulos, P., Liu, X.-Y., Fontebasso, A.M., Bouffet, E., Bartels, U., Albrecht, S., Schwartzentruber, J., Letourneau, L., et al. (2012). K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 439–447.
- Koschmann, C., Calinescu, A.-A., Nunez, F.J., Mackay, A., Fazal-Salom, J., Thomas, D., Mendez, F., Kamran, N., Dzaman, M., Mulpuri, L., et al. (2016). ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma. *Sci. Transl. Med.* 8, 328ra28.
- Krokan, H.E., and Bjørås, M. (2013). Base Excision Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.
- Kruidenier, L., Chung, C., Cheng, Z., Little, J., Che, K., Joberty, G., Bantscheff, M., Bountra, C., Bridges, A., Diallo, H., et al. (2012). A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* 488, 404–408.
- Kuwahara, Y., Roudkenar, M.H., Urushihara, Y., Saito, Y., Tomita, K., Roushandeh, A.M., Sato, T., Kurimasa, A., and Fukumoto, M. (2017). Clinically relevant radioresistant cell line: a simple model to understand cancer radioresistance. *Med. Mol. Morphol.* 50, 195–204.
- Lans, H., Marteijn, J.A., and Vermeulen, W. (2012). ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics Chromatin* 5, 4.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117–1134.
- Lenaerts, E., and Coucke, P. (2014). [Radiation physics for beginners]. *Rev. Med. Liege* 69 Suppl 1, 13–15.
- Lewis, P.W., Müller, M.M., Koletsky, M.S., Cordero, F., Lin, S., Banaszynski, L.A., Garcia, B.A., Muir, T.W., Becher, O.J., and Allis, C.D. (2013). Inhibition of PRC2 Activity by a Gain-of-Function H3 Mutation Found in Pediatric Glioblastoma. *Science* 340, 857–861.
- Lin, G.L., Wilson, K.M., Ceribelli, M., Stanton, B.Z., Woo, P.J., Kreimer, S., Qin, E.Y., Zhang, X., Lennon, J., Nagaraja, S., et al. (2019). Therapeutic strategies for diffuse midline glioma from high-throughput combination drug screening. *Sci. Transl. Med.* 11.
- Lobon-Iglesias, M.J., Giraud, G., Castel, D., Philippe, C., Debily, M.A., Briandet, C., Fouyssac, F., Carli, E. de, Dufour, C., Valteau-Couanet, D., et al. (2018). Diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) at recurrence: is there a window to test new therapies in some patients? *J. Neurooncol.* 137, 111–118.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health

REFERENCES

- Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* (Berl.) 131, 803–820.
- Louvel, G., Pris ,  .L., Boisselier, P., Manens, J.-P., Lafond, C., Bellec, J., Vinceller, S., and Crevoisier, R.D. (2008). Radioth rapie guid e par l'image (IGRT). [/data/revues/12783218/00120006/08004307/](#).
- Lowery, C.D., VanWye, A.B., Dowless, M., Blosser, W., Falcon, B.L., Stewart, J., Stephens, J., Beckmann, R.P., Lin, A.B., and Stancato, L.F. (2017). The Checkpoint Kinase 1 Inhibitor Prexasertib Induces Regression of Preclinical Models of Human Neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* 23, 4354–4363.
- Ludwig, K., and Kornblum, H.I. (2017). Molecular Markers in Glioma. *J. Neurooncol.* 134, 505–512.
- Luger, K., M der, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8   resolution. *Nature* 389, 251–260.
- Luijsterburg, M.S., de Krijger, I., Wiegant, W.W., Shah, R.G., Smeenk, G., de Groot, A.J.L., Pines, A., Vertegaal, A.C.O., Jacobs, J.J.L., Shah, G.M., et al. (2016). PARP1 Links CHD2-Mediated Chromatin Expansion and H3.3 Deposition to DNA Repair by Non-homologous End-Joining. *Mol. Cell* 61, 547–562.
- Mackay, A., Burford, A., Carvalho, D., Izquierdo, E., Fazal-Salom, J., Taylor, K.R., Bjerke, L., Clarke, M., Vinci, M., Nandhabalan, M., et al. (2017). Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* 32, 520-537.e5.
- Maerken, T.V., Vandesompele, J., Rihani, A., Paepe, A.D., and Speleman, F. (2009). Escape from p53-mediated tumor surveillance in neuroblastoma: switching off the p14 ARF -MDM2-p53 axis. *Cell Death Differ.* 16, 1563–1572.
- Manton, C.A., Johnson, B., Singh, M., Bailey, C.P., Bouchier-Hayes, L., and Chandra, J. (2016). Induction of cell death by the novel proteasome inhibitor marizomib in glioblastoma in vitro and in vivo. *Sci. Rep.* 6.
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2008). Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair* 7, 1765–1771.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., et al. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160–1166.
- Mohammad, F., Weissmann, S., Leblanc, B., Pandey, D.P., Højfeldt, J.W., Comet, I., Zheng, C., Johansen, J.V., Rapin, N., Porse, B.T., et al. (2017). EZH2 is a potential therapeutic target for H3K27M-mutant pediatric gliomas. *Nat. Med.* 23, 483.
- Morgan, W.F., and Sowa, M.B. (2005). Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14127–14128.
- Moxon-Emre, I., Taylor, M.D., Bouffet, E., Hardy, K., Campen, C.J., Malkin, D., Hawkins, C., Laperriere, N., Ramaswamy, V., Bartels, U., et al. (2016). Intellectual Outcome in Molecular Subgroups of Medulloblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 34, 4161–4170.
- Navada, S.C., Steinmann, J., L bbert, M., and Silverman, L.R. (2014). Clinical development of demethylating agents in hematology. *J. Clin. Invest.* 124, 40–46.
- O'Connor, M.J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol. Cell* 60, 547–560.

REFERENCES

- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Truitt, G., Boscia, A., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J.S. (2018). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-Oncol.* 20, iv1–iv86.
- Paugh, B.S., Qu, C., Jones, C., Liu, Z., Adamowicz-Brice, M., Zhang, J., Bax, D.A., Coyle, B., Barrow, J., Hargrave, D., et al. (2010). Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 3061–3068.
- Perri, F., Pisconti, S., and Della Vittoria Scarpati, G. (2016). P53 mutations and cancer: a tight linkage. *Ann. Transl. Med.* 4.
- Piunti, A., Hashizume, R., Morgan, M.A., Bartom, E.T., Horbinski, C.M., Marshall, S.A., Rendleman, E.J., Ma, Q., Takahashi, Y., Woodfin, A.R., et al. (2017). Therapeutic targeting of polycomb and BET bromodomain proteins in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Nat. Med.* 23, 493–500.
- Plessier, A., Le Dret, L., Varlet, P., Beccaria, K., Lacombe, J., Mériaux, S., Geffroy, F., Fiette, L., Flamant, P., Chrétien, F., et al. (2017). New in vivo avatars of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) from stereotactic biopsies performed at diagnosis. *Oncotarget* 8, 52543–52559.
- Pollard, S.M., Yoshikawa, K., Clarke, I.D., Danovi, D., Stricker, S., Russell, R., Bayani, J., Head, R., Lee, M., Bernstein, M., et al. (2009). Glioma Stem Cell Lines Expanded in Adherent Culture Have Tumor-Specific Phenotypes and Are Suitable for Chemical and Genetic Screens. *Cell Stem Cell* 4, 568–580.
- Poon, R.Y.C. (2016). Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1342, 3–19.
- Popovic, R., and Licht, J.D. (2012). Emerging epigenetic targets and therapies in cancer medicine. *Cancer Discov.* 2, 405–413.
- Puget, S., Philippe, C., Bax, D.A., Job, B., Varlet, P., Junier, M.-P., Andreiuolo, F., Carvalho, D., Reis, R., Guerrini-Rousseau, L., et al. (2012). Mesenchymal Transition and PDGFRA Amplification/Mutation Are Key Distinct Oncogenic Events in Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas. *PLoS ONE* 7, e30313.
- Puget, S., Beccaria, K., Blauwblomme, T., Roujeau, T., James, S., Grill, J., Zerah, M., Varlet, P., and Sainte-Rose, C. (2015a). Biopsy in a series of 130 pediatric diffuse intrinsic Pontine gliomas. *Childs Nerv. Syst.* 31, 1773–1780.
- Puget, S., Beccaria, K., Blauwblomme, T., Roujeau, T., James, S., Grill, J., Zerah, M., Varlet, P., and Sainte-Rose, C. (2015b). Biopsy in a series of 130 pediatric diffuse intrinsic Pontine gliomas. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* 31, 1773–1780.
- Rasmussen, B.K., Hansen, S., Laursen, R.J., Kosteljanetz, M., Schultz, H., Nørgård, B.M., Guldborg, R., and Gradel, K.O. (2017). Epidemiology of glioma: clinical characteristics, symptoms, and predictors of glioma patients grade I–IV in the the Danish Neuro-Oncology Registry. *J. Neurooncol.* 135, 571–579.
- Ray Chaudhuri, A., and Nussenzweig, A. (2017). The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 610–621.
- Reddington, J.P., Perricone, S.M., Nestor, C.E., Reichmann, J., Youngson, N.A., Suzuki, M., Reinhardt, D., Dunican, D.S., Prendergast, J.G., Mjoseng, H., et al. (2013). Redistribution of H3K27me3 upon DNA hypomethylation results in de-repression of Polycomb target genes. *Genome Biol.* 14, R25.

REFERENCES

- Reyes-Botero, G., Giry, M., Mokhtari, K., Labussière, M., Idbaih, A., Delattre, J.-Y., Laigle-Donadey, F., and Sanson, M. (2014). Molecular analysis of diffuse intrinsic brainstem gliomas in adults. *J. Neurooncol.* 116, 405–411.
- Rigueur, D., Brugger, S., Anbarchian, T., Kim, J.K., Lee, Y., and Lyons, K.M. (2015). The type I BMP receptor ACVR1/ALK2 is required for chondrogenesis during development. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 30, 733–741.
- Robison, N.J., and Kieran, M.W. (2014). Diffuse intrinsic pontine glioma: a reassessment. *J. Neurooncol.* 119, 7–15.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858–5868.
- Röntgen, W.C. (1898). Ueber eine neue Art von Strahlen. *Ann. Phys.* 300, 1–11.
- Sanai, N., Li, J., Boerner, J., Stark, K., Wu, J., Kim, S., Derogatis, A., Mehta, S., Dhruv, H.D., Heilbrun, L.K., et al. (2018). Phase 0 Trial of AZD1775 in First-Recurrence Glioblastoma Patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 24, 3820–3828.
- Schaeue, D., and McBride, W.H. (2015). Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 12, 527–540.
- Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.-Y., Jones, D.T.W., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A.M., Quang, D.-A.K., Tönjes, M., et al. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 482, 226–231.
- Serakinci, N., Mega Tiber, P., and Orun, O. (2018). Chromatin modifications of hTERT gene in hTERT-immortalized human mesenchymal stem cells upon exposure to radiation. *Eur. J. Med. Genet.* 61, 288–293.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* 66, 7–30.
- Sitbon, D., Podsypanina, K., Yadav, T., and Almouzni, G. (2017). Shaping Chromatin in the Nucleus: The Bricks and the Architects. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*
- Skibinski, C.G., Williamson, T., and Riggins, G. (2018). Mebendazole and Radiation in Combination Increase Survival through Anticancer Mechanisms in an Intracranial Rodent Model of Malignant Meningioma. *J. Neurooncol.* 140, 529–538.
- Smith, J., Mun Tho, L., Xu, N., and Gillespie, D. (2010). Chapter 3 - The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. In *Advances in Cancer Research*, G.F. Vande Woude, and G. Klein, eds. (Academic Press), pp. 73–112.
- Somosy, Z. (2000). Radiation response of cell organelles. *Micron Oxf. Engl.* 1993 31, 165–181.
- Sørensen, C.S., Syljuåsen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Rønnstrand, L., Khanna, K.K., Zhou, B.-B., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 3, 247–258.
- Stafford, J.M., Lee, C.-H., Voigt, P., Descostes, N., Saldaña-Meyer, R., Yu, J.-R., Leroy, G., Oksuz, O., Chapman, J.R., Suarez, F., et al. (2018). Multiple modes of PRC2 inhibition elicit global chromatin alterations in H3K27M pediatric glioma. *Sci. Adv.* 4, eaau5935.
- Storici, F. (2011). *DNA Repair: On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors* (IntechOpen).

REFERENCES

- Sturm, D., Witt, H., Hovestadt, V., Khuong-Quang, D.-A., Jones, D.T.W., Konermann, C., Pfaff, E., Tönjes, M., Sill, M., Bender, S., et al. (2012). Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma. *Cancer Cell* 22, 425–437.
- Szenker, E., Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2011). The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res.* 21, 421–434.
- Szumiel, I. (2015). Ionizing radiation-induced oxidative stress, epigenetic changes and genomic instability: the pivotal role of mitochondria. *Int. J. Radiat. Biol.* 91, 1–12.
- Taylor, K.R., Mackay, A., Truffaux, N., Butterfield, Y.S., Morozova, O., Philippe, C., Castel, D., Grasso, C.S., Vinci, M., Carvalho, D., et al. (2014). Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Genet.* 46, 457–461.
- Tollervey, J., and Lunyak, V.V. (2012). Epigenetics: Judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics* 7, 823.
- Vehlow, A., and Cordes, N. (2019). DDR1 (discoidin domain receptor tyrosine kinase 1) drives glioblastoma therapy resistance by modulating autophagy. *Autophagy* 15, 1487–1488.
- Vo, A., Taylor, J., Rosler, R., Piasecki, J., Leviten, D., Sierra, T., Dozier, E., Klucher, K., Boyle, B., Boyce, R., et al. (2017). Abstract 295: CASC-578, a novel Chk1 inhibitor, is active as a single agent in solid tumors and displays synergistic anti-tumor activity in combination with Wee1 inhibition. *Cancer Res.* 77, 295–295.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307–310.
- Wager, T.T., Hou, X., Verhoest, P.R., and Villalobos, A. (2016). Central Nervous System Multiparameter Optimization Desirability: Application in Drug Discovery. *ACS Chem. Neurosci.* 7, 767–775.
- Wang, H., Mu, X., He, H., and Zhang, X.-D. (2018). Cancer Radiosensitizers. *Trends Pharmacol. Sci.* 39, 24–48.
- Ward, J.F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 35, 95–125.
- Warren, K.E., Killian, K., Suuriniemi, M., Wang, Y., Quezado, M., and Meltzer, P.S. (2012a). Genomic aberrations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro-Oncol.* 14, 326–332.
- Warren, K.E., Killian, K., Suuriniemi, M., Wang, Y., Quezado, M., and Meltzer, P.S. (2012b). Genomic aberrations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro-Oncol.* 14, 326–332.
- Weber, K., Thomaschewski, M., Warlich, M., Volz, T., Cornils, K., Niebuhr, B., Träger, M., Lütgehetmann, M., Pollok, J.-M., Stocking, C., et al. (2011). RGB marking facilitates multicolor clonal cell tracking. *Nat. Med.* 17, 504–509.
- Weber, K., Thomaschewski, M., Benten, D., and Fehse, B. (2012). RGB marking with lentiviral vectors for multicolor clonal cell tracking. *Nat. Protoc.* 7, 839–849.
- Weeden, C.E., and Asselin-Labat, M.-L. (2018). Mechanisms of DNA damage repair in adult stem cells and implications for cancer formation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1864, 89–101.
- Werbrouck, C., Evangelista, C.C.S., Lobón-Iglesias, M.-J., Barret, E., Le Teuff, G., Merlevede, J., Brusini, R., Kergrohen, T., Mondini, M., Bolle, S., et al. (2019). TP53 pathway alterations drive

REFERENCES

radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG). *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*

Wiese, M., Schill, F., Sturm, D., Pfister, S., Hulleman, E., Johnsen, S.A., and Kramm, C.M. (2016). No Significant Cytotoxic Effect of the EZH2 Inhibitor Tazemetostat (EPZ-6438) on Pediatric Glioma Cells with Wildtype Histone 3 or Mutated Histone 3.3. *Klin. Padiatr.* 228, 113–117.

Wu, G., Broniscer, A., McEachron, T.A., Lu, C., Paugh, B.S., Becksfors, J., Qu, C., Ding, L., Huether, R., Parker, M., et al. (2012). Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat. Genet.* 44, 251–253.

Wu, G., Diaz, A.K., Paugh, B.S., Rankin, S.L., Ju, B., Li, Y., Zhu, X., Qu, C., Chen, X., Zhang, J., et al. (2014). The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat. Genet.* 46, 444–450.

Yang, L., Zhang, Y., Shan, W., Hu, Z., Yuan, J., Pi, J., Wang, Y., Fan, L., Tang, Z., Li, C., et al. (2017). Repression of BET activity sensitizes homologous recombination-proficient cancers to PARP inhibition. *Sci. Transl. Med.* 9.

Zhang, L., Chen, L.H., Wan, H., Yang, R., Wang, Z., Feng, J., Yang, S., Jones, S., Wang, S., Zhou, W., et al. (2014). Exome sequencing identifies somatic gain-of-function PPM1D mutations in brainstem gliomas. *Nat. Genet.* 46, 726–730.

(2019). Lilly scraps two research assets, leaving few rivals behind.

Titre : Modélisation *in vitro* & *in vivo* de la résistance à la radiothérapie dans les gliomes infiltrants du tronc cérébral (DIPG)

Mots clés : DIPG, radiorésistance, TP53, crible d'ARN interférence, modélisation

Résumé : Les gliomes infiltrants du tronc cérébral (DIPG) sont les tumeurs cérébrales pédiatriques les plus sévères. Le traitement standard, la radiothérapie, n'est efficace que transitoirement et la réponse est hétérogène. L'objectif du projet est de définir les mécanismes de radiorésistance.

Tout d'abord, la réponse *in vitro* à l'irradiation de modèles cellulaires de DIPG dérivés de biopsies au diagnostic a été évaluée et nous avons identifié les mutations de TP53 comme principal facteur de radiorésistance. Ce résultat a été validé *in vitro* à l'aide de 4 lignées isogéniques TP53^{WT} et TP53^{KD}. Puis, nous avons montré au niveau clinique qu'une mutation de TP53 est un biomarqueur de non-réponse à la radiothérapie. A l'aide d'un crible d'ARN interférence, nous avons identifié différentes kinases essentielles à la survie des cellules de DIPG à l'irradiation. L'inhibition de

CHK1 augmente la réponse à l'irradiation spécifiquement dans les cellules TP53^{MUT} et pourrait être considérée comme une nouvelle approche thérapeutique en combinaison avec la radiothérapie. Enfin, des modèles cellulaires résistants à l'irradiation ont été mis en place pour étudier la rechute ainsi que des outils pour modéliser les processus moléculaires de résistance et d'échappement à la radiothérapie par suivi unicellulaire de la dynamique clonale des cellules tumorales par marquage RVB.

Ces résultats vont plus loin dans la compréhension de la radiorésistance des DIPG. Nous avons démontré qu'une altération de TP53 est un marqueur théranostic de prédiction de radiorésistance et nous avons identifié de nouvelles opportunités thérapeutiques en combinaison avec la radiothérapie pour le traitement de cette maladie pédiatrique qui demeure incurable.

Title: Modeling *in vitro* & *in vivo* radiotherapy resistance in diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG)

Keywords: DIPG, radioresistance, TP53, high throughput screening, modeling

Abstract: Diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) are the most severe pediatric brain tumours. Though accepted as the main therapeutic, radiotherapy is only transiently efficient and not even in every patient. We previously identified a heterogeneous response to radiotherapy at diagnosis (Castel *et al.*, 2015). The aim of the project was to define the mechanisms of radioresistance.

First, we assessed *in vitro* response to ionizing radiations in a collection of DIPG cellular models derived from treatment-naïve biopsies and we uncovered TP53 mutation as the main driver of increased radioresistance. We validated this finding in 4 isogenic pairs of DIPG cells with TP53^{WT} and TP53^{KD}. Then, we demonstrated with an extended cohort of 73 DIPG patients that mutated TP53 patients had a poor response to radiotherapy. Using a

kinome-wide synthetic lethality RNAi screen, we further identified target genes that can sensitize TP53^{MUT} DIPG to ionizing radiations. CHK1 inhibition increases response to radiation specifically in TP53^{MUT} cells and could be considered as a new therapeutic approach in this setting. Finally, we established *in vitro* radioresistant DIPG cells to study tumour relapse and we developed tools to model post-radiotherapy relapse through the study of clonal dynamics using single cell RGB marking.

In all, this results go further in the understanding of the DIPG radioresistance. We demonstrated that a TP53 alteration is a theranostic marker to predict radioresistance and we opened new therapeutic opportunities in combination with radiotherapy for the treatment of this pediatric disease, which remains incurable.