



HAL
open science

Etude de l'impact de la mutation H3.3K27M sur le phénotype agressif et résistant de lignées cellulaires de gliome pédiatrique

Quentin Bailleul

► **To cite this version:**

Quentin Bailleul. Etude de l'impact de la mutation H3.3K27M sur le phénotype agressif et résistant de lignées cellulaires de gliome pédiatrique. Cancer. Université de Lille, 2020. Français. NNT : 2020LILUS107 . tel-03924113

HAL Id: tel-03924113

<https://theses.hal.science/tel-03924113>

Submitted on 5 Jan 2023

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.

Université de Lille

Laboratoire Canther UMR9020 CNRS – UMR1277 Inserm

Equipe « Plasticité cellulaire et Cancer »

Unité Tumorigénèse et Résistance aux Traitements – Centre Oscar Lambret

DOCTORAT

Biomolécules, Pharmacologie, Thérapeutique

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

Etude de l'impact de la mutation H3.3K27M sur le phénotype agressif et résistant de lignées cellulaires de gliome pédiatrique

Présentée et soutenue publiquement par

Quentin Bailleul

Le 4 Décembre 2020

Jury

Président : Pr Xuefen Le Bourhis – Université de Lille

Rapporteurs : Dr Helene Castel – Université de Rouen

Dr Marie-Anne Debily – Université d'Evry-Val d'Essonne

Examineurs : Pr Pascale Varlet – Centre Hospitalier Sainte Anne

Dr Eddy Pasquier – Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille

Membre invité : Dr Pierre Leblond – Centre Léon Berard

Directeur : Dr Samuel Meignan – Centre Oscar Lambret

REMERCIEMENTS

J'ai réalisé mes travaux de thèse au sein du laboratoire Canther UMR9020 CNRS – UMR1277 Inserm, dirigé par le Docteur Isabelle Van Seuningen, que je remercie pour son accueil. L'équipe « Plasticité cellulaire et Cancer » dont je faisais partie était dirigée par le Professeur Xuefen Le Bourhis, que je remercie pour ses conseils avisés et ses remarques toujours pertinentes.

Je tiens à remercier le Centre Oscar Lambret et son directeur, le Professeur Eric Lartigau, ainsi que la Région Hauts-de-France, pour le co-financement de mon allocation doctorale.

Je souhaite remercier vivement pour l'honneur qu'ils me font, le Docteur Hélène Castel et le Docteur Marie-Anne Debily, qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que le Professeur Pascale Varlet et le Docteur Eddy Pasquier qui ont accepté d'examiner mon travail.

Je voudrais également remercier les associations qui soutiennent notre unité, pour leur dévouement sans faille, dans l'optique de faire avancer nos projets de recherche.

Merci à toi, Samuel, d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Ces années passées au sein de la « Team UTRT » resteront gravées dans ma mémoire. Merci pour ta générosité, ta bonne humeur quotidienne et ta confiance permanente. Je me suis réellement senti soutenu et parfaitement encadré durant ces années passées sous ta tutelle. Merci pour ces toutes ces heures de corrections, relectures et répétitions. Je tiens également à m'excuser pour tous les ascenseurs émotionnels que j'ai pu te créer avec ce fameux modèle de réversion... mais nous avons finalement obtenu ce que nous voulions. Je retiendrais de toi, quelqu'un de prévenant, toujours orienté vers le côté positif et toujours ouvert à la discussion. Je ne te remercie cependant pas pour tes « tacles gratuits », n'étaient presque jamais drôle (je pense en fait que cet avis dépend de la position dans lequel on se trouve...) mais qui ont toujours su mettre de la bonne humeur au sein de ton équipe. Si je devais choisir une citation pour te représenter, je citerais un grand physicien : « Tu connais mon intelligence. Ne crois-tu pas que si j'avais tort, je le saurais ? » (Sheldon Cooper ~~et al.~~). MERCI pour tout, très sincèrement, tu es quelqu'un que je prendrais en exemple durant toute ma carrière.

Un grand MERCI, Mélanie, pour ton aide précieuse et tes conseils. Merci de m'avoir formé aux rudiments de la biologie moléculaire. Au-delà d'être collègues, nous sommes devenus amis, et je te remercie également pour les moments que l'on a pu passer en dehors du labo. Je m'étais promis de ne pas oublier de citer tous ces westerns. J'espère que tu n'en garderas pas un mauvais souvenir pour toute ta vie, je m'en voudrais. Merci pour tout ces moments, pour ta sincérité, ta bonne humeur, pour tous les délires et fou rire que nous avons pu avoir ensemble. Je ne suis pas près d'oublier tout ça ! un grand MERCI.

Merci à toi, Christine, tout d'abord pour tes conseils, ta formation à la culture et ton expertise en biologie cellulaire. Je te dois beaucoup de choses dans ma façon de travailler. Je me suis beaucoup inspiré de ton organisation de travail et ta façon de faire pour réaliser l'ensemble des manips. Un grand merci pour tout ça ! Je tiens également à te remercier pour les moments de co-voiturage que l'on a pu partager. Tu auras aussi été un soutien sans faille quant aux remarques envers le 6-2 ! MERCI à toi !!

Merci Nicole, pour ta bonne humeur permanente ainsi que tes conseils. Merci également pour toutes les petites attentions que tu nous portes au quotidien. J'ai beaucoup apprécié nos discussions autour des jeux de sociétés ! Je n'oublierais pas tes « Nicolades » qui ont provoqué pas mal de fous rires.

Merci également à toi, Alessandro, pour l'ensemble de tes analyses pertinentes, remarques et conseils précis, relectures et corrections. Finalement, nous n'aurons pas été longtemps au labo en même temps mais je me considère très chanceux d'avoir pu compter sur quelqu'un comme toi en cette fin de thèse. Merci aussi de m'avoir apporté un soutien footballistique au labo, je me sentais bien seul... Merci également pour l'ensemble des bons moments que nous avons pu passer ensemble.

Je te remercie Andria, pour ta bonne humeur quotidienne, tes conseils et analyses tous aussi pertinents les uns que les autres. J'aimerais que toutes les personnes que je serais amener à former soient comme toi. Je compte sur toi pour réaliser une belle caractérisation du modèle. Je ne doute pas du fait que tu feras une belle carrière scientifique. Bon courage à toi pour ta thèse et pour la suite.

Merci à Pierre pour ton expertise clinique et tes analyses toujours pertinentes. Merci également d'avoir répondu à chacune de mes questions.

Merci à toi, Isabelle, pour tout ce que tu as fait pour moi. Merci pour ta bonne humeur permanente, merci pour les moments sympas que l'on a pu partager ainsi que ton retour d'expérience canadienne.

Merci à Fabrice et Véronique, sans qui le café du matin aurait sûrement eu une autre saveur, merci à tous les deux pour votre joie de vivre, les fou-rires que nous avons pu avoir ensemble. Merci également pour vos remarques et conseils. Merci pour toute cette bonne humeur, qui permettait de bien commencer la journée. J'aimerais également que tous mes futurs collègues vous ressemblent. Un remerciement spécial à toi Fabrice, pour ta relecture.

Merci à Audrey, tout d'abord d'avoir accepté de faire parti de mon jury de CSI, mais aussi pour toutes les aides et conseils dont tu m'as fait part. C'est vraiment très agréable de travailler avec toi, j'ai beaucoup apprécié ta bienveillance, ta bonne humeur permanente ainsi que ta rigueur scientifique.

Merci à l'ensemble des « Smilliens », de m'avoir accueilli au sein de votre *open-space*. C'était très agréable de partager ce bureau avec vous.

Merci à Mélanie, Samy, Sabine et Marie-Hélène, pour les moments de convivialité passés lors des pauses café.

Merci à Marie Castets et Eddy Pasquier pour leur collaboration, leur expertise ainsi que leurs conseils. J'ai vraiment apprécié d'avoir pu échanger avec vous. Merci pour votre aide.

Merci à l'ensemble du personnel de l'IRCL, à commencer par son directeur, le Pr Philippe Delannoy. Merci également à Micheline, Matthias et Corinne pour leur accueil, leur bienveillance quotidienne. Un merci tout particulier à Michel pour son aide et sa bonne humeur.

Merci à l'ensemble des membres de l'équipe « SN3 », pour leurs conseils et analyses. Merci à l'ensemble des étudiants en thèse avec qui j'ai pu partager de très bons moments. Mention toute particulière à Clément Lecerf avec qui j'ai partagé les bancs de la fac depuis la Licence. C'était vraiment un plaisir de pouvoir réaliser notre thèse dans la même unité.

Un immense Merci à mes parents, qui m'ont toujours soutenu et sans qui tout cela n'aurait été possible. Merci à mes frères et sœurs, beaux-frères et belles-sœurs, qui ont toujours cru en moi et qui ont toujours été là pour moi.

Je terminerais par te remercier, Mélanie, pour le soutien sans faille dont tu as fait preuve, mais aussi pour les sacrifices que tu as dû réaliser pour que je puisse mener à bien ce projet.

Je ne peux oublier les personnes qui m'étaient chères et qui, je l'espère sont fières de moi...

SOMMAIRE

Introduction.....	7
1. Les gliomes pédiatriques.....	8
1.1. Les tumeurs cérébrales pédiatriques	8
1.2. Les gliomes infiltrants localisés au tronc cérébral	12
1.2.1. Symptômes et diagnostics des DIPG.....	12
1.2.2. Stratégies de traitement des DIPG	13
1.2.3. Résistance aux traitements des DIPG et innovations thérapeutiques	14
1.2.3.1. Résistance des DIPG aux agents de chimiothérapie	14
1.2.3.2. Les innovations thérapeutiques.....	16
2. Contexte épigénétique des DIPG	18
2.1. La chromatine et les régulations épigénétiques.....	18
2.1.1. Modifications post-traductionnelles et compaction de la chromatine en condition physiologique	18
2.1.2. Variants de l'histone H3, localisation et fonction	21
2.2. Les mutations H3K27M dans les DIPG	25
2.2.1. Effet de la mutation sur le remodelage de la chromatine	25
2.2.2. Conséquences épigénétiques et géniques des mutations H3K27M.....	27
2.2.2.1. Impact sur le profil épigénétique.....	27
2.2.2.2. Impact sur l'expression génique	28
2.2.3. Différences entre mutations H3.1 et H3.3K27M.....	29
2.3. Effet « driver » des mutations H3K27M.....	31
2.3.1. Genèse des DIPG.....	31
2.3.2. Caractère primitif des mutations H3K27M.....	32
2.3.3. Effet « driver » des mutations H3K27M.....	33
2.4. Autres altérations géniques au sein des DIPG.....	34
2.4.1. Mutations ACVR1.....	34
2.4.2. Mutations de la voie p53	35
2.4.3. Altération de la voie des RTK : Amplification de PDGFRA.....	35
2.4.4. Amplification de MYC	36
2.4.5. Mutations ATRX.....	36
2.4.6. Mutations H3G34R/V	36
2.4.7. Autres altérations décrites.....	37
3. Stratégies de modification du génome	38
3.1. Surexpression et invalidation génique.	38

3.2. Le gene editing	39
3.2.1. Les prémices du gene editing.....	39
3.2.2. Voies de réparation de l'ADN.....	41
3.2.2.1. Non-Homologous End-Joining (NHEJ).....	41
3.2.2.1.1. La voie C-NHEJ	41
3.2.2.1.2. La voie A-NHEJ	42
3.2.3. Recombinaison Homologue.....	44
3.3. Les outils permettant de créer des cassures doubles brins.....	47
3.3.1. Les nucléases à doigts de zinc (ZFN).....	47
3.3.2. La technologie des TALEN.....	49
3.3.2.1. Description des TALEN.....	49
3.3.2.2. Assemblage des TALEN	51
3.3.3. Le système CRISPR-Cas9	52
3.3.3.1. Histoire du système CRISPR/Cas.....	52
3.3.3.2. Mécanismes d'action du système CRISPR-Cas bactérien	53
3.3.3.3. Application au gene editing	55
3.3.3.4. Effets <i>off-target</i> et améliorations apportées.....	56
3.3.3.5. Comparatif des trois méthodes	57
Objectifs de la thèse.....	60
Résultats.....	62
1. Induction de la mutation H3.3K27M dans des lignées cellulaires de gliome pédiatrique.....	63
1.1. Lignées cellulaires de gliome pédiatrique.....	63
<i>Article 1: Oncogenic impact of H3.3K27M induction in pediatric glioma cell lines</i>	<i>65</i>
1.2. Résultats préliminaires de l'impact de la mutation H3.3K27M sur la croissance tumorale <i>in vivo</i> en poisson-zèbre.....	68
2. Réversion de la mutation H3.3K27M dans une lignée cellulaire de DIPG.....	70
2.1. Contexte.....	70
2.2. Lignées cellulaires de DIPG	70
2.3. Approche expérimentale initiale : les TALEN	71
<i>Article 2: H3.3K27M reversion in DIPG cells.</i>	<i>79</i>
2.4. Résultats complémentaires préliminaires	81
2.4.1. Matériel et méthodes	81
2.4.2. Résultats	84
Discussion.....	91
Conclusion et perspectives	108
Bibliographie.....	110
Annexes	125

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Répartition des cancers de l'enfant en France.....	8
Figure 2. Dénomination des gliomes selon leur origine présumée.....	9
Figure 3. Dichotomie des tumeurs cérébrales de l'enfant.....	11
Figure 4. Imagerie d'un gliome diffus de la ligne médiane.....	12
Figure 5. Compaction de l'ADN et marques épigénétiques.....	19
Figure 6. Différences structurales et transcriptionnelles des variants de l'histone H3.....	23
Figure 7. Répartition des différents variants d'histones et leurs chaperonnes.....	24
Figure 8. Impact de la mutation H3K27M sur l'expression génique.....	26
Figure 9. La mutation H3.3K27M provoque une expression de certains gènes ayant un promoteur bivalent. ...	29
Figure 10. Répartition des différents types de mutations chez des patients atteints de DIPG.....	30
Figure 11. Séquence d'apparition des diverses mutations au cours du développement des DIPG.....	32
Figure 12. Effets des combinaisons de mutations sur la tumorigénèse des DIPG.....	34
Figure 13. Répartition des altérations géniques au sein des différents types de tumeurs cérébrales pédiatriques.....	37
Figure 14. Mécanisme de réparation par NHEJ classique.....	42
Figure 15. Mécanisme de réparation par NHEJ alternative.....	43
Figure 16. Mécanisme de réparation par recombinaison homologue.....	46
Figure 17. Principe général des ZFN.....	48
Figure 18. Organisation structurale des TALE et spécificité de reconnaissance des bases de l'ADN.....	50
Figure 19. Principe de la technologie des TALEN.....	51
Figure 20. Mécanisme de défense bactérien dont est issu le système CRISPR-Cas9.....	54
Figure 21. Création d'un ARN guide unique et essor du système CRISPR-Cas9.....	55
Figure 22. Les principaux outils de <i>gene editing</i>	57
Figure 23. Immunophénotypage des cellules de gliome pédiatrique.....	64
Figure 24. Impact de la mutation K27M sur les propriétés invasives des cellules tumorales in vivo.	69
Figure 25. Etude de la ploïdie et du nombre de copies du gène <i>H3F3A</i> muté dans la lignée HSJD-DIPG-007.....	72
Figure 26. Stratégie de gene editing par utilisation de la technologie des TALEN.....	73
Figure 27. Design des plasmides contenant les TALEN et de l'oligonucléotide modèle.....	74
Figure 28. Schéma de transfection, tri et screening des clones.....	76
Figure 29. Second schéma de transfection, tri et screening des clones.....	77
Figure 30. Analyse par western blot de l'effet de la réversion de la mutation H3.3K27M sur la marque H3K27me3 et le niveau d'expression d'H3.3.....	84
Figure 31. Etude de la croissance cellulaire des cellules DIPG-012 et DIPG-012 ^{REV}	85
Figure 32. Mesure de l' <i>oxygen consumption rate</i> (OCR) des cellules DIPG-012 et DIPG-012 ^{REV}	87
Figure 33. Test de clonogénicité et étude de l'impact de la mutation H3.3K27M sur la radiorésistance des cellules de DIPG.....	89
Figure 34. Evaluation du taux basal de ROS et de son évolution après irradiations dans les cellules DIPG-012 vs. DIPG-012 ^{REV}	90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Principaux essais cliniques réalisés sur les gliomes pédiatriques de la ligne médiane entre 1987 et 2015.....	16
Tableau 2. Liste des principales modifications d'histones et leur effet activateur ou répresseur sur la transcription.....	20
Tableau 3. Liste non exhaustive des enzymes et domaines de reconnaissance en lien avec les différentes marques épigénétiques histones	21
Tableau 4. Comparatif des principaux outils de <i>gene editing</i>	59
Tableau 5. Caractéristiques des lignées de gliomes pédiatriques.....	64
Tableau 6. Caractéristiques des lignées de DIPG utilisées	71

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACVR1 : Activin A Receptor Type 1	DNET : Dysembryoplastic neuroepithelial tumor
ADN : Acide Désoxyribonucléique	DSB : Double Strand Break
Akt : Protein kinase B	EZH2 :Enhancer of Zeste Homolog 2
A-NHEJ : Alternative Non-Homologous End-Joining	FISH :Fluorescence in situ hybridization
ARNm : Acide Ribonucléique messenger	GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
ATP :Adénosine Triphosphate	GFP :Green Fluorescence Protein
ATRX : Alpha Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked	H3F3A/B : H3 histone Family member 3A/B
BIOMEDE : Biological Medecine for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Eradication	H3G34R/V : Substitution de la glycine 34 de l'histone H3 par une arginine ou une valine
BMP : Bone Morphogenetic Protein	H3K27ac : Acétylation de la lysine 27 de l'histone H3
B-NHEJ : Back-up Non-Homologous End-Joining	H3K27M : Substitution de la lysine 27 de l'histone H3 par une méthionine
BSA :Bovine Serum Albumin	H3K27me1/me2/3 : Mono/Di/Triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3
Cas : CRISPR Associated	HAT : Histone Acétyltransférase
Cas9 : CRISPR Associated protein 9	HDAC : Histone Désacétylase
CED : Convection Enhanced Delivery	HDMT : Histone Déméthylase
CENP-A : Centromere protein A	HGG : High-Grade Glioma
CMV :CytomégaloVirus humain	HIST1H3B/C : Histone cluster 1 H3 family member B/C
C-NHEJ :classique Non-Homologous End-Joining	HIST2H3A/C : Histone cluster 2 H3 family member A/C
Complexe MRN : complexe composé des protéines Mre11, Rad50 et Nbs1	HMT :Histone Méthyltransférase
CRISPR :Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats	HR : Homologous Recombination
crRNA : CRISPR RNA	InDel : Insertion/Deletion
DAXX :Death-associated protein 6	IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
DIPG :Diffuse Intrinsic Pontine Glioma	
DMG : Diffuse Midline Glioma	

JMJD3 : Jumonji domain-containing protein D3

MFI : Mean Fluorescence Intensity

MMEJ : Microhomology Mediated End Joining

MPT : Modification Post-Traductionnelle

mTOR : mechanistic Target Of Rapamycin

NHEJ : Non-Homologous End-Joining

OCR : Oxygen Consumption Rate

OLIG2 : Oligodendrocyte transcription factor 2

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAM : Protospacer-Adjacent Motif

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDGFRA : Platelet-Derived Growth Factor Receptor A

PE : Plating Efficiency

pHGG : Pediatric High-Grade Glioma

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PI3KCA1 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha

PI3KR1 : Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha

polyA : Polyadenylation

PPM1D : Protein Phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent 1D

PRC2 : Polycomb Repressive Complex 2

RNAg/sg : guide/ single guide RNA

RNAseq : RNA Sequencing

RNCE : Registre National des cancers de l'Enfant

RT-qPCR : Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction

shRNA : short hairpin RNA

siRNA : small interfering RNA

SNC : Système Nerveux Central

SPIM : Selective Plane Illumination Microscope

T2A : Thosa Asigna virus 2A

TALE : Transcription Activator-Like Effector

TALEN : Transcription Activator-Like Effector Nuclease

TGF-β : Transforming Growth Factor beta

TH-302 : Evofosfamide

TP53 : Tumor Protein 53 gene

tracrRNA : trans-activating CRISPR RNA

TRBC : Truit Red Blood Cells

TS : Taux de Survie

TSM : Tumor Stem Medium

ZFN : Zinc Finger Nucleases

Introduction

INTRODUCTION

1. Les gliomes pédiatriques

1.1. Les tumeurs cérébrales pédiatriques

Chaque année en France, plus de 2 500 enfants sont atteints d'un cancer. On estime ainsi qu'environ 1 enfant sur 440 sera atteint d'un cancer avant l'âge de 15 ans (Institut National du Cancer, Leblond *et al.*, 2010). Malgré un taux de guérison tous types et tous stades confondus de près de 80%, cette incidence fait du cancer la deuxième cause de décès chez l'enfant, après les accidents de la vie quotidienne. Les leucémies sont les cancers pédiatriques les plus fréquents (29%), devant les tumeurs du système nerveux central (SNC), qui représentent entre 20 et 25% des cancers de l'enfant, ce qui en fait la famille de tumeurs solides la plus fréquente, devant les neuroblastomes et les sarcomes des tissus mous (8% et 6,3% des cas respectivement) (Figure 1) (Hassan *et al.*, 2017 ; Registre National des cancers de l'enfant)

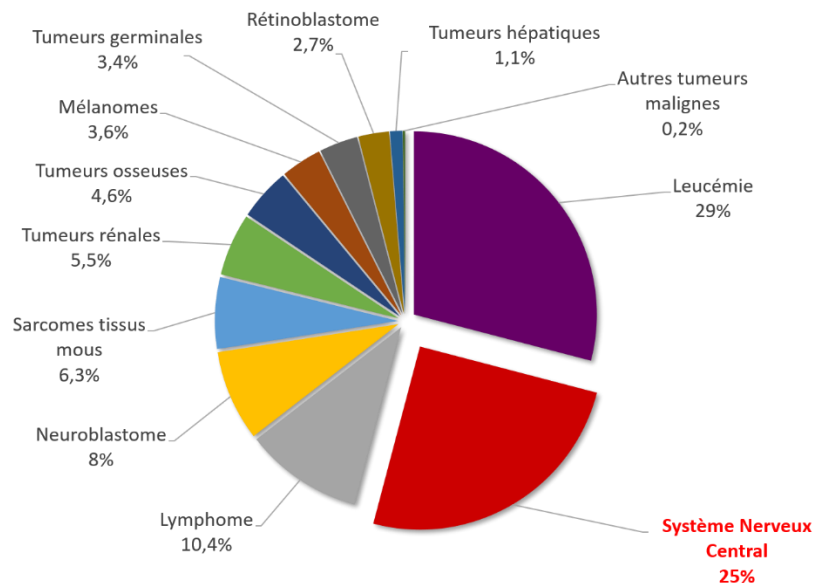


Figure 1. Répartition des cancers de l'enfant en France. Répartition selon les données histologiques issues des données enregistrées dans le Registre national des cancers de l'enfant (RNCE) sur la période 2010 à 2014.

Les tumeurs gliales représentent environ la moitié des tumeurs cérébrales (Ostrom *et al.*, 2019). Ces tumeurs présentent des marqueurs gliaux, suggérant un développement tumoral à partir des cellules gliales elles-mêmes ou encore de leurs progéniteurs, même si l'origine de ces tumeurs reste mal définie (Ludwig et Kornblum, 2017). Dans un contexte sain, les cellules gliales jouent un rôle de soutien, de protection, d'alimentation et d'entretien des neurones. Il

INTRODUCTION

s'agit principalement des astrocytes, oligodendrocytes, cellules de Schwann, épendymocytes et autres cellules composant la microglie (Figure 2.A).

Une classification des gliomes peut ainsi se faire selon le type de cellules gliales impliquées (oligodendrocytes, astrocytes, épendymocytes). On peut ainsi diviser les gliomes en 4 groupes distincts : les tumeurs astrocytiques, les épendymomes, les tumeurs neuro-gliales mixtes et les tumeurs astrocytiques diffuses & oligodendrogliomes (Figure 2.B).

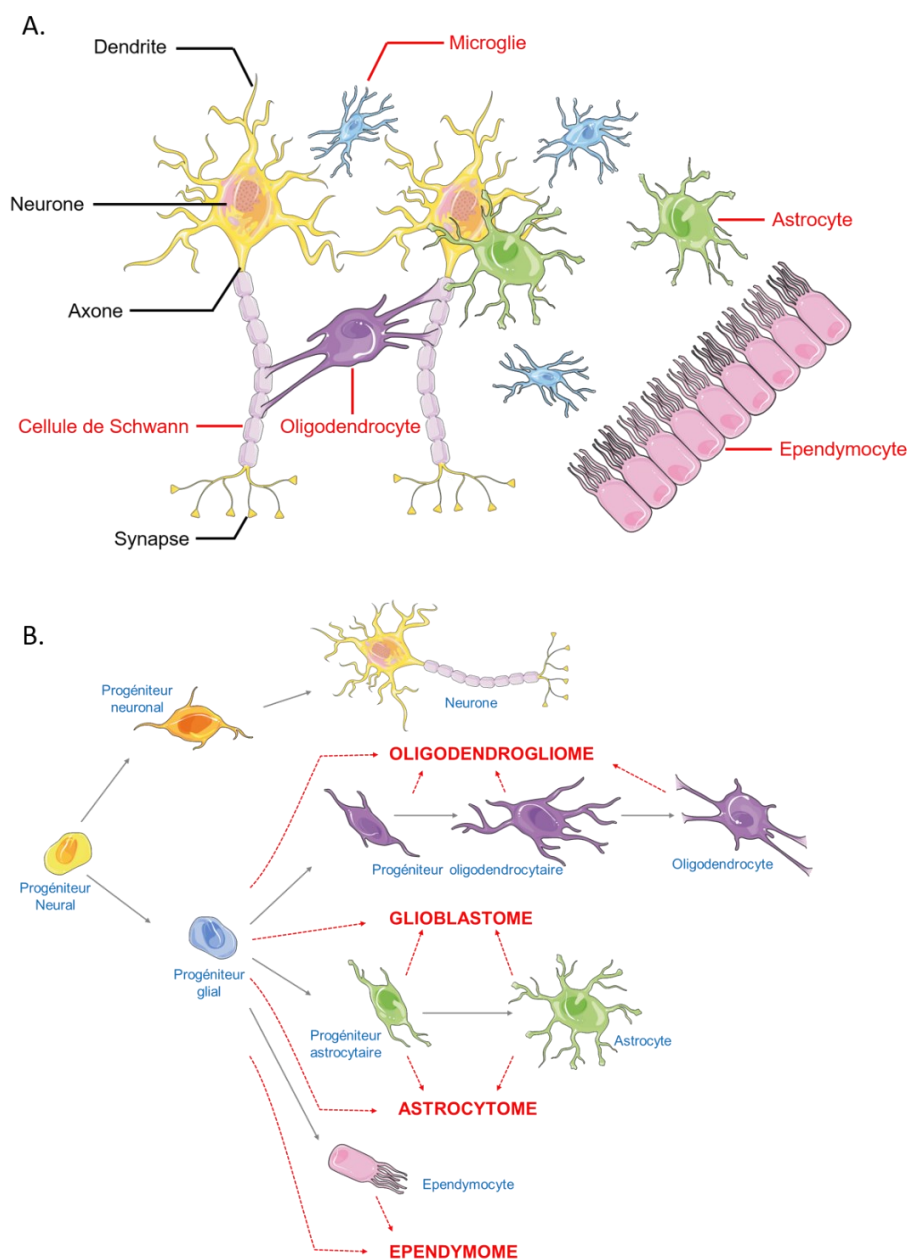


Figure 2. Dénomination des gliomes selon leur origine présumée. A. Les astrocytes, les oligodendrocytes, les épendymocytes et la microglie (composée notamment de macrophages) sont les principales cellules composant la glie. On peut également y ajouter les cellules de Schwann, bien qu'uniquelement présentes au niveau du système nerveux périphérique. B. Les tumeurs gliales, oligodendrogliomes, glioblastome et astrocytome se formeraient ainsi suite à l'apparition de mutations dans les cellules gliales ou leurs précurseurs (Adapté de Huse et Holland, 2010).

INTRODUCTION

Vient ensuite s'ajouter une sous-classification de ces tumeurs selon leur grade, défini selon des critères phénotypiques et génotypique combinés, donnant lieu aux diagnostics « intégrés » (Louis *et al.*, 2016). Les gliomes de bas grade (grade I et II) y sont considérés comme bénins tandis que les tumeurs de haut grade (grade III et IV) sont les formes malignes, les gliomes de grade IV étant plus connus sous le nom de glioblastomes (Louis *et al.*, 2016 ; Hutter *et al.*, 2017). Bien qu'une majeure partie de ces tumeurs gliales sont de bas grade (OMS grade I et II), il n'en reste pas moins que 19% des tumeurs cérébrales pédiatriques sont des gliomes de haut grade (HGG) (III et IV) et appartiennent principalement au groupe des tumeurs diffuses astrocytiques et oligodendrogliomes, incluant les astrocytomes ou oligodendrogliomes anaplasiques, les glioblastomes ou encore les gliomes diffus de la ligne médiane (Figure 3).

- ❖ Ainsi, au sein du groupe des **tumeurs astrocytiques**, l'astrocytome pilocytique est le sous type tumoral le plus fréquent, mais également le gliome pédiatrique le plus répandu. Il se trouve généralement localisé dans le cervelet ou encore dans les voies optiques, bien qu'il puisse être retrouvé ailleurs dans le système nerveux central (Sadighi et Slopis, 2013). Ces tumeurs présentent un diagnostic plutôt favorable avec un taux de survie à 5 ans supérieur à 90% lié à la possibilité de réaliser une ablation tumorale dans 90 à 95% des cas.
- ❖ **Les épendymomes** sont, après les medulloblastomes, le troisième type de tumeur solide le plus fréquent chez l'enfant. Ces sont des tumeurs issues des épendymocytes, cellules formant une membrane recouvrant le canal central de la moelle épinière ainsi que les ventricules cérébraux. Les épendymomes peuvent être de bas grade (subependymome, épendymome myxopapillaire) ou de haut grade (ependymome anaplasique : grade III) et sont retrouvés dans la fosse postérieure au niveau du cervelet.
- ❖ **Les tumeurs neuro-gliales mixtes** représentent un autre type de gliomes et sont dans la majeure partie des cas des tumeurs bénignes. C'est notamment le cas des tumeurs neuro-épithéliales dysembryoplasiques (DNET : grade I), dont le traitement est généralement constitué uniquement d'une ablation tumorale (Luzzi *et al.*, 2019). Les gangliogliomes (grade I) sont un sous-type de gliomes très rares (0,5% des tumeurs du

INTRODUCTION

SNC) et sont également, dans 80% des cas, des tumeurs de bas grade et ce même s'il existe des cas de gangliogliomes anaplasiques de grade III. Ils sont localisés dans diverses zones du cerveau, avec une fréquence plus importante au niveau du lobe temporal ou encore au niveau des hémisphères cérébraux (Dudley *et al.*, 2015).

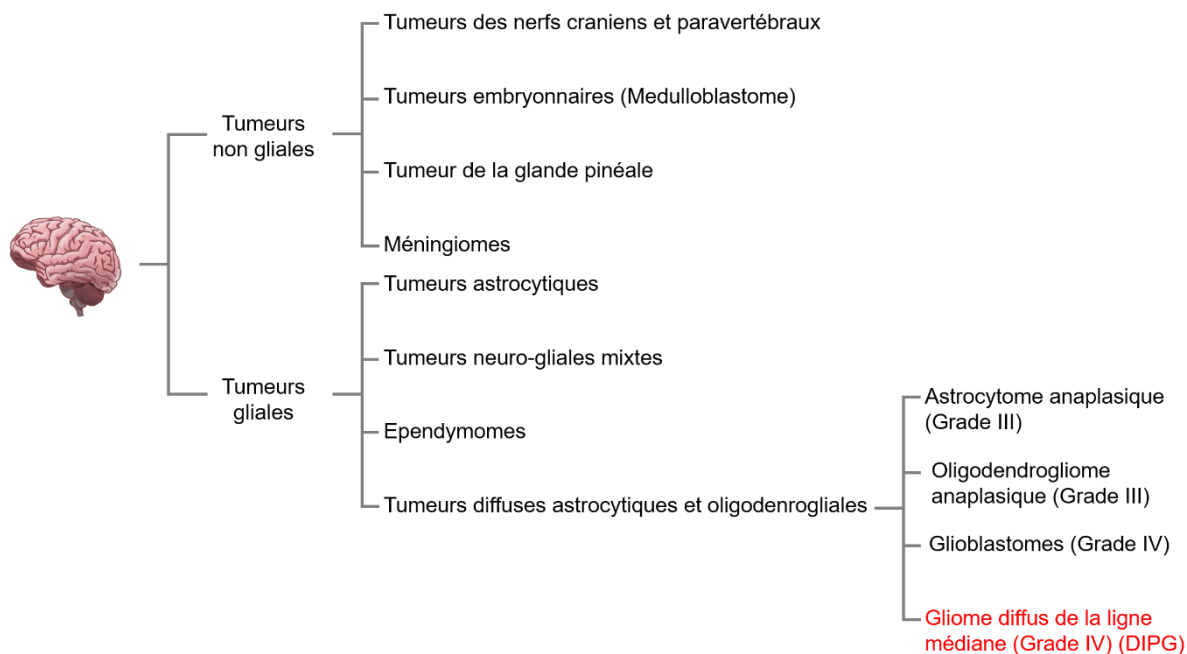


Figure 3. Dichotomie des tumeurs cérébrales de l'enfant. Les tumeurs cérébrales de l'enfant se subdivisent en 2 grands types, gliales et non gliales, selon leur origine. Parmi les tumeurs non gliales, on notera que les tumeurs embryonnaires telles que le médulloblastome sont les plus agressives et les plus fréquentes (OMS Grade IV). Au sein des tumeurs gliales, les tumeurs astrocytiques, neuro-gliales mixtes ou encore les épendymomes sont majoritairement des gliomes de bas grades, même s'il en existe des formes plus agressives. Les tumeurs diffuses de types astrocytique ou oligodendrogiale sont quant à elles principalement des gliomes de haut grade. Les DIPG sont un sous-type de gliome diffus de la ligne médiane (Adapté de Hutter *et al.*, 2017 et Louis *et al.*, 2016).

Les tumeurs localisées au tronc cérébral représentent quant à elles 15% des tumeurs du système nerveux central, parmi lesquelles 80% sont des gliomes diffus de la ligne médiane (incluant les DIPG pour *Diffuse Intrinsic Pontine Glioma*) (Saratsis *et al.*, 2014). En France, leur incidence correspond à environ 50 cas par an. Les DIPG touchent principalement les jeunes enfants, avec un âge médian situé entre 6 et 7 ans. Même si le nombre de cas reste relativement faible, inscrivant les DIPG, comme bon nombre des cancers pédiatriques, au rang des maladies dites rares, les DIPG comptent parmi les tumeurs cérébrales ayant un pronostic des plus sombres, avec une survie médiane de 9 à 12 mois, un taux de mortalité à 2 ans de 90 % pour un taux de survie à 5 ans n'excédant pas 1% (Hargrave *et al.*, 2006 ; Buczkowicz *et al.*, 2014).

INTRODUCTION

1.2. Les gliomes infiltrants localisés au tronc cérébral

1.2.1. Symptômes et diagnostics des DIPG

Les symptômes évocateurs des DIPG sont notamment une paralysie des nerfs crâniens 6 et 7, nerfs qui contrôlent les muscles de l'œil ou encore ceux du visage. Cela se traduit par une double vision (diplopie), un strabisme, des difficultés à mâcher et/ou avaler ou encore des difficultés à fermer les paupières. Ces tumeurs engendrent également une altération des voies longues (faiblesse dans les jambes et dans les bras), une ataxie ou encore un syndrome pyramidal (perte de contrôle de mouvement, perte de réflexes...) (Robison et Kieran, 2014 ; Lassiter *et al.*, 1971 ; Warren, 2012). Les DIPG présentent une symptomatologie à évolution rapide, caractéristique conduisant généralement à un diagnostic dans les 3 mois suivant les premiers signes cliniques (Cohen *et al.*, 2017). De plus, le développement rapide de la tumeur provoque de façon précoce un blocage de l'écoulement du fluide cérébro-spinal, augmentant la pression dans la cavité crânienne et provoquant des maux de têtes ainsi que des vomissements. Le diagnostic des DIPG se fait essentiellement par IRM, par observation d'une masse tumorale diffuse au niveau du tronc cérébral (supérieure à 50% du tronc) (Robison et Kieran, 2014 ; Hargrave *et al.*, 2006)(Figure 4).



Figure 4. Imagerie d'un gliome diffus de la ligne médiane. IRM cérébrale en coupe sagittale T2 montrant une lésion caractéristique d'un gliome infiltrant de la ligne médiane d'une petite fille de 8 ans.

Du fait de leur localisation, les biopsies sur les patients atteints de DIPG ne sont systématiques que depuis peu. En ce sens, en 2007 encore, l'équipe de Schumacher décrivait que le diagnostic des DIPG pouvait se faire sur la seule base de critères précis d'imagerie et d'une symptomatologie caractéristique (Schumacher *et al.*, 2007). Les prélèvements destinés à la recherche étaient alors principalement obtenus par autopsie, rendant l'accès aux échantillons

INTRODUCTION

encore plus rare, et limitant sévèrement la compréhension des DIPG, qui plus est sur des échantillons ayant reçu différents traitements.

Fort heureusement, la pratique d'une biopsie stéréotaxique au diagnostic s'est largement répandue durant la dernière décennie, et ce pour plusieurs raisons. D'une part, la réalisation de biopsies permet de confirmer le diagnostic par immunohistochimie, mais également d'obtenir des informations sur les altérations géniques présentes (mutations, remaniements chromosomiques...) et ainsi de proposer une thérapie adaptée. C'est en ce sens que l'essai clinique BIOMEDE (*Biological Medicine for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Eradication*) mené par l'Institut Gustave Roussy de Paris, a vu le jour en 2014. Cet essai clinique international (250 patients d'Europe et d'Australie) vise à séquencer le génome des cellules cancéreuses prélevées lors des biopsies dans le but de proposer aux patients, une thérapie ciblée appropriée. D'autre part, ces biopsies permettent d'obtenir des échantillons autorisant le développement de modèles d'études *in vitro* et *in vivo* amenant à une meilleure compréhension des DIPG. Mais surtout, plusieurs études ont montré que la réalisation d'une biopsie stéréotaxique dans cette région présentait un rapport bénéfice/risque favorable du fait d'une faible morbidité transitoire (Samadani et Judy, 2003; Hamisch *et al.*, 2017). Ainsi, l'étude de Puget *et al.*, publiée en 2015 montre que sur 130 biopsies, 3,9% des cas présentaient une morbidité transitoire, se traduisant par une aggravation de l'ataxie préexistante (2 patients), une ataxie et paralysie des nerfs crâniens 6 et/ou 7 (3 patients) (Puget *et al.*, 2015).

Il n'en demeure pas moins une rareté des échantillons biologiques disponibles, facteur souvent limitant quant à la caractérisation moléculaire des gliomes de haut grade pédiatriques (pHGG), présentant, qui plus est, des profils biologiques et histologiques très différents de ceux de l'adulte. De fait, l'extrapolation des données obtenues chez l'adulte est extrêmement limitée (Schroeder *et al.*, 2014 ; Jones *et al.*, 2012).

1.2.2. Stratégies de traitement des DIPG

La localisation des DIPG dans une zone du cerveau aussi peu accessible et critique et leur caractère diffus rendent l'exérèse chirurgicale complète de ces tumeurs impossible. Le traitement standard des DIPG est ainsi une radiothérapie focale, associée ou non à une administration concomitante de témozolomide ou autre chimiothérapie. Celle-ci se déroule

INTRODUCTION

en 30-33 séances journalières de 1,8 Gy pour un total de 54 à 59,4Gy (Cohen *et al.*, 2017, El-Khouly *et al.*, 2019).

Diverses équipes ont néanmoins tenté plusieurs protocoles, tels que l'hyper-fractionnement (75,6Gy en 60 fractions) ou l'hypo-fractionnement (39Gy en 13 fractions ou encore 45Gy en 15 fractions) sans cependant apporter de bénéfice en termes de survie globale (Freeman *et al.*, 1993; Zaghoul *et al.*, 2014). Il semblerait toutefois, selon l'étude considérée, que l'hypo-fractionnement, bien que n'apportant pas de progrès en termes de survie globale, soit un protocole plus adapté pour les enfants, leurs familles et le centre de soins étant donné la durée du traitement plus courte, les contraintes moins importantes et l'absence d'effets secondaires immédiats ou tardifs supplémentaires. Diverses tentatives d'utilisation de traitements adjuvants radio-sensibilisants ont vu le jour, mais n'ont pas apporté, elles non plus, de gain en termes de survie globale.

1.2.3. Résistance aux traitements des DIPG et innovations thérapeutiques

1.2.3.1. Résistance des DIPG aux agents de chimiothérapie

Depuis plus de 40 ans, aucun progrès en termes de survie globale n'a été réalisé pour le traitement des DIPG. La radiothérapie n'apporte qu'un bénéfice transitoire, allongeant la survie de quelques mois, et bien que de nombreux essais cliniques aient été menés durant ces dernières années, aucune thérapie médicamenteuse (petites molécules, thérapies ciblées, chimiothérapies radio-sensibilisantes...) n'a apporté de gain supplémentaire quant à la survie des patients atteints de DIPG. Les principaux essais cliniques menés sur les DIPG sont référencés ci-après (Tableau 1).

Thérapie (Nature/Cible)	Résultat de l'étude		Référence
	Médiane de survie	Survie (Globale/à 1an/à 2ans)	
PCV : Prednisone/Lomustine/Vincristine (Corticostéroïde/agent alkylant/alcaloïde)		5 ans : 20% mais d'important risques d'infections	Jenkin <i>et al.</i> , 1987
	11 mois + Toxicité trop importante		Jakacki <i>et al.</i> , 1999
B-interferon (Glycoprotéine recombinante)	9 mois		Packer <i>et al.</i> , 1996

INTRODUCTION

Carboplatine (Sel de platine)		Survie globale : 12 mois	Allen <i>et al.</i> , 1999
CEV : Carboplatine Etoposide, Vincristine (Sel de platine/ inhibiteur topoisomérase II/ alcaloïde)		Survie sans évènement 1 an : 17% ± 5% 2 ans : 6% ± 3%	Jennings <i>et al.</i> , 2002
CEVC : Cisplatine, Etoposide, Vincristine, Cyclophosphamide (Sel de platine/ inhibiteur topoisomérase II/ alcaloïde/ agent alkylant)			
Tamoxifène (Anticœstrogènes)	10,3 mois	1an : 37% ± 9,5%	Broniscer <i>et al.</i> , 2000
	6,32 mois	1an : 16,1% ± 12%	Michalski <i>et al.</i> , 2010
Topotecan (Inhibiteur topoisomérase I)	15 mois (9,6 – 19 mois)	1an : 53%	Sanghavi <i>et al.</i> , 2003
	8,3mois	1 an : 25,5% ± 8%	Bernier-Chastagner <i>et al.</i> , 2005
Carboplatine + RMP-7 (Sel de platine / agoniste récepteur bradykinine B2)	10,8 mois	1an ≈ 45%	Packer <i>et al.</i> , 2005
Témozolomide (Agent alkylant)	12 mois	1an : 48% ± 8%	Broniscer <i>et al.</i> , 2005
	12,7 mois		Chiang <i>et al.</i> , 2010
	9,5 mois	1 an : 35% ± 14% 2 ans : 17% ± 10%	Bailey <i>et al.</i> , 2013
Imatinib (inhibiteur PDGFRA)		1 an ≈ 40.8% ± 9,5%	Pollack <i>et al.</i> , 2007
Ara-C/ Actinomycine D/ Cisplatine/ Etoposide/ Ifosfamide (Antimétabolite/antibiotique/ sel de platine/inhibiteur topoisomérase II/agent alkylant)	12 mois	1 an : 45% ± 6% 2ans : 18% ± 5%	Massimino <i>et al.</i> , 2008
Cisplatine/Etoposide/isotretinoïne (Sel de platine / inhibiteur topoisomérase II / dérivé de la vitamine A)	9 mois	1 an : 29% ± 11% 2ans : 12% ± 8%	
Vinorelbine (Vinca-alcaloïdes, bloque la mitose en G2/M)	9 mois	1 an : 43% ± 13% 2ans : 21% ± 11%	
Vandetanib (Inhibiteur EGFR/VEGFR)	12 mois	1 an : 37.5% ± 10.5% 2ans : 21.4% ± 11%,	Broniscer <i>et al.</i> , 2010
Gefitinib (Inhibiteur EGFR)	12 mois	1 an : 56.4% ± 7.6% 2 ans : 19,4% ± 5,9%	Pollack <i>et al.</i> , 2011
Erlotinib (Inhibiteur EGFR)	12 mois	6 mois - 90%	Geoerger <i>et al.</i> , 2011
Tipifarnib (Inhibiteur de la farnésyl transférase)	8,3 mois	SG à 1 an : 34,3% ± 7,4%	Haas-Kogan <i>et al.</i> , 2011

INTRODUCTION

Acide Valproïque (Inhibiteur HDAC)	13,5 mois (nombre de patient trop faible)		Felix <i>et al.</i> , 2014
Bevacizumab (Inhibiteur VEGF)	8,8 mois		Salloum <i>et al.</i> , 2015

Tableau 1. Principaux essais cliniques réalisés sur les gliomes pédiatriques de la ligne médiane entre 1987 et 2015. MS : Médiane de survie. SG : Survie globale. SSP : Survie sans progression.

1.2.3.2. Les innovations thérapeutiques

Néanmoins, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont sans cesse à l'étude, notamment issues des nouvelles découvertes liées aux bouleversements épigénétiques inhérents aux DIPG. C'est en ce sens que l'effet du GSK-J4 a été évalué. Cette molécule cible en effet la déméthylase JMJD3 qui est responsable de la déméthylation de la lysine 27 de l'histone H3. L'idée portée par l'utilisation de cette épidroque est de contrebalancer l'effet de la mutation H3K27M (chapitre 2.2 ci-après). Toutefois, bien que des résultats prometteurs étaient avancés *in vitro* (Hashizume *et al.*, 2014), il semblerait que cette drogue présente quelques limitations quant à son utilisation *in vivo* où elle serait rapidement métabolisée en GSK-J1, présentant une perméabilité cellulaire limitée (Katagi *et al.*, 2019). Une autre épidroque est actuellement en cours de développement, le panobinostat. Ce composé est un inhibiteur d'histone désacétylase qui a été mis en évidence lors d'un criblage de molécules pharmacologiques mené par l'équipe de Monje en 2015 (Grasso *et al.*, 2015). Une étude récente a mis en évidence que l'efficacité du panobinostat pouvait même être améliorée par une combinaison avec le marizomib, un inhibiteur du protéasome (Lin *et al.*, 2019).

Divers mécanismes peuvent expliquer cette résistance des cellules de DIPG et notamment la barrière hémato-encéphalique. Cette barrière physiologique, séparant le système nerveux central de la circulation sanguine, a pour vocation de prévenir des variations de concentration en hormones ou autres neurotransmetteurs mais surtout de protéger le SNC des micro-organismes pathogènes ainsi que des substances toxiques. Substances « toxiques » au rang desquelles figurent bon nombre d'agents de chimiothérapie. D'ailleurs, l'équipe de Hulleman en 2013 montrait que des cultures primaires de cellules de DIPG exprimaient certes des pompes d'efflux, leur conférant une résistance intrinsèque aux agents de chimiothérapie, mais que la présence de pompes d'efflux au niveau des cellules de la barrière hémato-encéphaliques pouvait accroître cette résistance (Veringa *et al.*, 2013). Afin d'outrepasser cette barrière physiologique, plusieurs stratégies d'administration d'agent de chimiothérapie

INTRODUCTION

ont été imaginées. Parmi elles la CED (Convection Enhanced Delivery), actuellement en cours de développement, est une technique permettant d'administrer l'agent de chimiothérapie directement à l'endroit de la tumeur, par l'intermédiaire d'un cathéter dans lequel une pression hydraulique constante est appliquée afin d'homogénéiser la distribution. Un premier essai d'administration du topotecan par CED à des patients n'apportait pas de bénéfice particulier en termes de réponse et de survie. Toutefois, compte-tenu du trop faible nombre de patients (n=2) et du manque de recul quant à la pression adéquate, les auteurs appelaient à parfaire cette technique (Anderson *et al.*, 2013). Des essais cliniques utilisant la CED sont actuellement en cours, comme l'essai clinique utilisant des nanoparticules de panobinostat MTX110 (NCT03566199). Une autre stratégie d'administration, plus récente et actuellement en cours de développement, consiste à appliquer des pulses d'ultrasons afin d'ouvrir les jonctions serrées des cellules composant la barrière hémato-encéphalique et ainsi rendre possible le passage des agents de chimiothérapie (Beccaria *et al.*, 2020). En 2019, l'équipe d'Idbaih montrait l'efficacité de cette technique dans un modèle murin d'administration du carboplatine sous ultrasons (Drean *et al.*, 2019).

Ces éléments ont fait l'objet d'une revue acceptée pour publication dans le journal Médecine/Sciences (Annexe 1)

Au-delà de ces innovations thérapeutiques, et compte tenu du fait que les tumeurs gliales sont des tumeurs présentant des zones hypoxiques, des molécules présentant une activité accrue à de faible concentration en di-oxygène sont en cours d'évaluation. En effet, alors que la concentration physiologique en oxygène dans le cerveau varie entre 0,5% et 7%, les gliomes de haut grade présentent une concentration réduite en oxygène (< 2,5%), avec des zones extrêmement hypoxiques ($\approx 0,1\%$) (Filatova *et al.*, 2013). Or, l'hypoxie peut jouer un rôle dans la résistance aux traitements des gliomes, en réduisant notamment le nombre de dommages à l'ADN réalisés lors de la radiothérapie, en diminuant le potentiel apoptotique des cellules ou en leur conférant une résistance aux chimiothérapies cytotoxiques (Cavazos et Brenner, 2016).

C'est pourquoi, des stratégies visant à utiliser des pro-drogues activées en conditions hypoxiques ont été développées. Ces composées, peu toxiques dans des tissus oxygénés, ont été conçus pour qu'ils se transforment en un composé plus cytotoxique en condition hypoxiques (Yeh et Kim, 2015). L'évofosfamide (Evo ou TH-302) est l'une de ces molécules développées dans cette optique (Figure 5). Sa toxicité est d'ailleurs maximale dans des

INTRODUCTION

conditions d'hypoxie extrême. Le TH-302 possède l'avantage supplémentaire d'être cytotoxique par diffusion dans les cellules adjacentes, appartenant à des zones moins hypoxiques (Meng *et al.*, 2012). Le TH-302 a d'ores et déjà prouvé son efficacité *in vitro* et *in vivo* dans d'autres types de cancers, et a ainsi fait l'objet d'essais cliniques de phases I et II en combinaison avec la doxorubicine atteints chez des patients atteints de sarcomes (Sun *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Ganjoo *et al.*, 2011; Chawla *et al.*, 2014). Un essai clinique de phase III dans ces tumeurs est actuellement en cours (NCT01440088).

L'hypoxie étant présente au sein des gliomes de haut grade incluant les DIPG, j'ai ainsi, au cours de ma thèse, conduit une évaluation *in vitro* du potentiel du TH-302 sur des lignées cellulaires de pHGG et de DIPG (article en annexe 2).

2. Contexte épigénétique des DIPG

2.1. La chromatine et les régulations épigénétiques

2.1.1. Modifications post-traductionnelles et compaction de la chromatine en condition physiologique

L'ADN humain est composé de 6 milliards de paires de bases, compactées dans 23 paires de chromosomes, dans une sphère de 5 μm de diamètre qu'est le noyau. Afin de tenir dans un espace aussi petit, l'ADN va subir différents niveaux de compaction (Figure 5). Dans un premier temps, l'ADN s'enroule autour d'une structure particulière, le nucléosome, qui constitue l'unité de base structurelle de la chromatine. Un nucléosome est un octamère protéique composé de protéines, les histones, et autour duquel s'enroule 146 paires de base d'ADN sur 1,65 tour, compactant l'ADN d'un facteur 6 (McGhee et Felsenfeld, 1980). Chaque nucléosome contient deux fois les histones H2A, H2B, H3 et H4, pour une masse totale de 205kDa.

La chromatine ainsi formée (ADN + protéines) peut se trouver sous deux formes, une forme condensée et une forme non condensée. Le niveau de compaction de la chromatine est un phénomène dynamique, régulé par les modifications apportées aux queues des histones constituant le nucléosome. En effet, les queues N-terminales des histones se trouvent à l'extérieur du nucléosome et sont accessibles aux protéines qui vont pouvoir les modifier. Ces modifications post-traductionnelles (MPT) des histones vont provoquer une compaction ou une décompaction de la chromatine, donnant ou non à la machinerie transcriptionnelle un

INTRODUCTION

Histone	Marques épigénétiques	Activateur / Répresseur
Histone H2A	K5 ac K9 ac K13 ac S1 p	Activateur
	S121 p K119 ub	Répresseur
Histone H2B	K5 ac K12 ac K15 ac K20 ac S14 p K120 ub	Activateur
Histone H3	K4 ac K36 ac K9 me1/2/3 K27 me2/3	Répresseur
	K9 ac K14 ac K27 ac K115 ac K4 me1/2/3 R17 me1/2/3 K27 me1 K36 me1/2/3 K79 me1/2/3 T3 p S10 p S28 p	Activateur
Histone H4	K20 me1/2/3	Répresseur
	K5 ac K8 ac K13 ac K16 ac R3 me1/2/3	Activateur

Tableau 2. Liste des principales modifications d'histones et leur effet activateur ou répresseur sur la transcription. K. Lysine ; R. Arginine ; S. Sérine ; T. Tyrosine ; ac. Acétylation ; me. Méthylation ; p. phosphorylation ; ub. Ubiquitinylation. (Extrait de Sawan et Herceg, 2010; Berger, 2007 ; Kouzarides, 2007 , Duchatel *et al.*, 2019)

INTRODUCTION

	<i>Writers</i>	<i>Erasers</i>	<i>Readers</i>
Acétylation	Histone acétyltransférase (HAT)	Histone désacétylase (HDAC)	Bromodomaines
Méthylation	Histone méthyltransférase (HMT)	Histone déméthylase (HDMT)	Chromodomaines Domaines Tudor Domaine PHD finger Domaines MBT Domaines PWWP
Phosphorylation	Kinase	Phosphatase	Domaine BRCT Domaines SH2 Domaine BIR
Ubiquitynylation	Ubiquitine ligase	Désubiquitynylases	Domaine UBD (Ubiquitin binding domaine)

Tableau 3. Liste non exhaustive des enzymes et domaines de reconnaissance en lien avec les différentes marques épigénétiques histones. Chaque modification post-traductionnelle des histones possède son propre type de *writers*, *readers* et *erasers*. PHD finger, plant homeodomain zinc finger; MBT, malignant brain tumor; PWWP, proline-tryptophane-tryptophane-proline; BRCT, BRCA1 C Terminal; SH2, Src homologie 2; BIR, Baculovirus IAP repeats.

2.1.2. Variants de l'histone H3, localisation et fonction

Pour chaque famille d'histone, il existe un certain nombre de variants, que l'on définit par une protéine se substituant aux histones principales (que sont H3, H4, H2A et H2B), bien que l'histone H4 n'en possède qu'un seul. Ainsi, la famille d'histone H3 possède 5 variants classés en 3 groupes. Le premier groupe est constitué des variants H3.1 et H3.2, le second regroupe les variants H3.3 et CENP-A, et le troisième groupe contient uniquement le variant H3t. Ce dernier est retrouvé uniquement dans les tissus testiculaires (Szenker *et al.*, 2011). Bien que le variant CENP-A possède une séquence protéique extrêmement différente des autres, le variant H3.3, lui, ne diffère du variant H3.2 et H3.1 que par 4 et 5 acides-aminés respectivement (Figure 6.A). Il semblerait d'ailleurs que ces différences changent les modalités d'incorporation des variants décrites ci-dessous.

- ❖ Le premier groupe est le groupe des **variants « répliatifs »** ou **variants canoniques**, groupe le plus représenté dans le génome, composés des variants H3.1 et H3.2. Ces variants sont codés par 10 et 3 gènes respectivement et ces gènes présentent la

INTRODUCTION

particularité de ne pas posséder d'intron et d'être regroupés en tandem ou en cluster sur un même chromosome. Leur ARNm présente également des particularités, comme un motif en tige-boucle remplaçant la queue polyA ainsi qu'une séquence riche en purine. Sa traduction est finement régulée par la liaison de la protéine SLBP (*Stem-loop binding protein*) et du petit ARN nucléaire U7 snRNP respectivement sur ces domaines (Marzluff *et al.*, 2002; Maze *et al.*, 2014). Cette structure permet une production massive de ces protéines au début de la phase S du cycle cellulaire et leur incorporation directement à la chromatine lors de leur synthèse en phase S. Il a également été montré qu'elles sont incorporées dans le cadre de dommage à l'ADN (Wu et Bonner, 1981; Polo *et al.*, 2006; Szenker *et al.*, 2011). Les variants H3.1 et H3.2 sont retrouvés dans l'ensemble du génome (Figure 6.B).

- ❖ Le second groupe contient ainsi les **variants « de remplacement »** que sont H3.3 et CENP-A. Les variants de ce groupe sont codés par des gènes indépendants composés d'introns et d'exons. Alors que le variant H3.3 est codé par 2 gènes distincts : les gènes *H3F3A* et *H3F3B*, le variant CENP-A n'est codé que par un seul gène : *CENPA*. Les gènes *H3F3A* et *H3F3B* codent pour la même protéine et ne diffèrent qu'au niveau des séquences non traduites. L'ARNm de ces gènes est épissé et possède une queue polyA, contrairement à ceux des variants H3.1 et H3.2. La synthèse protéique du variant H3.3 ainsi que son incorporation ont lieu de manière indépendante de la synthèse d'ADN et permet de reformer les nucléosomes suite au passage de la machinerie transcriptionnelle (Wu *et al.*, 1982; Osley, 1991; Szenker *et al.*, 2011) (Figure 6.B). Si CENP-A est retrouvé uniquement au niveau des centromères et est produit en phase G2 du cycle cellulaire, H3.3 est quant à lui retrouvé dans les nucléosomes des gènes actifs de l'euchromatine ainsi que dans les régions télomériques et péri-centromériques.

INTRODUCTION

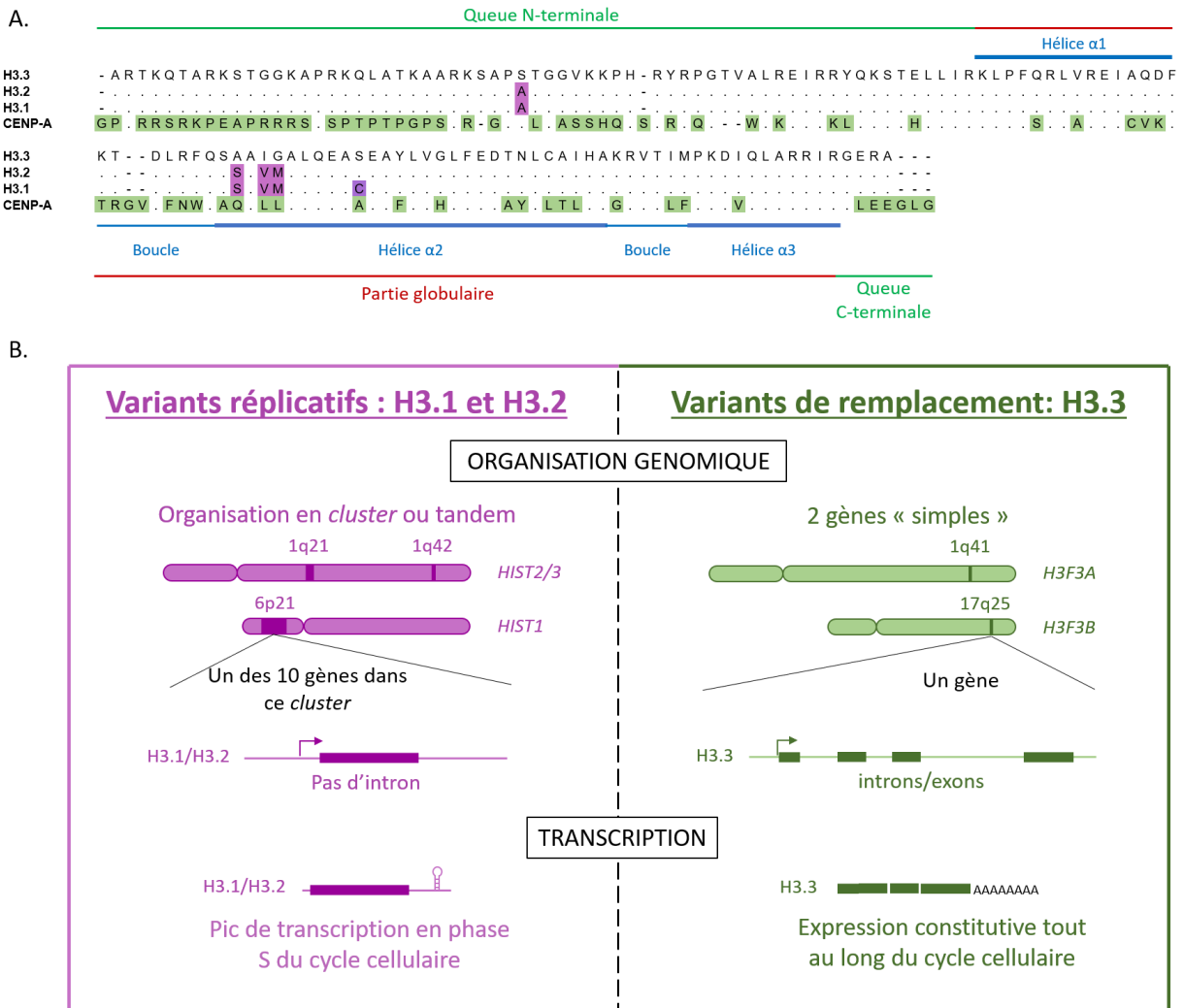


Figure 6. Différences structurales et transcriptionnelles des variants de l'histone H3. L'histone H3 possède 4 principaux variants : CENP-A, H3.1, H3.2 et H3.3. **A.** Alignement des séquences protéiques des différents variants d'histone H3. Les variations d'acides aminés par rapport au variant H3.3 sont surlignées (en violet pour les variants répliatifs et en vert pour les variants de remplacement). L'histone H3 est composée d'une queue N-terminale, d'une partie globulaire décomposée en motifs hélice-boucle-hélice et d'une queue C-terminale. **B.** Le variant d'histone H3.3 est codé par 2 gènes « simples » composé d'introns et d'exons, transcrits puis épissés en ARNm dotés d'une queue polyA. Les variants H3.1 et H3.2 sont codés par 10 et 3 gènes respectivement, regroupés en *clusters*. Un des gènes codant pour le variant H3.1 est retrouvé dans le cluster situé sur le chromosome 6. Ces *clusters* ne comportent pas d'introns et l'ARNm présente la particularité d'avoir à son extrémité un motif tige-boucle (Adapté de Szenker *et al.*, 2011)

Les protéines de la famille H3 sont incorporées à la chromatine grâce à des protéines chaperonnes. Chaque groupe et/ou variant possède des complexes de protéines chaperonnes qui leur sont propres (Figure 7). Ainsi, les variants H3.1 et H3.2 sont incorporés en même temps que la synthèse d'ADN à l'aide du complexe protéique CAF-1, composé des sous unités p150, p60 et p48. Le variant H3.3 est quant à lui incorporé au niveau des régions codantes transcrites et au niveau des promoteurs à l'aide du complexe protéique HIRA, composé des

INTRODUCTION

protéines HIRA, CABIN1 et UBN (Szenker *et al.*, 2011). Dans les régions télomériques et péricentriques, le variant H3.3 est incorporé grâce au couplage de la protéine DAXX et ATRX. Enfin, le variant CENP-A, retrouvé au niveau des centromères, est incorporé *via* le complexe HJURP (Figure 7).

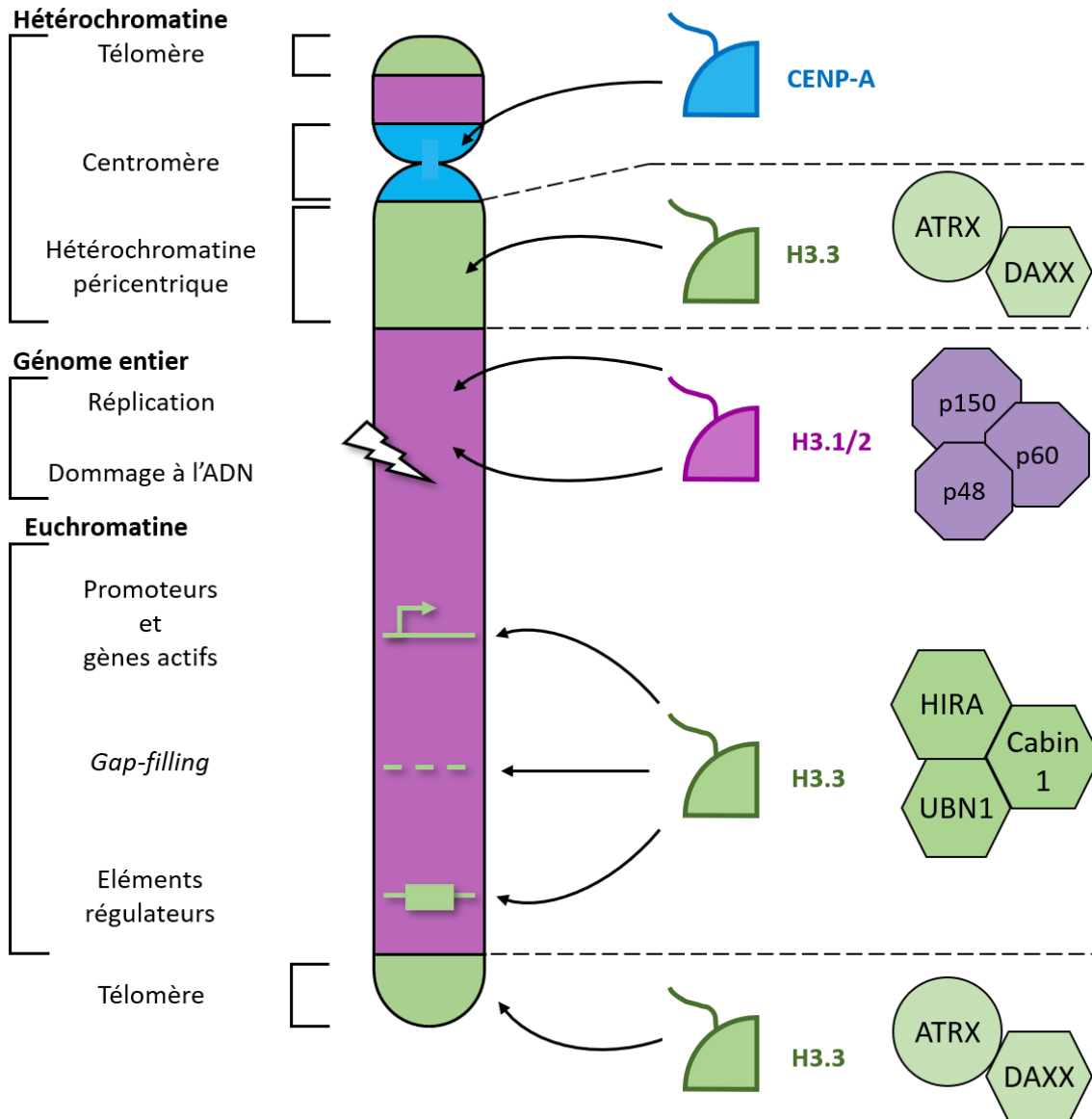


Figure 7. Répartition des différents variants d'histones et leurs chaperonnes. Le recrutement des histones se fait par des protéines chaperonnes et varie selon la localisation sur le chromosome. Le variant H3.3 est, par exemple, incorporé par le complexe HIRA au niveau des promoteurs de gènes actifs. Ainsi, le variant H3.3 est incorporé dans des zones d'euchromatine contenant les promoteurs et les gènes actifs, les zones de *gap-filling* ou encore les éléments régulateurs. On le retrouve également dans des zones d'hétérochromatine telles que les télomères ou les zones péricentriques. Les variants H3.1 et H3.2 sont quant à eux retrouvés principalement dans des zones d'hétérochromatine contenant les gènes inexprimés et sont incorporés durant la phase de réplication et dans le cadre de dommages à l'ADN. Le variant CENP-A est retrouvé quant à lui uniquement au niveau des centromères (Adapté de Filipescu *et al.*, 2013)

INTRODUCTION

2.2. Les mutations H3K27M dans les DIPG

2.2.1. Effet de la mutation sur le remodelage de la chromatine

L'avènement récent des techniques de séquençage à haut-débit et la généralisation des prélèvements biopsiques au diagnostic ont permis de mettre au jour un certain nombre de caractéristiques moléculaires des DIPG. Notamment, une mutation mono-allélique de l'histone H3 sur sa lysine 27, conduisant à son remplacement par une méthionine et ainsi dite H3K27M, a été mise en évidence. (Schwartzentruber *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Il est maintenant avéré que 80% des DIPG sont porteurs d'une mutation H3K27M. Ces mutations K27M sont retrouvées dans deux des dix gènes codant pour le variant d'histone H3.1 : *HIST1H3B* et *HIST1H3C* ainsi que dans le gène *H3F3A* codant pour le variant d'histone H3.3. Bien que beaucoup plus rares, des cas de mutations sur les gènes *HIST2H3A* et *HIST2H3C*, codant pour le variant d'histone H3.2 ont également pu être identifiés (<1%). (Castel *et al.*, 2015). De plus, les tumeurs présentant une mutation H3K27M se situent majoritairement au niveau de la ligne médiane, ce qui inclut le tronc, le thalamus et la moelle épinière (Lulla *et al.*, 2016).

De ce fait, en 2016, l'OMS a procédé à une reclassification des HGG en définissant une nouvelle entité : les DMG (*Diffuse Midline Glioma*) muté H3K27M (Louis *et al.*, 2016). Cette mutation est également retrouvée dans certains gliomes de la ligne médiane chez l'adulte, bien que beaucoup plus rare encore, ce qui en fait un événement moléculaire surtout caractéristique de la pédiatrie (Schreck *et al.*, 2019 ; Reyes-Botero *et al.*, 2014). Cette mutation, contrairement à la mutation H3G34R/V présentée ci-après, n'est quasiment retrouvée que dans les tumeurs de la ligne médiane (thalamique, cortex et tronc cérébral).

En condition physiologique, la lysine 27 de l'histone H3 peut être soit acétylée, soit méthylée, et l'apposition de la di et triméthylation est réalisée par le *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2) et plus précisément par l'enzyme « *writer* » EZH2. Cette marque sera ensuite lue par le complexe PRC1 qui va permettre d'apposer d'autres marques épigénétiques, aboutissant à une répression de l'expression du gène cible. Dans le contexte pathologique, la forme mutée H3K27M suit une distribution similaire au variant H3 sauvage (Nagaraja *et al.*, 2019) et représente seulement 3--17% des histones H3 totales au niveau de la chromatine (Lewis *et al.*, 2013). D'un point de vue mécanistique, le changement de lysine en méthionine en position 27

INTRODUCTION

engendre une perte globale de la marque H3K27me3 liée à la mutation. Cette perte de H3K27me3 entraîne une décompaction de l'ADN, permettant l'accès à la machinerie transcriptomique (Figure 8). Bender *et al.*, en 2013, montraient que la mutation H3K27M, bien que mono-allélique, avait ainsi un effet dominant négatif en ayant recours à un recrutement aberrant de PRC2 (Bender *et al.*, 2013).

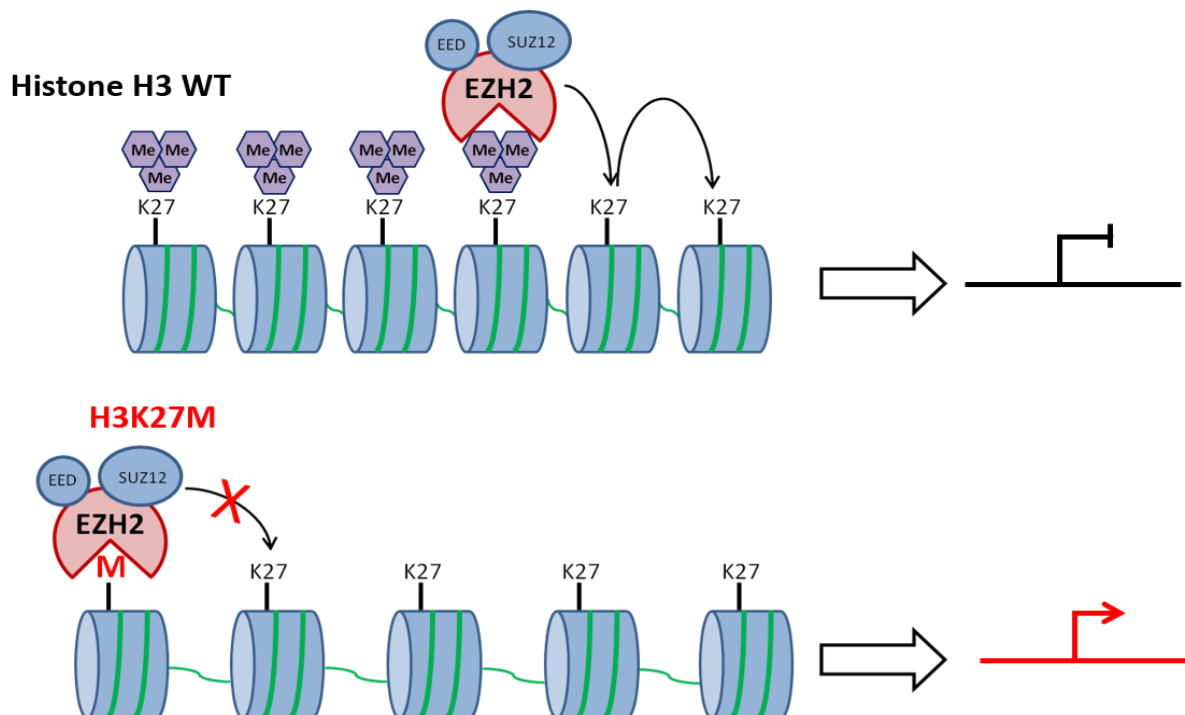


Figure 8. Impact de la mutation H3K27M sur l'expression génique. En l'absence de mutation, la méthyltransférase EZH2, appartenant avec EED et SUZ12 au complexe PRC2, permet la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3, favorisant ainsi une compaction de l'ADN et donc une répression de l'expression des gènes dans la région considérée. Dans le cas des mutations H3K27M, EZH2 est recrutée au niveau de la méthionine 27, provoquant une perte d'efficacité de son site catalytique, empêchant ainsi la triméthylation des histones H3 sauvages sur leurs lysines 27. Cela conduit ainsi à un relâchement de la chromatine et donc à une activation de l'expression des gènes.

Plus tard, l'équipe de Reinberg, en 2018, venait compléter ce propos. En effet, cette équipe montrait que la présence de la mutation menait bel et bien à un recrutement de PRC2 au niveau des zones géniques contenant la mutation, mais que ce recrutement était uniquement transitoire contrairement à l'hypothèse initiale d'une séquestration pérenne (Stafford *et al.*, 2018). La chaîne latérale de la méthionine 27 se fixerait ainsi dans le site actif du domaine SET d'EZH2 avec 16 fois plus d'affinité que le résidu lysine 27 sauvage (Justin *et al.*, 2016). L'étude de Stafford montrait donc que la perte de triméthylation de la lysine 27 WT n'était pas due à une séquestration du complexe PRC2 mais à une baisse d'efficacité de celui-ci. La mutation provoquerait un changement allostérique du complexe PRC2, aboutissant à son inefficacité.

INTRODUCTION

Ainsi, EZH2 serait transitoirement séquestré par le variant muté H3.3K27M et cette interaction diminuerait durablement l'activité du complexe PRC2 (Stafford *et al.*, 2018)

Les auteurs constataient également que les sites qui gardaient un niveau basal d'H3K27me3 présentaient même une augmentation de cette marque (Stafford *et al.*, 2018). En 2013, l'équipe de Chan a confirmé que des lignées cellulaires de tumeurs cérébrales pédiatriques porteuses de la mutation H3K27M présentaient une diminution globale du niveau de H3K27me3 par rapport à des cellules non mutées H3K27 (Chan *et al.*, 2013). Cette étude montrait également un remodelage important de l'expression génique lié à une perte de la triméthylation au niveau de plusieurs groupes de gènes, remodelage confirmé par l'étude de Buczkowicz en 2014 (Buczkowicz *et al.*, 2014). A noter également que de très rares cas de DIPG présentent une autre mutation de la lysine 27, la mutation H3K27I. Cette mutation, mise en évidence dans un échantillon tumoral par l'équipe de Castel *et al.*, est également capable de provoquer une perte de la marque H3K27me3 (Castel *et al.*, 2015 ; Lewis *et al.*, 2013)

2.2.2. Conséquences épigénétiques et géniques des mutations H3K27M

2.2.2.1. Impact sur le profil épigénétique

Nous avons vu précédemment que la présence de mutations H3K27M aboutissait à une diminution de la marque H3K27me3. Des études mettaient également en évidence une altération d'autres marques épigénétiques. En effet, la perte de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 s'accompagne également d'une diminution de la marque H3K27me2 (Lewis *et al.*, 2013; Harutyunyan *et al.*, 2019). En effet, l'étude d'Harutyunyan paru en 2019, montrait que la présence de la mutation provoquait à la fois une perte globale d'H3K27me3, mais également une diminution de la marque H3K27me2 (certes moins importante). Alors que la perte globale d'H3K27me3 laissait toutefois des marques ponctuelles en certains endroits du génome (îlots CpG), la marque H3K27me2 était, elle, toujours retrouvée sur l'ensemble du génome, mais en plus faible quantité (Harutyunyan *et al.*, 2019), ce qui confirme d'ailleurs que le complexe PRC2 ne serait pas séquestré, puisqu'également responsable de l'apposition de cette marque.

Une autre marque épigénétique est impactée par les mutations H3K27M, à savoir l'acétylation de cette lysine 27. En effet, il est maintenant clair que la présence d'une mutation H3K27M a pour conséquence une augmentation de l'acétylation de cette même lysine. Cette marque

INTRODUCTION

épigénétique, en condition physiologique, est retrouvée au niveau des promoteurs et enhancers dans des régions actives d'un point de vue transcriptomique (Creyghton *et al.*, 2010). L'équipe de Lewis *et al.* en 2013 mettait en évidence pour la première fois cette conséquence de la perte de triméthylation. Cette équipe montrait que la présence de la mutation dans des échantillons de patients atteints de DIPG induisait bien une perte de triméthylation de la lysine 27 mais également une augmentation de la marque H3K27ac (Lewis *et al.*, 2013). D'autres études plus récentes confirmaient ces résultats, montrant également un enrichissement de la marque H3K27ac dans des zones du génome où elle n'était pas présente auparavant (Piunti *et al.*, 2017 ; Krug *et al.*, 2019). D'ailleurs, il semblerait que la marque H3K27ac soit colocalisée au niveau de nucléosome contenant une histone H3 mutée K27M, pouvant remettre en cause le mécanisme par lequel le complexe PRC2 serait recruté par la mutation (Piunti *et al.*, 2017).

D'autres marques épigénétiques semblent également être impactées par la mutation, notamment l'acétylation de H3K9 (H3K9ac), l'acétylation de l'histone H4 ou encore la diméthylation de H3K36 (H3K36me2) (Stafford *et al.*, 2018).

2.2.2.2. Impact sur l'expression génique

L'ensemble de ces modifications du contexte épigénétique conduit à des programmes d'expression génique propres aux DIPG porteurs de la mutation H3.3K27M (Nagaraja *et al.*, 2019; Silveira *et al.*, 2019). L'impact majeur décrit de la perte de H3K27me3, inhérente à la mutation, est une levée de répression, en particulier de gènes cibles de PRC2, dont les promoteurs présentent une bivalence chromatiniennne (cohabitation de la marque répressive H3K27me3 et de la marque activatrice H3K4me3) (Harutyunyan *et al.*, 2019 ; Larson *et al.*, 2019). Dans l'étude de Larson *et al.*, les auteurs montraient que des promoteurs bivalents en condition H3K27 WT, présentaient une perte d'H3K27me3 en présence de la mutation, qui se traduisait par une expression génique liée à la présence de la marque activatrice H3K4me3 (Figure 9) (Larson *et al.*, 2019 ; Silveira *et al.*, 2019).

INTRODUCTION



Figure 9. La mutation H3.3K27M provoque une expression de certains gènes ayant un promoteur bivalent. Divers gènes possèdent un promoteur dit « bivalent » puisque porteur d'une marque activatrice (H3K4me3) et répressive (H3K27me3). Lorsque la mutation H3.3K27M est présente, celle-ci entraîne une perte d'H3K27me3 au niveau de ces promoteurs, aboutissant à une expression de ces gènes grâce à la présence de la marque H3K4me3 (Adapté de Larson *et al.*, 2019).

En ce sens, il a été constaté que la présence du variant muté H3.3K27M est souvent associée à l'expression de gènes classifiés comme étant impliqués dans le développement neurale, le maintien du caractère souche (LIN28B et ID1/4 par exemple) et dans les voies de signalisation Notch (NOTCH3, DLL1 et JAG1 par exemple), WNT (LRP5, FZD5 et WNT5A par exemple), Hedgehog (PTCHD1, GLI2 et GLI3 par exemple) ou encore des éphrines (EFNA5 et EPHA2 par exemple) (Harutyunyan *et al.*, 2019 ; Larson *et al.*, 2019; Nagaraja *et al.*, 2019 ; Silveira *et al.*, 2019).

2.2.3. Différences entre mutations H3.1 et H3.3K27M

En termes de répartition, 58 à 63% des DIPG présentent une mutation H3.3K27M tandis que 18 à 30% des DIPG sont porteurs d'une mutation H3.1K27M (Castel *et al.*, 2015 ; Taylor, Mackay, *et al.*, 2014 ; Wu *et al.*, 2012) (Figure 10.A). D'un point de vue clinique, les patients mutés H3.1K27M sont globalement plus jeunes, avec une médiane d'âge au diagnostic de 4 ans contre 7 ans pour les patients mutés H3.3K27M. Autre différence non négligeable, les patients présentant une mutation K27M sur le variant H3.1 présentent un meilleur pronostic que les patients mutés sur le variant H3.3. Ces derniers ont une médiane de survie qui est réduite de 5 mois, passant de 15 mois pour les H3.1K27M à 10 mois pour les patients mutés H3.3K27M (Khuong-Quang *et al.*, 2012). Castel *et al.* montraient également que les tumeurs H3.1K27M présentaient une meilleure réponse à la radiothérapie, mais également un plus faible pouvoir métastatique que les tumeurs mutées H3.3K27M (9% vs 43% respectivement) (Castel *et al.*, 2015). Cependant, une nouvelle étude de la même équipe, publiée en 2019, montrait que le caractère plus radorésistant des DIPG mutés H3.3K27M était

INTRODUCTION

davantage lié à la présence de mutations sur *TP53* qu'à la mutation H3.3K27M en elle-même (Werbrouck *et al.*, 2019)

Cette différence peut s'expliquer, entre autres, par le type cellulaire d'origine. En effet, alors que les tumeurs H3.3K27M ont plutôt un profil de type proneural/oligodendroglial, les tumeurs H3.1K27M semble plutôt être d'origine mésenchymateuse/astrocytique.

Différentes études montraient que, selon le variant d'histone muté, la nature des mutations concomitantes était différente. En effet, alors que les mutations d'ACVR1 sont retrouvées préférentiellement chez les patients mutés H3.1K27M, les DIPG mutés pour *TP53* et présentant une amplification de *PDGFRA* sont généralement associés à une mutation de type H3.3K27M. (Puget *et al.*, 2012 ; Taylor, Mackay, *et al.*, 2014 ; Mackay *et al.*, 2017). Les tumeurs H3.1K27M sont également caractérisées par un gain du chromosome 1q et/ou de la totalité du chromosome 2 alors que les DIPG H3.3K27M présentent plutôt une perte du chromosome 14q24 et 17p13.1. (Mackay *et al.*, 2017) (Figure 10.B).

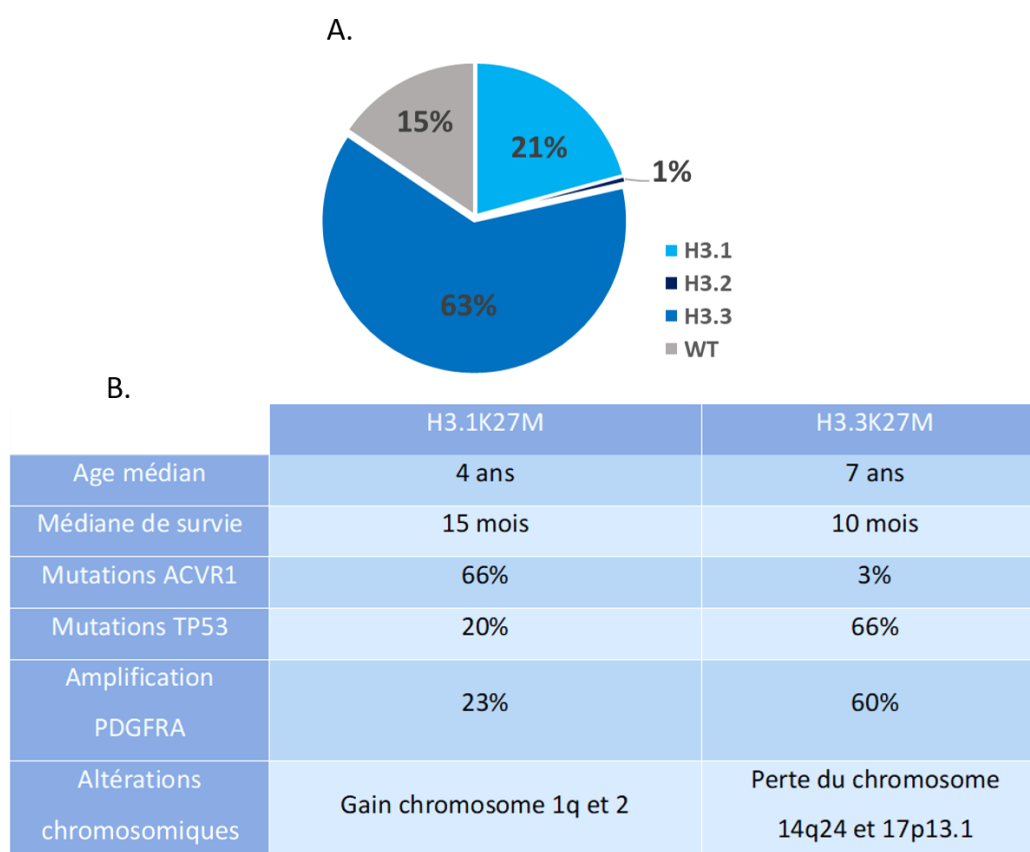


Figure 10. Répartition des différents types de mutations chez des patients atteints de DIPG. A. Répartition des mutations K27M des variants de l'histone H3 au sein des DIPG. **B.** Différences majeures relevées entre les tumeurs mutées H3.1K27M et les tumeurs mutées H3.3K27M. Les pourcentages ont été calculés sur la base de 4 études différentes (Taylor, Mackay, *et al.*, 2014 ; Buczkowicz *et al.*, 2014 ; Castel *et al.*, 2015 ; Mackay *et al.*, 2017)

INTRODUCTION

2.3. Effet « *driver* » des mutations H3K27M

2.3.1. Genèse des DIPG

Les DIPG sont des tumeurs présentant une certaine hétérogénéité intra-tumorale avec la présence de plusieurs sous-clones (entre 3 et 10 dans 85% des tumeurs), présentant des localisations et des profils mutationnels distincts (Vinci *et al.*, 2018). Quelques pistes concernant la genèse des DIPG ont été étudiées. Ainsi, il semblerait que le facteur de transcription OLIG2 soit un marqueur permettant de définir l'origine potentielle des cellules de DIPG. En effet, l'équipe de Monje *et al.* en 2011 constatait que la moitié des cellules souches neurales (NESTIN+) du tronc présentaient une expression de la VIMENTINE et de OLIG2. Or, lors du développement du cerveau de l'enfant, ces protéines sont exprimées durant les deux premières années, avant d'être réprimées pour ensuite subir un nouveau pic d'expression aux alentours de 6 ans. Cette période est concomitante avec la période d'apparition des DIPG, ce qui sous-entend que les cellules souches neurales seraient à l'origine des DIPG (Monje *et al.*, 2011).

Ces résultats étaient confirmés par une autre étude, qui montrait la présence du facteur de transcription OLIG2 dans 60% des cellules prolifératives (Ki67+) du tronc cérébral sain (Tate *et al.*, 2015). De plus, OLIG2 est hautement exprimé chez des patients atteints de DIPG et il semblerait que ce facteur de transcription soit nécessaire à la formation tumorale dans des modèles murins (Anderson *et al.*, 2017). En effet, dans cette étude, les auteurs transplantaient des cellules de DIPG OLIG2⁺ ainsi que des cellules de DIPG OLIG2^{KD} (en orthotopique) et constataient que seules les cellules OLIG2^{KD} aboutissaient à des tumeurs plus petites et les souris transplantées avaient une survie accrue, pouvant démontrer l'implication de OLIG2 dans la tumorigénèse des DIPG.

Si l'origine des DIPG semble être les cellules souches neurales, il semblerait que des précurseurs d'oligodendrocytes jouent également un rôle dans la tumorigénèse des DIPG H3K27M. Cette sous-population est prédominante au sein de ces tumeurs et la différenciation de ces précurseurs en oligodendrocytes est liée à l'activité de PRC2. Or, PRC2 est inactivé dans les DIPG H3K27M, empêchant la différenciation de ces progéniteurs. En effet, l'étude de Filbin *et al.* en 2018 montrait, grâce à une analyse en *single-cell* d'échantillons de patients atteints de DIPG mutés H3K27M, que les tumeurs présentaient différents sous-types de populations

INTRODUCTION

cellulaires avec un phénotype de type astrocytique, de type oligodendrocytique ou encore de type souche. (Filbin *et al.*, 2018).

2.3.2. Caractère primitif des mutations H3K27M

La tumorigénèse est un évènement complexe à décrypter, encore plus dans le cadre du DIPG, notamment du fait de la rareté des échantillons. Une étude publiée en 2016 s'est intéressée à la répartition spatiale de différentes mutations somatiques au sein de différents échantillons d'une même tumeur chez des patients atteints de DIPG, et ce afin de « reconstruire l'évolution des tumeurs ». Concrètement, des séquençages de différentes zones au sein d'une même tumeur étaient réalisés après autopsie. La présence des mutations H3K27M était alors observée dans l'ensemble des zones tumorales, laissant penser que la mutation H3.3K27M était un des premiers évènements à se mettre en place lors de la tumorigénèse, puisque retrouvée dans la totalité des échantillons. Les auteurs montraient également la présence d'associations de mutations partenaires dans leurs échantillons : H3K27M/ACVR1 ; H3K27M/PPM1D ; H3K27M/TP53 ou encore H3K27M/PI3KR1 (Figure 11) (Nikbakht *et al.*, 2016).

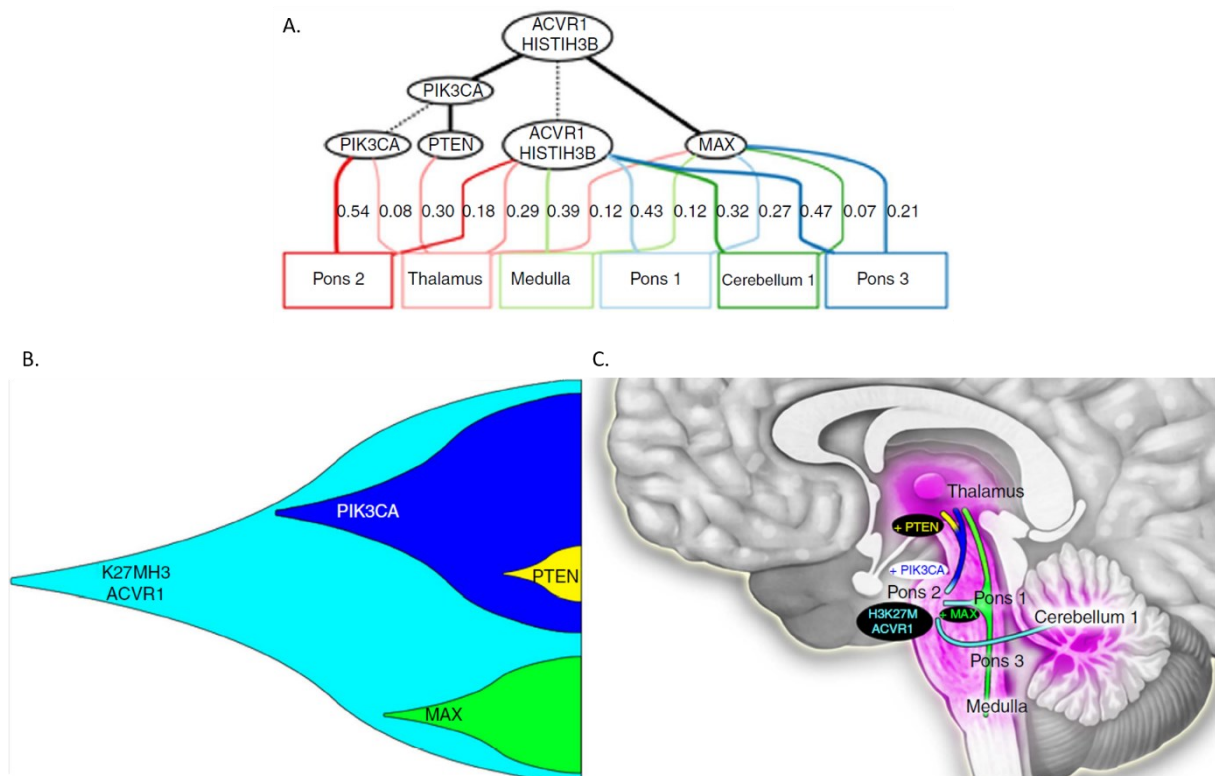


Figure 11. Séquence d'apparition des diverses mutations au cours du développement des DIPG. Des prélèvements dans différentes régions d'une même tumeur étaient réalisés chez des patients atteints d'un DIPG et séquencés. **A.** Exemple d'arbre phylogénétique ainsi construit à partir de la fréquence des mutations au sein des différents échantillons. Cet arbre montre l'évolution des mutations lors du

INTRODUCTION

développement tumoral. **B.** Représentation de l'évolution spatio-temporelle de cette même tumeur lors de la diffusion dans le thalamus, le cervelet ou le pont. Ordre d'apparition des mutations durant la diffusion tumorale. **C.** Schématisation de la diffusion tumorale dans différentes localisations. La tumeur s'est formée dans le pont, puis a rapidement diffusé dans le cervelet. Ces différents prélèvements comportaient les mutations H3K27M et ACVR1. Les échantillons prélevés dans le thalamus présentent des mutations secondaires (PIK3CA, MAX et PTEN), montrant que la diffusion dans cette zone s'est faite dans un second temps (Adapté de Nikbakht *et al.*, 2016).

2.3.3.Effet « *driver* » des mutations H3K27M

Les mutations H3K27M étant vraisemblablement un des premiers événements apparaissant lors de la formation des DIPG, il est légitime de penser qu'elles sont fortement impliquées dans, si ce n'est nécessaires à, la tumorigénèse de ces tumeurs. Plusieurs études se sont intéressées au potentiel rôle *driver* des mutations H3K27M. L'étude de Pathania, tout d'abord, consistait à introduire le gène H3F3A muté, ainsi qu'à engendrer des *knock-down* de TP53/ATRX par électroporation *in utero*. Bien que la mutation H3.3K27M ou la perte de p53 seule ne suffisent pas à former des tumeurs *in vivo*, l'association H3.3K27M + perte de p53 y apparaissait suffisante pour induire la tumorigénèse chez la souris, une tumeur apparaissant au bout de 6 à 8 mois (Pathania *et al.*, 2017). Dans cette même étude, une réduction de ce laps de temps à 4 mois était obtenue en réalisant un *knockdown* d'ATRX en plus de ces deux événements. Enfin, les auteurs montraient que l'association mutation H3.3K27M/perte de p53/perte d'ATRX/amplification de PDGFRA réduisait drastiquement le temps de latence tumorale, passant de 4mois à 21jours seulement pour voir former une tumeur (Figure 12) (Pathania *et al.*, 2017). Ces résultats confirmaient ceux obtenus par l'étude de Funato *et al.* en 2014, qui montrait que l'introduction de la mutation H3.3K27M couplée à un *knockdown* de p53 ainsi qu'une amplification de PDGFRA dans des cellules souches embryonnaires provoquait l'apparition d'un phénotype néoplasique (Funato *et al.*, 2014). L'équipe de Baker en 2019 confirmait également cette observation. Dans cette étude, l'introduction de la mutation seule dans des cellules neurales de souris (par un système Cre-lox) ne suffisait pas à conduire à des tumeurs cérébrales, alors que l'ajout d'altération supplémentaire, à savoir un *KO* de p53 et une amplification de PDGFRA, conduisait à la formation de tumeurs diffuses et reprenant les caractéristiques des tumeurs du tronc cérébrale (Larson *et al.*, 2019). De ce fait, les mutations H3K27M aurait bien un effet « *driver* » en association cependant avec d'autres altérations, comme la perte de p53 ou encore l'amplification de PDGFRA.

INTRODUCTION

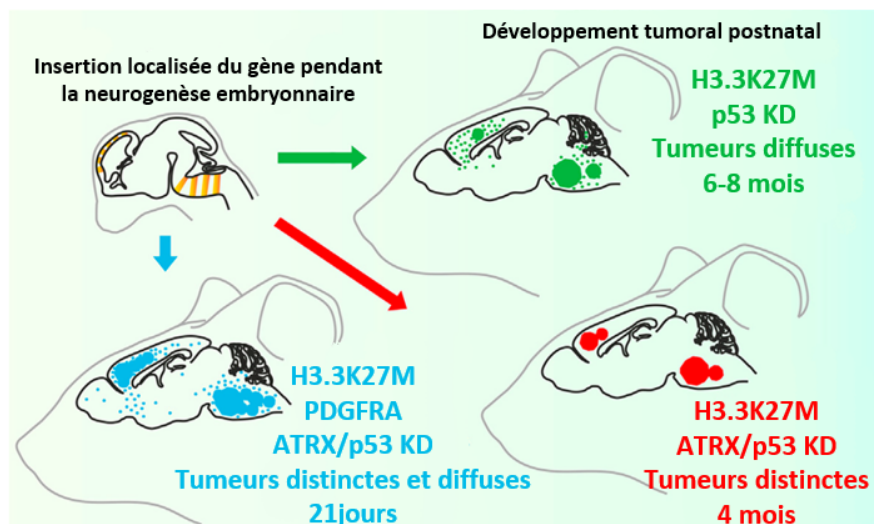


Figure 12. Effets des combinaisons de mutations sur la tumorigénèse des DIPG. Différentes combinaisons d'insertion/invalidation/amplification étaient réalisées. Alors que la combinaison H3.3K27M/p53 KD provoque l'apparition de tumeurs diffuses tardives Lujsterburg *et al.*, la réalisation d'un knockdown d'ATRX en plus, permet de réduire le temps de formation des tumeurs (rouge). Enfin, l'ajout de l'amplification de PDGFRA induit la formation de tumeurs distinctes et diffuses de manière plus rapide (bleu). (Adapté de Pathania *et al.*, 2017)

2.4. Autres altérations géniques au sein des DIPG

2.4.1. Mutations ACVR1

Le gène du récepteur à l'activine récepteur de type 1A, ou ALK2, code pour un récepteur de type 1 de la famille des protéines de la morphogénèse osseuse (BMP pour Bone Morphogenetic Protein), qui interviennent dans la voie de signalisation du TGF- β (Rigueur *et al.*, 2015). Celui-ci est activé lors de la fixation de son ligand, qui active le facteur de transcription SMAD. Six mutations du gène *ACVR1* sont retrouvées dans 20 à 32% des cas de DIPG (R206H, Q207E, R258G, G328E, G328V, G328W, and G356D) (Buczkoicz *et al.*, 2014 ; Fontebasso *et al.*, 2014 ; Taylor, Vinci, *et al.*, 2014 ; Carvalho *et al.*, 2019). Ces mutations aboutissent à une activation constitutive du récepteur et sont également retrouvées dans une maladie génétique, la fibrodysplasie ossifiante progressive (FOP) (Han *et al.*, 2018). En 2016, une étude montrait qu'au même titre que la mutation H3K27M, les mutations d'*ACVR1* semblent être parmi les événements arrivant le plus précocement lors de la tumorigénèse puisque ces mutations étaient retrouvées dans la totalité des cellules cancéreuses composant la tumeur (Nikbakht *et al.*, 2016).

De façon intéressante, les mutations d'*ACVR1* sont retrouvées quasi-exclusivement dans les DIPG mutés H3.1K27M (Taylor, Mackay, *et al.*, 2014). Une étude récente menée par l'équipe

INTRODUCTION

de Hoeman, visait à induire des mutations d'ACVR1 et/ou de H3.1K27M dans des progéniteurs « souches » de souris. Les auteurs montraient que l'induction de mutations d'ACVR1 uniquement augmentait significativement la croissance de ces cellules, bien que celles-ci ne formaient pas de tumeurs *in vivo*. L'apport de la mutation H3.1K27M ne changeant rien à ce constat, les auteurs montraient la nécessité d'introduire une amplification de PDGFRA pour obtenir un effet sur la gliomagénèse mais également sur la survie des souris. De manière intéressante, les auteurs montraient également que l'incidence tumorale (nombre de souris dans lesquelles une tumeur était observable) était bien plus importante dans les tumeurs mutées à la fois pour AVRC1 et H3.1K27M (90% vs. 44% pour les cellules mutées uniquement H3.1K27M), démontrant l'effet coopératif des deux mutations (Hoeman *et al.*, 2019).

2.4.2. Mutations de la voie p53

Différentes altérations des voies de signalisations activées par la protéine p53 sont retrouvées dans les DIPG. *TP53* est un gène central d'un point de vue cellulaire puisqu'il est impliqué dans différents mécanismes moléculaires en réponse à un stress cellulaire : l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la voie de réparation de l'ADN (Vogelstein *et al.*, 2000). Il est maintenant établi que le gène *TP53* est un gène dont les mutations sont retrouvées dans plus de 50% des cas de cancers (Perri *et al.*, 2016). Au sein des DIPG, ce pourcentage atteint 40 à 77% des selon les études (Khuong-Quang *et al.*, 2012 ; Grill *et al.*, 2012). Comme précédemment indiqué, les mutations affectant le gène *TP53* sont majoritairement retrouvées dans les DIPG mutés H3.3K27M. En effet, des mutations de *TP53* sont retrouvées dans 60% des DIPG mutés H3.3K27M, mais seulement dans 12,5% des cas de DIPG mutés H3.1K27M. Ces chiffres ont ensuite été confirmés dans une étude ultérieure (Taylor, Mackay, *et al.*, 2014 ; Buczkowicz *et al.*, 2014). De plus, il est à noter que 10 à 12% des DIPG présentent une mutation du gène *PPM1D*, codant pour la protéine WIP1, une phosphatase exerçant un rétrocontrôle négatif sur p53, limitant son activité (Zhang *et al.*, 2014).

2.4.3. Altération de la voie des RTK : Amplification de PDGFRA

Les récepteurs tyrosine kinase sont des récepteurs membranaires qui, lors de leur activation par leur ligand, initient une cascade de phosphorylation et activent des processus cellulaires telles que la différenciation, la croissance cellulaire ou encore la survie cellulaire (Lemmon et Schlessinger, 2010). Chez les patients atteints de DIPG, 40% des cas présentent une amplification de *PDGFRA* et, dans un plus faible pourcentage, une mutation de celui-ci (5 à 9%

INTRODUCTION

des cas). A noter que l'amplification de *PDGFRA* est retrouvée uniquement dans des DIPG mutés H3K27M (Zarghooni *et al.*, 2010; Buczkowicz *et al.*, 2014). D'autres amplifications (plus rares mais tout de même à relever) étaient retrouvées au sein des DIPG, notamment une amplification du récepteur à l'EGF ou encore du récepteur MET (Zaghloul *et al.*, 2014)

2.4.4. Amplification de MYC

Le gène MYC-N est un proto-oncogène, impliqué dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Guglielmi *et al.*, 2014). Il se trouve que des amplifications de c-MYC et MYC-N ont été retrouvées dans les DIPG (Wu *et al.*, 2014). L'équipe de Buczkowicz en 2014, classait les DIPG en 3 sous-groupes distincts : MYC-N, « Silent » et muté H3K27M. Dans le sous-groupe MYC-N, une amplification ainsi qu'une surexpression de ce dernier était retrouvée, tandis qu'une amplification de PVT-1/MYC était observée uniquement dans le sous-groupe muté H3K27M dans 9 prélèvements sur 35 (25%) (Buczkowicz *et al.*, 2014).

2.4.5. Mutations ATRX

D'autres altérations décrites dans le cadre des DIPG, les mutations d'ATRX, dont la fonction physiologique consiste à incorporer le variant d'histone H3.3 au niveau des zones télomériques ainsi que dans des zones répétées du génome, nécessaire au *silencing* de ces gènes (Wong *et al.*, 2010). ATRX se trouve muté dans 5 à 12% des cas de DIPG (Khuong-Quang *et al.*, 2012 ; Wu *et al.*, 2014 ; Solomon *et al.*, 2016). Les mutations d'ATRX conduisent à une augmentation de mutations somatiques simple base, aboutissant à des difficultés de réparation de l'ADN par *Non Homologous End-Joining* (NHEJ) (Koschmann *et al.*, 2016.). Cependant, les mutations d'ATRX sont majoritairement retrouvées dans des prélèvements d'origine autopsique chez des patients où elle était absente dans le prélèvement biopsique au moment du diagnostic, semblant ainsi indiquer que la mutation d'ATRX serait un événement secondaire (Taylor, Mackay, *et al.*, 2014).

2.4.6. Mutations H3G34R/V

Une autre mutation sur l'histone H3 a également pu être mise en évidence. Il s'agit du remplacement de la Glycine 34 en Arginine ou en Valine (H3G34R/V). Il se trouve que cette mutation concerne uniquement le gène H3F3A codant pour le variant d'histone H3.3 et caractérise plutôt des tumeurs hémisphériques, dans lesquelles elle est retrouvée dans 15% des cas (Schwartzentruber *et al.*, 2012; Mackay *et al.*, 2017). Cette mutation est par ailleurs

INTRODUCTION

exclusive avec les mutations H3K27M. Il faut noter que les patients atteints de tumeurs avec une mutation H3G34R/V ont une médiane de survie de 24-mois (vs. 12mois pour les H3K27M) (Sturm *et al.*, 2012), bien que cela puisse aussi s'expliquer par la localisation hémisphérique de ces tumeurs (Figure 13).

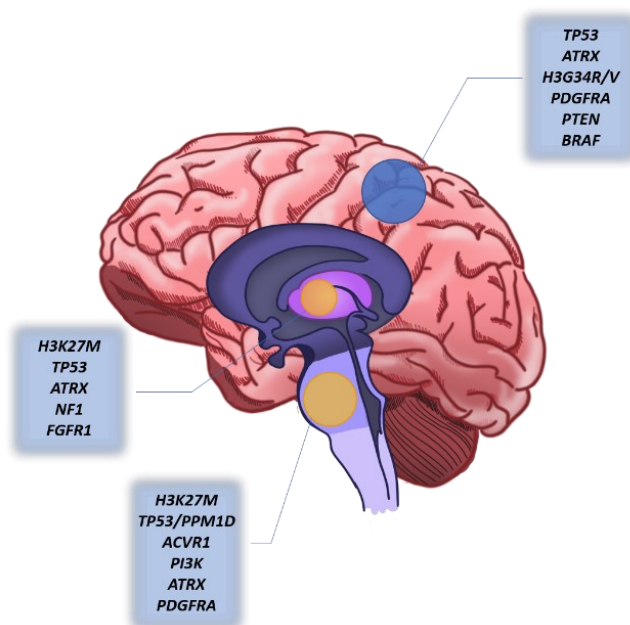


Figure 13. Répartition des altérations génétiques au sein des différents types de tumeurs cérébrales pédiatriques. Les tumeurs H3K27M sont retrouvées majoritairement au niveau de la ligne médiane composée entre autres du pont de varole et du thalamus, alors que les mutations H3G34R/V sont retrouvées dans les zones hémisphériques. D'autres altérations sont retrouvées au niveau de sites spécifiques. A titre d'exemple, alors que des mutations sur le gène *PTEN* ne sont retrouvées majoritairement qu'au sein des tumeurs hémisphériques, les mutations du gène *ACVR1* ne sont quant à elles retrouvées qu'au niveau des tumeurs du tronc cérébral (Adapté de Lulla *et al.*, 2016)

2.4.7. Autres altérations décrites

Il existe d'autres voies altérées dans les DIPG, notamment concernant la régulation du cycle cellulaire. En effet, la voie PI3K/mTOR est notamment impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et il se trouve que les mutations de *PI3KCA*, *PIK3R1* ou encore de *PTEN* (phosphatase de PI3K) sont retrouvées dans 30% des DIPG (Buczkoicz *et al.*, 2014).

La voie Aurora kinase est elle aussi une des voies impactées dans les DIPG. En effet, une surexpression de *AURKB* a été détecté dans 70% des DIPG (Buczkoicz *et al.*, 2013), suggérant l'idée d'utiliser des inhibiteurs d'Aurora kinase comme traitement.

Enfin, la voie RB est également altérée dans les DIPG. Cette voie exerce un rétrocontrôle négatif sur le cycle cellulaire ainsi que sur la progression tumorale. Des amplifications de *CDK4*, *CDK6* et *CCND1* ainsi que des délétions de *CDKN2A* étaient ainsi retrouvées (Paugh *et al.*, 2011; Warren *et al.*, 2012).

INTRODUCTION

Il est ainsi établi que les mutations H3K27M jouent un rôle dans la tumorigénèse. Cependant, leur implication dans le caractère résistant des DIPG n'a toutefois que peu été évalué. Une des principales limites de l'étude de ces mutations est le manque d'échantillons biologiques pertinents.

Evaluer finement l'impact d'un facteur biologique, ici les mutations H3K27M, reposent souvent sur la comparaison de deux situations que sont la présence et l'absence dudit facteur. Or, à la rareté des prélèvements de DIPG, s'ajoute la rareté des DIPG non mutés H3K27M. De plus, l'hétérogénéité inter individu complique l'analyse des résultats biologiques obtenus sur des cellules issues de différents patients, à plus forte raison sur des cohortes limitées. Dans ce contexte, les modèles cellulaires ne différant que par la présence ou l'absence de la mutation s'avèrent être des outils de compréhension précieux. L'établissement de tels outils est rendu possible grâce à diverses approches de modifications du génome cellulaire.

3.Stratégies de modification du génome

3.1. Surexpression et invalidation génique.

Afin d'étudier le rôle d'un gène particulier au sein d'une cellule, diverses stratégies complémentaires sont envisageables. Dans un premier temps, il est souvent relativement simple d'introduire le gène au sein du génome de la cellule, afin d'entraîner sa surexpression. Cela peut se faire par une transfection (stable ou transitoire), c'est-à-dire introduire un ADN exogène (ou construction) au sein de la cellule. Dans le cadre d'une transfection stable, il faut incorporer à la construction un gène de sélection permettant de ne conserver que les cellules ayant intégré le gène d'intérêt dans leur génome. Dans le cas de l'étude de l'effet de mutations, cette stratégie n'est possible que si et seulement si ladite mutation possède un effet dominant-négatif, permettant d'observer un effet même si l'allèle sauvage demeure présent dans la cellule. Cette stratégie vise donc à introduire le gène muté au sein du génome. Cependant, le gène introduit sera quasi systématiquement surexprimé au sein de la cellule, ajoutant à l'effet propre dudit insert, l'effet d'un bouleversement dû à une abondance anormale de la protéine mais aussi à un stress du réticulum endoplasmique devant faire face à cette surexpression. Aussi, afin de garantir que l'effet observé ne soit lié qu'à la mutation et non à la surexpression, il faut prévoir une population contrôle dans laquelle le gène sauvage

INTRODUCTION

a été introduit et s'exprimerait, idéalement, dans les mêmes proportions. Une autre alternative, bien plus complexe à mettre en place, serait de réaliser une édition du génome afin de réécrire ce dernier et d'y introduire la mutation sans surexpression dudit gène.

La deuxième stratégie pour évaluer l'effet d'un gène et/ou d'une mutation est d'invalider ou d'enlever ce gène ou cette mutation. Il existe différentes méthodes pour parvenir à cela. Il est possible d'invalider partiellement le gène par *knock-down* en utilisant des petits ARN interférent (siRNA pour *small interfering RNA*) qui vont permettre la dégradation spécifique de l'ARNm et donc d'éteindre partiellement, voire quasi totalement, la production de la protéine qui en est issue. L'utilisation de siRNA est transitoire, alors que l'utilisation de petits ARN en épingle à cheveux (shRNA pour *short hairpin RNA*) qui vont s'intégrer au génome et être exprimés sous le contrôle d'un promoteur, va permettre une extinction du gène au long terme. Dans le cadre de l'étude d'une mutation non délétère pour la protéine, invalider le gène en entier engendrerait un biais. En effet, si la présence de la mutation n'engendre pas une inactivation de la protéine, inactiver le gène en entier pourrait avoir des conséquences non liées à ladite mutation. Il faudra alors de nouveau envisager une autre approche utilisant l'édition précise du génome, ou *gene editing*, dans le but de modifier/corriger celle-ci, sans altérer le reste de la séquence, afin de conserver *in fine*, un allèle fonctionnel.

3.2. Le *gene editing*

3.2.1. Les prémices du *gene editing*

Avant la fin des années 1980, il était quasiment impossible de contrôler l'insertion d'un ADN exogène dans un organisme (animal ou végétal), laissant ainsi planer un doute certain quant à l'effet potentiellement délétère que pouvait induire une insertion aléatoire dans le génome. L'obtention de mutants reposait alors sur des méthodes de mutagenèse chimique ou insertionnelle. Les premiers succès d'insertion d'une copie d'ADN exogène ont été réalisés par Smithies et Capecchi au milieu des années 1980 (Smithies *et al.*, 1985 ; Thomas *et al.*, 1986 ; Capecchi, 1989). Leurs études montraient qu'il était possible d'introduire un ADN exogène dans le génome humain, selon un processus qui sera nommé « recombinaison homologue ». Ces découvertes furent d'ailleurs récompensées par le Prix Nobel de Médecine en 2007, au vu de l'immense champ d'application qu'a pu ouvrir cette découverte. Cependant, les auteurs montraient également certaines limites à cette application. En effet, l'intégration d'une

INTRODUCTION

séquence d'ADN exogène par recombinaison homologue est un phénomène extrêmement rare et sa fréquence était alors estimée entre une cellule pour mille et une cellule pour un milliard. De plus, ce taux de recombinaison est très variable selon le type cellulaire ou encore l'état cellulaire (phase du cycle cellulaire notamment). Enfin, cette approche n'empêchait pas l'intégration de l'ADN exogène à différents sites non désirés du génome. C'est pourquoi, il est rapidement apparu nécessaire d'augmenter ce pourcentage. En ce sens, d'autres équipes ont constaté, dans des modèles murins, que la création d'une cassure double brin à un locus précis du génome augmentait le pourcentage de recombinaison homologue (Rouet *et al.*, 1994). Pour ce faire, les auteurs utilisaient une enzyme de type endonucléase, la protéine I-SceI, coupant l'ADN en de rares endroits du génome. Ce fut véritablement la première stratégie de « *gene editing* » à être mise en place. Néanmoins, une limitation importante persistait encore, puisque même s'il existe des centaines d'endonucléases, celles-ci reconnaissent une séquence qui leur est propre. De ce fait, la probabilité de trouver une endonucléase provoquant une coupure au sein du gène souhaité restait cependant très faible. De plus, lors de la création d'une cassure double brin, le mécanisme de réparation de l'ADN le plus fréquent est la jonction des extrémités non homologues, ou NHEJ (*Non Homologous End-Joining*). Les chercheurs ont commencé à modifier les endonucléases afin de parer ces contraintes. C'est à partir de ce moment-là, que le *gene editing* sous sa forme actuelle a vu le jour.

Les stratégies de *gene editing* modernes reposent ainsi sur l'utilisation d'une endonucléase ciblant une séquence connue de l'ADN afin de créer une cassure double brin au niveau d'un site d'intérêt, dans le but d'activer les mécanismes de réparation de l'ADN. L'utilisation de cette stratégie permet notamment d'invalider un gène (*Knock-out*) ou d'insérer une séquence d'ADN exogène dans un locus précis. En effet, lors de la création d'une cassure double brin de l'ADN, la protéine ATM (*Ataxia Telangectasia Muté*) va reconnaître et signaler cette cassure selon un mécanisme d'activation par autophosphorylation. Par une cascade de phosphorylation, le cycle cellulaire sera bloqué, permettant ainsi la réparation de l'ADN par deux mécanismes distincts, que sont la jonction des extrémités non homologues, ou NHEJ (*Non Homologous End-Joining*) et la recombinaison homologue, ou HR (*Homologous Recombination*).

INTRODUCTION

3.2.2. Voies de réparation de l'ADN

3.2.2.1. Non-Homologous End-Joining (NHEJ)

Un des mécanismes possibles de réparation de l'ADN est la réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ). Celle-ci constitue d'ailleurs la voie principale de réparation des cassures double-brin de l'ADN. Il existe cependant deux voies de réparation par NHEJ : la voie dite classique (C-NHEJ) et une voie dite alternative (A-NHEJ) (Nussenzweig et Nussenzweig, 2007), impliquant des acteurs moléculaires différents.

3.2.2.1.1. La voie C-NHEJ

La voie classique de réparation par NHEJ est un processus rapide de réparation de l'ADN (environ 10 à 30min) qui se décompose en 3 étapes majeures. Dans un premier temps, la cassure est reconnue par l'hétérodimère Ku70/Ku80, qui va protéger les extrémités de la cassure (Walker *et al.*, 2001). Ensuite, les extrémités de la cassure seront rendues compatibles avec la réparation, étape nécessitant le recrutement de phosphatases, kinases, nucléases ou encore polymérase. La préparation des extrémités des cassures engendre des pertes ou des modifications de nucléotides qui vont se retrouver à la fin de la réparation et pouvant entraîner une instabilité génétique aboutissant la plupart du temps à des mutations de type Insertion/délétion (InDel). Enfin, la dernière étape est l'étape de ligation. C'est durant cette étape que les extrémités précédemment préparées sont liées entre-elles. (Figure 14)

INTRODUCTION

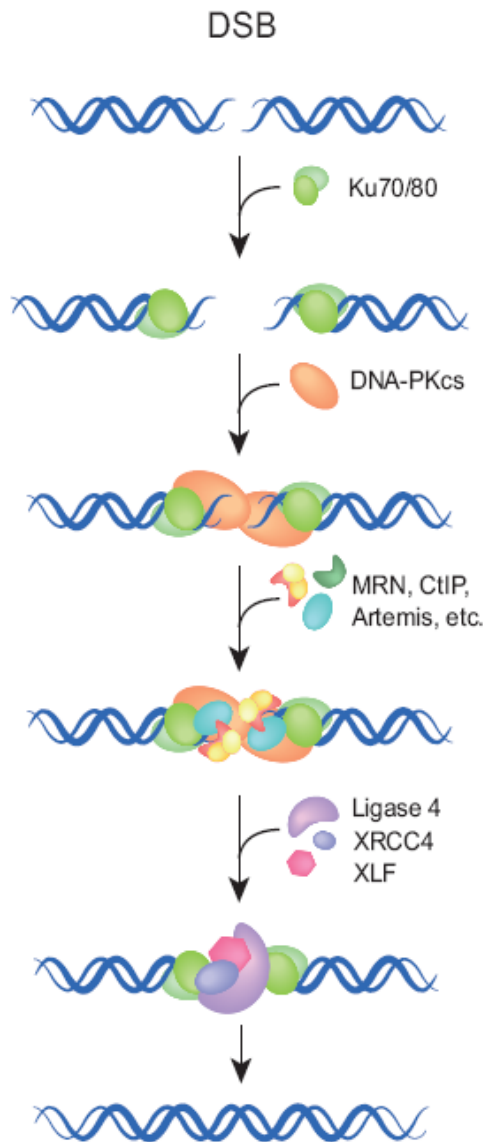


Figure 14. Mécanisme de réparation par NHEJ classique. La cassure double brin est reconnue par un hétérodimère composé des protéines Ku70 et Ku80 qui va former un anneau autour de l'ADN et coulisser le long de ce dernier. La DNA-PKcs va ensuite être recrutée, qui va elle-même permettre le recrutement d'autres enzymes capables de modifier les extrémités comme MRE11, WRN, Artémis ou encore les ADN polymérases λ et μ . L'étape de ligation fait intervenir un complexe, composé de trois protéines : XRCC4/XLF/Ligase IV, qui va réaliser la jonction entre les extrémités. Bien que la protéine XRCC4 ne possède pas d'activité catalytique en propre, elle permet de stabiliser la Ligase IV et permet également son adressage aux sites de cassure. (Extrait de Dueva et Iliakis, 2013)

3.2.2.1.2. La voie A-NHEJ

Le NHEJ-Alternatif (A-NHEJ), autrement appelé B-NHEJ (*Back-up NHEJ*) ou encore MMEJ (*Microhomology Mediated End Joining*), est un mécanisme de NHEJ plus long (entre 30min et 20h) et qui se met en place dans le cadre d'un dysfonctionnement du mécanisme C-NHEJ, lorsque notamment les cellules sont déficientes pour des acteurs majeurs du NHEJ, tels que le dimère Ku70/80 ou encore le complexe XRCC4/ADN Ligase IV (Bennardo *et al.*, 2008). Le

INTRODUCTION

mécanisme A-NHEJ est un processus dans lequel l'ADN sera réparé en utilisant des séquences de micro-homologies qui se trouvent de part et d'autre de la cassure double brin. A cela se pose d'ores et déjà deux sources d'erreurs de réparation. En effet, le A-NHEJ conduit à une résection de la séquence d'ADN comprise entre deux séquences d'homologie. De ce fait, *via* ce mécanisme, il est probable d'obtenir des délétions de plus ou moins grande partie du génome. De plus, ce mécanisme peut très bien restaurer l'ADN à partir d'une séquence ne provenant pas d'un site proche de la cassure, entraînant des translocations chromosomiques (Iliakis *et al.*, 2004).

D'un point de vue mécanistique, la protéine PARP1, senseur des dommages à l'ADN, permet le recrutement du complexe MRN (composé des protéines MRE11, RAD50 et NBS1) et autorise également le recrutement du complexe XRCC1/DNA Ligase 3. Concrètement, en l'absence du complexe Ku70/80, la protéine PARP1 va permettre le recrutement du complexe MRN et son partenaire CtIP. Cette étape va permettre la résection d'une séquence plus ou moins longue jusqu'à une zone contenant un domaine de micro-homologie complémentaire (formé de quelques nucléotides). Une fois l'association par homologie effectuée, la ligation aura alors lieu grâce au complexe XRCC1/DNA Ligase 3 (Figure 15).

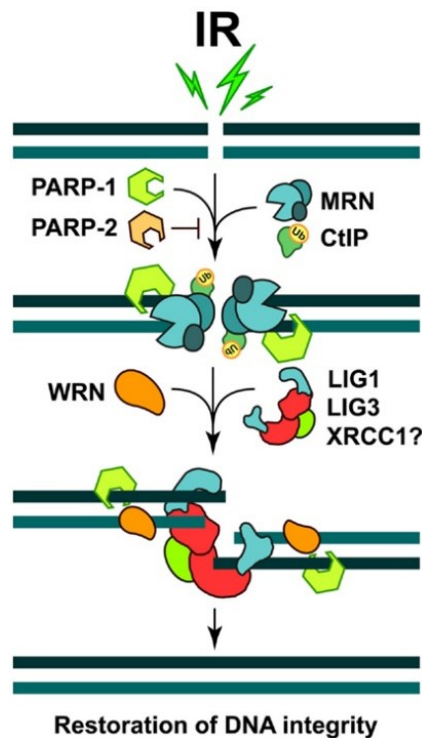


Figure 15. Mécanisme de réparation par NHEJ alternative. La protéine PARP1 va jouer un rôle prépondérant dans ce mécanisme. En effet, celle-ci va permettre le recrutement du complexe MRN (formé des protéines MRE11, RAD50 et NBS1) ainsi que leur partenaire CtIP. Cette étape va permettre

INTRODUCTION

la résection d'une séquence plus ou moins longue jusqu'à une zone contenant un domaine de micro-homologie complémentaire (formée de quelques nucléotides). Une fois l'association par homologie effectuée, la ligation a alors lieu grâce au complexe XRCC1/DNA Ligase 3 en partenariat avec la protéine WRN. Il a également été montré que la ligase 1 peut intervenir dans ce mécanisme. (Extrait de Mladenov *et al.*, 2013)

3.2.3. Recombinaison Homologue

Le second mécanisme de réparation de l'ADN est la recombinaison homologue. Ce processus nécessite la présence d'une séquence homologue intacte de la région contenant le site de cassure, et ce dans le but de restaurer la séquence d'ADN originelle. Dans des conditions physiologiques, la cellule va utiliser la chromatide sœur afin de corriger une cassure double brin survenue suite à un stress (radiation ionisante par exemple). Alors que les mécanismes de NHEJ peuvent survenir durant la totalité du cycle cellulaire (même si leur activité est potentialisée pendant les phases S et G2), la recombinaison homologue a lieu uniquement durant les phases S et G2 du cycle cellulaire (San Filippo *et al.*, 2008). La recombinaison homologue se déroule en trois étapes distinctes, la phase pré-synaptique, synaptique et post-synaptique (Figure 16).

L'étape initiale de la recombinaison homologue est la **phase présynaptique**, durant laquelle le complexe MRN (composé pour rappel des protéines MRE11-RAD50-NBS1) est rapidement recruté aux extrémités de la cassure. C'est au cours de cette étape qu'a lieu une résection des extrémités de l'ADN du brin 5', formant ainsi une longue extrémité 3' d'ADN simple brin, sous l'action du complexe MRN précédemment recruté, en coopération avec la protéine CtIP. Cette étape de résection est primordiale dans l'initiation de la recombinaison homologue, puisque c'est cette portion d'ADN simple brin qui va permettre la recherche d'une homologie au sein du génome (West, 2003). Ce moment constitue le point de non-retour dans la décision de faire de la recombinaison homologue ou de la réparation par NHEJ. Une fois le filament d'ADN simple brin formé, celui-ci est pris en charge par le complexe RPA, qui est un complexe hétéro-trimérique présentant une forte affinité pour l'ADN simple brin et permettant de protéger et stabiliser ce dernier (Braun *et al.*, 1997). Le complexe ADN simple brin/RPA joue un rôle important pour deux raisons. La première est que c'est ce complexe qui va contribuer à l'activation de la kinase ATR, qui par cascade, va activer les protéines ATM, CHK1 et CHK2 afin d'arrêter le cycle cellulaire et permettre la réparation (Zou et Elledge, 2003). Le second rôle est de permettre la formation d'un filament nucléoprotéique hélicoïdal de la recombinase

INTRODUCTION

RAD51, par remplacement des complexes RPA par RAD51, permettant ainsi la recherche de séquence homologues.

La seconde phase est donc la **phase synaptique**. C'est durant cette phase qu'aura lieu la recherche et l'envahissement de la séquence homologue. Durant celle-ci, la protéine RAD51 va catalyser la réaction d'échange de brin par invasion du brin intact. En effet, après dissociation du brin homologue intact, le brin envahissant va créer une boucle avec le brin homologue, appelée boucle de déplacement ou *D-loop (displacement loop)*. Au moment où l'appariement se fait, une jonction se crée entre le brin envahissant (visant à être corrigé) et le brin homologue (servant de correcteur), cette jonction est appelée jonction de Holliday.

La troisième et dernière étape de la recombinaison homologue, la phase post-synaptique, constitue la période durant laquelle l'ADN sera réparé. Deux chemins sont alors envisageables, soit l'ADN sera réparé par un mécanisme appelé **SDSA** (*Synthesis-Dependent Strand Annealing*) ou par un mécanisme appelé **DSBR** (*Double-Strand Break Repair*). **Le mécanisme SDSA** ne fait intervenir qu'une seule élongation. En effet, le brin envahissant subit une élongation complémentaire du brin homologue sur une distance limitée et finit par se détacher et être de nouveau lié avec l'ADN originel, aboutissant à la réparation ce dernier. La seconde extrémité clivée va donc être allongée par complémentarité avec le brin corrigé nouvellement synthétisé. **Le mécanisme DSBR** fait intervenir la seconde extrémité cassée. Elle va subir la même chose que la première extrémité et il y aura formation d'une double jonction de Holliday (dHJ). Par ce mécanisme, les deux extrémités subiront une élongation en même temps. Ce mécanisme de recombinaison homologue peut conduire à un crossing over, qui correspond à un échange important de matériel, ou à de la conversion génique, échange de matériel plus restreint.

Il faut noter également que la recombinaison homologue peut également se faire par utilisation d'un ADN simple brin (ssDNA) ou autrement appelé *single strand donor oligonucleotide* (ssODN). Bien que moins stable d'un point de vue moléculaire, cette méthode présente par ailleurs quelques avantages, augmentant notamment l'efficacité de la recombinaison homologue comparée à une stratégie double brin, et sa nature simple brin présente une meilleure capacité d'entrée dans la cellule (Miura *et al.*, 2015 ; Yoshimi *et al.*, 2016).

INTRODUCTION

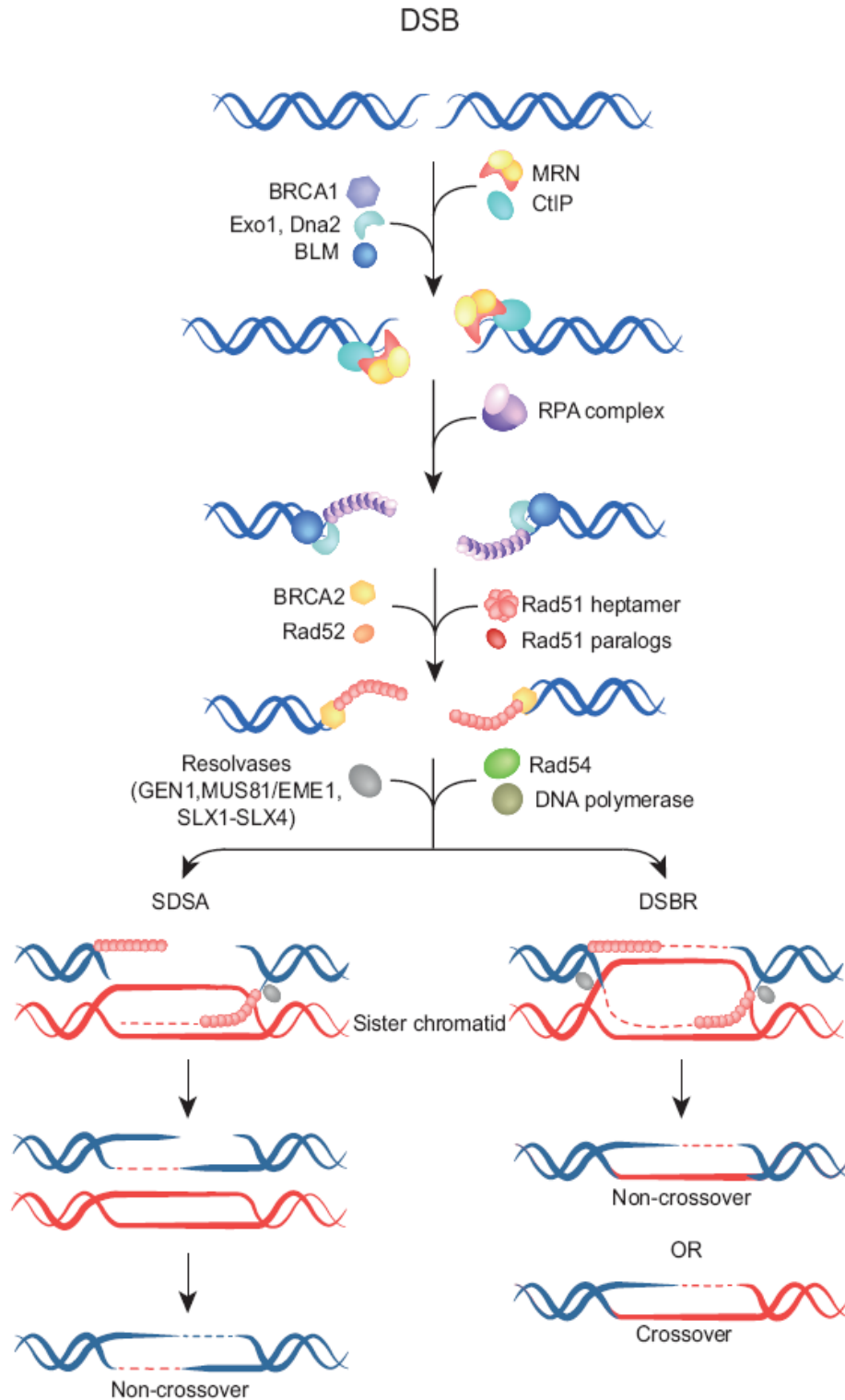


Figure 16. Mécanisme de réparation par recombinaison homologue. Lors de la création d'une cassure double brin, le complexe MRN et son partenaire CtIP sont recrutés. Une résection des extrémités peut alors avoir lieu, grâce à l'intervention de différents acteurs, tels que l'exonuclease 1 (EXO1), l'hélicase BLM (Bloom's syndrome hélicase) ou encore la nucléase DNA2. Une fois le filament d'ADN simple brin formé, celui-ci est pris en charge par le complexe RPA, qui est un complexe hétérotrimérique composé des protéines RPA70, RPA32 et RPA14 présentant une forte affinité pour l'ADN simple brin et permettant de protéger et stabiliser ce dernier. L'affinité de l'ADN simple brin étant plus forte pour le

INTRODUCTION

complexe RPA que pour la protéine RAD51, divers acteurs tels que RAD52, BRCA2, ou encore des paralogues de RAD51 vont entrer en jeu afin de permettre le remplacement de RPA par RAD51. Avant le commencement de l'élongation du brin envahissant (ayant subi la cassure), la protéine RAD51 située à la toute fin de la *D-loop* sera retirée, afin de faire apparaître le groupement 3'-OH de la séquence, permettant ainsi son élongation par une ADN polymérase. Pour ce faire, deux acteurs entrent en jeu, à savoir la protéine RAD54 et son partenaire RAD54B. Une fois la séquence homologue trouvée et envahie, différentes enzymes vont alors intervenir, nommées résolvases, mais qui sont en réalité des nucléases structure-spécifiques, telles que GEN1, MUS81-EME1, ou encore le complexe SLX1-SLX4 (Extrait de Dueva et Iliakis, 2013)

3.3. Les outils permettant de créer des cassures doubles brins

Pour mettre en place les mécanismes de réparation présentés ci-dessus, il faut que l'ADN de la cellule ait subi une/des cassure(s) double brin. La découverte de l'importance de ces coupures doubles brin dans l'initiation de la recombinaison dans les années 1980 et celle de l'endonucléase I-SceI chez la levure au début des années 1990 ont montré la voie concernant l'édition du génome. Dans un premier temps, les chercheurs ont utilisé des méganucléases, ayant une séquence cible bien spécifique, mais cette stratégie a vite été oubliée car il n'était pas possible de cibler la zone souhaitée, et ce malgré les diverses tentatives de mutagenèse de ces méganucléases (Adli, 2018). Depuis, diverses nucléases artificielles ont été développées, et tout particulièrement les nucléases à doigt de zinc, ou *Zinc Finger Nucleases* (ZFN), les TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nuclease*) ou plus récemment le système CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats – CRISPR Associated Protein 9*) dont voici les principes de fonctionnement ainsi que les avantages et limites.

3.3.1. Les nucléases à doigts de zinc (ZFN)

Les protéines à doigts de zinc (ZF) constituent une grande famille de facteurs de transcription présents au sein de la cellule. L'étude de Pavletich montrait dès 1991, que les doigts de zinc se fixaient à l'ADN de manière spécifique en ciblant une région de 3 nucléotides (Pavletich et Pabo, 1991). D'un point de vue structurel, les doigts de zinc sont composés d'une trentaine d'acides aminés liés à un seul atome de zinc, et possèdent un domaine de reconnaissance de l'ADN composé de plusieurs motifs Cys2His2, qui vont reconnaître 3 ou 4 paires de base. Il semblait alors nécessaire de comprendre le code des doigts de zinc afin de répertorier la séquence de 3 paires de bases ciblée par chaque doigt de zinc (Desjarlais et Berg, 1992). Ainsi, leur association permettait de cibler une séquence bien précise composée d'un multiple de 3 nucléotides (en général 9, 12 ou 15), de préférence retrouvée en un endroit unique du génome

INTRODUCTION

de la cellule. En 1996, l'équipe de Chandrasegaran développait une stratégie visant à coupler des doigts de zinc avec l'endonucléase bactérienne FokI (Kim *et al.*, 1996) nécessitant de se dimériser afin de couper l'ADN (Bitinaite *et al.*, 1998). Cette particularité implique que toutes les stratégies utilisant cette nucléase nécessitent de concevoir deux séquences cibles spécifiques et suffisamment proches l'une de l'autre. Cette contrainte est cependant un avantage car la séquence nucléotidique cible n'en sera que plus longue et le *design* plus spécifique de la région ciblée. De ce fait, les ZFN sont obtenus suite à un simple assemblage des doigts de zinc avec le domaine de clivage de la protéine FokI. Comme décrit précédemment, cette stratégie fonctionne en dimère et va donc permettre de cibler une séquence de deux fois 9, 12, 15 ou encore 18 nucléotides (Figure 17).

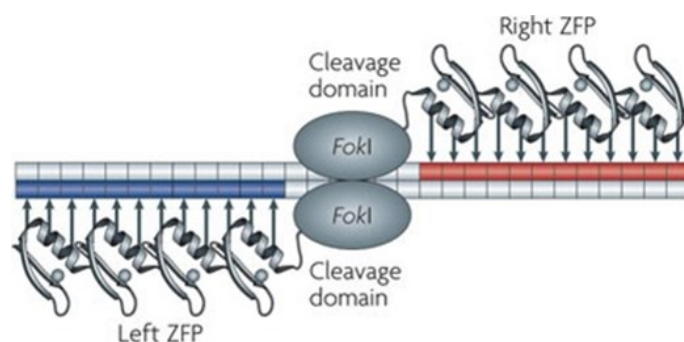


Figure 17. Principe général des ZFN. Les ZFN sont assemblées afin de cibler une séquence spécifique. Leur association avec l'endonucléase FokI permet, lorsque celle-ci sera dimérisée, de créer une cassure double brin à un endroit particulier du génome. (Extrait de Urnov *et al.*, 2010)

Néanmoins, la spécificité de la cassure créée par les ZFN peut être diminuée suite à l'homodimérisation de FokI provenant de la même séquence ZFN, et donc influencer le résultat du *gene editing*. C'est pourquoi, une étude réalisée par Miller *et al.* en 2007, consistait à développer un variant de l'endonucléase FokI incapable de s'homodimériser, dans le but d'améliorer la spécificité des ZFN. (Miller *et al.*, 2007)

A partir de là, il semblait alors possible de cibler n'importe quelle séquence de l'ADN. D'ailleurs, les ZFN ont été utilisés dans un certain nombre d'organismes et lignées cellulaires pour créer des mutations ponctuelles ou invalider un gène grâce à l'introduction de mutations de type InDel (Urnov *et al.*, 2010). Un des points limitant de l'utilisation de cette stratégie est qu'il n'existe pas de code de reconnaissance des ZF, puisque la présence d'un doigt de zinc peut modifier l'affinité du doigt de zinc suivant pour un triplet. Il faut donc créer plusieurs assemblages de ZFN afin de pouvoir déterminer quelle combinaison permettra de cibler la séquence d'intérêt. De plus, une limitation importante quant à l'utilisation des ZN réside dans

INTRODUCTION

la synthèse des paires actives. En effet, même si diverses méthodes ont été développées pour l'assemblage des ZFN, telles que l'assemblage modulaire, l'approche OPEN (Oligomerized Pool Engineering) ou encore l'assemblage contexte-dépendant, ces méthodes nécessitent des compétences bien particulières et pointues et n'offrent qu'un nombre limité de séquences ciblables efficacement (Beerli et Barbas, 2002 ; Maeder *et al.*, 2008 ; Sander *et al.*, 2011).

Aussi, à partir des années 2010, les ZFN ont progressivement laissé la place à des technologies permettant de cibler un plus grand nombre de séquences, mais également moins contraignantes à mettre en place et/ou à assembler.

3.3.2. La technologie des TALEN

3.3.2.1. Description des TALEN

Un nouvel outil générant des cassures double brin à l'ADN, s'est développé durant la dernière décennie afin d'augmenter les possibilités d'édition du génome, il s'agit des TALEN (*Transcription-Activator-Like Effector Nuclease*). Ceux-ci reposent sur une stratégie similaire à celle des ZFN basés sur une association de modules protéiques ayant un domaine de liaison à l'ADN et associés avec l'endonucléase FokI. En effet, les TALEN sont composés d'effecteurs de type III, les TALE (*Transcription-activator-like effector*), qui sont issus d'une bactérie pathogène des plantes (*Xanthomonas*) et qui, à l'état naturel, entrent dans le noyau des cellules hôtes pour y activer la transcription de gènes cibles, favorisant l'infection (Kay *et al.*, 2007 ; Bogdanove *et al.*, 2010). Les TALE sont composés d'une séquence d'adressage à l'ADN (NLS) ainsi qu'un domaine d'activation et d'une région centrale composée de séquences répétées (7 à 30). Chacune de ces répétitions est constituée de 34 acides aminés qui se lient à un nucléotide cible unique (Figure 18.A). Les TALE vont alors s'associer à la séquence nucléotidique cible pour former une hélice autour de l'ADN. Les répétitions qui composent la zone centrale de chaque TALE ont une séquence invariable, mis à part au niveau des nucléotides codant pour les acides aminés 12 et 13. Ce sont ces deux acides aminés qui déterminent la spécificité de liaison aux nucléotides de l'ADN de chacune des répétitions. L'étude de Boch *et al.*, en 2009 a d'ailleurs permis de déchiffrer le code des domaines TALE. Ainsi, les di-résidus variables les plus retrouvés dans les TALE sont les résidus NI (Asn-Ile), HD (His-Asp), NK (Asn-Lys)/NH (Asn-His) et NG (Asn-Gly) qui vont reconnaître respectivement les nucléotides A, C, G et T (Boch *et al.*, 2009) (Figure 18.B). Le di-résidu NN (Asn-Asn) présente la particularité de reconnaître deux nucléotides, à savoir A et G, même s'il reconnaîtra

INTRODUCTION

préférentiellement le nucléotide A. Bien que présentant une spécificité pour le nucléotide G, les di-résidus NK et NH sont en général moins utilisés que les di-résidus NN qui ont une plus forte affinité pour le nucléotide G. Ces résidus peuvent malgré tout être utilisés pour avoir une plus forte spécificité (Boch *et al.*, 2009 ; Streubel *et al.*, 2012) (Figure 18.B et C).

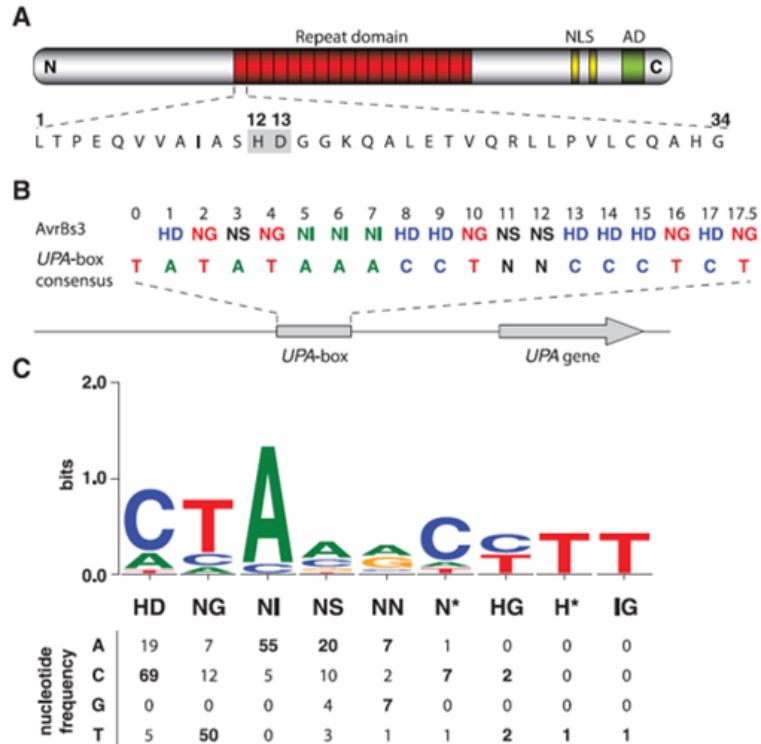


Figure 18. Organisation structurale des TALE et spécificité de reconnaissance des bases de l'ADN. A. Les TALE sont composés d'une séquence d'adressage au noyau (NLS) et d'un domaine d'activation. La séquence centrale des TALE est composée de séquences répétées qui ne varient les unes des autres qu'au niveau des acides aminés 12 et 13. **B.** Chaque combinaison d'acides aminés 12 et 13 va permettre la reconnaissance d'un nucléotide. **C.** Chaque combinaison aura une plus forte affinité pour un nucléotide. Par exemple, la combinaison NI va reconnaître majoritairement un A (Extrait de Boch *et al.*, 2009).

Par cette stratégie, il est donc possible de synthétiser des TALEN, par assemblage modulaire, qui vont reconnaître, dans l'absolu, n'importe quelle séquence d'intérêt. Il faut toutefois prendre en compte une particularité importante : la région N-terminale présente avant les domaines répétés qui va se lier avec le nucléotide T est importante pour la reconnaissance de l'ADN et la stabilité du TALE. Il faut donc que la séquence cible des TALE possède un T en 5' (Doyle *et al.*, 2013). Il est également possible d'en prédire facilement de potentiels effets *off-targets* (Grau *et al.*, 2013).

La fusion de ces TALE de synthèse avec le domaine de clivage à l'ADN de la nucléase FokI autorise la création d'une cassure double brin à n'importe quel site désiré du génome, on

INTRODUCTION

Il passe donc du TALE au TALEN. Il est alors envisageable de créer une cassure double brin et de réaliser de l'édition du génome au niveau d'un site spécifique. Comme décrit précédemment pour les ZFN, la nucléase FokI agit en dimère et il est donc nécessaire de créer une paire de TALEN de part et d'autre du brin d'ADN afin d'induire une cassure double brin en un point précis du génome (Figure 19).



Figure 19. Principe de la technologie des TALEN. Un TALEN est un ensemble de modules (nommés NG, NN, HD ou NI) reconnaissant chacun spécifiquement un nucléotide. De par l'agencement de ces modules, les TALEN vont reconnaître spécifiquement la région du génome d'intérêt. Lorsque les deux TALEN, L et R, sont en place, leurs endonucléases FokI se dimérisent pour provoquer une cassure double brin de l'ADN au niveau de la région souhaitée. Le dernier module est quelque peu différent, il ne contient que 20 résidus (contre 34) et est donc qualifié de demi-répétition, mais contient malgré tous les di-résidus nécessaires à la reconnaissance du nucléotide.

Les sites de reconnaissance de l'ADN par les TALEN sont donc constitués de deux séquences de 14 à 20pb reconnues par chaque module. Ces séquences sont séparées par une séquence pouvant aller de 14 à 24 pb qui va faciliter la dimérisation de la nucléase FokI. C'est donc au sein de cette région que la cassure double brin aura lieu.

3.3.2.2. Assemblage des TALEN

L'utilisation des TALEN se base sur un assemblage rapide et efficace des séquences répétées du TALE artificiel. Bien qu'il puisse sembler difficile de réaliser l'assemblage des TALEN, notamment du fait de la présence d'un grand nombre de séquences répétées, diverses méthodes ont été développées pour diminuer les contraintes liées à cet assemblage. La première méthode consiste à assembler les répétitions par clonage modulaire en *Golden Gate*. Par cette méthode, il est possible d'assembler jusqu'à 10 répétitions par réaction de ligation et donc de réaliser des TALEN en quelques jours seulement. Une deuxième méthode se base sur un assemblage des unités par des ligations successives en utilisant des enzymes de restriction compatibles qui vont créer des extrémités cohésives complémentaires (telles que les enzymes NheI et SpeI). Pour ce faire, il est uniquement nécessaire d'avoir 4 plasmides

INTRODUCTION

contenant les répétitions reconnaissant chaque type de nucléotide. L'assemblage se fait par une étape de restriction/ligation classique (Huang *et al.*, 2011). Enfin, une 3^{ème} méthode a été développée, n'utilisant ni les méthodes de clonages conventionnelles, ni même les étapes de sélection et amplification en bactéries compétentes nécessaires après ligation. Cette méthode repose sur un assemblage automatisé des répétitions en phase solide, appelé FLASH (*Fast Ligation-Based Automatable Solid-phase High-throughput*). Les différentes répétitions sont assemblées sous forme de monomère, dimère, trimères ou encore tétramères. Cette méthode permet la synthèse de TALEN en quelques heures seulement et est utilisée pour la production à grande échelle (Reyon *et al.*, 2012).

Les TALEN ont permis de grandes avancées et sont toujours utilisés pour l'édition du génome. Ils sont utilisables non seulement *in vitro* dans des cellules en culture mais également *in vivo* dans un très grand nombre d'organismes comme le poisson-zèbre, la souris, le rat ou encore le lapin (Dupret et Angrand, 2014).

Bien que les TALENS permettent de cibler n'importe quelle séquence génomique, à partir du moment où elle est précédée d'une thymidine et soient plus faciles à mettre en place que les ZFN, la création d'une cassure double brin nécessite d'introduire 2 constructions distinctes au sein des cellules, les TALEN fonctionnant en dimère. De fait, leur mise en place s'en trouve fastidieuse d'un point de vue expérimental. Même s'ils furent très utilisés au début des années 2010, l'émergence d'une nouvelle stratégie, plus facile à mettre en œuvre, a vu le jour : le système CRISPR-Cas9. La découverte de ce système ainsi que le développement de son application dans le cadre du *gene editing* a relégué les TALEN au second plan.

3.3.3. Le système CRISPR-Cas9

3.3.3.1. Histoire du système CRISPR/Cas

Le système CRISPR-Cas 9 a été développé à partir de protéines appartenant au système de défense contre les virus et autres plasmides découvert vers la fin des années 1980 dans les bactéries *Escherichia coli*. Les séquences répétées (nommées CRISPR par la suite pour *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*) mises en évidence étaient séparées par des séquences d'ADN non répétées, appelées *spacers* (Ishino *et al.*, 1987). Ce n'est qu'une dizaine d'années plus tard, lors du séquençage du génome de phages et des bactéries, que les

INTRODUCTION

chercheurs ont remarqué que des séquences CRISPR étaient retrouvées dans 40% des bactéries et 90% des archées (Mojica *et al.*, 2000). Deux années plus tard, des gènes associés à ces séquences répétées étaient mis en évidence : les gènes associés aux CRISPR nommés « Cas » pour *CRISPR associated* (Jansen *et al.*, 2002). Il fut finalement démontré que les *spacers* étaient des séquences d'ADN viral ou encore d'autres éléments génétiques mobiles (Mojica *et al.*, 2005 ; Bolotin *et al.*, 2005). Ainsi, les travaux de Barrangou et collaborateurs ont montré qu'après introduction d'une charge virale dans des bactéries de type *Streptococcus thermophilus*, un nouveau *spacer* au sein des séquences CRISPR faisait son apparition et que celui-ci contenait une partie de la séquence virale. La bactérie avait donc intégré une courte séquence de ce phage au sein même de son génome. Ils mettaient également en évidence que la séquence du CRISPR influençait par ailleurs la spécificité de ciblage des enzymes Cas, aboutissant à une défense ciblée contre ce phage (Barrangou *et al.*, 2007). En effet, l'activité de ces enzymes est catalysée par un petit ARN CRISPR (crRNA) transcrit à partir des séquences *spacers*. Il a également été prouvé que la présence de ce crRNA entraîne un blocage du transfert de l'ADN viral au génome bactérien (Brouns *et al.*, 2008 ; Marraffini et Sontheimer, 2008). D'autres découvertes majeures ont ensuite permis de décrypter le mécanisme d'action du système CRISPR. Il a ainsi été montré que les séquences *spacers* sont similaires les unes par rapport aux autres au niveau d'une région appelé *protospacer-adjacent motif*, qui se révélera être la séquence clivée par la Cas9 (Deveau *et al.*, 2008). Ensuite, il a été démontré que la protéine Cas9 était la seule protéine Cas à avoir une activité catalytique à l'ADN (Garneau *et al.*, 2010). Enfin, les travaux de Saprunauskas *et al.* en 2011 montraient que le système CRISPR/Cas de bactéries *Streptococcus thermophilus* était transférable et fonctionnel dans des bactéries *Escherichia coli* et leur conférait donc une protection (Saprunauskas *et al.*, 2011)

3.3.3.2. Mécanismes d'action du système CRISPR-Cas bactérien

Afin de comprendre le fonctionnement du système CRISPR-Cas9 utilisé aujourd'hui pour réaliser du *gene editing*, il semble utile de connaître les mécanismes de défense des bactéries dont il est issu. Il existe chez les procaryotes deux groupes décrits de système CRISPR qui dépendent de l'organisation des gènes Cas situés en amont des séquences CRISPR. Le groupe 1 contient les CRISPR de type I et type III et est retrouvé communément chez les archées. Le groupe 2 contient les CRISPR de type II, IV, V et VI. Dans le cadre du *gene editing*, le système

INTRODUCTION

CRISPR le plus utilisé actuellement est le système de type II, seul système détaillé ici donc, issu de bactéries *Streptococcus pyogenes* (spCas9) (Figure 20).

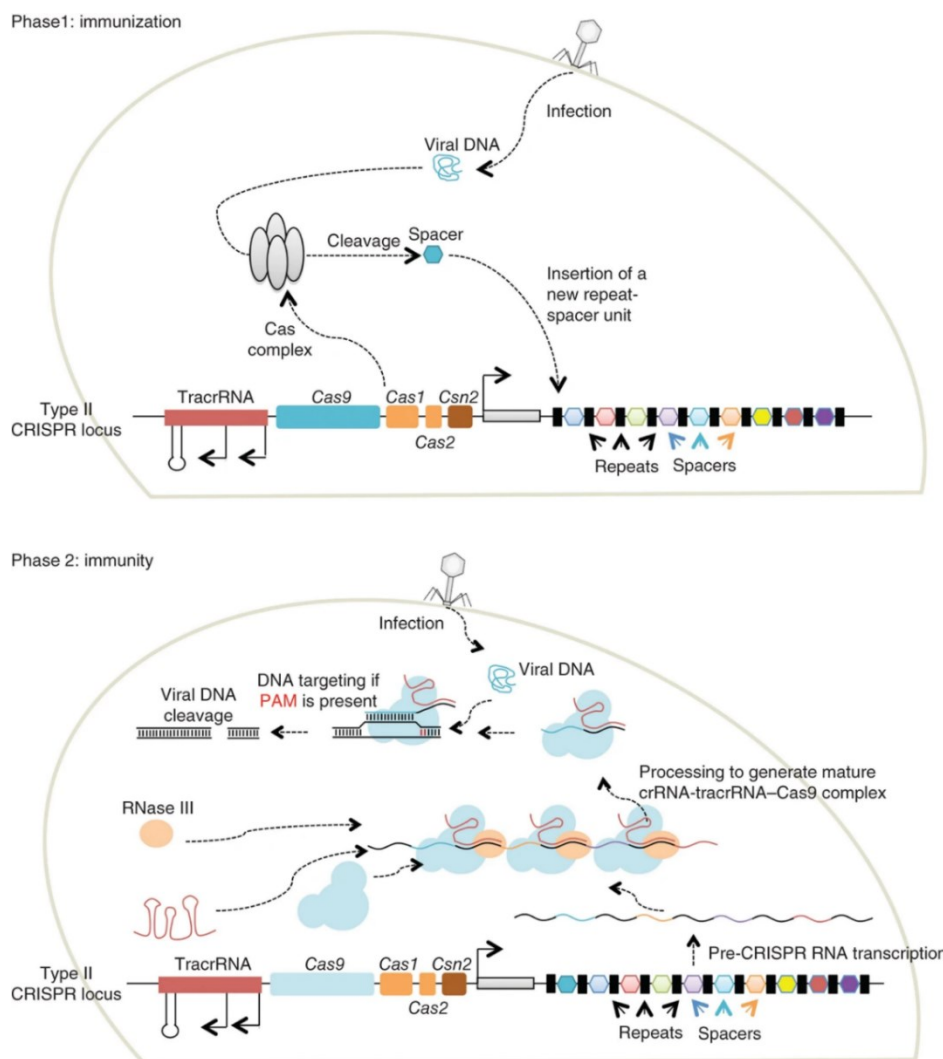


Figure 20. Mécanisme de défense bactérien dont est issu le système CRISPR-Cas9. Phase 1. Lors de l'infection par un virus, celui-ci va libérer son ADN, qui sera ensuite pris en charge par le complexe protéique Cas issu du cluster de gènes situé en amont des séquences CRISPR. Cet ADN viral sera ensuite clivé pour former le *spacer* (environ 30 paires de bases, qui va venir s'insérer au sein d'une nouvelle unité [séquence répétée-*spacer*]). **Phase 2.** La bactérie va ensuite transcrire l'ensemble des séquences CRISPR ainsi que les *spacers* et formera ainsi un long ARN pré-CRISPR. La RNase III va ensuite cliver cet ARN afin de produire de multiples petits ARN contenant une séquence répétée et un *spacer*, formant ainsi un RNA CRISPR (crRNA). Le dernier élément du locus CRISPR est le crRNA transactivateur (tracrRNA), qui est un ARN possédant un domaine partiellement complémentaire de la séquence répétée. Le crRNA va s'associer avec le tracrRNA pour former l'ARN guide (ARNg), ce complexe va ensuite activer la Cas9 et va la guider vers l'ADN viral dans le cadre d'une nouvelle infection. La protéine Cas9 contient deux régions capables d'avoir une activité nucléase, créant ainsi une cassure double brin. Celle-ci va d'abord se lier à la séquence PAM qui lui est propre, et qui se trouve à proximité de l'ARN guide (Extrait de Mali *et al.*, 2013).

INTRODUCTION

3.3.3.3. Application au gene editing

C'est en 2012 que l'utilisation du système CRISPR a connu son envol dans le cadre d'expériences de *gene editing*. En effet, alors que le crRNA et le tracrRNA sont naturellement deux entités différentes au sein de la cellule bactérienne qui vont s'associer pour jouer un rôle en complexe, l'équipe de Charpentier *et al.* ont eu l'idée de les fusionner afin d'obtenir un unique ARN guide (ou RNAsg pour *RNA single guide*) chimérique composé de deux parties : une partie variable de 16 à 20 nucléotides ciblant une séquence d'intérêt et une séquence fixe de 40 nucléotides (Jinek *et al.*, 2012) (Figure 21.A). Cette découverte est l'élément déterminant dans l'utilisation de ce système pour la réalisation de *gene editing*, entraînant immédiatement une augmentation exponentielle dans l'utilisation du CRISPR-Cas9, (Figure 21.B). Cette découverte les conduisait par ailleurs à l'obtention du prix Nobel de chimie en 2020.

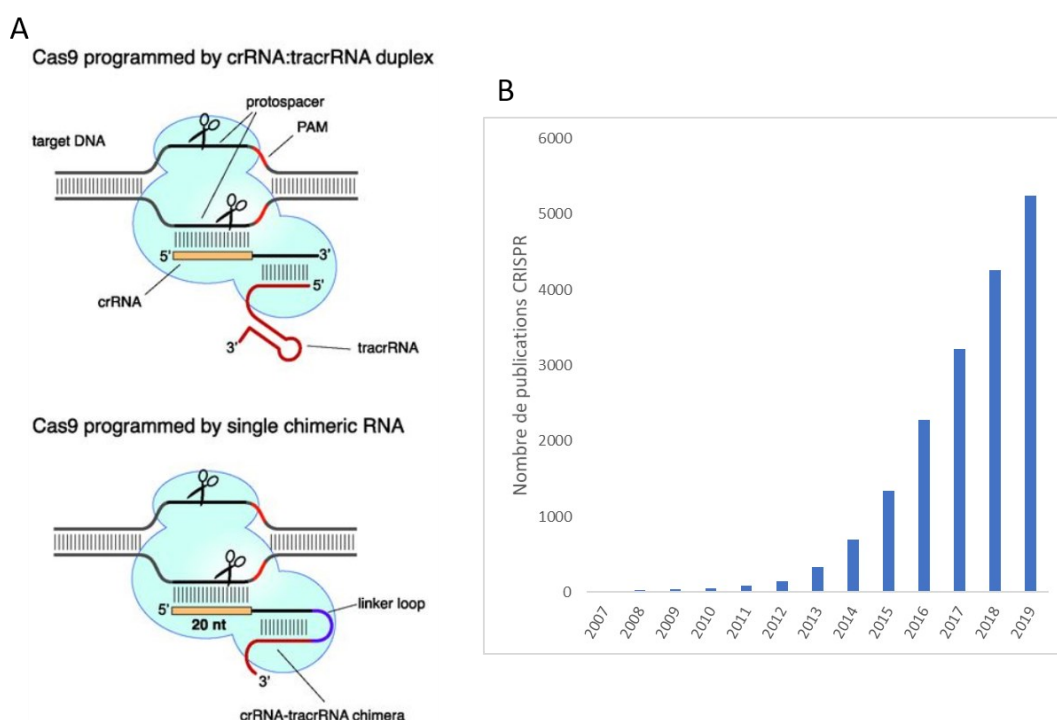


Figure 21. Création d'un ARN guide unique et essor du système CRISPR-Cas9. A. En 2012, les travaux de Jinek et collaborateurs ont créé un ARN chimérique qui consiste en la fusion du crCRISPR spécifique de la séquence cible et du tracrRNA, qui s'apparient en condition naturelle et qui sont nécessaires à l'activation de la Cas9 (Extrait de Jinek *et al.*, 2012) **B.** A partir de ces travaux, les publications impliquant le système CRISPR-Cas9 ont connu une croissance exponentielle, passant de 145 publications par an en 2012 à 5247 en 2019.

Les systèmes CRISPR offrent un champ large d'application, puisque facile, rapide et efficace, et donnent l'opportunité de cibler n'importe quelle séquence de l'ADN. Un des facteurs à prendre en compte lors de l'utilisation du système CRISPR et notamment au niveau du design

INTRODUCTION

de l'ARNg, est la séquence PAM de la Cas9 utilisée. Les séquences PAM étant fréquemment retrouvées dans tous les génomes, elles ne constituent pas un facteur limitant quant à la séquence que l'on souhaite cibler, mais il est nécessaire d'avoir une séquence PAM à proximité de la séquence cible de l'ARNg. La protéine spCas, la plus utilisée, a pour séquence PAM la séquence NGG où N désigne n'importe quelle base suivie de deux guanines. La Cas9 va ensuite se lier au complexe ARNg/ADN. Il est néanmoins envisageable d'utiliser des protéines Cas9 provenant d'autres bactéries et qui possèdent des séquences PAM différentes.

3.3.3.4. Effets *off-target* et améliorations apportées

Les effets *off-target* sont un autre point important à prendre en compte lors de l'utilisation du système CRISPR. En effet, ce système étant issu d'un mécanisme de défense contre des virus, pouvant potentiellement muter, la spécificité relative des CRISPR semblerait finalement être un avantage pour les bactéries, mais représente de ce fait un important désavantage pour la réalisation de *gene editing*. Il a d'ailleurs été démontré que le système CRISPR-Cas9 pouvait avoir de nombreux effets *off-target*, pouvant engendrer des modifications non souhaitées, telles que des insertions, délétions ou même des réarrangements chromosomiques sur des loci tiers (Fu *et al.*, 2013). En effet, les nucléases sont capables de se fixer malgré des mésappariements et selon le niveau d'expression du CRISPR, les effets *off-target* peuvent être plus ou moins importants (Pattanayak *et al.*, 2013). Diverses équipes de recherches ont donc développé des méthodes afin de prédire les effets *off-target* du système CRISPR-Cas9. A titre d'exemple parmi tant d'autres, des bases de données ont été créées afin de déterminer les potentiels effets *off-target* des CRISPR, comme Cas-OFFinder, GUIDE-Seq, ou encore CRISPOR (Bae *et al.*, 2014 ; Tsai *et al.*, 2015 ; Haeussler *et al.*, 2016). D'autres stratégies visant à réduire la possibilité d'effets *off-target* ont été mises en place, comme par exemple, utiliser une Cas9 nickase. Comme indiqué dans son nom, cette protéine va créer non pas créer une cassure mais un *nick* (entaille) sur un brin de l'ADN. Cette stratégie ressemble aux ZFN et TALEN dans l'idée puisque pour obtenir une cassure double brin, il faut donc un second RNAsg avec une séquence cible se trouvant sur le second brin et proche de la première séquence (Ran *et al.*, 2013). Ainsi, par cette méthode, il n'y aura cassure que si les deux séquences cibles sont reconnues, ce qui augmente la spécificité. Dans le même registre, une autre stratégie vise à réduire les effets *off-targets*, en utilisant le domaine de clivage de la protéine FokI (utilisé dans les ZFN et les TALEN) dans une Cas9 mutée dans ses deux domaines catalytiques. Dans cette

INTRODUCTION

stratégie, il faut également utiliser une deuxième construction, et donc cibler deux séquences qui se trouvent proches, afin de permettre la dimérisation de la protéine FokI, réduisant le risque d'effet *off-target* (Tsai *et al.*, 2014). Enfin, des stratégies de mutagenèse de la protéine Cas9 ont abouti à la création de Cas9 « *High fidelity* ». La première, nommée Cas9-HF1, présente quatre mutations impactant le domaine d'interaction de la nucléase avec l'ADN. La seconde, la protéine eSpCas9(1.1) porte trois autres mutations. Dans ces deux cas, l'utilisation de cette protéine conduit à une importante diminution, voire même une élimination des effets *off-target* par le système CRISPR-Cas9, en réduisant les contacts avec de l'ADN non spécifique (Kleinstiver *et al.*, 2016 ; Slaymaker *et al.*, 2016)

3.3.3.5. Comparatif des trois méthodes

Chaque outil possède ses propres avantages et inconvénients, mais il est désormais clair que le système CRISPR-Cas9 est actuellement l'outil de *gene editing* le plus simple et le plus rapide à mettre en place, mais également un des plus spécifiques suites aux améliorations apportées décrites précédemment (Figure 22).

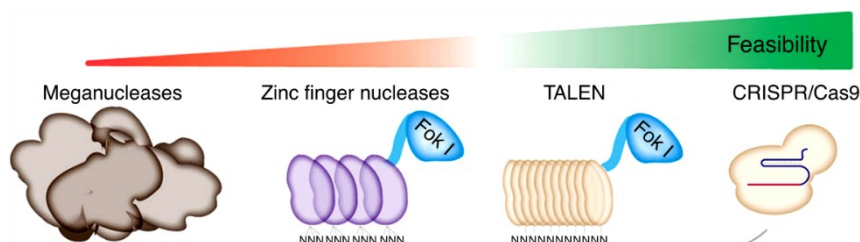


Figure 22. Les principaux outils de *gene editing*. Les méganucléases ainsi que les ZFN étaient les premiers outils développés pour créer une cassure double-brin de l'ADN. Leur mise en place reste cependant fastidieuse et ne permettent pas de cibler n'importe quelle séquence du génome. Le système CRISPR-Cas9 se distingue des TALEN par sa facilité de création et d'utilisation, ce qui en fait l'outil le plus utilisé à l'heure actuelle (Adapté de Adli, 2018).

Du point de vue de la fonctionnalité, les méganucléases ne permettent pas de cibler n'importe quelle séquence d'ADN et même si les ZFN apportent plus d'ouverture par rapport à cela, puisque modulables, il n'est néanmoins pas possible de cibler toutes les séquences d'un génome. Au contraire, les TALEN et les CRISPR permettent le ciblage de n'importe quelle séquence, la seule condition étant que la séquence cible soit précédée d'une thymidine avant chaque TALEN ou suivi d'une séquence PAM (NGG pour spCas) dans le cadre du système CRISPR-Cas9 (Tableau 4).

INTRODUCTION

Un autre point impactant la difficulté d'utilisation de ces outils est leur conception. Les méganucléases sont des protéines naturelles qui sont peu, voire même pas du tout, modifiables, tandis que l'assemblage et la mise en place des ZFN nécessite des connaissances pointues en termes de biologie moléculaire notamment d'un point de vue assemblage de protéines, élément central de la liaison des ZFN avec l'ADN. Les TALEN sont modérément faciles à assembler, nécessitant quelques connaissances en termes de clonage, alors que le système CRISPR ne nécessite aucun assemblage particulier, il est seulement nécessaire de synthétiser un oligonucléotide pour la séquence ciblée (Tableau 4).

Enfin, un dernier point technique qui permet de distinguer le système CRISPR-Cas9 des autres outils de *gene editing*, est la délivrance des outils à la cellule. Exception faite du cas où une nickase Cas9 est utilisée, un seul vecteur contenant la Cas9 et l'ARN guide est nécessaire. Dans le cas des ZFN et des TALEN, il faut deux vecteurs contenant chacun un bras. Notons que si les méganucléases et les ZFN sont faciles à introduire *in vivo*, du fait de la petite taille, les TALEN et le système CRISPR-Cas9 présentent des séquences plutôt larges, limitant leur pénétration dans les cellules (Tableau 4).

INTRODUCTION

	Méganucléases	ZFN	TALEN	CRISPR-Cas9
Site de reconnaissance	Entre 14 et 40bp	9 à 18 pb par monomère (18 à 36 par paire)	14 à 20 pb par monomère (28 à 40 par paire)	20pb (40 si utilisation de la nickase)
Spécificité	Faible nombre de mésappariements tolérés	Faible nombre de mésappariements tolérés	Faible nombre de mésappariements tolérés	Plusieurs mésappariements tolérés
Contraintes des séquences cibles	Cible très peu de séquences, difficilement modifiables	Difficile de cibler des séquences non riches en G	Pour chaque monomère de TALEN, celui-ci doit être précédé par un T en 5'	La séquence ciblée doit posséder la séquence PAM de la Cas9
Facilité de création	Difficile	Difficile, nécessite des connaissances en modification de protéines	Modérée (rapide mais nécessite des méthodes de clonage complexes)	Facile (Clonage + synthèse oligonucléotide)
Accès aux cellules <i>in vitro</i>	Relativement facile avec des méthodes telles que l'électroporation ou la transduction virale			
Accès aux cellules <i>in vivo</i>	Relativement facile grâce à la petite taille des méganucléases	Relativement facile grâce à la petite taille des cassettes d'expression des ZFN (utilisées dans plusieurs vecteurs viraux)	Difficile à cause de la taille importante de chaque TALEN mais également à cause des répétitions de l'ADN (possibilité de recombinaison dans les vecteurs lentiviraux)	Modéré selon le choix de la Cas9 (la séquence du spCas9 est longue mais il existe des orthologues plus petits)

Tableau 4. Comparatif des principaux outils de *gene editing*. Tableau reprenant les principales différences entre les méganucléases, les ZFN, les TALEN et le système CRISPR-Cas9 au niveau des contraintes du design, de leur facilité de mise en place et d'introduction au sein des cellules *ex vivo* et/ou *in vivo*. (Adapté de Cox *et al.*, 2015)

Objectifs de la thèse

OBJECTIFS DE LA THESE

Les DIPG sont les tumeurs cérébrales ayant un pronostic des plus sombres puisque ne répondant que très peu, voire pas, aux différents traitements de chimio et radiothérapies (Gallitto *et al.*, 2019). Ces tumeurs sont notamment caractérisées par une mutation récurrente au niveau de l'histone H3, la mutation H3K27M, qui est retrouvée dans plus de 80% des cas de DIPG et a donné lieu à une nouvelle dénomination qui lui est propre, définie par l'OMS en 2016, qui est « Gliomes diffus de la ligne médiane mutés H3K27M ». Il est désormais acquis que les mutations H3K27M sont un évènement primitif et prédominant dans la tumorigénèse (Funato *et al.*, 2014 ; Pathania *et al.*, 2017 ; Larson *et al.*, 2019 ; Harutyunyan *et al.*, 2019 ; Nikbakht *et al.*, 2016). Bien que plusieurs voies de signalisation aient été décrites comme impactées par la présence de la mutation H3K27M (Harutyunyan *et al.*, 2019 ; Larson *et al.*, 2019 ; Nagaraja *et al.*, 2019 ; Silveira *et al.*, 2019), l'implication de la mutation dans la résistance aux traitements des DIPG demeure à ce jour peu documentée. Or, si d'un point de vue fondamental, l'implication de la mutation dans la tumorigénèse est une question nécessaire et récurrente, d'un point de vue clinique, son implication dans la résistance aux traitements est pour nous la question primordiale.

C'est pourquoi, l'objectif de mes travaux de thèse était d'évaluer le rôle de la mutation H3.3K27M sur le caractère agressif et résistant des gliomes de haut grade pédiatriques, dont les DIPG bien entendu.

Etant donné le faible nombre d'échantillons biologiques disponibles, mes travaux porteront sur des lignées cellulaires de gliome pédiatriques et de DIPG. Dans ce contexte, j'ai mis en œuvre deux stratégies complémentaires impliquant la création de modèles cellulaires, à savoir :

- ❖ Introduire la mutation dans des lignées cellulaires de gliomes pédiatriques initialement non mutées H3K27M
- ❖ Corriger la mutation, par *gene editing* dans des lignées de DIPG mutées H3.3K27M.

Sur la base de ces modèles, j'ai ainsi pu évaluer l'impact de la mutation sur divers aspects cellulaires et moléculaires en lien avec la résistance aux traitements de ces tumeurs.

Résultats

RESULTATS

1. Induction de la mutation H3.3K27M dans des lignées cellulaires de gliome pédiatrique

1.1. Lignées cellulaires de gliome pédiatrique

Bien que les mutations H3K27M sont caractéristiques des gliomes de la ligne médiane, en particulier des DIPG, celles-ci sont également retrouvées dans 42% des gliomes de haut grade pédiatriques (tout sous-type confondu) ainsi que dans des gliomes de bas grade issues de la ligne médiane (Mackay *et al.*, 2017; Mosaab *et al.*, 2020). Ainsi, nous avons choisi d'établir des modèles d'inductions de la mutation H3.3K27M dans 3 lignées cellulaires, présentant une origine, un grade et des profils mutationnel distincts.

Les lignées Res259, SF188 et KNS42 étaient gracieusement fournies par le Dr Chris Jones, de *'Institute of Cancer Research, Sutton, Royaume-Uni*. Ces lignées avaient ainsi été préalablement caractérisées par Bax et collaborateurs en 2009 (Tableau 5, Figure 23) (Bax *et al.*, 2009 ; Ishii *et al.*, 1999 ; COSMIC database). Alors que les lignées SF188 et KNS42 sont des lignées de haut grade pédiatriques (Grade IV), la lignée Res259 est quant à elle une lignée de bas grade (Grade II), selon la classification de l'OMS. L'ensemble de ces lignées, issues de patients âgés de 4 à 16 ans, était établie à partir de tumeurs toute d'origine astrocytaire, comme en atteste la présence de la Glial fibrillary acidic protein (GFAP), de la protéine S100 ou encore de la vimentine. Une différence moléculaire majeure entre ces lignées est que la lignée Res259, contrairement aux deux autres, ne présente pas de cellules positives aux marqueurs CD133 et ne présente pas de positivité à la Nestine en immunohistochimie, suggérant une quantité négligeable, si ce n'est moindre de cellules souches cancéreuses (Tableau 5, Figure 23).

RESULTATS

Lignée	Grade OMS	Diagnostic	Age	Temps de doublement	Mutation <i>TP53</i>	Immunohistochimie			
						GFAP	S100	Vimentine	CD133
Res259	II	AD	4ans	24h	nc	+	++	+++	0%
SF188	IV	GBM multiforme	8ans	26h	✓	++	++	+++	7%
KNS42	IV	GBM multiforme	16ans	48h	✓	+++	+++	+++	4%

Tableau 5. Caractéristiques des lignées de gliomes pédiatriques. Pour chaque lignée : grade OMS, type tumoral, âge de survenue, temps de doublement, statut mutationnel *TP53* et positivité aux marqueurs déterminé par immunohistochimie : (+++) Fortement positif, (++) modérément positif, (+) faiblement positif, (nc) non connu, d'après les données de Ishii *et al.*, 1999, Bax *et al.*, 2009 et de la base de données COSMIC. AD : Astrocytome diffus. GBM : Glioblastome

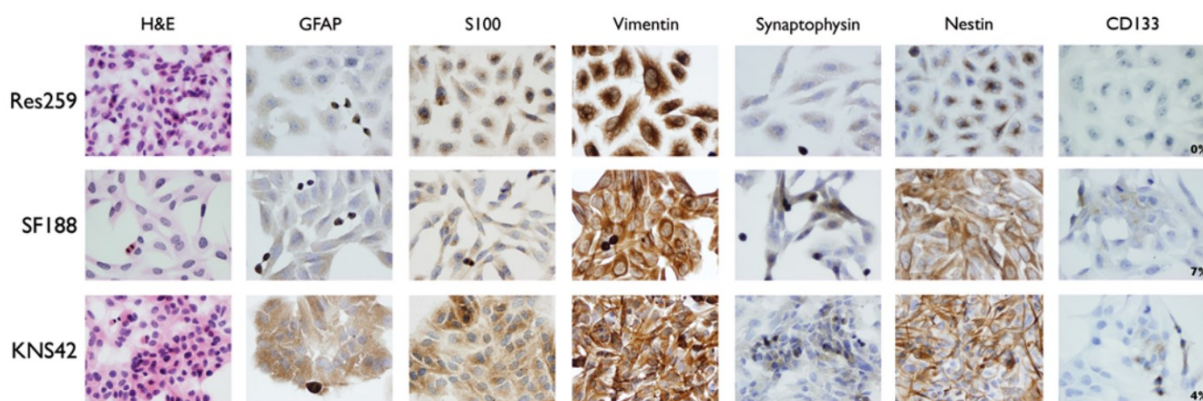


Figure 23. Immunophénotypage des cellules de gliome pédiatrique. Les cellules étaient cultivées en monocouches adhérentes et marquées avec divers marqueurs de cellules gliales et souches tels que GFAP, S100, vimentine, nestine et CD133. (H&E) Hématoxyline et éosine (Adapté de Bax *et al.*, 2009).

RESULTATS

Article 1: Oncogenic impact of H3.3K27M induction in pediatric glioma cell lines

H3.3K27M mutation promotes cell growth and resistance to therapies in low grade pediatric glioma cell line

Introduction

Les nombreux essais cliniques entrepris dans les DIPG n'ont, encore à ce jour, malheureusement apporté aucun réel bénéfice pour les patients qui en sont porteurs. De ce fait, le traitement de référence des DIPG demeure une prise en charge que l'on pourrait qualifier de palliative, reposant quasi exclusivement sur un traitement par radiothérapie. La découverte en 2012 de mutations somatiques récurrentes au sein des DIPG, les mutations H3K27M, a conduit l'OMS à définir en 2016, une nouvelle entité de gliomes de la ligne médiane : les gliomes de la ligne médiane mutés H3K27M (Louis *et al.*, 2016). Il est désormais démontré que ces mutations sont impliquées dans la genèse des DIPG. Néanmoins, le rôle de ces mutations au moment du diagnostic, notamment sur la résistance aux traitements de ces tumeurs, demeure flou. En effet, diverses études se sont intéressées à l'impact de la mutation sur le remodelage de la chromatine et ses capacités à induire la tumorigénèse (Funato *et al.*, 2014; Pathania *et al.*, 2017; Larson *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020). Ainsi, ces études se penchaient davantage sur les effets moléculaires et épigénétiques induits par la mutation et ne s'intéressaient que peu aux effets biologiques liés à la présence ou non de celle-ci. C'est dans ce contexte que nous avons initié, au sein du laboratoire, ces travaux visant à évaluer le rôle de ces mutations, non plus sur l'origine de la tumeur, mais bien sur leurs caractéristiques biologiques et la résistance aux traitements. Pour ce faire, nous avons induit la mutation H3.3K27M, la forme la plus fréquente et liée au plus mauvais pronostic, dans des lignées de gliome pédiatrique initialement non-mutés pour la lysine 27 de l'histone H3.

RESULTATS

Résultats

J'ai ainsi entrepris l'établissement de lignées cellulaires de gliomes pédiatriques, initialement non mutées H3K27M, dans lesquelles j'ai introduit le gène *H3F3A* muté, afin d'exprimer la protéine mutée H3.3K27M mais également, en contrôle, la protéine sauvage H3.3 non mutée. J'ai ainsi établi ce modèle, H3.3K27M vs. H3.3, dans 3 lignées cellulaires de gliomes pédiatriques sus-tentoriels : la lignée Res259 (Grade II), la lignée SF188 (Grade IV) et la lignée KNS42 (Grade IV).

Pour mettre en place cette stratégie, j'ai introduit dans mes cellules, par transfection plasmidique, le gène *H3F3A* (muté ou non) fusionné avec le rapporteur fluorescent mCherry. J'ai alors pu vérifier la localisation nucléaire de la protéine par microscopie. Puis j'ai validé la présence de la mutation d'un point de vue protéique, par western blot, ainsi que les effets épigénétiques associés à la mutation, à savoir la perte de la marque H3K27me3 et la diminution de la marque H3K27me2.

Fort de ces résultats, j'ai, dans un premier temps, évalué l'impact de la mutation sur la croissance cellulaire. J'ai ainsi pu montrer que la mutation induisait une accélération de la croissance cellulaire ainsi qu'une augmentation des propriétés clonogéniques des cellules mutées dans 2 des 3 lignées testées (Res259 et SF188), et ce bien que la distribution des cellules dans le cycle cellulaire lors de la phase de croissance ne soit pas significativement impactée par l'introduction de la mutation. Une analyse de l'expression de gènes impliqués dans les voies de signalisation apoptotique et TGF- β /BMP dans la lignée Res259, nous permettait d'observer des altérations de ces voies suite à l'introduction de la mutation. Ainsi, grâce à notre collaboration avec le Dr Marie Castets (CRCL, Lyon), nous mettons en évidence une dérégulation de la voie des BMP (Bone Morphogenetic Proteins) ainsi qu'une perturbation de l'équilibre des voies de mort cellulaire. Ces altérations pouvaient être à l'origine de points de résistance spécifiques et avoir un impact putatif sur la réponse aux traitements.

Une analyse par *RNAseq* sur nos modèles permettait par ailleurs de mettre en évidence que la mutation H3.3K27M apportait une signature identifiée comme liée à EZH2 et à la marque H3K27me3, confortant la spécificité des altérations induites dans les trois lignées cellulaires.

RESULTATS

Cette analyse nous permettait également de mettre en évidence un enrichissement de gènes impliqués dans la voie PI3K-Akt.

J'ai ensuite évalué l'impact de la mutation sur la résistance aux traitements de ces cellules. Tout d'abord, compte tenue de la place prépondérante qu'occupe la radiothérapie dans la prise en charge des gliomes de haut grade de l'enfant, je me suis intéressé à l'impact de l'induction d'H3.3K27M sur la réponse des cellules à la radiothérapie. Or, que ce soit dans le cadre d'un schéma monofractionné, ou suite à un schéma d'irradiation fractionné, les cellules Res259 et KNS42 exprimant la protéine mutée présentaient une sensibilité moindre à la radiothérapie que les cellules exprimant la protéine H3.3 non mutée, suggérant une radiorésistance induite par la mutation. Grâce à notre collaboration avec le Dr Eddy Pasquier (CRCM, Marseille), nous avons pu également déterminer l'impact de la mutation sur la résistance à un panel d'agents de chimiothérapie (détail en annexe 3), à travers un *screening* pharmacologique mené sur une sélection de 80 agents anti-cancéreux. Alors que les lignées de haut grade SF188 et KNS42 n'apparaissaient que peu impactées quant à leur chimio sensibilité suite à l'induction de la mutation, la lignée Res259 présentait d'importants changements provoqués par l'expression de la protéine H3.3K27M. En effet, lors de ce screening, la mutation conférait une chimio-sensibilité significative pour 11 composés et une chimio-résistance pour 22 composés.

L'ensemble de ces résultats sont présentés en détail dans l'article ci-après.

Article 1: Oncogenic impact of H3.3K27M induction in pediatric glioma cell lines.

H3.3K27M mutation promotes cell growth and resistance to therapies in low grade pediatric glioma cell lines

Quentin Bailleul^{a,b}, Andria Rakotomalala^{a,b}, Mélanie Arcicasa^{a,b}, Audrey Hochart^c, Marie Castets^d, Eddy Pasquier^e, Audrey Vincent^b Pierre-Olivier Angrand^b, Xuefen Le Bourhis^b, Pierre Leblond^{d,f}, Alessandro Furlan^{a,b}, Samuel Meignan^{a,b}

^aTumorigenesis and resistant to treatment unit, Centre Oscar Lambret, Lille, France

^bUniv. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut de Recherche contre le Cancer de Lille, UMR9020 – UMR-S 1277 - Canther – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

^cLille University hospital center, Lille, France

^dLyon Cancer Research Center- Inserm U1052, Lyon, France

^eAix-Marseille University, Inserm, CNRS, Paoli-Calmettes Institute, Cancerology Center Research of Marseille, Marseille, France

^fLyon Pediatric Hematology and Oncology Institute, Lyon, France

Short title : Oncogenic impact of H3.3K27M induction in pediatric glioma cell lines

Keywords: H3.3K27M, Glioma, Child, Resistance to therapies, DIPG

Conflicts of interest : none declared

Introduction

Tumors of the central nervous system (CNS) are the more frequent solid tumors in children, representing around 25% of cancers¹. Glial tumors, or gliomas, represent approximately 50% of brain tumors². In this group, there is a distinction between low-grade glioma (LGG, WHO grade I & II) and high-grade glioma (HGG, WHO grade III & IV). Patient survival is conditioned by the histological type with a 5-year survival of 91% for LGG and 46% for HGG³. Among them, there is a very distinct entity: The Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG), which accounts for 15 to 20% of childhood CNS tumours⁴. They have the worst prognosis with a median survival no longer than 12 months and a 2-year survival rate of around 10%⁵. Resection is limited due to the location in the brainstem and also to the infiltrative properties of DIPG.

DIPG are exclusively pediatric, requiring specific studies since extrapolation of data obtained from adult glioma patients is inappropriate⁶. DIPGs are characterized by a high resistance to chemotherapy and targeted therapies and also a high resistance to ionizing radiations. Indeed, numerous clinical assays were lead for 40 years, but no one significantly increased the patient's survival⁷. The current treatment remains fractionated radiotherapy (1,8Gy daily for 30 days)⁸.

The discovery of a somatic mutation in histone H3 genes, the H3K27M mutations, gives new insight into our understanding of pediatric high-grade glioma, and especially DIPG^{9,10}. If these mutations are present in 42% of pediatric high-grade glioma (pHGG), 80% of DIPGs exhibit a H3K27M mutation^{11,12}. This mono-allelic mutation leads to a replacement of the lysine by a methionine in position 27 of the histone H3 coding genes. This mutation affects more frequently the H3F3A gene (around 73% of cases), coding the H3.3 variant, but was also found in HIST1H3B/C gene, coding for the H3.1 variant (around 26 % of cases). Mutation in the H3.2 variant was also found in a few tumors. H3K27M mutation has a dominant-negative effect that leads to a global loss of the H3K27me3 epigenetic mark in the genome¹³. It has already been shown that H3K27M is an early event and promotes tumorigenicity in combination with *TRP53* mutation and *PDGFRA* amplification¹⁴⁻¹⁶. In this respect, in the 2016 update of the WHO classification, a new entity was defined and named « Diffuse midline glioma, H3K27M mutant »¹⁷.

Therapies targeting epigenetic alterations linked to the H3K27M mutation have been evaluated. While promising pre-clinical results using GSK-J4, an inhibitor of the demethylase JMJD3 responsible for the demethylation of H3K27, were obtained, it seems that this drug is rapidly transformed *in vivo* in GSK-J1, which has a limited cell permeability limiting its therapeutic potential^{18,19}. Panobinostat, an HDAC inhibitor, was highlighted in a screening of pharmacological molecules in DIPG, independently of the H3K27M status²⁰. However, the ability of this drug to improve the survival of DIPG-xenografted mice was only partial^{20,21}. Some studies underlined the role of the H3.3K27M mutation in Notch pathway²² or in increasing cancer-testis antigens expression²³. Thus, these studies evaluated the potential of some inhibitors specific of these targets. However, to the best of our knowledge, no study evaluated so far, the impact specific to the mutation in DIPG cells' resistance to a panel of chemotherapies or ionizing radiations.

This work aimed to evaluate the impact of H3K27M induction in both low- and high-grade glioma context. For that purpose, we introduced the mutation in one pLGG cell line and two pHGG cell lines. We then assessed the impact of the mutation on epigenetic marks and biological effects like cell growth and clonogenic properties, and gene expression. Finally, we evaluated, for the first time, the impact of the mutation on the response to not only a panel of anticancer drugs but also to ionizing radiations.

Materials and Methods

Cell culture

Human pediatric high-grade glioma cell lines, SF188, KNS42 and UW479, were kindly provided by Dr Chris Jones (The Institute of Cancer Research, Sutton, UK). All pHGG cell lines were grown as a monolayer in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, non-essential amino acid solution and antibiotics cocktail (Life Technologies). All cell lines were free of mycoplasma contamination. Cells were incubated in a humid atmosphere at 37 ° C with 5% CO₂.

H3F3A H3K27M / H3F3A induction.

Cells were dissociated, collected and 1x10⁶ cells was transfected using Cell Line Nucleofector™ Kit V (Lonza) with 1µg of plasmid containing K27M mutated *H3F3A* gene fused with *mCherry* fusion gene, and bearing a resistance gene for hygromycin B. As a control, original cells were also transfected with the same plasmid containing the WT *H3F3A* gene. After 2 days, Hygromycin B was added at 400 µg/mL. After 2 weeks of selection, cells were sorted with an ARIA III SORP (Becton-Dickinson) flow cytometer using laser at 561nm and the emission filter 610/20.

Confocal microscopy

The cells were seeded in a chambered coverslip type µ-Slide 8 well (Ibidi) in the amount of 25,000 cells per well. After 24 to 48 hours of incubation, cells were labeled with Hoechst (NucBlue, Invitrogen) in order to visualize the cell nuclei. Cells were then observed by confocal microscopy (LSM 880, Zeiss), using diode Laser (405 nm) and Diode Laser (561 nm) in the channels corresponding to this marker (emission filter 445/50) and to the mCherry (emission filter 605/70) (20X magnification).

Western blot

For western blot analysis, histones were collected using histone extraction kit (Abcam). Protein concentration was determined by BCA Assay (Bio-Rad). The following primary antibodies were used: Rabbit anti-H3K27M diluted 1/1000 (Abcam), rabbit anti-H3.3 diluted 1/1000 (Abcam), rabbit anti-H4 diluted 1/1000 (Cell Signalling), rabbit anti-H3K27me1/me2/me3 diluted 1/1000 (Cell Signaling), rabbit anti-H3K27ac diluted 1/1000 (Abcam). Membrane was washed using TBS-Tween 0.2% solution and secondary anti-rabbit (Cell Signaling) coupled with HRP was diluted at 1/2000 in BSA buffer. After washing, membrane was revealed using Luminata Crescendo Western HRP Substrate (Merck Millipore). To detect signal, we used Fusion Solo S system (Vilber Lourmat).

Growth assay

Cells were dissociated, collected and counted. Cells were seeded in 96-well plates (250 cells/well for SF188 and Res259 and 500 cells/well for KNS42) and the plate was placed in an Incucyte incubator (Essen Bioscience) that measured the confluency daily throughout the experiment.

Cell cycle analysis

Cells were collected and 5x10⁵ cells were incubated 30min with Vybrant™ DyeCycle™ Violet Stain (ThermoFischer Scientific). Cell cycle was analyzed by flow cytometry using CytoFLEX (Beckman Coulter), using violet laser at 430nm, with emission filter 450/45. Analysis was realized using Modfit software.

RT-qPCR assay

The total RNA of Res259-H3.3 and Res259-H3.3K27M was extracted using the Nucleospin RNAII (Macherey-Nagel) kit. 500ng RNA have been retro transcribed using the RT2 First Strand kit (Qiagen), after an additional step of residual genomic DNA elimination. The expression of 84 genes involved in apoptotic signaling pathways or TGF- β /BMP was quantified by qPCR on the cDNAs obtained using the RT2 Profiler PCR Array (Qiagen) kits. The mean of expression of the five calibrating genes *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *RPLP0* was used for normalization of gene panel expression. Res259-H3.3K27M was compared to Res259-H3.3 using the relative quantification method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

RNAseq analysis

RNA sequencing was performed by ICM sequencing platform (Paris, France). Analysis includes the use of FastQ for quality control of sequencing readings, with default settings. Subsequently, the Kallisto software was used for the pseudo-alignment and quantification steps of the abundance of transcripts with the annotations Ensembl version 96. The packages R tximport and AnnotationHub were used to summarize the abundance of transcripts. The parameters used for tximport were type=kallisto, ignoreTxVersion=True and countsFromAbundance=lengthScaledTPM. The tx2gene parameter was provided using the Ensembl version 96 annotations from the AnnotationHub package. Expression ratios were calculated for each gene and cell type (Res259, KNS42, SF188) between H3.3K27M and H3.3. Genes with a ratio <0.5 or >2 in all the 3 cell lines were simultaneously selected as potential candidates and used for enrichment analyses performed on EnrichR and KEGG.

Clonogenicity assay and ionizing radiations

Cells were seeded into 12-well culture plates (200 cells/well). Six hours later, cells were irradiated with fractions of 0, 1, 2 or 3 Grays per day for 3 consecutive days using a linear accelerator XSTRAHL 100 (photons of 50 kV, dose rate of 1.25 Gy/min). After irradiation, cells were maintained for 10 days, then colonies were revealed by crystal violet staining and counted. The Plating Efficiency (PE) is the ratio [number of colonies counted / number of seeded cells] at 0Gy and the Survival Fraction (SF) is the ratio [number of colonies after irradiation / (PE x number of seeded cells)]. The results were represented as a survival curve (SF depending on the irradiation dose) in a logarithmic scale.

Screening of chemotherapeutic drugs

Drug sensitivity and resistance profiling was performed on human Res259, SF188 or KNS42 pHGG cell lines. The drug screening library included 80 substances consisting of conventional chemotherapeutics and a broad range of targeted oncology compounds. Every compound was tested in four concentration ranges separated by one log at a constant DMSO level (1%). In brief, 1250 living cells were seeded per well in 96-well plates and incubated in the presence of compounds in a humidified environment at 37°C and 5% CO₂. After 72h of treatment, cell viability was measured using the CellTiter-Glo luminescent assay (Promega) and the data were normalized to negative control wells (DMSO only). Half-maximal inhibitory concentration values (IC₅₀) were deduced from dose-response curves obtained using GraphPad Prism software. The same protocol was used for precise IC₅₀ evaluation using a range of 8 concentrations for each tested compound.

Statistical analysis

All analyses and fittings were performed with GraphPad PRISM software. All statistical analysis was based on a two-way ANOVA test.

Results

H3.3K27M induction decreases H3K27 trimethylation

To investigate the impact of the H3.3K27M mutation on pediatric glioma resistance to therapies, we introduced the *H3F3A* mutated gene fused with the coding sequence for mCherry fluorescent protein in three pediatric gliomas cell lines: Res259 (WHO Grade II), SF188 (WHO Grade IV) and KNS42 (WHO Grade IV). The cells containing the mutation will be named H3.3K27M thereafter. As a control, we used the same construct, but with the wild-type *H3F3A* gene, in cells therefore named H3.3.

We first selected cells using hygromycin B, then sorted mCherry positive cells by FACS for each transfected cell line. After amplification, we validated the nuclear location of our fusion protein by fluorescence microscopy (Fig.1A, Suppl. S1A). Besides, over 99% of cells were mCherry^{pos} cells after amplification, when checked by flow cytometry (Suppl. S1B).

We next validated the mutant protein expression encoded by our construct by western blot in the three cell lines. Thanks to an antibody specific for the mutation, we observed the presence of the mutated protein, fused with mCherry at 42 kDa (25 kDa for the mCherry protein + 17 kDa for H3.3 protein). An additional minority band probably resulting from a cleavage was observed, but no band was detected at the size of the endogenous H3.3 protein, confirming the absence of this mutation in the glioma cell lines that we selected for this study. Western blot against mCherry displayed the same pattern (Suppl. S1C), and so did the western blot against H3.3 (Fig.1B), with the addition of the band corresponding to the endogenous H3.3 protein. Interestingly, the introduction of our constructs triggered a similar level of exogenous H3.3 level in H3.3K27M and H3.3 control cells for each cell line (Fig.1B), which warranted the goodness of our models to properly compare the importance of the H3.3K27M mutated protein with respect to its wild-type counterpart. Moreover, we could check that the level of H3.3 endogenous protein was not modified by our approach (Fig.1B).

Since the mutation was associated with epigenetic alterations in patients, we further evaluated the level of relevant epigenetic marks in these models. We first checked the level of H3K27 tri- (me3), di- (me2) and mono- (me1) methylation by western blot. In all cell lines, H3.3K27M mutation induced a strong decrease in the level of repressive marks, especially on the H3K27me3 level but also on the H3K27me2 level. In contrast, both H3K27me1 and H3K27ac levels were not altered by the mutation for the three cell lines (Fig.1B).

We confirmed the impact of our constructs on the H3K27me3 level thanks to a service based on the Luminex® technology to quantify histone post-translational modifications (Active Motif service delivery, Suppl. S1D). Altogether, these results showed that we succeeded in recreating epigenetics patterns observed in H3K27M mutated glioma.

H3.3K27M increases cell growth and clonogenic properties of glioma cells

Thanks to these relevant models of H3K27M induced cells, we were able to evaluate the impact of the mutation on glioma cell behaviors. We first monitored cell growth by time-lapse microscopy. H3.3K27M cells reached confluency before H3.3 control cells in Res259 and SF188 cells, but not in KNS42 cells (Fig.2A). To further investigate these differences in cell growth, we evaluated cell cycle repartition by flow cytometry. Surprisingly, we could not detect any significant differences between H3.3 and H3.3K27M cells in the three cell lines, even if we noticed heterogeneity on cell cycle repartition between cell lines (Fig.2B, Suppl. 2A). These results were consistent with the cell growth curves, that displayed similar slopes, even for Res259 and SF188 cells that undergo an initial delay for H3.3 cells. To analyze this latter

difference in cell growth, we incubated cells at low density in 12-well plates to quantify the proportion of cells that can form colonies. After ten days of culture, the number of colonies was counted. This number was much higher for Res259- and SF188-H3.3K27M cells when compared to control cells (66% and 62% increases for Res259 and SF188, respectively) (Fig.2C & D, Suppl. S2B). Accordingly to cell growth results, KNS42 H3.3 and H3.3K27M cells did not show significant differences in their ability to form colonies. Taken together, these results suggest that H3.3K27M may promote cell growth in harsh conditions, such as low cellular density.

H3.3K27M induction deregulates TGF- β /BMP pathways and apoptosis balance

Resistance to cell death is one of the cancer cells main characteristics, highly involved in resistance to treatment. Similarly, blocking the cell differentiation pathways is crucial in tumor transformation, allowing the maintenance of a more or less critical stem compartment in the tumor.

To study that, we measured the impact of the H3.3K27M mutation on the expression of genes associated with these two phenomena in Res259 cells. To do this, we quantified the expression of a panel of 84 actors and targets of the TGF- β /BMP pathway to define whether this signaling is altered in Res259-H3.3K27M cells, compared to Res259-H3.3 cells. It appeared that the K27M mutation induces a change in the expression of mainly extracellular proteins involved in the modulation of BMP activity, including a decrease in the expression of several inhibitory genes such as *CHRD*, *COL1A1*, and *COL1A2*. In parallel, we observed an increase in the expression of *BMP2* and *BMP5* ligands in H3.3K27M cells, but a decrease in the expression of BMP pathway targets such as *INHBA*, *INHBB*, and *BMP7* ligand (Fig.3A).

We also evaluated the impact of the mutation on expression of 84 genes involved in apoptosis. We observed that one of the final effectors of the caspase cascade, responsible for DNA fragmentation, *DFFA*, and the partner and activator of p53, *TP53BP2*, showed their expression increased by a factor 1.4 and 1.5, respectively (Fig.3B). On the other hand, the apoptotic pathway seems disturbed and potentially blocked upstream. Five genes involved in the control of mitochondrial permeability – *BAK1*, *BNIP3L*, *BCL2A1*, *AIFM1*, *BNIP3* – have an expression decreased by 1.3, 1.4, 1.45, 1.55 and 1.75, respectively, in Res259-H3.3K27M (Fig.3B). These results suggest a profound deregulation of the mechanisms of the intrinsic pathway of apoptosis. Finally, we observed a decrease in gene expression coding for members of the CD27/CD70 ligand/receptor complex, members of the signaling pathway of Tumor Necrosis Factor (TNF) involved in inflammation²⁴. This observation is concomitant with a three-fold higher expression of inflammasome-activated caspase 1 in mutant cells.

H3.3K27M mutation alters expression of PI3K-Akt pathway

Transcriptomic profiles of cells Res259, KNS42, SF188 expressing wild-type or mutant forms of histone H3.3, were evaluated by RNAseq. After normalization, expression ratios were calculated for each of the three cell lines. An initial analysis was carried out by considering the genes whose ratios were in all cell lines, higher than two or lower than 0.5. This analysis resulted in the selection of 330 transcripts, including 148 pseudogenes (data not shown).

Enrichment analyses were performed on the selected 182 genes. The analysis of transcription factors and histone marks via EnrichR is consistent with the expression of the H3K27M mutation (Fig.4A-B). It indicates an EZH2 (transcription factor) and H3K27me3 (histone mark) signature, attesting to the specificity of the induced alterations in the three

cellular types. At the transcriptional level, we observed an enrichment of genes involved in several signaling pathways, especially in the PI3K-Akt pathway, with eight genes associated, revealed by the EnrichR (Fig.4C-D). Analysis with KEGG interface allowed us to locate these 8 alterations in the PI3K-Akt pathway (Fig.4E). The altered genes encode mainly for extracellular proteins, including HGF and IGF2 ligands, interleukin IL2RG, matrix protein TNXB, or proteins at the interface between the cell membrane and the microenvironment, with integrin ITGA2B or proteins G, GNGT2 and GNG8.

These data demonstrated that our H3.3K27M models have a concordant transcriptomic signature, associated to an EZH2 and H3K27me3 signature but also showed alterations of the PI3K-Akt pathway.

H3.3K27M promotes cell resistance to fractionated radiotherapy

Radiotherapy remains the reference treatment of DIPG, for more than 40 years now. That's why it is important to understand whether glioma resistance to radiotherapy is inherent to these tumors or whether H3.3K27M mutation plays a role in this resistance.

To address this question, we assessed the answer of our models to irradiations. We seeded cells at low density and applied to them different doses of ionizing radiations (0, 1, 2 or 3Gy) every day for 3 consecutive days. After calculating the plating efficiency of each cell line, based on the ratio between the number of colonies formed at 0 Gy and the number of cells seeded, we were able to quantify the survival rate for each dose of irradiation. This way, we were able to show that H3.3K27M cells were more resistant to an irradiation with 3x3Gy when compared to H3.3 cells in the Res259 cell line (Fig.5, top panel), demonstrating that the K27M mutation could confer radioresistance features to this low-grade glioma cell line. KNS42-H3.3K27M cells also showed a significantly higher resistance to irradiations, with 3x1Gy and 3x2Gy, with respect to their unmutated counterparts (Fig.5, bottom panel). In contrast, no significant difference in the radiosensitivity was observed between H3.3 and H3.3K27M cells in the SF188 cell line (Fig.5, central panel). These results suggest that H3.3K27M mutation can drive cell resistance to radiotherapy both in low grade glioma and in high grade glioma, but not systematically.

H3.3K27M significantly affects sensitivity to chemotherapies in low grade glioma cells

We subsequently evaluated the impact of the mutation on cell resistance to chemotherapies. To do that, we determined the IC50 for a panel of eighty anticancer drugs in H3.3K27M and H3.3 cells and calculated their ratio between these the two kinds of cells. We set the cut-off to >2.5 and <0.4 , to conclude on a chemo resistant or chemo sensitive effect of the mutation, respectively. The presence of the mutation moderately affected the resistance to chemotherapies of SF188 and KNS42 cells. Indeed, we observed a higher ratio only for 5 and 6 drugs respectively over the eighty tested, suggesting a low impact of the mutation on global chemo resistance in these cell lines (Fig.6A). In an opposite manner, for respectively 1 and 2 drugs, the ratio of IC50 indicated an increase of chemo sensitivity for KNS42 and SF188 cell lines (Fig. 6A).

In the Res259 cell line, the mutation had a strong impact on chemoresistance. Indeed, the presence of the mutation increased the IC50 of 22 drugs (ratio ranging from 2.5 to 24.1) and inversely decreased the IC50 of 11 drugs (ratio ranging from 0.36 to 0.04) (Fig.6A).

It is noteworthy that, even if the mutation had a low impact on KNS42 cells chemosensitivity, increasing the chemoresistance for only six drugs, a similar chemoresistance

was also evidenced for four out of these six drugs in the Res259 H3.3K27M cells : Temsirolimus, that is an inhibitor of mTOR (IC₅₀ ratios of 3.2 and 2.7 respectively for KNS42 and Res259 cell lines); EPZ5676, that inhibits DOT1L methyltransferase (IC₅₀ ratios of 7.3 and 2.9 respectively); Idelalisib, which is an antagonist of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (IC₅₀ ratios of 7.9 and 2.9 respectively), and Alisertib, which is an Aurora A kinase inhibitor (IC₅₀ ratios of 24.1 and 19.4 respectively).

To refine these results, we performed cytotoxicity assays on these drugs with a wide range of concentrations. Survival curves and determination of IC₅₀ confirmed the difference between Res259-H3.3 cells and Res259-H3.3K27M cells, with IC₅₀ values respectively 2.3 μM vs. 2.2 nM for Temsirolimus, 19.8 vs. 53.9 μM for EPZ5676, 0.7 vs. 7.5 μM for Idelalisib and 2.2 nM vs. 2.5 μM for Alisertib (Fig.6B). Altogether, these results showed that H3.3K27M could promote cell resistance to chemotherapies, especially in the context of low-grade cells.

Discussion

Although the H3.3K27M mutation was evidenced in pHGG years ago, and its importance for modifying the epigenetic landscape was well studied, much less is known with respect to its impact on resistance to therapies. In order to address this issue, we introduced in pediatric glioma cell lines a H3.3K27M mutated protein fused with the mCherry fluorescent protein as a reporter. We first confirmed the relevance of our cell models, by showing that the introduction of the H3.3K27M protein did not alter the expression of the endogenous protein, but acted in a dominant manner to drive the epigenetic modifications expected with the presence of the mutation. Our models thus confirmed results previously described, such as the loss of H3K27me³^{13,15} and the decrease in H3K27me²²⁵. In contrast, our models did not exhibit an increase in the H3K27ac mark, contrarily to some studies, which had shown an increase of the H3K27ac mark in H3.3K27M DIPG cells^{26,27}. Previously, studies evaluated H3K27ac following the introduction of the mutation in the same cell line and showed contrary results^{28,29}, which highlights the difficulty to draw a clear conclusion on this mark.

In our model, the level of endogenous H3.3 is not strikingly affected by the introduction of the H3F3A gene, and is similar between H3.3 and H3.3K27M conditions. The only difference observed is linked to the expression of the exogenous construct. Recently, the study of Chen *et al.* showed that the introduction of the mutation increased H3.3 level in SF188 cell line²², in contrast with our results. On our side, our results are consistent with several other studies, which showed that the introduction of the mutation did not impact the total H3 protein level^{15,16,23}.

Thanks to this relevant model generated in three different pediatric glioma cell lines, we were able to investigate the biological consequences of the H3.3K27M mutation. We first showed that the H3.3K27M mutation accelerates cell growth in Res259 and SF188 but not in the KNS42 cell line. Although a previous study evidenced in a murine DIPG model H3.3K27M-induced differences in cell cycle repartition, with an increasing number of cells in S phase³⁰, we could not detect any H3.3K27M-associated difference in cell cycle repartition in our models. This stands in agreement with the slopes of the curves being quite similar between H3.3K27M and control cells, and suggests an impact of the H3.3K27M mutation on the ability for cells to proliferate when they are cultured at low confluency. Consistently, when we seeded cells at very low density to measure their clonogenic properties, H3.3K27M cells produced a greater number of colonies when compared to control cells, in Res259 and SF188 cell lines, but not in the KNS42 cell model.

Other studies introduced H3.3K27M in pediatric glioma cell lines Res259 and/or SF188, but they didn't show any difference in cell growth^{22,23}, possibly due to increased initial cell density in those studies. Still, one of these studies evidenced a cell growth decrease in a mutated DIPG cell line in which the mutation had been reversed with the CRISPR/Cas9 technology. The impact of the mutation on cell growth seems to be cell context-dependent.

Besides, Silveira *et al.* showed that the inhibition of *H3F3A* expression by shRNA induced cell differentiation, concluding on the role of the mutation to maintain a stem-cell profile³¹. These observations were reinforced by Chen *et al.*, who highlighted the activation of Notch pathways, responsible for stemness, in DIPG H3.3K27M cellular models²². Our results are also consistent with these observations. Indeed, our H3.3K27M cells exhibited higher properties to form colonies that could be linked to acquired stemness properties.

BMP2, BMP5, and BMP7 have an important role in the nervous system development, inducing the differentiation of neural stem cells to astrocytes (BMP2, 5, and 7) and dopaminergic neurons (BMP5 and 7)³²⁻³⁴. Moreover, it has been shown that the increase of H3K27me3 mark in glioma stem-like cells induced lower expression of BMP5³⁵. We therefore evaluated the impact of the mutation in gene expression implicated in BMP pathways. We observed with a qPCR array an increase in BMP2, BMP5 ligands, and a decrease of BMP7 ligand, that were confirmed by the RNAseq analysis. Consistently with the aforementioned studies, we thus highlight that the reduction of H3K27me3 level in mutant cells increase BMP5 expression. Taken together, these results suggested that the mutation disturbs the BMP balance, with a potential impact on glioma cell differentiation.

We also observed no overall disorganization of the apoptotic gene panel's expression profile, but a specific alteration of certain genes involved in particular pathways. Alterations observed in this apoptotic PCR-array were confirmed by the RNAseq data. The introduction of the mutation in Res259 cells suggested a deregulation of the apoptosis pathway. Interestingly, it has already been shown that epigenetic alterations contribute to changes in the activity of the intrinsic apoptotic pathway³⁶. Our results thus reinforce the notion that the alteration of H3K27me3 disturbs the apoptotic pathway balance, which may contribute to specific resistance and impact response to therapies.

We then wondered whether H3.3K27M could improve cell resistance to ionizing radiations. Actually, we showed that Res259 and KNS42 mutant cells had a higher resistance to ionizing radiations in a fractionated or mono dose schedules (data not shown). In the DIPG context, with a vast majority of patients bearing the mutation, it had been shown that resistance to radiotherapy may be linked to *TP53* mutations³⁷. In our study, H3.3 and H3.3K27M cells differed only by the presence of the mutation, and response to ionizing radiation was thus independent of the *TP53* status. As a conclusion, we evidence that the H3.3K27M mutation can increase cell resistance to radiotherapy in both low- and high-grade context.

Screening of a panel of anticancer drugs was already performed on DIPG cells on a panel of 14 patient-derived DIPG cell cultures (one H3K27WT, four H3.1K27M-mutated, and nine H3.3K27M-mutated)²⁰. Because of the availability of only one H3K27WT cell culture, authors were not able to compare wild-type and mutated cells, but highlighted the efficiency of panobinostat. Our models suggest that the response to panobinostat is not altered by the mutation. Moreover, for the first time, we evaluated the specific impact of the H3.3K27M mutation on cell resistance to a panel of chemotherapies. We showed that the mutation significantly altered the resistance to therapies mostly in a low-grade glioma context. We also highlighted an induced resistance to 4 drugs in both Res259- and KNS42-H3.3K27M cells. Interestingly, two of these four drugs, idelalisib (PI3K inhibitor) and temsirolimus (mTOR inhibitor) target the PI3K-Akt/mTOR pathway, in agreement with the RNAseq analysis showing an alteration of this pathway, known to regulate the response to therapies. Underlying mechanisms are being studied.

To sum up, we showed that the H3.3K27M mutation significantly influences the response to chemotherapies in Res259 cell lines and much more weakly in SF188 and KNS42 cells. The nature of the cell lines could explain these differences. Indeed, Res259 cells originate from low-grade pediatric glioma, while SF188 and KNS42 are from high-grade glioma. Therefore, the mutation alone can increase cell resistance to chemo and radiotherapy in a low-grade context. Still, in the context of high-grade gliomas, cells bear genetic alterations that can support their aggressiveness and resistance to treatments, and H3.3K27M mutation by itself only sparingly confers a certain increase in HGG cell chemo and/or radioresistance, depending on the cell line.

References

- 1 Hassan, H., Pinches, A., Picton, S. V. & Phillips, R. S. Survival rates and prognostic predictors of high grade brain stem gliomas in childhood: a systematic review and meta-analysis. *J Neurooncol* **135**, 13-20, doi:10.1007/s11060-017-2546-1 (2017).
- 2 Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol* **21**, v1-v100, doi:10.1093/neuonc/noz150 (2019).
- 3 Desandes, E., Guissou, S., Chastagner, P. & Lacour, B. Incidence and survival of children with central nervous system primitive tumors in the French National Registry of Childhood Solid Tumors. *Neuro Oncol* **16**, 975-983, doi:10.1093/neuonc/not309 (2014).
- 4 Saratsis, A. M. *et al.* Comparative multidimensional molecular analyses of pediatric diffuse intrinsic pontine glioma reveals distinct molecular subtypes. *Acta Neuropathol* **127**, 881-895, doi:10.1007/s00401-013-1218-2 (2014).
- 5 Hargrave, D., Bartels, U. & Bouffet, E. Diffuse brainstem glioma in children: critical review of clinical trials. *Lancet Oncol* **7**, 241-248, doi:10.1016/S1470-2045(06)70615-5 (2006).
- 6 Schroeder, K. M., Hoeman, C. M. & Becher, O. J. Children are not just little adults: recent advances in understanding of diffuse intrinsic pontine glioma biology. *Pediatr Res* **75**, 205-209, doi:10.1038/pr.2013.194 (2014).
- 7 Vanan, M. I. & Eisenstat, D. D. DIPG in Children - What Can We Learn from the Past? *Front Oncol* **5**, 237, doi:10.3389/fonc.2015.00237 (2015).
- 8 Freeman, C. R. *et al.* Final results of a study of escalating doses of hyperfractionated radiotherapy in brain stem tumors in children: a Pediatric Oncology Group study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **27**, 197-206, doi:10.1016/0360-3016(93)90228-n (1993).
- 9 Schwartzenruber, J. *et al.* Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* **482**, 226-231, doi:10.1038/nature10833 (2012).
- 10 Wu, G. *et al.* Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet* **44**, 251-253, doi:10.1038/ng.1102 (2012).
- 11 Castel, D. *et al.* Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol* **130**, 815-827, doi:10.1007/s00401-015-1478-0 (2015).
- 12 Mackay, A. *et al.* Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* **32**, 520-537 e525, doi:10.1016/j.ccell.2017.08.017 (2017).
- 13 Bender, S. *et al.* Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell* **24**, 660-672, doi:10.1016/j.ccr.2013.10.006 (2013).
- 14 Nikbakht, H. *et al.* Spatial and temporal homogeneity of driver mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Commun* **7**, 11185, doi:10.1038/ncomms11185 (2016).

- 15 Funato, K., Major, T., Lewis, P. W., Allis, C. D. & Tabar, V. Use of human embryonic stem cells to model pediatric gliomas with H3.3K27M histone mutation. *Science* **346**, 1529-1533, doi:10.1126/science.1253799 (2014).
- 16 Pathania, M. *et al.* H3.3(K27M) Cooperates with Trp53 Loss and PDGFRA Gain in Mouse Embryonic Neural Progenitor Cells to Induce Invasive High-Grade Gliomas. *Cancer Cell* **32**, 684-700 e689, doi:10.1016/j.ccell.2017.09.014 (2017).
- 17 Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* **131**, 803-820, doi:10.1007/s00401-016-1545-1 (2016).
- 18 Hashizume, R. *et al.* Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat Med* **20**, 1394-1396, doi:10.1038/nm.3716 (2014).
- 19 Katagi, H. *et al.* Radiosensitization by Histone H3 Demethylase Inhibition in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Clin Cancer Res* **25**, 5572-5583, doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-3890 (2019).
- 20 Grasso, C. S. *et al.* Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Med* **21**, 555-559, doi:10.1038/nm.3855 (2015).
- 21 Hennika, T. *et al.* Pre-Clinical Study of Panobinostat in Xenograft and Genetically Engineered Murine Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Models. *PLoS One* **12**, e0169485, doi:10.1371/journal.pone.0169485 (2017).
- 22 Chen, K. Y. *et al.* Reciprocal H3.3 gene editing identifies K27M and G34R mechanisms in pediatric glioma including NOTCH signaling. *Commun Biol* **3**, 363, doi:10.1038/s42003-020-1076-0 (2020).
- 23 Deng, H. *et al.* Histone H3.3K27M Mobilizes Multiple Cancer/Testis (CT) Antigens in Pediatric Glioma. *Mol Cancer Res* **16**, 623-633, doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0460 (2018).
- 24 Wajant, H. Therapeutic targeting of CD70 and CD27. *Expert Opin Ther Targets* **20**, 959-973, doi:10.1517/14728222.2016.1158812 (2016).
- 25 Harutyunyan, A. S. *et al.* H3K27M induces defective chromatin spread of PRC2-mediated repressive H3K27me2/me3 and is essential for glioma tumorigenesis. *Nat Commun* **10**, 1262, doi:10.1038/s41467-019-09140-x (2019).
- 26 Krug, B. *et al.* Pervasive H3K27 Acetylation Leads to ERV Expression and a Therapeutic Vulnerability in H3K27M Gliomas. *Cancer Cell* **35**, 782-797 e788, doi:10.1016/j.ccell.2019.04.004 (2019).
- 27 Piunti, A. *et al.* Therapeutic targeting of polycomb and BET bromodomain proteins in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Nat Med* **23**, 493-500, doi:10.1038/nm.4296 (2017).
- 28 Chan, K. M. *et al.* The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev* **27**, 985-990, doi:10.1101/gad.217778.113 (2013).
- 29 Lewis, P. W. *et al.* Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science* **340**, 857-861, doi:10.1126/science.1232245 (2013).
- 30 Cordero, F. J. *et al.* Histone H3.3K27M Represses p16 to Accelerate Gliomagenesis in a Murine Model of DIPG. *Mol Cancer Res* **15**, 1243-1254, doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0389 (2017).
- 31 Silveira, A. B. *et al.* H3.3 K27M depletion increases differentiation and extends latency of diffuse intrinsic pontine glioma growth in vivo. *Acta Neuropathol* **137**, 637-655, doi:10.1007/s00401-019-01975-4 (2019).
- 32 Brederlau, A., Faigle, R., Kaplan, P., Odin, P. & Funa, K. Bone morphogenetic proteins but not growth differentiation factors induce dopaminergic differentiation in mesencephalic precursors. *Mol Cell Neurosci* **21**, 367-378, doi:10.1006/mcne.2002.1178 (2002).
- 33 Nakashima, K. *et al.* BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5868-5873, doi:10.1073/pnas.101109698 (2001).

Article 1: Oncogenic impact of H3.3K27M induction in pediatric glioma cell lines.

- 34 Jovanovic, V. M. *et al.* BMP/SMAD Pathway Promotes Neurogenesis of Midbrain Dopaminergic Neurons In Vivo and in Human Induced Pluripotent and Neural Stem Cells. *J Neurosci* **38**, 1662-1676, doi:10.1523/JNEUROSCI.1540-17.2018 (2018).
- 35 Natsume, A. *et al.* Chromatin regulator PRC2 is a key regulator of epigenetic plasticity in glioblastoma. *Cancer Res* **73**, 4559-4570, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0109 (2013).
- 36 Yin, H. *et al.* Histone demethylase JMJD3 regulates CD11a expression through changes in histone H3K27 tri-methylation levels in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Oncotarget* **8**, 48938-48947, doi:10.18632/oncotarget.16894 (2017).
- 37 Werbrouck, C. *et al.* TP53 Pathway Alterations Drive Radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG). *Clin Cancer Res* **25**, 6788-6800, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0126 (2019).
- 38 Mosaab, A. *et al.* Histone H3K27M Mutation Overrides Histological Grading in Pediatric Gliomas. *Sci Rep* **10**, 8368, doi:10.1038/s41598-020-65272-x (2020).

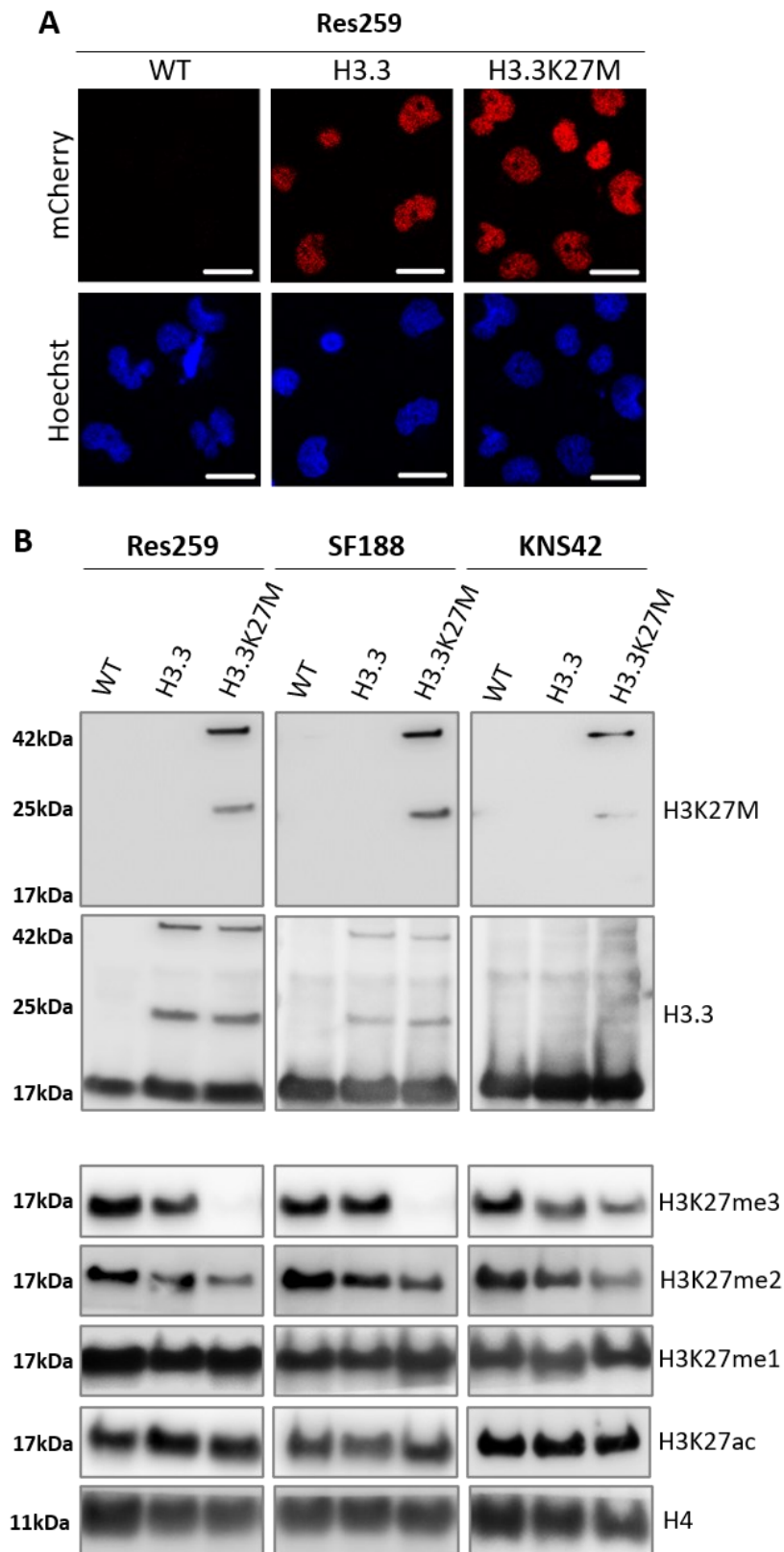


Figure 1. Validation of the H3.3K27M models. **A.** Microscopy pictures of the Res259 cell line, WT cells or cells expressing the H3F3A mutated (H3.3K27M) or unmutated (H3.3) gene. Fluorescence was acquired for the mCherry signal (top lane) or Hoechst signal (bottom lane). **B.** Western blot of H3K27M and H3.3 was performed on all cell lines. Other epigenetic marks were also evaluated as H3K27me3/me2/me1 and H3K27ac. H4 was used as a loading control.

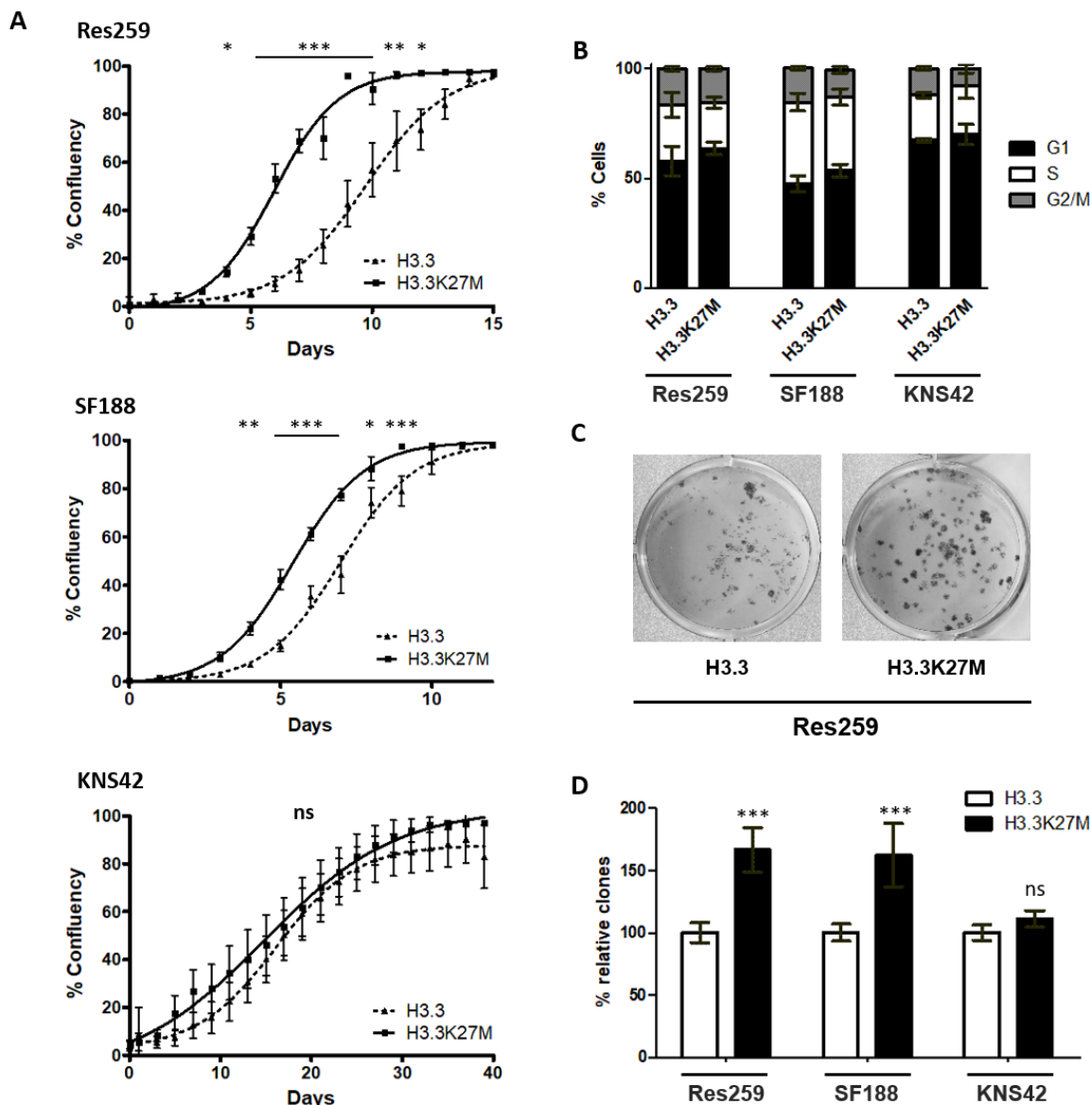


Figure 2. Effects of H3.3K27M induction on cell growth and clonogenic properties. **A.** Confluency was measured every day using Incucyte. Cell growth curves given % of confluency as function of time in days. The assay was conducted in sextuplicate and repeated 3 times. Error bars represent \pm SD of sextuplicates. Significance was calculated with Anova test (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns non significant) (dark line: H3.3K27M; dotted dark line: H3.3). **B.** Cell cycle distribution measured by flow cytometry using vybrant dye. **C.** Pictures of colonies formed by Res259-H3.3 and -H3.3K27M cells 10 days after seeding. **D.** Percentage of formed colonies number normalized to H3.3 condition in each cell line. The experiment was realized in quadruplicate and repeated 3 times. Error bars represent \pm SD of quadruplicates. Significance was evaluated using Anova test. (** $p < 0.01$, ns non significant)

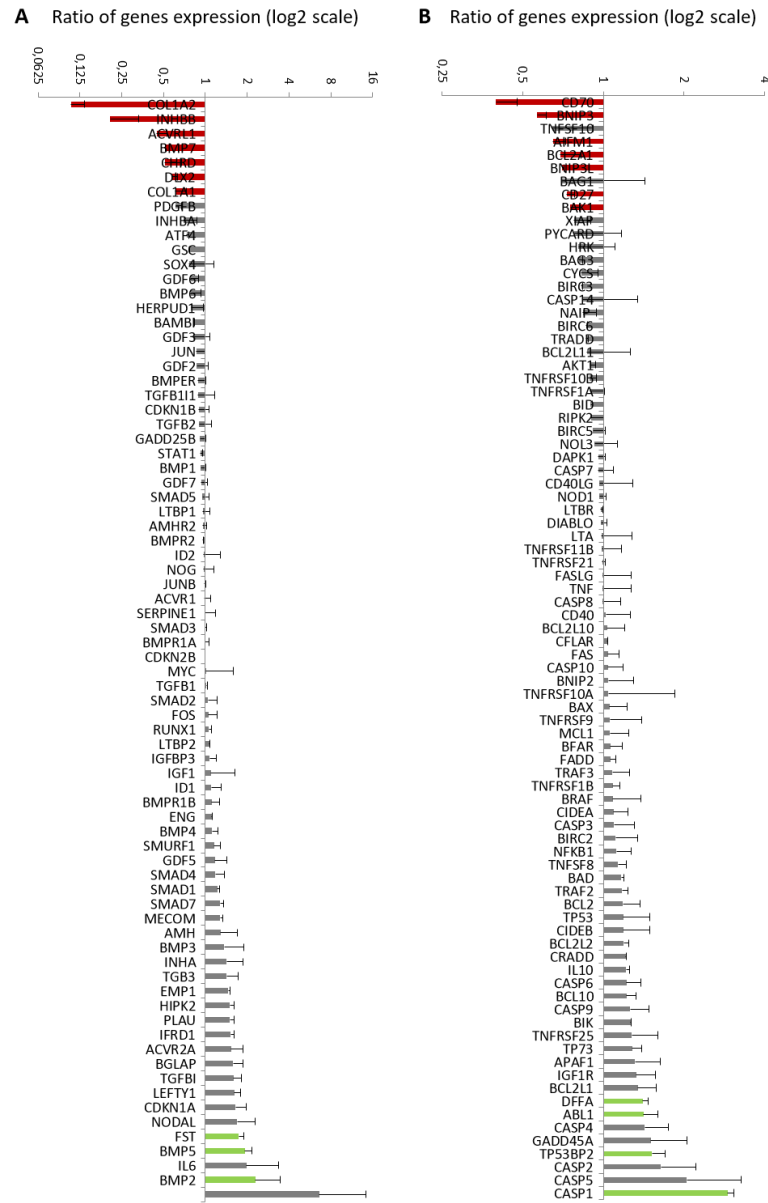


Figure 3. Impact of the K27M mutation on the apoptotic and BMP/TGF gene expression profile. An RT2 Profiler PCR Array approach dedicated to expression profiling of key targets/effectors of the BMP/TGF (A) and apoptotic (B) pathways was used to compare the amount of mRNA in Res259-H3.3K27M and Res259-H3.3. The results are presented in standardized expression reports. Genes down-regulated in H3.3K27M cells are in red; up-regulated genes are shown in green. n=2, mean \pm std.

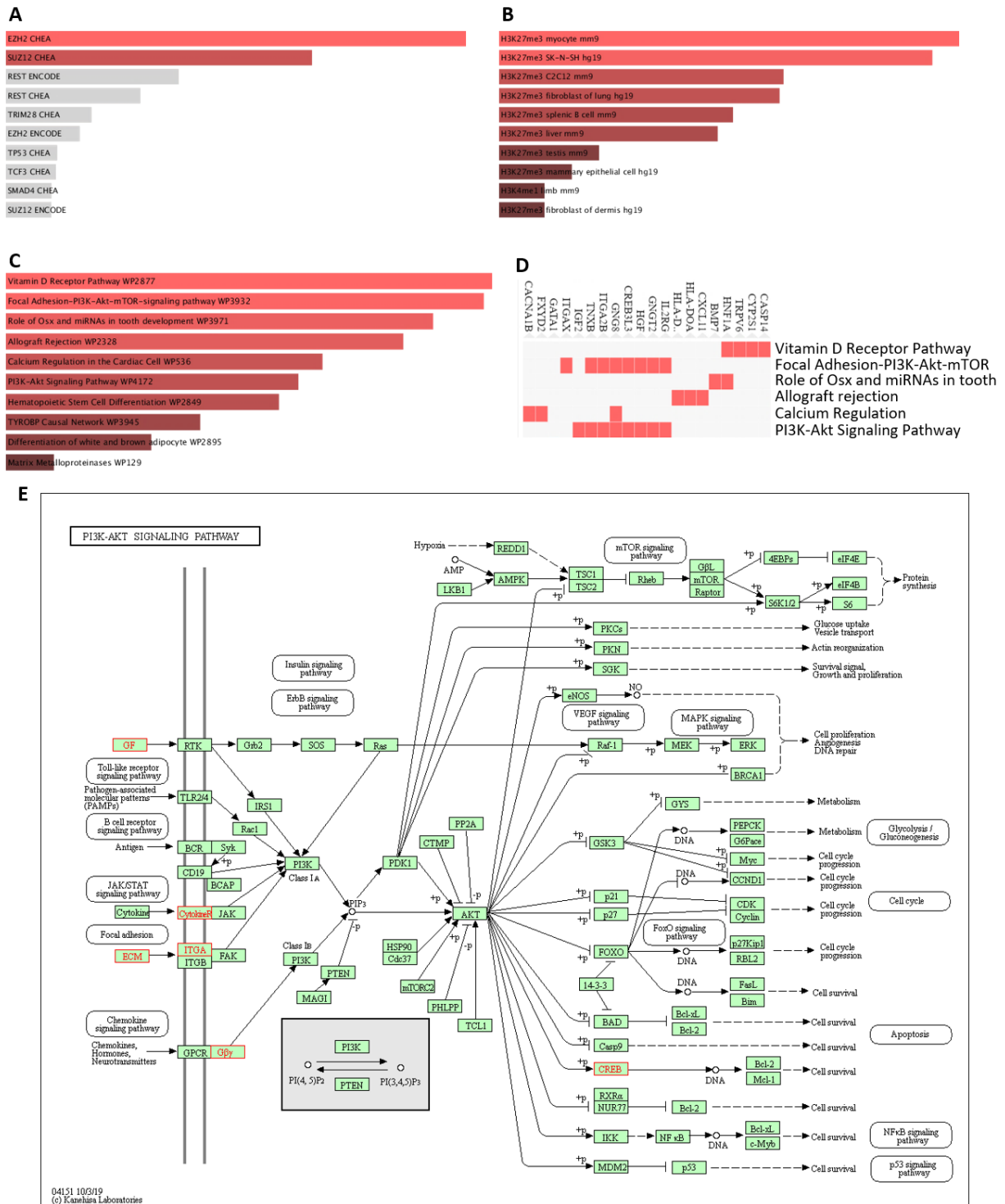


Figure 4. Enrichment analysis of transcription factors, histone marks and PI3K-Akt-mTOR associated to gene expression variation in H3.3K27M cells. RNAseq EnrichR analysis between H3.3 and H3.3K27M exhibits (A) an EZH2-associated signature for transcription factors (Base Encode and ChEAConsensus TFs fromChIP-X) or (B) an H3K27me3-associated signature for histone marks (Base Encode Histone Modification 2015). Enrichment analysis from Wikipathways indicating the presence of 8 genes associated to PI3K-Akt-mTOR pathway (C-D). E. Enrichment analysis from KEGG database presenting these 8 identified proteins inside the PI3K-Akt-mTOR pathways (red).

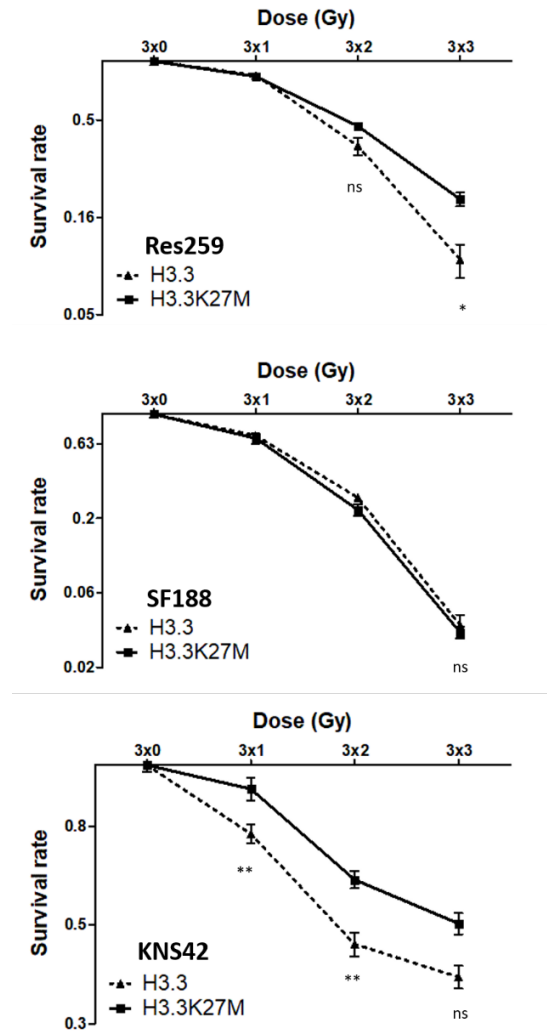


Figure 5. Effect of H3.3K27M induction on cell resistance to irradiations. The impact of H3.3K27M on cell resistance to ionizing radiation was determined by clonogenic assay. Cells were irradiated with fractions of 0, 1, 2 or 3 Grays³⁸ per day for 3 consecutive days. After 10 days, colonies were counted. Results are representative of 3 independent experiments. *** p < 0.001; ** p < 0.01; * p < 0.05.

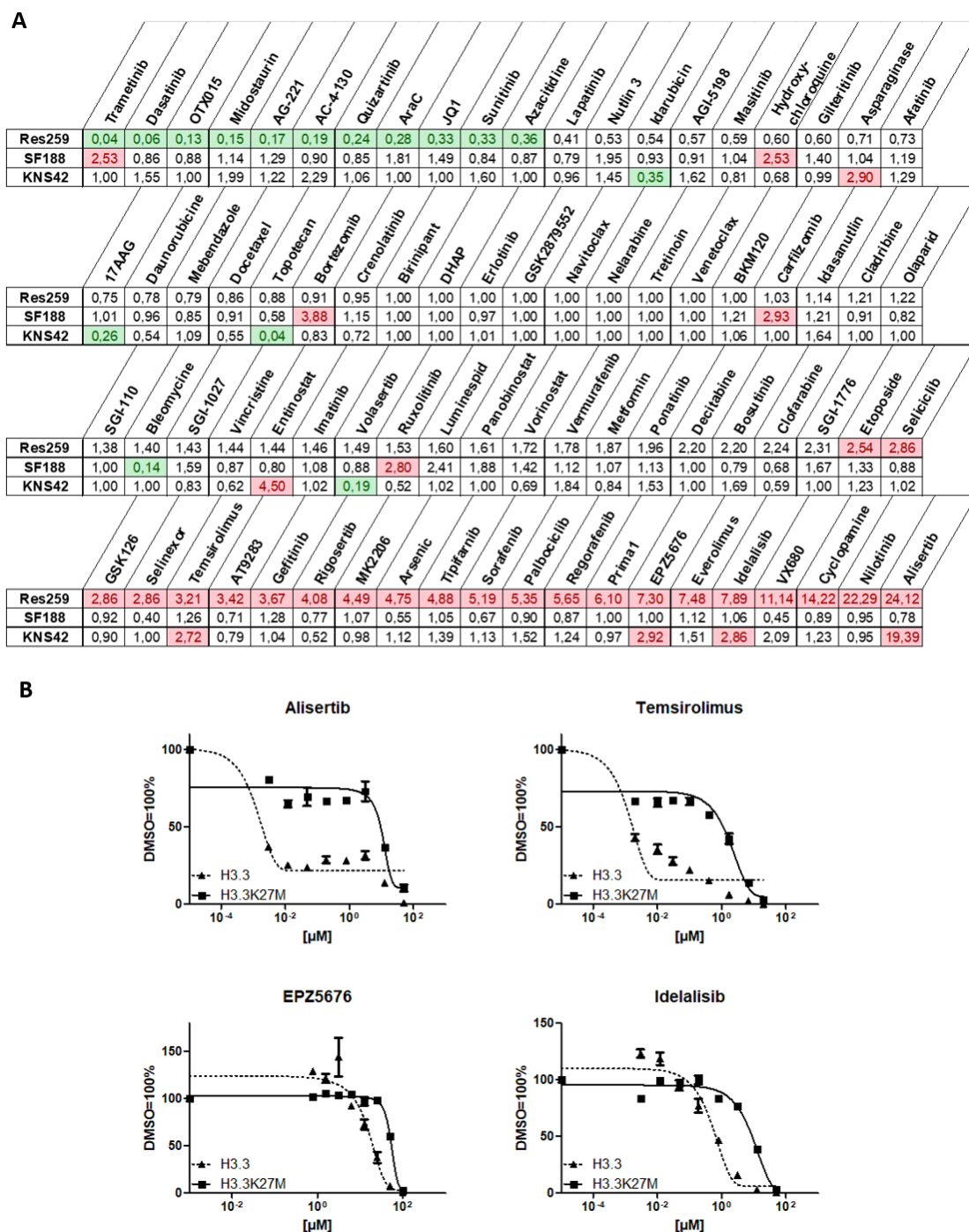


Figure 6. Impact of H3.3K27M on cell resistance to a chemotherapy library. A. A library of 80 compounds was tested, each one at 4 different concentrations. Cells were seeded and incubated with compound for 72h. Ratio of H3.3K27M/H3.3 IC50 was calculated and reported. Drugs were classified according to the ratio value obtained on Res259 cell line. Red boxes represent a ratio >2.5 between H3.3K27M and H3.3, i.e. a chemoresistance linked to the mutation. Green boxes represent a ratio <0.4, reflecting a chemosensitivity conferred by the mutation. **B.** Cells were incubated and drugs were added 24h after incubation. % of viability was measured by CellTiter-Glo luminescent assay, 72h after treatment. The IC50 values were determined by fitting the survival curves. (H3.3 dotted dark line; H3.3K27M dark line)

Supplementary Data

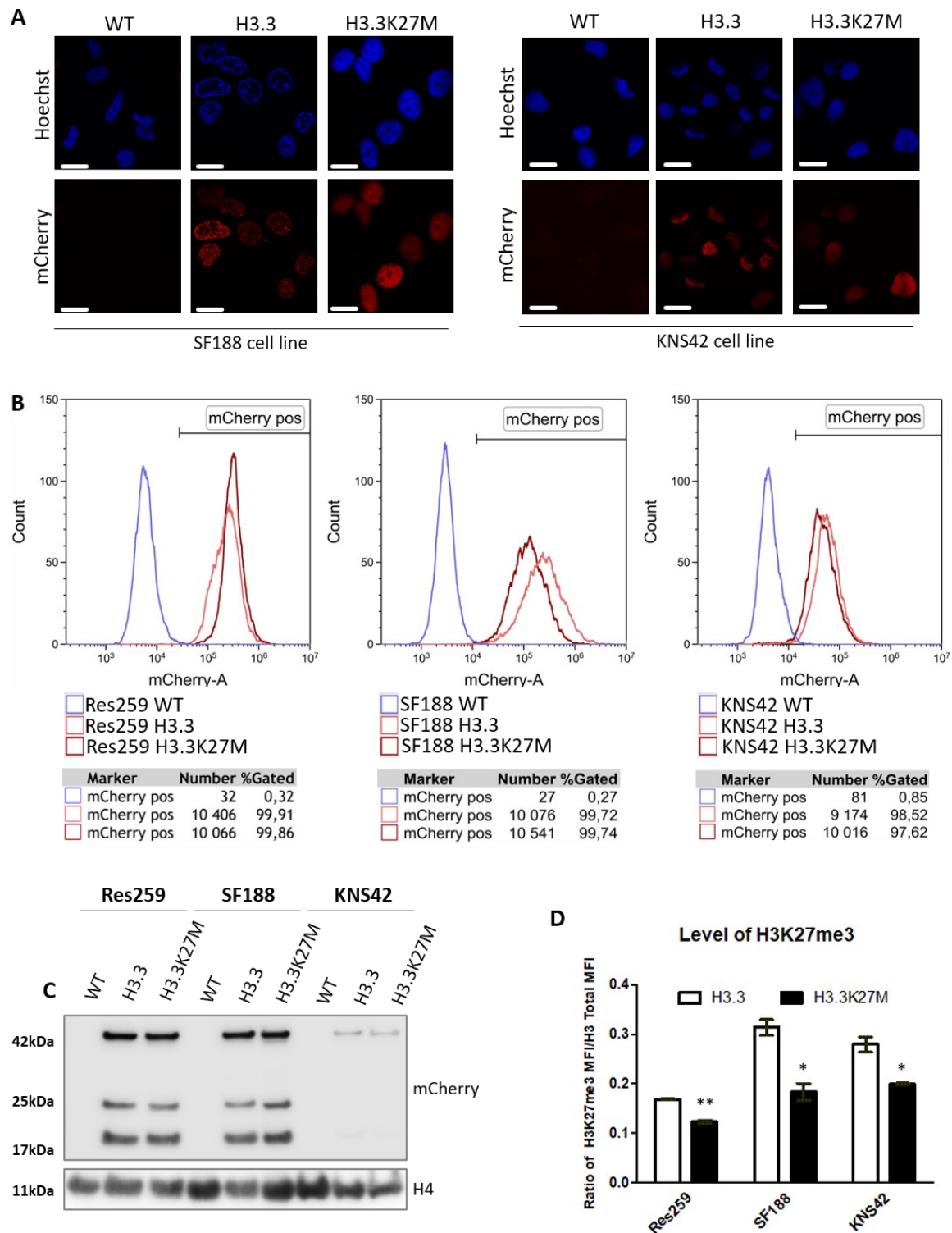


Figure S1. Validation of the H3.3K27M induction models. **A.** Microscopy pictures of the SF188 and KNS42 cell lines. Untransfected cells (WT) or cells expressing the *H3F3A* mutated (H3.3K27M) or unmutated (H3.3) gene. Fluorescence was acquired for the mCherry signal (top lane) or Hoechst signal (bottom lane). **B.** Cell fluorescence was evaluated by flow cytometry based on mCherry signal in Res259, SF188 and KNS42 cell lines. Dark red: H3.3K27M cells. Light red: H3.3 cells. Blue: WT cells. **C.** Western blot against mCherry was performed in the three cell lines. Histone H4 is use as loading control. **D.** H3.3K27me3 quantification by Luminex multiplex assay (Active motif service delivery). White and dark histograms represent level of H3K27me3 in H3.3 and H3.3K27M cells respectively.

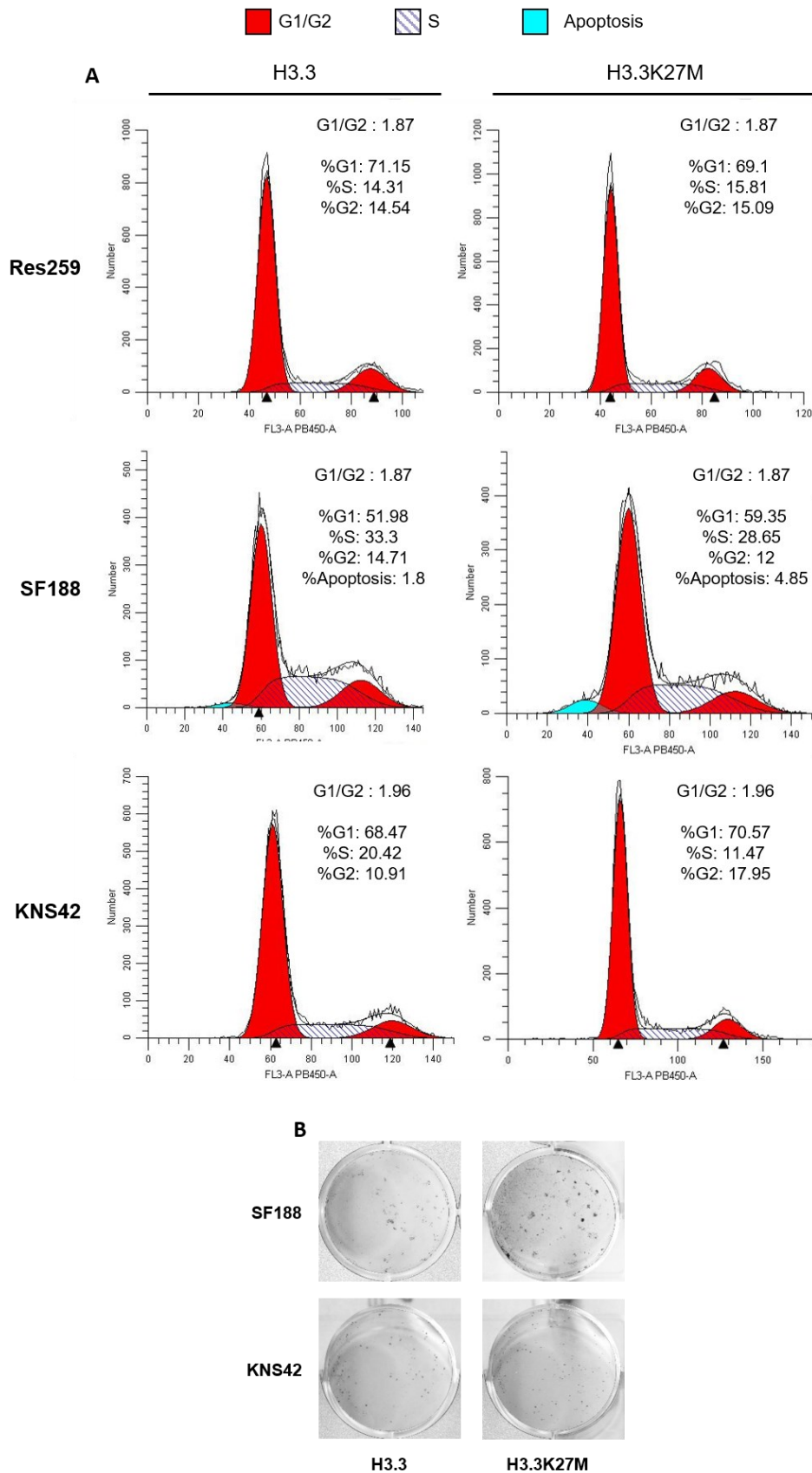


Figure S2. Impact of the H3.3K27M on cell cycle and clonogenic properties. **A.** Cell cycle analysis was performed on Res259, SF188 and KNS42 by flow cytometry. Analysis was performed on Modfit software. Percentage was calculated setting the ratio G1/G2. **B.** Pictures of colonies formed by Res259-H3.3 and -H3.3K27M cells 10 days after seeding.

RESULTATS

1.2. Résultats préliminaires de l'impact de la mutation H3.3K27M sur la croissance tumorale *in vivo* en poisson-zèbre

Matériel et Méthodes

Les embryons de poisson-zèbre (*Danio rerio*) utilisés sont issus d'un croisement entre les souches AB et TU et ont été élevés dans l'installation de poisson-zèbre (SFR Santé, Lyon, France) selon les recommandations éthiques en vigueur. 1×10^6 cellules Res259-H3.3K27M ou Res259-H3.3 ont été resuspendues dans 30 μ L de PBS au moment de la greffe. Les embryons de poisson-zèbre à 48 heures après la fécondation (hpf) ont été déchorionnés et anesthésiés à la tricaine (Sigma-Aldrich, E10521) et 20 nL de suspension cellulaire (environ 300 cellules) ont été injectées dans le lécithocèle de chaque embryon. Les embryons ont ensuite été placés à 28°C pendant 48 heures en présence de N-phénylthiourée (Sigma-Aldrich, P7629) pour inhiber la synthèse de mélanine. Les embryons ont ensuite été fixés sur la nuit au PFA4% à 4°C, puis imagés par microscopie photonique à feuillets de lumière SPIM (Zeiss Light Sheet Z1).

Résultats

Compte-tenu du caractère très invasif des cellules de DIPG, nous avons cherché à définir *in vivo* si la mutation H3.3K27M modifiait les propriétés de dissémination des cellules tumorales. Nous avons décidé d'utiliser le poisson-zèbre (*Danio rerio*), qui s'est imposé comme un modèle de référence ces dernières années pour étudier la dissémination métastatique (Berens *et al.*, 2016; Teng *et al.*, 2013; Rouhi *et al.*, 2010). Les cellules Res259-H3.3K27M et Res259-H3.3 exprimant la protéine mCherry ont été injectées dans le sac vitellin d'embryons de poissons-zèbre à 48 heures post-fécondation (48 hpf), au niveau de la région péricardique. Les images réalisées 48h plus tard suggèrent que les cellules tumorales exprimant la mutation disséminent davantage à distance de la tumeur xenogreffée (Figure 24). Cette analyse préliminaire nécessite cependant d'être reproduite et quantifiée.

RESULTATS

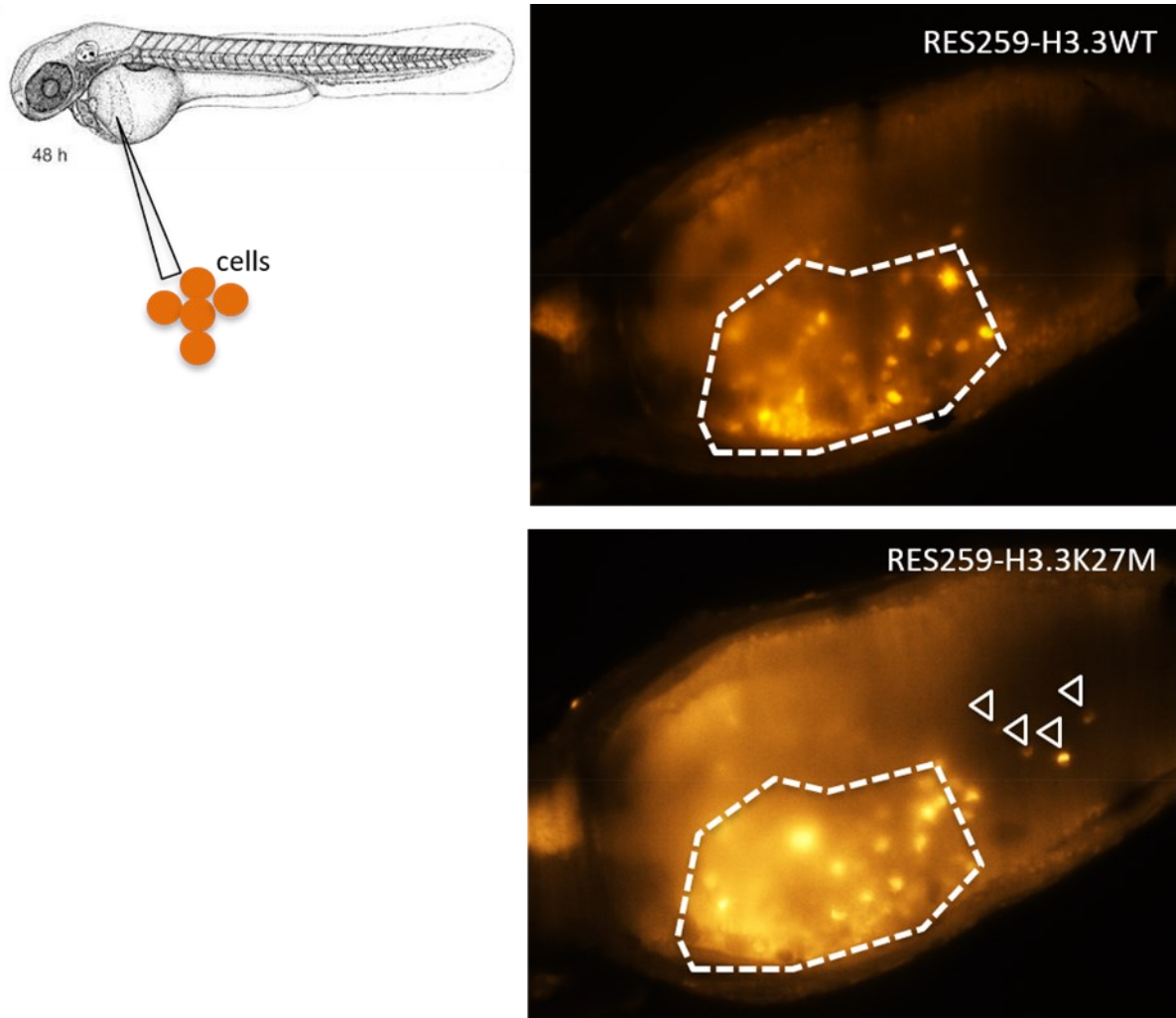


Figure 24. Impact de la mutation K27M sur les propriétés invasives des cellules tumorales in vivo. A. Modèle de xéno greffe des cellules Res259-H3.3K27M et Res259-H3.3 dans l'embryon de poisson-zèbre (48hpf). **B.** Images représentatives des greffes obtenues à partir des cellules Res259-H3.3K27M et Res259-H3.3, suggérant une dissémination plus importante des cellules tumorales exprimant la mutation (flèches). Imagerie SPIM.

RESULTATS

2. Réversion de la mutation H3.3K27M dans une lignée cellulaire de DIPG

2.1. Contexte

Les lignées utilisées dans les modèles d'induction de la mutation H3.3K27M sont issues de lignées de gliomes sus-tentoriels, avec une origine, un grade ainsi que des mutations partenaires qui leurs sont propres. Bien que les résultats obtenus avec ces modèles aient permis de mettre en évidence divers effets imputables à la mutation, ces effets nécessitent toutefois d'être évalués et confirmés dans un contexte cellulaire propre aux cellules de DIPG. C'est dans ce contexte que nous envisagions d'établir, non pas un modèle d'induction dans des cellules de DIPG, mais bien un modèle cellulaire de DIPG initialement muté H3.3K27M dans lequel la mutation aurait été invalidé. Pour ce faire, des stratégies de *knock-down* ou *knock-out* nous aurait permis d'apporter une réponse partielle à cette question du fait de limites certaines, telles qu'une perte partielle ou totale de l'expression d'un allèle du gène H3F3A. C'est pourquoi, nous entreprenons d'établir un modèle cellulaire de DIPG dans lequel la mutation aurait été corrigé, par *gene editing*.

2.2. Lignées cellulaires de DIPG

Les lignées cellulaires HSJD-DIPG-007 et -012 étaient gracieusement fournies par le Dr Angel Montero Carcaboso de l'hôpital Sant Joan de Déu de Barcelone. Ces lignées cellulaires sont issues de patients âgés respectivement de 9.9 et 9.7 ans. Diverses caractérisations du statut mutationnel avaient été réalisées sur ces lignées (Mohammad *et al.*, 2017 ; Taylor, Mackay, *et al.*, 2014). Ces caractéristiques sont reprises dans le tableau ci-dessous (Tableau 6). La perte de la marque H3K27me3 était également constatée par immunohistochimie (Mohammad *et al.*, 2017).

Notons que ces cellules sont cultivées en suspension sous forme de tumorosphères. Cependant, ces lignées peuvent également être cultivées en conditions adhérentes, sous forme de mono-couche.

RESULTATS

Lignée	Age	Type de prélèvement	Survie	Mutations					
				<i>H3F3A</i>	<i>HIST1H3B</i>	<i>TP53</i>	<i>ACVR1</i>	<i>PPM1D</i>	<i>PI3KCA</i>
HSJD-DIPG-007	9.9ans	Nécropsie	1.5 mois	✓	×	×	✓	✓	✓
HSJD-DIPG-012	9.7ans	Biopsie	15.1 mois	✓	×	✓	nc	nc	nc

Tableau 6. Caractéristiques des lignées de DIPG utilisées. Pour chaque lignée : âge de survenue, type de prélèvement, survie après diagnostic, statut mutationnel pour H3.3 (*H3F3A*) et H3.1 (*HIST1H3B*), pour *TP53*, pour *ACVR1*, pour *PPM1D* et pour *PI3K (PI3KCA)* déterminé par séquençage. Le statut mutationnel *TP53* était confirmé par immunohistochimie. Nc = Non connu (Extrait de Mohammad *et al.*, 2017 ; Taylor, Mackay, *et al.*, 2014)

2.3. Approche expérimentale initiale : les TALEN

Afin de créer un modèle cellulaire de DIPG dans lequel la mutation H3.3K27M a été corrigée, notre première stratégie reposait sur la réécriture du génome, au niveau de la mutation, par recombinaison homologue, en créant, au préalable, une cassure double brin **par la technologie des TALEN**.

Eligibilité de la lignée HSJD-DIPG-007 pour le *gene editing*

Avant l'établissement de notre stratégie, il nous fallait nous assurer que nos cellules ne présentaient pas une polypléidie, et de fait un nombre aberrant de copies de l'allèle *H3F3A* muté, qui aurait été rédhibitoire vis-à-vis de notre approche. Par cytométrie en flux, j'ai donc étudié le cycle cellulaire de nos cellules. J'ai ainsi comparé la moyenne d'intensité de fluorescence de nos cellules en phase G1 du cycle cellulaire avec celle d'une lignée cellulaire contrôle que nous savions diploïde (cellules humaines saines HK-2). En guise d'étalon interne, nous utilisons des globules rouges de truites (TRBC) nous permettant de déterminer le ratio MFI (Mean Fluorescence Intensity) cellules en phase G1 / MFI Globules rouges de truite. Par cette méthode, le ratio dans la lignée contrôle (HK-2) était de 1.71, tandis que ce ratio passait à 1,92 dans la lignée HSJD-DIPG-007 (Figure 25.A) indiquant que nos cellules n'étaient pas polypléïdes.

J'ai ensuite vérifié, par FISH, la présence d'une copie unique du gène *H3F3A* muté au sein des cellules HSJD-DIPG-007. Pour cela, j'ai produit une sonde fluorescente, par PCR, basée sur la séquence de la mutation. Après hybridation *in situ*, j'ai pu vérifier en microscopie que les cellules ne présentaient qu'un seul point de fluorescence au sein de leur noyau (Figure 25.B).

RESULTATS

Cette expérience me permettait de déduire que les cellules HSJD-DIPG-007 ne présentaient pas plusieurs copies du gène *H3F3A* muté. Ces deux résultats faisaient de la lignée HSJD-DIPG-007 une bonne candidate pour notre stratégie de *gene editing*.

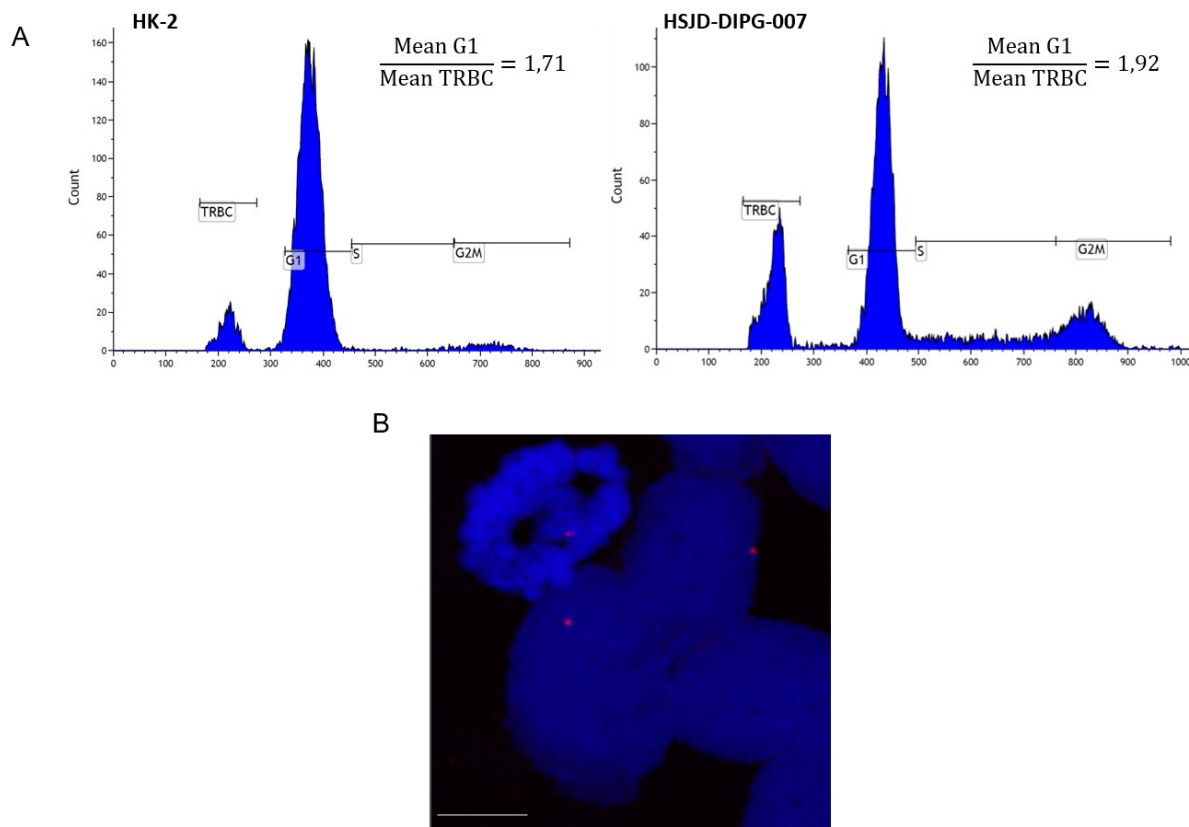


Figure 25. Etude de la ploïdie et du nombre de copies du gène *H3F3A* muté dans la lignée HSJD-DIPG-007. A. Analyse du cycle cellulaire de la lignée HSJD-DIPG-007 en comparaison avec la lignée diploïde HK-2. Des globules rouges de truites (TRBC) étaient utilisés comme étalon interne. Le ratio des moyennes d'intensité de fluorescence des globules rouges de truites et des cellules en phase G1 était calculé. **B.** Analyse par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) dirigée contre le gène *H3F3A* muté réalisée sur la lignée HSJD-DIPG-007 (Echelle = 5 μ M).

Stratégie générale de *gene editing* utilisant les TALEN

La stratégie mise en œuvre se basait sur la création d'une cassure double brin, au niveau de l'allèle muté du gène *H3F3A*. L'objectif étant ensuite d'activer les mécanismes de réparation par recombinaison homologue en fournissant un oligonucléotide modèle. Cet oligonucléotide devait ainsi présenter une séquence identique à l'allèle sauvage du gène *H3F3A*. Au final, nous souhaitons obtenir un modèle cellulaire ne différent de la lignée d'origine que par le nucléotide responsable de la mutation H3.3K27M (Figure 26)

RESULTATS

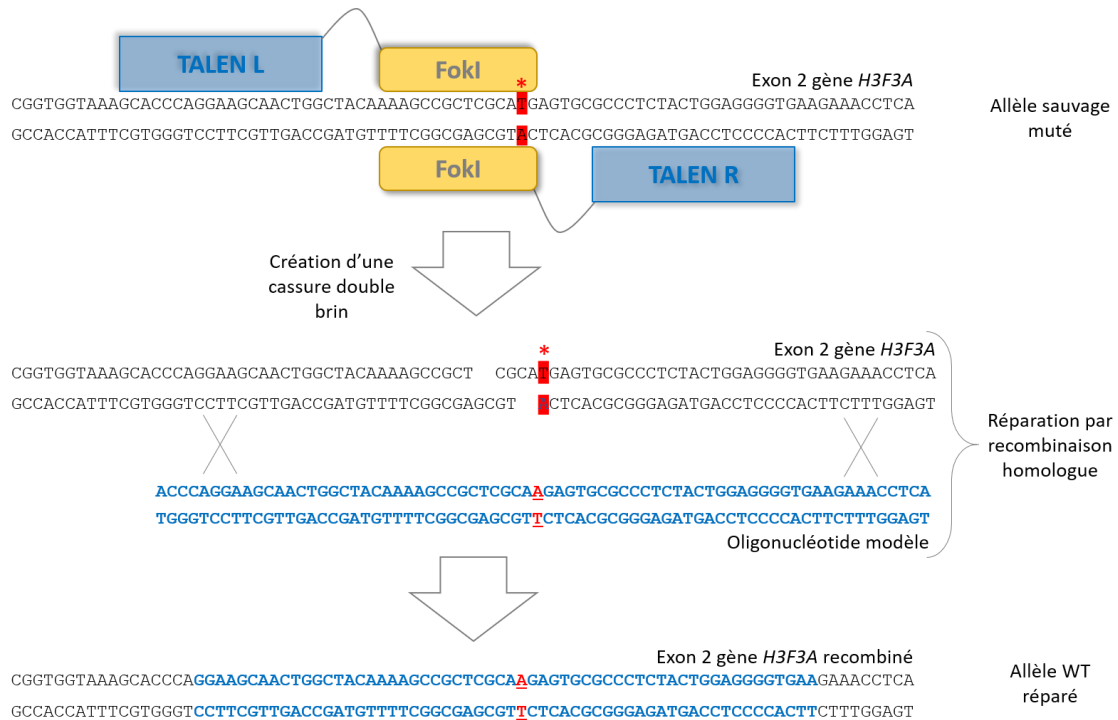


Figure 26. Stratégie de *gene editing* par utilisation de la technologie des TALEN. Les TALEN vont cibler spécifiquement les régions en amont et en aval de la mutation. La dimérisation de la protéine FokI va permettre la création d'une cassure double brin qui sera ensuite réparée par recombinaison homologue grâce à la présence d'un oligonucléotide modèle porteur de la séquence non mutée du gène *H3F3A* (en bleu). Le produit final sera ainsi identique à la séquence initiale mais dépourvu de la mutation.

Design des TALEN et de l'oligonucléotide modèle

Afin de créer une cassure double brin au niveau de la mutation et dans le but de concevoir des TALEN prenant en compte d'éventuelles mutations silencieuses présentes au sein de notre lignée, nous avons séquencé la région contenant la mutation. Le résultat de ce séquençage nous confirmait la présence de la mutation H3.3K27M et ce de façon mono-allélique dans la lignée DIPG-007. Par ailleurs, l'alignement de séquences, avec la séquence publiée du gène *H3F3A*, nous révélait un faible polymorphisme de cette région du gène dans cette même lignée (98,5% d'homologie par rapport à la séquence de référence). Nous avons donc pu *designer* des TALEN permettant la création d'une cassure double brin, au niveau de la mutation, comme présenté dans la figure 26. Les séquences des deux TALEN, synthétisées par Gene Art (ThermoFischer), étaient alors clonées dans une seconde construction plasmidique afin d'avoir, sous le contrôle d'un même promoteur CMV, la séquence codante de la protéine fluorescente mCherry (pour le plasmide contenant le TALEN L) ou de la GFP (pour le plasmide contenant le TALEN R), séparée à chaque fois de la séquence du TALEN par le peptide autoclivable T2A (Figure 27.A). Ainsi, la présence d'une fluorescence témoignait de

RESULTATS

l'expression du TALEN associé. Cet ajout nous permettait par la suite de pallier le faible taux de transfection cellulaire de nos lignées de DIPG par un tri cellulaire.

Dans le but de permettre, suite à la coupure par les TALEN, une recombinaison homologe et ainsi une restauration de la séquence sauvage en lieu et place de la mutation, nous avons conçu un oligonucléotide modèle. Cet oligonucléotide double brin, de 72 pb, était identique à la séquence trouvée dans les cellules DIPG-007. Cependant, outre la restauration du codon AAA (Lysine) en place de la mutation ATG (Méthionine) nous avons incorporé, dans cet oligonucléotide, une série de mutations silencieuses au niveau de la mutation H3.3K27M de manière à changer la séquence nucléotidique sans pour autant changer la séquence peptidique. La présence de ces mutations silencieuses devait ainsi nous permettre de distinguer les cellules ayant subi la recombinaison homologe par PCR (grâce à un couple d'amorces spécifiques de cet oligonucléotide) et par séquençage (Figure 27.B).

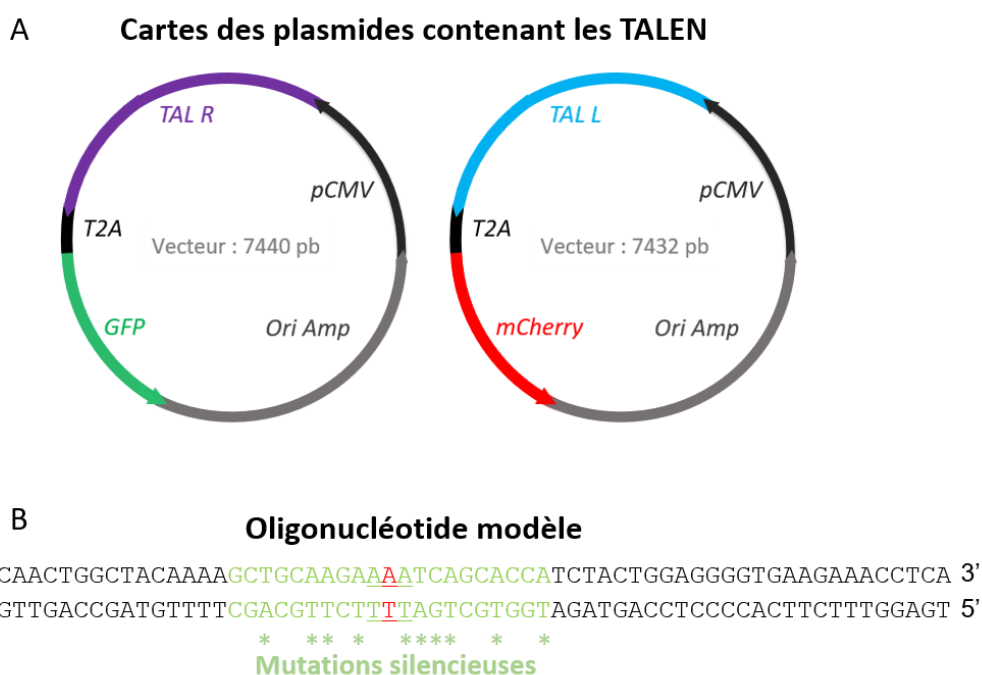


Figure 27. Design des plasmides contenant les TALEN et de l'oligonucléotide modèle. **A.** Les séquences codantes de la protéine fluorescente (GFP ou mCherry) ainsi que du TALEN (R ou L) sont placées sous le contrôle d'un même promoteur CMV et séparées par une séquence codant pour le peptide autoclivable T2A. Les plasmides ainsi construits ont une taille respective de 7440 et 7432 paires de bases. **B.** La séquence de l'oligonucléotide modèle double brin est composée de 72 nucléotides et permet la correction de la mutation par le retour d'une lysine à la place de la méthionine (en rouge). L'oligonucléotide possède la particularité de présenter des mutations silencieuses (étoiles vertes) permettant la détection de l'allèle ayant recombiné par PCR grâce à un *primer* spécifique de la séquence (séquence verte).

RESULTATS

Protocoles de réversion de la mutation

Une étude de 2014, menée par Strouse *et al.*, décrivait un schéma de transfection adapté à la stratégie que nous souhaitions mettre en place (Strouse *et al.*, 2014). La recombinaison homologue étant un mécanisme ayant lieu lors des phases S et G2 du cycle cellulaire, les auteurs proposaient de synchroniser les cellules en utilisant de l'aphidicoline (qui bloque les cellules lors de la transition G1/S du cycle). Les auteurs montraient ensuite que la transfection de leurs cellules, 4h après la reprise du cycle, apportait un pourcentage de recombinaison optimal.

En me basant sur cette étude, je décidais de synchroniser les cellules pendant 24h, puis je transfectais les cellules 4h après retrait de l'aphidicoline (Figure 28.A). Le tri des cellules mCherry^{POS}/GFP^{POS} m'a permis d'isoler 480 cellules, à partir desquelles j'ai obtenu 145 clones. Après amplification, je screenais, par cytométrie en flux avec un anticorps anti-H3K27me3, 115 clones parmi lesquels 95% présentaient un niveau de triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 équivalent à celui de la lignée DIPG-007 originelle, indiquant un maintien de la mutation H3.3K27M. Néanmoins, nous dégagions 6 clones présentant une nette augmentation du niveau d'H3K27me3 avec des valeurs de MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) allant de 88,05 à 104,73 contre seulement 30,53 de MFI pour les cellules DIPG-007 originelles (Figure 28.B). J'ai donc entrepris de valider, par western blot, la perte de la mutation théoriquement inhérente à ce retour de la marque H3K27me3. Cependant, je constatais que l'ensemble de ces clones présentait toujours la mutation au niveau protéique (Figure 28.C).

RESULTATS

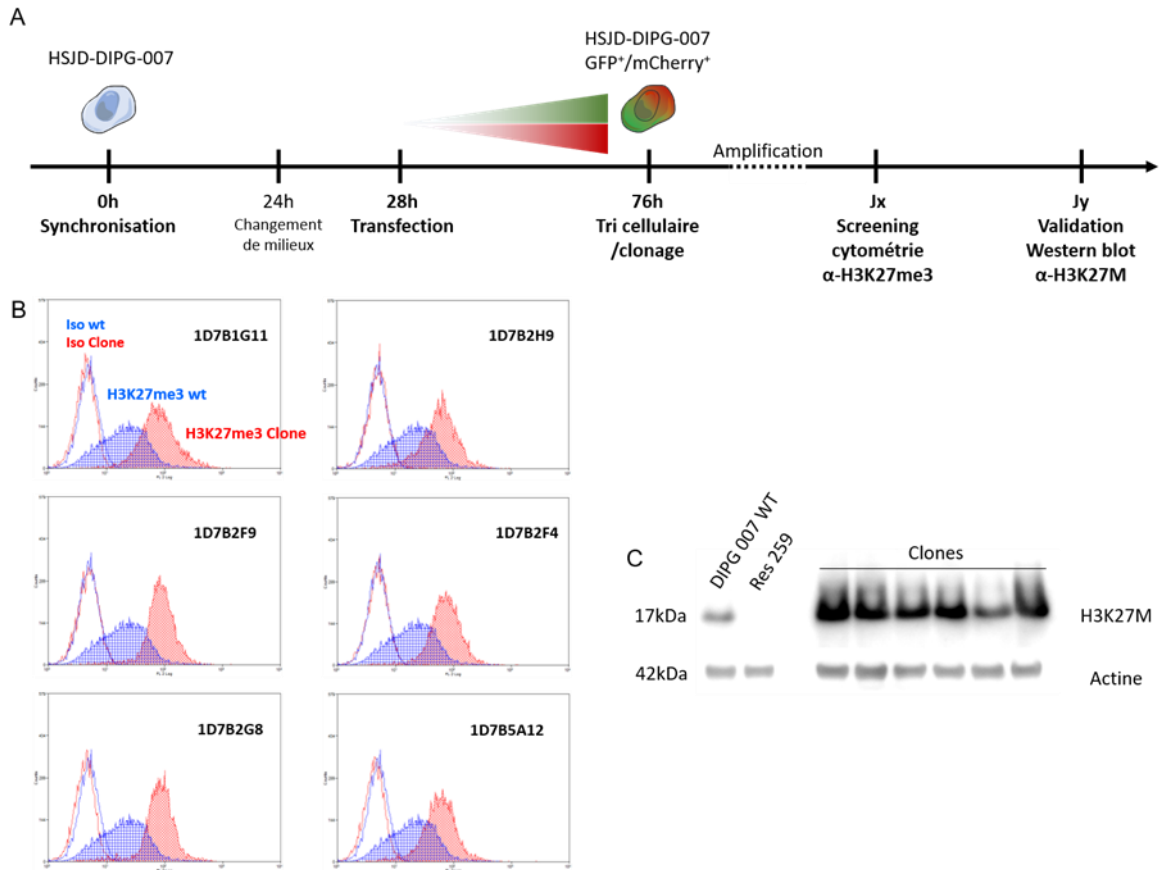


Figure 28. Schéma de transfection, tri et screening des clones. **A.** Les cellules étaient synchronisées en présence d'aphidicoline durant 24h. 4h après reprise du cycle, les cellules étaient transfectées avec l'oligonucléotide modèle et les deux plasmides contenant chacun un TALEN (le gradient de fluorescence est représenté par les triangles rouges et verts). 48h post-transfection, un tri cellulaire était réalisé sur la base de la double fluorescence GFP/mCherry. Après amplification, un screening par cytométrie anti-H3K27me3 suivi d'une validation par western blot de la perte de la mutation étaient réalisés. **B.** Les clones, transfectés, triés et amplifiés, étaient fixés, perméabilisés et incubés avec un anticorps isotype contrôle ou anti H3K27me3, puis analysés en cytométrie dans le canal FL2 (PE). En bleu, la population DIPG-007 originelle utilisée en contrôle. En rouge, le clone issu de la transfection et du clonage. **C.** La présence de la protéine mutée était évaluée par western blot dans les clones présentant un retour de la triméthylation. La lignée Res259 (H3K27 WT) et la lignée originelle DIPG-007 (mutée H3K27M) étaient utilisées en guise de contrôles.

Ce premier protocole étant un échec quant au résultat final, j'ai décidé d'entreprendre un second protocole. J'ai premièrement vérifié que les fluorescences mCherry et GFP étaient d'ores et déjà détectables 24h après transfection. De ce fait, et partant du postulat que la recombinaison homologue a lieu durant la phase S du cycle cellulaire, j'ai transfecté et synchronisé les cellules en même temps. Après 24h, j'ai retiré l'aphidicoline afin de laisser repartir les cellules dans le cycle. De cette manière, je m'assurais que les cellules qui entraient en phase S exprimaient bel et bien les TALEN ainsi que l'oligonucléotide modèle. 48h post-transfection, je réalisais un tri des cellules GFP^{POS}/mCherry^{POS} (Figure 29.A). Après clonage,

RESULTATS

j'obtenais 155 clones que je screenais par western blot dirigé contre la mutation H3K27M. De manière surprenante, aucun des clones ne présentait la perte de la mutation (Figure 29.B).

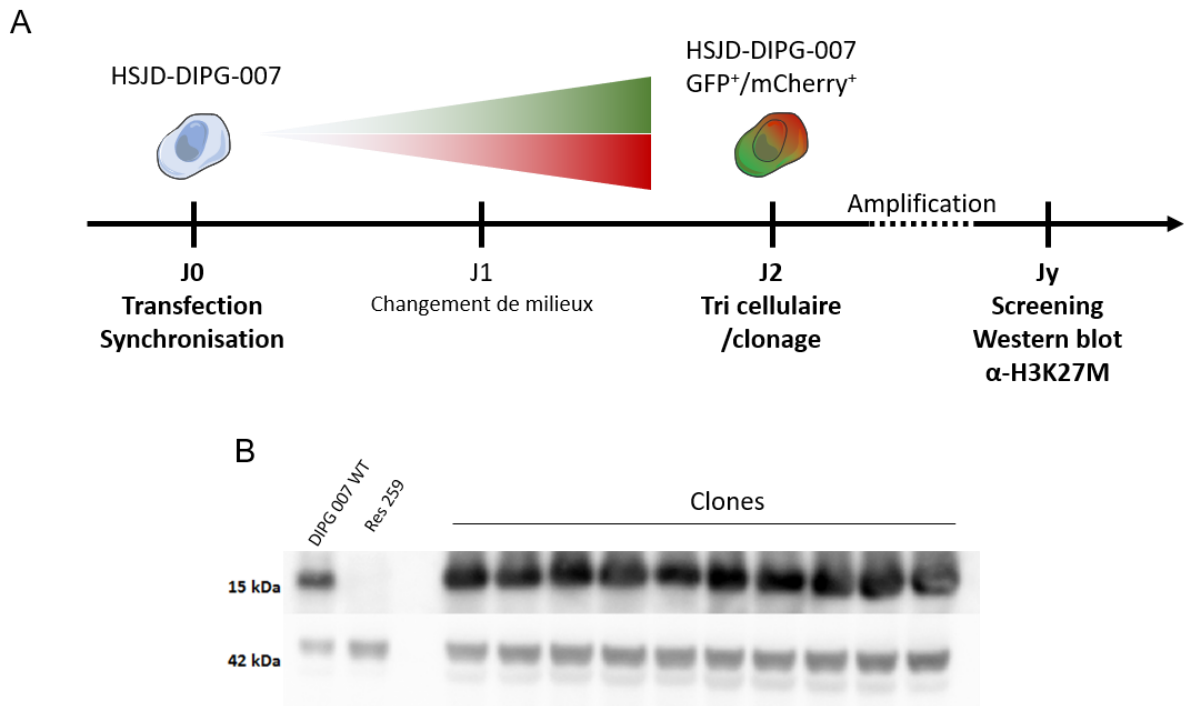


Figure 29. Second schéma de transfection, tri et screening des clones. **A.** Les cellules DIPG-007 étaient transfectées et synchronisées en même temps. Le retrait de l'aphidicoline était réalisé au bout de 24h. 48h post-transfection, les cellules GFP^{POS}/mCherry^{POS} étaient triées et clonées. Un western blot dirigé contre la mutation était ensuite réalisé après amplification (le gradient de fluorescence est représenté par les triangles rouges et verts). **B.** Exemple de clones exprimant toujours la protéine H3 mutée K27M. La lignée Res259 (H3K27 WT) et la lignée originelle DIPG-007 (mutée H3K27M) étaient utilisées en guise de contrôles.

Ce second échec mettait en lumière plusieurs freins dans la réussite de notre projet :

- Un faible taux de transfection ($\approx 10\%$ de cellules GFP^{POS}/mCherry^{POS}) s'accompagnant d'un faible pourcentage de viabilité cellulaire ($\approx 30\%$) dans nos lignées de DIPG
- Un faible pourcentage de reprise de ces cellules après clonage par FACS ($\approx 30\%$)
- La nécessité d'une expression des deux TALEN et leur taux de coupure, sur l'allèle muté, incertain
- La rareté de l'événement de recombinaison homologue
- Et enfin, le fait qu'ôter la mutation pourrait représenter un désavantage sélectif par rapport aux cellules ayant recombiné sur l'allèle sauvage.

RESULTATS

La combinaison de ces différents freins (évènements rares ou incertains) rendait trop aléatoire nos chances de réussite avec cette première approche.

Afin de dépasser certaines de ces limites et/ou inconnues, j'entreprenais la mise en œuvre d'une nouvelle stratégie de réversion de la mutation reposant sur l'utilisation du système CRISPR-Cas9 et du *gene trapping*. Cette stratégie présentait l'avantage de compter plusieurs étapes de validation, à travers des modèles intermédiaires stables, jusqu'à l'obtention du modèle réversé final.

RESULTATS

Article 2: *H3.3K27M reversion in DIPG cells.*

Establishment of H3.3K27M reversion model using CRISPR-Cas9 strategy in DIPG cell line

Contexte

Suite aux différents écueils rencontrés lors des précédentes tentatives de réversion de la mutation H3.3K27M par la technologie des TALEN, nous avons décidé d'entreprendre la création de ce modèle cellulaire selon une toute autre approche. Celle-ci, par étape, permettait de garantir notre progression vers la création du modèle final de DIPG H3.3K27M réversé. Cette approche s'appuyait sur des travaux publiés en 2017 qui décrivaient une édition précise du génome par *gene trapping* (Wassef *et al.*, 2017).

Grâce à l'utilisation du système CRISPR-Cas9, nous souhaitions créer une cassure double brin, non plus au niveau du site de la mutation, mais dans l'intron du gène *H3F3A* situé en aval de la mutation. Le but de cette approche était d'insérer une cassette de résistance à un antibiotique, flanquée de deux sites FRT (permettant son excision *a posteriori*), par recombinaison homologue avec un insert contenant un bras d'homologie de part et d'autre de la cassette. Bras d'homologie strictement identiques à la séquence originelle, mis à part le nucléotide responsable de la mutation H3.3K27M.

Résultats

Après transfection de nos cellules avec le plasmide contenant le système CRISPR-Cas9 complet et celui contenant l'insert, j'ai sélectionné les cellules ayant recombiné par sélection à la généticine. Après cinq jours, les cellules résistantes étaient clonées. En parallèle, je m'assurais de l'insertion de la cassette dans les cellules résistantes par PCR. Une première PCR me permettait de conclure quant à la présence du transgène au sein du génome. Une seconde PCR me permettait de vérifier que l'insert s'était inséré au sein du gène *H3F3A*.

Après amplification, j'ai réalisé un screening des clones par western blot dirigé contre la mutation. Celui-ci me permettait d'isoler 3 clones présentant une perte de la mutation d'un point de vue protéique. Cette perte de la mutation était validée par séquençage. La dernière étape consistait alors à exciser la cassette de résistance et ainsi restaurer l'expression d'une protéine H3.3 fonctionnelle. Pour ce faire, après transfection des clones avec un plasmide

RESULTATS

codant la protéine de fusion FLP-GFP, j'ai trié et sous-cloné les cellules GFP^{POS}. J'obtenais ainsi divers sous-clones dans lesquels j'évaluais la bonne excision de la cassette de résistance. Par PCR dirigée contre l'intron 2 du gène *H3F3A*, je mettais en évidence l'exérèse de la cassette de résistance. Le modèle final ainsi obtenu ne différait des cellules originelles mutées que par l'absence de la mutation et la présence d'un site FRT résiduel au sein de l'intron 2 du gène *H3F3A*.

L'établissement de ce modèle cellulaire est décrit sous forme d'un article ci-après. Article qui sera par la suite complété par les diverses évaluations menées sur ces modèles.

Establishment of H3.3K27M reversion model using CRISPR-Cas9 strategy in DIPG cell line

Quentin Bailleul^{a,b}, Andria Rakotomalala^{a,b}, Mélanie Arcicasa^{a,b}, Pierre-Olivier Angrand^b, Eric Adriaenssens^b, Xuefen Le Bourhis^b, Pierre Leblond^c, Alessandro Furlan^{a,b}, Samuel Meignan^{a,b}

^aTumorigenesis and resistance to treatment Unit, Centre Oscar Lambret, Lille, France

^bUniv. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut de Recherche contre le Cancer de Lille, UMR9020 – UMR-S 1277 - Canther – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

^cLyon Pediatric Hematology and Oncology Institute, Lyon, France

Short title : H3.3K27M reversion in DIPG cells.

Keywords: H3.3K27M mutation, pediatric glioma, Child, DIPG, gene editing

Conflicts of interest : none declared

Introduction

Pediatric solid tumors are more frequently Central Nervous System (CNS) tumors, which represent 25% of cancers in children¹. Among them, Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPGs) have the worst prognosis, with a median survival around 1-year and a 2-year survival rate lower than 10%². Due to their location and also their infiltrative characteristics, DIPGs resection is very limited, and their high resistance to chemo and radiotherapy also contributes to this poor prognosis. As a consequence, treatment of DIPG did not know any significant evolution for 40 years, and the only current treatment remains radiotherapy³.

Since the development of sequencing, somatic mutations have been highlighted in DIPG. Notably, the discovery in 2012 of a somatic mutation in histone H3, H3K27M, represented a real turning point in DIPG understanding^{4,5}. It's now clear that 80% of DIPGs have H3K27M mutation, and furthermore, the importance of this alteration led the WHO to define in 2016 a new subgroup named "Diffuse Midline Glioma, H3K27M mutant"⁶⁻⁸. This mono-allelic mutation consists in the replacement of the lysine 27 by a methionine. The most frequent form of the mutation occurs on the *H3F3A* gene, coding for the H3.3 variant (around 73% of cases). The H3K27M is also found in the *HIST1H3B/C* genes, coding for the H3.1 variant (around 26% of cases), and in few cases in the *HIST2H3C* gene, coding the H3.2 variant (<1%)⁷. In physiological conditions, the lysine 27 residue can be trimethylated by the EZH2 methyltransferase from Polycomb Repression Complex 2 (PRC2), and this H3K27me3 mark leads to a repression of gene expression. In mutated cells, the methionine 27 residue cannot be trimethylated, but still recruits and alters EZH2 methyltransferase activity, leading to a global loss of H3K27me3 mark and disturbing gene expression^{9,10}.

Transgenic mice models have suggested that H3.3K27M is not sufficient to induce tumorigenesis, but accelerates it in the presence of partner alterations, like *TP53* mutations and *PDGFRA* amplification¹¹⁻¹³.

Study of the H3.3K27M impact is quite difficult, due to a lack of consistent models. Besides, many studies have investigated the importance of H3K27M mutation in DIPG cell lines originating from biopsies or autopsies. Still, a significant number of these works were performed with DIPG cells bearing the mutation without trying to modify its expression. And most of the others used either shRNA/siRNA approaches, that leave residual levels of expression, or knock-out systems, that impair the expression of the mutated allele^{14,15}. In order to completely remove the expression of the mutated protein with the smallest possible disturbance on the genome, we developed a gene editing strategy based on the CrispR-Cas9 system. The aim of this study was to create an original model of DIPG cell line, in which the mutation has been reversed.

Material & Methods

Cell culture

DIPG cell line HSJD-DIPG-012 was kindly provided by Dr Angel Carcaboso (Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain). This cell line carries a H3K27M mutation on the *H3F3A* gene. DIPG cells are maintained as tumorspheres in Tumor Stem Medium (TSM), composed half of Neurobasal™-A medium (Life Technologies), and half of DMEM/F12 medium, supplemented with 1% of GlutaMAX, 1% Antibiotic antimycotic, 1% MEM non-essential amino Acids, 1mM sodium pyruvate and 1% HEPES. This medium is extemporaneously supplemented with 2% B-27 supplement (Life technologies), 20ng/mL human EGF, 20ng/mL human basic-FGF, 10ng/mL human PDGF-AA, 10ng/mL PDGF-BB (all from Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) and heparin (). Alternately, adherent monolayers of DIPG were cultured in TSM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (...). Cells were grown in wet atmosphere at 37°C and 5% CO₂. For passaging, cells were dissociated with TrypLE™ Select (Thermofischer), at 37°C for 5min.

Plasmids

Plasmids were synthesized by e-Zyvec company (Lille, France). Plasmid containing CRISPR-Cas9 system encodes Cas9, associated with GFP sequence separated by the autocleavable peptid T2A. This plasmid also contains a guide RNA, which targets 5'-ACCCCTCATTTACTTGATT-3' sequence in the second intron of the *H3F3A* gene. The plasmid containing the insert is composed of two 1kb-long recombination arms (from the *H3F3A* gene in the HSJD-DIPG-012 cell genome) flanking a resistance cassette, composed of En2-splice acceptor sequence, T2A autocleavable peptid sequence, geneticin resistance gene and eZ-HSVtkTer sequence. This resistance cassette is delimited by two FRT sites. The pCAG-Flpe:GFP encoding for the Flp recombinase fused to GFP was purchased from Addgene.

Transfection and Selection

Two million cells were transfected by electroporation using Cell Line Nucleofector™ Kit V (Lonza) with 1µg of each plasmid. 0.8mg/mL genetecin (Life technology) was added to medium two days after transfection, and selection was performed for 5 days. Cells were then maintained under 0.5mg/mL genetecin. Concerning FLP plasmid transfection, the same protocol was used and cells were sorted and cloned in 96 wells plates using BD FACSAria III (BD Bioscience).

PCR & Gel migration

Genomic DNA was extracted using NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel). PCR were done using Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen). Primer sequences are listed in the table below.

Targeted site	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
Geneticin resistance sequence	5'-ATTCGGCTATGACTGGGCAC-3'	5'-CGATGTTTCGCTTGGTGGTC-3'
Resistance cassette - <i>H3F3A</i> gene	5'-GCTGGCACTCTGTGCGATAC-3'	5'-TGCCAATCCAATCCTATCCTCC-3'
<i>H3F3A</i> gene intron 2	5'-GGAGACCTCGTATATCACTG-3'	5'-GGAAGGTATTAGCTGTCAAGGC-3'
<i>H3F3A</i> gene exon 2	5'-GATTTTGGGTAGACGTAATCTTCA-3'	5'-TTTCTGTTATCCATCTTTTGT-3'

All primers were blasted using NCBI Primer-blast website. For PCR products checking, Safe White DNA marker (Abm) was added to PCR products before migration in a 0.8% to 2% agarose gel at 100V according to amplicons size.

Sequencing

PCR products from *H3F3A* exon 2 were purified using PCR clean-up kit (Macherey-Nagel) and sent to GATC company for Sanger sequencing.

Western blot analysis

Proteins were extracted using RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCL, pH 7.9, 120 mM NaCl, 1% Nonidet, 1 mM EDTA, 5 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0.04 mM AEBSF). Protein concentration was quantified using BCA Biorad Protein Assay (Biorad). Then 50µg of proteins were mixed with NuPAGE LDS sample buffer (Invitrogen) and heated 5min at 95°C. Proteins were separated in a polyacrylamide gel (NuPAGE, Invitrogen) in MES buffer (Novex). Transfer was carried out in transfer buffer containing Glycin (0.192M), Tri Base (25mM), Sodium dodecyl sulfate (1.3mM) and Methanol (20%). Membrane was saturated using BSA buffer (TBS-Tween 0.2% with 5% BSA). Primary rabbit antibody anti-H3K27M (Abcam, 1:1000) or anti-actin (Santa Cruz, 1:2000) was added in BSA buffer and membrane was incubated overnight at 4°C. Membrane was washed using TBS-Tween 0.2% solution. Second anti-rabbit antibody coupled with HRP was diluted at 1:2000 in BSA buffer and membrane was incubated for 1h. After washing, membrane was revealed with Luminata Crescendo Western HRP Substrate (Merck Millipore). Luminescent signal was detected using Fusion Solo S system (Vilber Lourmat).

Global approach

We aimed to create a DIPG cell line model in which H3.3K27M mutation had been reverted via gene editing. To do that, we based our strategy on a study from Wassef *et al.*, published in 2017, describing a protocol in which they introduced a point mutation at a precise site of the genome¹⁶.

Our strategy was composed by successive steps giving the opportunity to validate its proper progression. In practice, the first step was to create a DNA double strand break, using CRISPR-Cas9, in the second intron of the *H3F3A* gene, about 400 bp downstream the mutation. In order to favor the DNA reparation by homologous recombination, we designed a targeting vector, containing the geneticin resistance cassette and two 1 kb homologous arms from each side of the targeting site. This resistance cassette contained a splice acceptor sequence (SA), an self-cleaving peptide coding sequence (T2A), a sequence encoding resistance to geneticin (G418R) and a polyadenylation sequence (pA). The two homologous arms have the same sequence from the *H3F3A* gene, apart from the A nucleotide responsible for the H3.3K27M mutation which was reverted to T (Fig.1). Because of the absence of promoter upstream the resistance gene, only recombining cells will exhibit resistance to geneticin, thanks to the splice acceptor.

The next step was to clone resistant cells to segregate those who recombined on the mutated allele, from those recombinants on the non-mutated allele. Clones thus obtained were screened to keep only ones reverted for the mutation. Because the introduction of this construct impairs the expression of the full length H3.3 protein, the cassette was flanked by two FRT sites. The last step was to remove the resistance cassette, by transfecting cells with plasmid encoding flippase fused with GFP, and by sorting/subcloning them. Resulting DIPG cells will exhibit two functional unmutated alleles of the *H3F3A* gene with a residual FRT site within the second intron for the reverted allele (Fig.1).

Results

Obtention of HSJD-DIPG-012 resistant clones reverted for the H3.3K27M mutation

We transfected HSJD-DIPG-012 cell line (renamed DIPG-012 thereafter) with the two plasmids containing the CRISPR-Cas9 system and the homologous recombination targeting insert respectively. After seven days of selection with geneticin, we obtained several colonies of resistant cells (named DIPG-012 G418Res). We first evaluated the insertion of the cassette in the genome of our cells by PCR with primers targeting the resistance gene, and we obtained the expected 371 bp product (Fig.2A, left). We confirmed the insertion of our construct at the right locus by a complementary PCR using one primer in the insert, and the other one in the *H3F3A* gene outside the homology arm sequence. Indeed, we detected a 1578 bp product, indicating that the insert was well located into the second intron of the *H3F3A* gene (Fig.2A, right).

To segregate cells which recombined on the mutated or on the WT allele, we cloned DIPG-012 G418Res cells into 96-well plates. Then we screened all the clones by western blot against the mutation, in order to keep only clones that did not express the mutation any more. Out of the 50 clones tested, we only obtained three clones (namely clones 2, 3 and 4) in which the mutated protein can not be detected anymore, suggesting the recombination on the mutated allele in these clones (Fig.2B). This supports the hypothesis of a selective advantage provided by the K27M mutation. As a control, we kept two clones in which the mutated protein was still present, indicating that the recombination took place in the wild-type allele (clones 1 and 5). We then confirmed this result by sequencing. As expected, all the clones in which we cannot detect the mutated protein presented a loss of the mutation at DNA level (Fig.2C). Altogether, these results allowed to conclude that we succeeded to reverse the H3.3K27M mutation in DIPG cells, by our gene trapping strategy.

Removal of the resistance cassette by flippase

At this step, our strategy led us to a loss of the H3.3K27M mutation in DIPG-012 cell line. However, the presence of the cassette in the *H3F3A* gene led to a likely loss of expression of this allele. Indeed, the presence of the polyadenylation sequence downstream the resistance gene drives an arrest of the synthesis of the *H3F3A/G418R* mRNA. That's why the last step was to restore a *H3F3A* functional gene, different from WT sequence by only a residual FRT site in the intron 2.

To do that, we transfected DIPG-012/clone2 cells with a plasmid containing GFP-fused *FLP* gene, and GFP⁺ cells were sorted and subcloned. After amplification, only 7 subclones grew and we screened them by PCR against the second *H3F3A* intron, in order to visualize the residual FRT site. As expected, in the DIPG-012 WT cells, we obtained only one 658 bp product corresponding to both original mutated and WT allele (Fig.3). On the contrary, we observed two products in the intermediate DIPG-012/clone2, one at 2900 bp corresponding to the recombined allele (containing the cassette) and another at 658 bp, corresponding to the WT allele. Finally, in DIPG-012/clone2/subclone1 cells, we observed the two expected products at 658 bp and 692 bp corresponding to WT and recombined alleles, with this latter bearing only the FRT residual site (34bp). These results allowed us to validate the removal of the resistant cassette in the H3.3K27M reverted DIPG-012 cell line and so the obtention of our final cellular model.

Conclusion

DIPG are brain tumors with a very poor prognosis, characterized by a recurrent somatic mutation in the histone H3 genes, the H3K27M. The role of the mutation in the genesis of DIPG has already been studied. However, its role on the tumor physiology and aggressiveness is still unclear. This is mainly due to a lack of relevant H3K27-unmutated DIPG cellular models. Here we described the establishment, by gene editing, of a reversion cellular model in an initially mutated DIPG cell line.

Different recent studies evaluated the loss of the mutation using knock-down or knock-out approaches. Silveira *et al.* aimed to unvalidate the mutation using shRNA¹⁴. Another study used the Crispr-Cas9 system to perform a knock-out of the *H3F3A* gene to assess the H3K27M mutation effect¹⁵. These strategies display major drawbacks, namely a residual expression or, on the contrary, the complete suppression of one *H3F3A* allele expression, respectively. For example, as the H3.3 variant is implicated in setting up DNA damage repair by non-homologous end-joining¹⁷, altering its expression can introduce a significant bias in the study of the impact on radioresistance.

Recently, a study described a DIPG cellular model, in which the mutation had been reversed, using the CRISPR-Cas9 system¹⁸. This study used a different approach with respect to ours. Indeed, they created a double-strand break using two nickases, guided by two RNA guides, to reduce off-target effects. This strategy required the segregation and the screening of a high number of clones. Our approach is based on the insertion of a resistance cassette to select only recombining cells, and so needed to screen a lower number of clones. Moreover, we aimed to create three subclones from three different clones to avoid clonal and off-target effects.

Our established H3.3K27-reversed DIPG cellular model is strictly similar to initial cells, apart from the mutation and a residual FRT site. This residual FRT site is localized in the second intron of the *H3F3A* gene, far from splicing sites. Therefore, the effect of this FRT site can be considered as negligible. We finally succeeded in creating an original model of DIPG cells, initially mutated, in which the mutation has been reversed.

References

- 1 Hassan, H., Pinches, A., Picton, S. V. & Phillips, R. S. Survival rates and prognostic predictors of high grade brain stem gliomas in childhood: a systematic review and meta-analysis. *J Neurooncol* **135**, 13-20, doi:10.1007/s11060-017-2546-1 (2017).
- 2 Hargrave, D., Bartels, U. & Bouffet, E. Diffuse brainstem glioma in children: critical review of clinical trials. *Lancet Oncol* **7**, 241-248, doi:10.1016/S1470-2045(06)70615-5 (2006).
- 3 Freeman, C. R. *et al.* Final results of a study of escalating doses of hyperfractionated radiotherapy in brain stem tumors in children: a Pediatric Oncology Group study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **27**, 197-206, doi:10.1016/0360-3016(93)90228-n (1993).
- 4 Schwartzenuber, J. *et al.* Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* **482**, 226-231, doi:10.1038/nature10833 (2012).
- 5 Wu, G. *et al.* Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet* **44**, 251-253, doi:10.1038/ng.1102 (2012).
- 6 Castel, D. *et al.* Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol* **130**, 815-827, doi:10.1007/s00401-015-1478-0 (2015).
- 7 Mackay, A. *et al.* Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* **32**, 520-537 e525, doi:10.1016/j.ccell.2017.08.017 (2017).
- 8 Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* **131**, 803-820, doi:10.1007/s00401-016-1545-1 (2016).
- 9 Bender, S. *et al.* Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell* **24**, 660-672, doi:10.1016/j.ccr.2013.10.006 (2013).
- 10 Lewis, P. W. *et al.* Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science* **340**, 857-861, doi:10.1126/science.1232245 (2013).
- 11 Nikbakht, H. *et al.* Spatial and temporal homogeneity of driver mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Commun* **7**, 11185, doi:10.1038/ncomms11185 (2016).
- 12 Funato, K., Major, T., Lewis, P. W., Allis, C. D. & Tabar, V. Use of human embryonic stem cells to model pediatric gliomas with H3.3K27M histone mutation. *Science* **346**, 1529-1533, doi:10.1126/science.1253799 (2014).
- 13 Pathania, M. *et al.* H3.3(K27M) Cooperates with Trp53 Loss and PDGFRA Gain in Mouse Embryonic Neural Progenitor Cells to Induce Invasive High-Grade Gliomas. *Cancer Cell* **32**, 684-700 e689, doi:10.1016/j.ccell.2017.09.014 (2017).
- 14 Silveira, A. B. *et al.* H3.3 K27M depletion increases differentiation and extends latency of diffuse intrinsic pontine glioma growth in vivo. *Acta Neuropathol* **137**, 637-655, doi:10.1007/s00401-019-01975-4 (2019).
- 15 Harutyunyan, A. S. *et al.* H3K27M induces defective chromatin spread of PRC2-mediated repressive H3K27me2/me3 and is essential for glioma tumorigenesis. *Nat Commun* **10**, 1262, doi:10.1038/s41467-019-09140-x (2019).
- 16 Wassef, M. *et al.* Versatile and precise gene-targeting strategies for functional studies in mammalian cell lines. *Methods* **121-122**, 45-54, doi:10.1016/j.ymeth.2017.05.003 (2017).
- 17 Luijsterburg, M. S. *et al.* PARP1 Links CHD2-Mediated Chromatin Expansion and H3.3 Deposition to DNA Repair by Non-homologous End-Joining. *Mol Cell* **61**, 547-562, doi:10.1016/j.molcel.2016.01.019 (2016).
- 18 Chen, K. Y. *et al.* Reciprocal H3.3 gene editing identifies K27M and G34R mechanisms in pediatric glioma including NOTCH signaling. *Commun Biol* **3**, 363, doi:10.1038/s42003-020-1076-0 (2020).

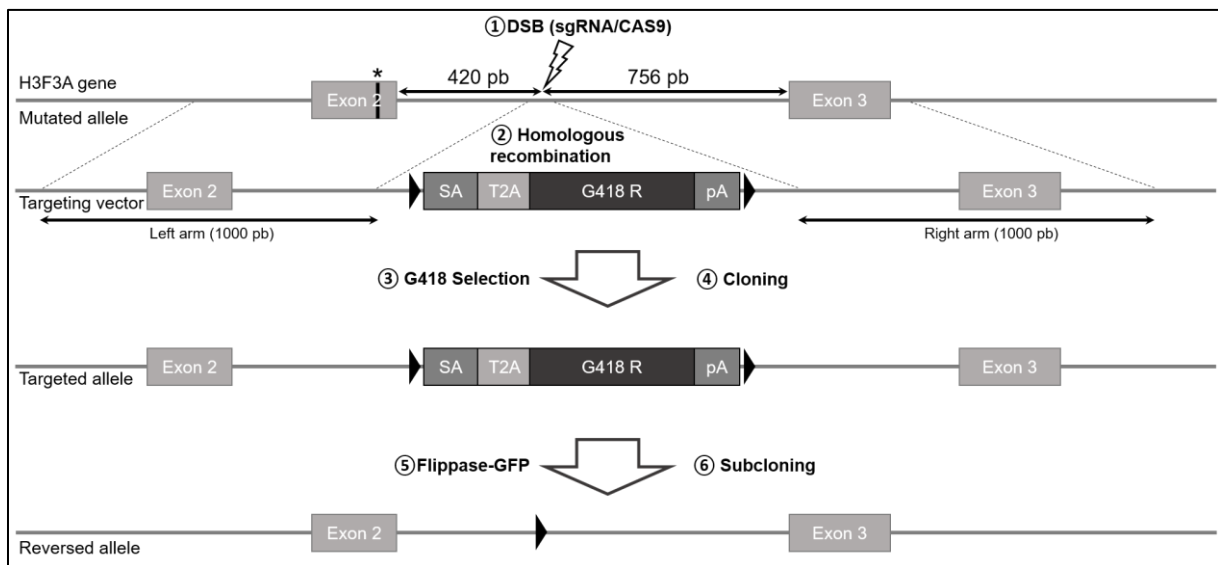


Figure 1. Global gene trapping strategy for the H3.3K27M mutation reversion. DNA Double strand break is induced in the second intron of the H3F3A gene using CRISPR-Cas9 system. Targeting vector favors homologous recombination and contains two homology arms, based on the H3F3A gene, apart from the nucleotide responsible for the H3.3K27M mutation. It also contains a resistance cassette to G418. After selection, geneticin resistant cells are cloned to select those who lost the mutation. After transfection with a plasmid encoding GFP fused-flippase, cells are subcloned in order to keep only those who lost the cassette and restored a functional H3F3A allele.

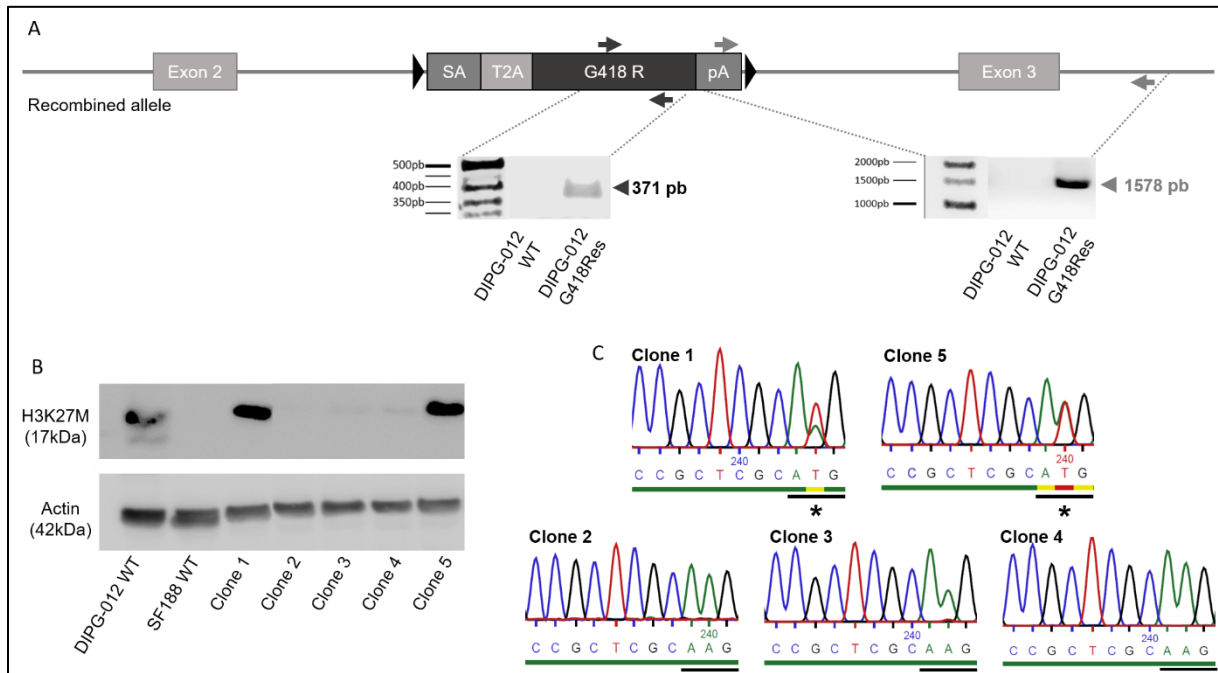


Figure 2. Loss of the H3.3K27M mutation in DIPG-012 cells. **A.** PCR validating the presence of the insert and its proper location. Primers are represented by arrows. Expected PCR products length are indicated besides each gel picture. **B.** Western Blot against the H3K27M mutated protein. As a negative control, we used SF188 cells (H3K27M^{WT}). **C.** Part of chromatograms from the sequencing of PCR products on the H3F3A exon 2. Triplet coding the lysine or methionine 27 of histone H3 is black underlined. Presence of the mutation is indicated by an asterisk.

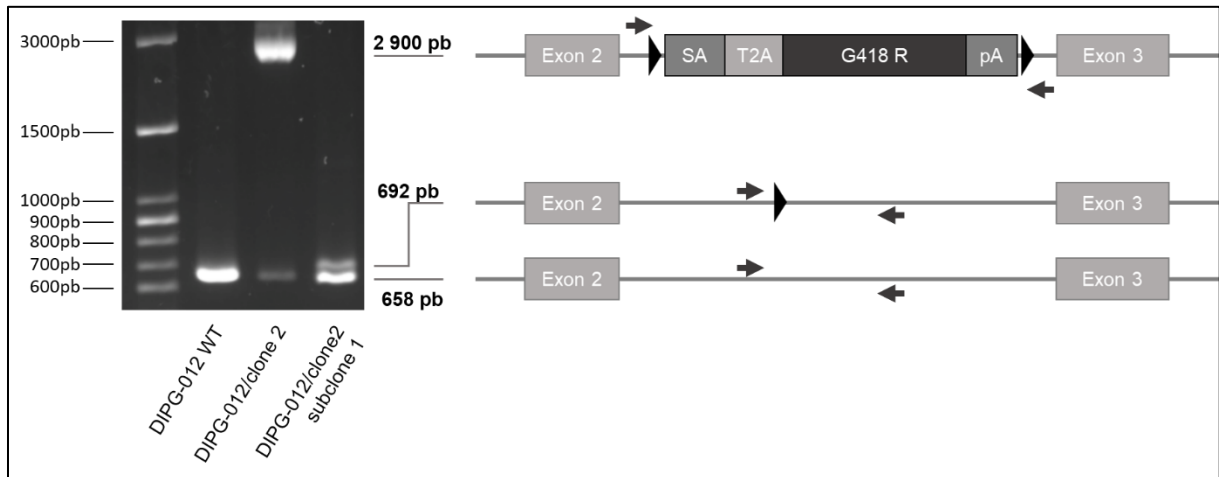


Figure 3. Validation of the resistance cassette excision by flippase. PCR validating the removal of the cassette in DIPG subclone 1. Different couples of primers are represented by arrows. Expected PCR products length and corresponding theoretic intronic region are indicated besides gel picture.

RESULTATS

2.4. Résultats complémentaires préliminaires

2.4.1. Matériel et méthodes

Extraction des histones et analyse en western blot

Après récolte des cellules, la lyse cellulaire et l'extraction des histones était réalisées à l'aide du kit Histone Extraction Kit (Abcam). Les protéines étaient ensuite dosées en utilisant le kit BCA Biorad Protein Assay (Biorad). À partir de ce dosage, 1µg de protéines était ajouté à 5µL de tampon NuPAGE LDS sample buffer (Invitrogen) et dénaturé à 95°C pendant 5 minutes. Les protéines dénaturées étaient séparées en gel de polyacrylamide 12% (NuPAGE, Invitrogen) par électrophorèse dans du tampon de migration NuPAGE de type MES (Novex). Le transfert sur membrane de nitrocellulose (Thermo scientific) était réalisé en conditions humides dans un tampon de transfert constitué de Glycine (0,192M), Tri Base (25mM), Sodium dodecyl sulfate (1,3mM) et méthanol (20%). La membrane de nitrocellulose était ensuite saturée dans une solution de BSA (TBS-Tween 0,2% contenant 5% de BSA). La membrane était alors incubée, une nuit à 4°C sous agitation, dans la solution de saturation contenant les anticorps primaires de lapin anti-H3K27M (Abcam), anti-H3K27me3 (Abcam), anti-H3K27ac (Cell Signaling), anti-H3.3 (Cell Signaling) ou anti-H4 (Cell Signaling), dilués au 1 : 1000e. Après lavage au TBS-Tween 0,2%, les membranes étaient incubées sous agitation avec les anticorps secondaires anti-lapin, couplés à la *horseradish peroxidase* (HRP), dilués au 1 : 2000e dans une solution de BSA. La révélation consistait en l'ajout du substrat *Luminata Crescendo Western HRP Substrate* (Merck Millipore) puis en la détection du signal de chimioluminescence à l'aide du système Fusion Solo S (Vilber Lourmat).

Test de croissance cellulaire

- En conditions adhérentes

Les cellules étaient récoltées et comptées après coloration au bleu de Trypan grâce au TC20 Automated Cell Counter (Biorad). 250 cellules par puits étaient alorsensemencées en plaque 96 puits *Image-Lock* (EssenBioscience) dans du milieu TSM base contenant 10% de SVF. Une mesure de la confluence cellulaire était ensuite réalisée toutes les 24h à l'aide de la technologie Incucyte.

RESULTATS

- En gliosphères

Les cellules étaient récoltées et comptées. 1000 ou 3000 cellules par puits étaientensemencées dans des plaques 96 puits à fond rond. Après 8 jours d'incubation, une imagerie était réalisée à l'aide d'un microscope de type Nikon ECLIPSE Ti-S et le diamètre des gliosphères était mesuré sur le logiciel ImageJ.

Étude du métabolisme cellulaire

Des gliosphères de diamètre compris entre 550 et 800 μm étaient déposées au centre des puits d'une plaque Seahorse XFe96 (Agilent). Une analyse de l'*oxygen consumption rate* (OCR) était réalisée à l'aide de la technologie XF Seahorse (Agilent). Au cours de l'expérience, étaient successivement injectés : 1 μM d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase), une première dose de FCCP (protonophore découplant la chaîne respiratoire de l'ATP synthase) permettant d'atteindre une concentration finale de 2 μM , une deuxième dose de FCCP permettant d'atteindre une concentration finale de 2,5 μM et enfin 1 μM d'antimycine A (inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale) et 1 μM de roténone (inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale). Cette combinaison permettait d'évaluer les paramètres que sont la respiration basale, la part de la consommation d' O_2 dédiée à la régénération d'ATP à partir d'ADP et de P_i , la consommation d' O_2 maximale que peut atteindre la chaîne respiratoire (après les injections de FCCP) et enfin la consommation d'oxygène non mitochondriale (après l'injection d'antimycine A et de roténone). Pour chacun des puits, les valeurs d'OCR mesurées étaient normalisées par rapport au diamètre des sphères.

Évaluation de la radiosensibilité par test de clonogénicité

300 μL d'une solution d'agar 0,6% était déposés au fond des puits d'une plaque 24 puits. Les cellules étaient récoltées, dissociées, puis comptées. 2000, 3000, 4000 et 8000 cellules, pour les conditions 0Gy, 1Gy, 2Gy et 3Gy respectivement, étaientensemencées par puits par-dessus la première couche d'agar, dans 300 μL de milieu de culture à 0,3% d'agar. Après 24h, les cellules étaient exposées à des doses de 0Gy, 1Gy, 2Gy ou 3Gy de radiations ionisantes dans le département de radiothérapie du Centre Oscar Lambret (Lille), à l'aide d'un accélérateur linéaire de type XSTRAHL 100 (photons de 50 kV, débit dose de 1,25 Gy/minute). Après 10 jours d'incubation, la révélation des colonies formées s'effectuait par distribution de

RESULTATS

60 µL d'une solution de sels de tétrazolium à 5 mg/mL (Sigma aldrich) dans les différents puits. Les plaques étaient ensuite scannées et les sphères étaient quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ. Tout d'abord, le dénombrement des sphères obtenues dans la condition 0 Gy permettait de calculer le plating efficiency (PE) par la formule suivante :

$$PE = \text{Nombre de colonies à 0 Gy} / \text{Nombre de cellules ensemencées}$$

Ensuite, un taux de survie relatif (TS) pour chacune des doses d'irradiations était calculé par la formule suivante :

$$TS = \text{Nombre de colonies après irradiation} / (PE \times \text{Nombre de cellules ensemencées})$$

Les valeurs ainsi obtenues permettaient de tracer une courbe de survie représentant le taux de survie en échelle logarithmique en fonction de la dose d'irradiation reçue.

Évaluation du taux de ROS cellulaire

Les cellules étaient récoltées et comptées. 1×10^5 cellules par puits étaient ensemencées en plaque 24 puits. Une irradiation mono-fractionnée de 6 Gy ou le Tert butyl hydroperoxide, à des concentrations finales de 0 µM à 75 µM (expérience contrôle non présentée), étaient utilisés comme inducteurs de stress oxydant. Après 4h en présence de Tert butyl hydroperoxide ou à 1h, 3h et 5h post-radiothérapie, le taux de ROS cellulaires était mesuré à l'aide de la sonde fluorescente CellROX green (Invitrogen), utilisée à une concentration finale de 500 nM par puit. Les cellules étaient ensuite centrifugées, rincées puis marquées au LIVE/DEAD Fixable violet (Life Technologies), afin d'évaluer la viabilité cellulaire en parallèle du taux de ROS cellulaire. Après incubation, l'analyse était réalisée avec un cytomètre de type Cytoflex (Beckman Coulter) en utilisant le laser 508 nm et le filtre 525/40 pour le CellROX Green et le laser 405 nm et le filtre 450/45 pour le LIVE/DEAD Fixable violet. L'acquisition et l'analyse étaient faites grâce au logiciel Cytexpert. Le niveau de ROS était analysé sur la seule population de cellules viables mise en évidence par le marquage LIVE/DEAD pour chaque condition. La valeur de delta *Mean Fluorescence Intensity* (Delta MFI) était calculée selon la formule suivante :

$$\text{Delta MFI} = (\text{MFI condition} - \text{MFI bruit de fond}) / \text{MFI bruit de fond.}$$

RESULTATS

2.4.2. Résultats

Les données précédemment exposées montrent que nous avons réussi à créer un modèle cellulaire de DIPG, initialement muté, dans lequel nous avons réversé la mutation H3.3K27M. Le résultat de cette approche est l'obtention de cellules de DIPG-012 ne différant des cellules originelles mutées que par l'absence de la mutation et la présence d'un site FRT résiduel au sein de l'intron 2 du gène H3F3A.

Sur la base de ce modèle, j'ai donc pu initier une évaluation préliminaire des effets épigénétiques et biologiques de la réversion de la mutation H3.3K27M. Pour la suite de cette étude, le clone DIPG-012/clone2/subclone1 présentant une perte de la mutation sera nommé DIPG-012^{REV}.

Impact épigénétique de la perte de la mutation H3.3K27M

Il est maintenant établi que la mutation H3.3K27M inhibe l'activité de la méthyltransférase EZH2, aboutissant à une perte globale de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3. Avant d'évaluer les effets biologiques de la réversion de la mutation, j'ai tout d'abord vérifié par western blot que le sous clone DIPG-012^{REV} ne présentait plus la mutation H3K27M et que cette perte de la mutation était accompagnée d'une restauration de la marque H3K27me3.

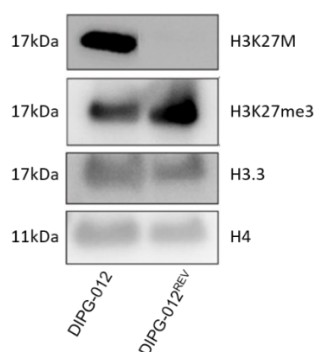


Figure 30. Analyse par western blot de l'effet de la réversion de la mutation H3.3K27M sur la marque H3K27me3 et le niveau d'expression d'H3.3. Après extraction des histones, un western blot utilisant des anticorps anti-H3K27M, anti-H3K27me3 et anti-H3.3 était réalisé sur les cellules DIPG-012 et DIPG-012^{REV}. L'histone H4 était utilisée comme marqueur d'équicharge.

Les résultats obtenus montrent que le sous-clone réversé, dans lequel la cassette de résistance a été excisée, présente une restauration de la marque H3K27me3, associée à la perte de la mutation H3K27M (Figure 30). Mais également, la réversion de la mutation ne semble pas affecter le niveau total d'histone H3.3 (Figure 30). Ces résultats confirment que notre modèle

RESULTATS

cellulaire de DIPG a bien été corrigé et que cette correction apporte un retour de la marque H3K27me3 sans altérer le niveau total d'histone H3.3.

Effet de la perte de la mutation H3.3K27M sur la croissance cellulaire

Suite à l'établissement de ce modèle, j'ai pu entamer des études préliminaires, dans le but de le caractériser. Dans un premier temps, j'ai évalué l'effet de la perte de la mutation sur la croissance cellulaire. Après l'ensemencement des cellules, j'ai, d'une part, pu suivre la croissance de celles-ci en condition adhérente par un suivi journalier de la confluence (Figure 31.A). D'autre part, j'ai également suivi la croissance en gliosphères des cellules, par mesure du diamètre des sphères formées en suspension (Figure 31.B).

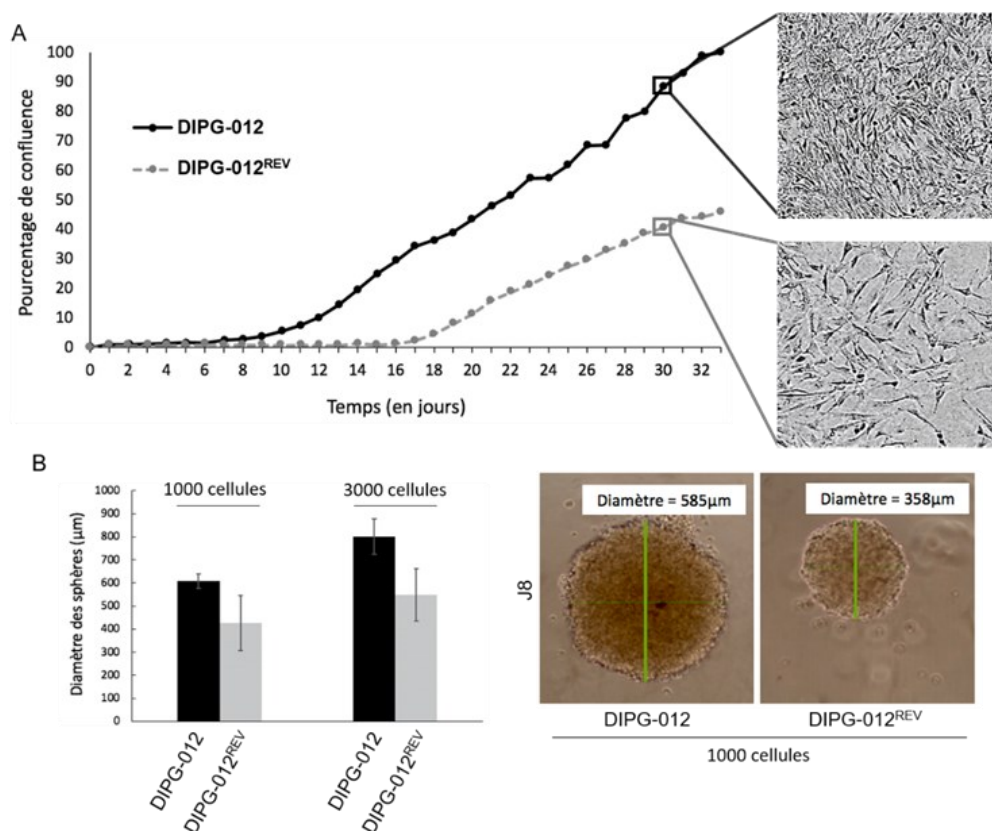


Figure 31. Étude de la croissance cellulaire des cellules DIPG-012 et DIPG-012^{REV}. **A.** Les cellules étaient ensemencées en plaque 96 puits à raison de 250 cellules par puits en conditions adhérentes. Un suivi journalier de la confluence était réalisé grâce à la technologie Incucyte. L'évolution de la confluence des cellules DIPG-012 est représentée par la courbe noire tandis que celle des DIPG-012^{REV} est représentée par la courbe grise. Une image reflétant la différence observée était prise lors du 30^{ème} jour. **B.** Le diamètre des gliosphères des DIPG-012 (en noir) et DIPG-012^{REV} (en gris) était mesuré 8 jours après l'ensemencement de 1000 ou 3000 cellules. Ce résultat est représentatif de 8 réplicats techniques par condition. A droite, photographie de gliosphères provenant des cellules DIPG-012 et DIPG-012^{REV} réalisée 8 jours après l'ensemencement de 1000 cellules/puits.

RESULTATS

En conditions adhérentes, les cellules DIPG-012 mutées H3.3K27M atteignaient 100% de confluence 33 jours après ensemencement. Ce même jour, les cellules DIPG-012^{REV} n'atteignaient quant à elle que 46% de confluence (Figure 31.A). Cette expérience suggère que les cellules dans lesquelles la mutation a été réversée présenteraient un retard de croissance par rapport aux cellules contrôles mutées. De façon concomitante, les sphères formées par les cellules DIPG-012^{REV}, 8 jours après ensemencement à partir de 1000 cellules, présentaient un diamètre moyen inférieur à celui des sphères formées par les cellules DIPG-012 originelles (respectivement 425 μm et 609 μm) (Figure 31.B). Cette tendance est conservée lorsque 3000 cellules sont ensemencées, avec des diamètres moyens de 800 μm et 549 μm pour les cellules DIPG-012 et DIPG-012^{REV} respectivement (Figure 31.B). Ces résultats montrent que la réversion de la mutation H3.3K27M entrainerait un retard de la croissance des cellules de DIPG.

Etude du métabolisme cellulaire

Un métabolisme cellulaire altéré est l'une des causes décrites de la dérégulation de la croissance des cellules cancéreuses, c'est pourquoi, j'ai entrepris d'évaluer l'effet de la réversion de la mutation H3.3K27M sur le métabolisme des cellules de DIPG. Pour cela, et grâce à la technologie XF96 Seahorse, j'ai effectué des mesures d'oxymétrie, sur des gliosphères calibrées ayant un diamètre compris entre 550 et 800 μm (Figure 32). Cette étude préliminaire du métabolisme cellulaire nous permettait d'évaluer de manière comparative le recours à un métabolisme de type phosphorylation oxydative (*i.e.* respiration mitochondriale basale, consommation d'O₂ dédiée à la production d'ATP et respiration mitochondriale maximale). Ces résultats montrent que les cellules DIPG-012 et DIPG-012^{REV} avaient, de ce point de vue, un profil métabolique similaire, sans différence significative. Ce résultat étant préliminaire, il est nécessaire de reproduire cette expérience mais il semblerait toutefois que la mutation H3.3K27M n'aurait pas d'impact sur la respiration mitochondriale dans les cellules de DIPG.

RESULTATS

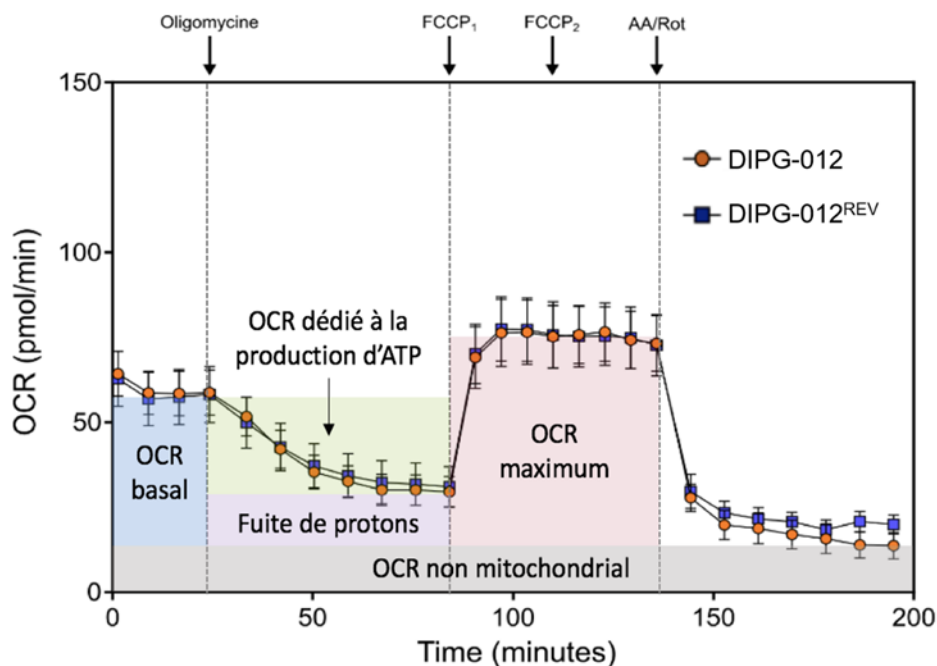


Figure 32. Mesure de l'oxygène consommation rate (OCR) des cellules DIPG-012 et DIPG-012^{REV}. La consommation d'O₂ des gliosphères de DIPG-012 (ligne orange) et DIPG-012^{REV} (ligne bleue), d'un diamètre compris entre 550 et 800 µm, était mesurée en fonction du temps. L'utilisation de différents inhibiteurs permettait de mesurer divers paramètres de la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Le taux de consommation de l'oxygène nommé OCR (*oxygen consumption rate*) basal (bleu) correspond à la consommation moyenne en O₂ des cellules de la gliosphère. L'injection d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase) permet de mesurer l'OCR dédié à la production d'ATP, correspondant à un métabolisme de type OXPHOS pour produire de l'énergie. Cette valeur résulte de la différence entre l'OCR basal et l'OCR mesuré suite à l'injection d'oligomycine. L'injection de FCCP (protonophore découplant la chaîne respiratoire de l'ATP synthase), permet de mesurer l'OCR maximum correspondant quant à lui à l'activité la plus importante que peut atteindre la chaîne respiratoire mitochondriale (en rouge). Au sein de la cellule, il existe d'autres mécanismes consommant de l'O₂ (e.g NADPH oxydase). Cette consommation d'O₂ non mitochondriale (en gris) est mesurable grâce à l'injection d'antimycine A (inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale) et de roténone (inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale). Les protons externalisés au niveau de l'espace inter-membranaire mitochondrial servent à la production d'ATP, mais également à la production de chaleur. Ainsi, la consommation d'O₂ dédiée à la production de chaleur, ou fuite de proton (en violet) est mesurée en réalisant la différence entre l'OCR mesuré après injection d'oligomycine et l'OCR non mitochondrial.

Effet de la mutation H3.3K27M sur la résistance aux traitements des cellules de DIPG

La problématique principale du laboratoire est l'étude de la résistance aux traitements des cellules de DIPG et, par extension, l'éventuel rôle de la mutation H3.3K27M dans cette résistance. J'ai donc initié une évaluation de l'effet de la réversion de la mutation sur la radiothérapie, qui demeure à ce jour, le traitement de référence des DIPG.

Pour cela, j'ai ensemencé des cellules de DIPG-012 et DIPG-012^{REV} en condition semi-solide (en agar mou), puis je les ai soumises à des doses croissantes de radiothérapie. L'utilisation

RESULTATS

d'agar mou permettait ici à chaque clone cellulaire de rester individualisé, afin de ne pas confondre résistance à la radiothérapie et croissance cellulaire. Ainsi, la condition non irradiée (0 Gy) était similaire à un test de clonogénicité et nous permettait non seulement de servir de contrôle concernant le test de radiorésistance, mais également de mesurer la capacité des cellules à former des sphères en milieu semi solide. Cette condition, nous informait notamment d'un effet notable de la perte de la mutation sur la capacité des cellules à former des colonies. En effet, pour 2000 cellulesensemencées, les cellules DIPG-012 forment en moyenne deux fois plus de colonies que les cellules DIPG-012^{REV}, 10 jours après ensemencement (Figure 33.A). A partir de cette condition contrôle, il était possible de déterminer la valeur de *plating efficiency* PE (ratio entre le nombre de colonies formées dans la condition non traitée et le nombre de cellulesensemencées), qui passait de 0,3 pour les cellules DIPG-012 à 0,14 pour les cellules DIPG-012^{REV}, reflétant parfaitement l'effet observable visuellement (Figure 33.A).

Concernant le test de radiorésistance, la valeur du PE nous permettait de normaliser les résultats et de déterminer pour chaque condition, un taux de survie après irradiation. Après une irradiation monofractionnée allant de 1 à 3 Gy, nous n'avons pas observé de différence significative entre les cellules DIPG-012 et DIPG-012^{REV} (Figure 33.B). Des taux de survie légèrement inférieurs apparaissent pour les cellules réversées pour des irradiations à 2Gy et 3Gy, et ces expériences devront être répétées pour confirmer ou infirmer cette tendance.

RESULTATS

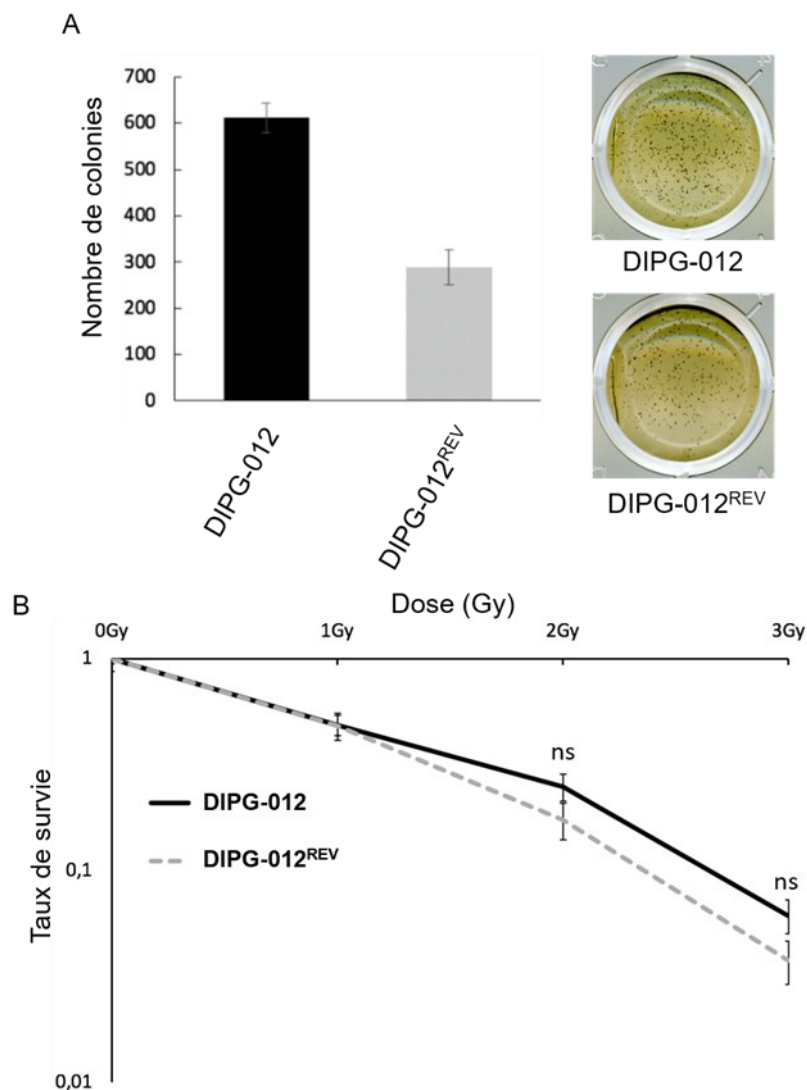


Figure 33. Test de clonogénicité et étude de l'impact de la mutation H3.3K27M sur la radiorésistance des cellules de DIPG. Les cellules de DIPG étaient ensemencées en agar mou dans des plaques 24 puits **A**. Dans la condition contrôle (0 Gy), 2000 cellules étaient ensemencées et les colonies formées à 10 jours après ensemencement étaient comptées (Le résultat présenté est issu de 4 répliques techniques). A droite, photographie d'un puits de chaque type cellulaire à 0 Gy, 10 jours après ensemencement. **B**. Les cellules DIPG-012 et DIPG-012^{REV} étaient ensemencées en agar mou puis soumises à une irradiation unique à des doses croissantes, allant de 1 à 3 Gy. Après 10 jours, le nombre de colonies formées était révélé par une coloration au MTT et, après comptage, le taux de survie était déterminé pour chaque condition.

Le second aspect de la résistance aux traitements étant la résistance à la chimiothérapie, je réalisais également une première évaluation de l'impact de la mutation sur la résistance au témozolomide. Dans ce test préliminaire, les cellules DIPG-012 et DIPG-012^{REV} ne présentaient aucune différence de sensibilité en réponse à un traitement au témozolomide, avec une très forte insensibilité des cellules pour des doses allant jusqu'à 100 μ M (données non présentées).

RESULTATS

Effet de la mutation H3.3K27M sur le taux basal de ROS et leur détoxification

Les espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) ayant un rôle dans la résistance aux traitements, notamment la radiothérapie, et également un lien avec le métabolisme cellulaire, j'ai ensuite évalué le taux de ROS au sein de nos cellules, avant et après une irradiation ionisante de 6 Gy. L'objectif étant d'évaluer l'impact de la mutation H3.3K27M sur le taux basal de ROS, mais également sur les capacités de détoxification des cellules. Pour cela, j'ai utilisé la sonde oxydable fluorescente CellROX™ Green (Figure 34).

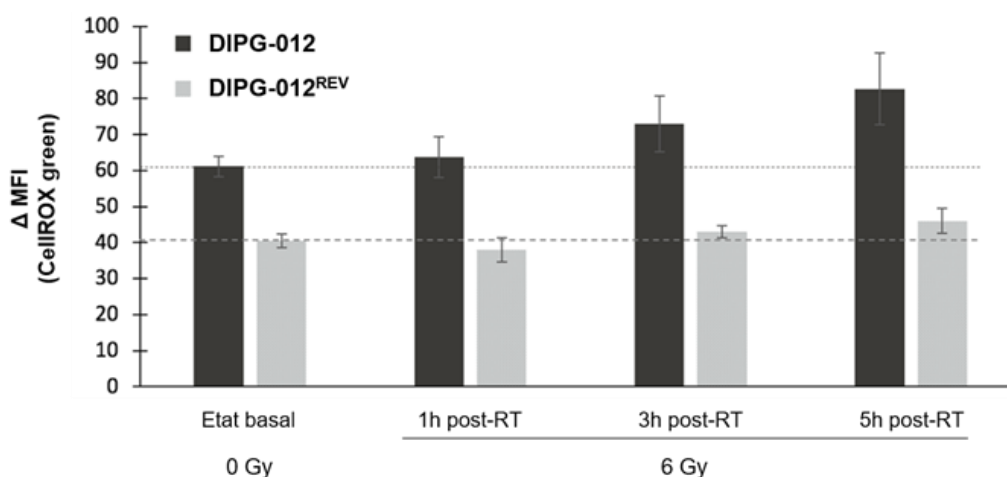


Figure 34. Evaluation du taux basal de ROS et de son évolution après irradiations dans les cellules DIPG-012 vs. DIPG-012^{REV}. Le taux de ROS cellulaire était déterminé par cytométrie en flux suite à un marquage au CellROX™ green. Pour chaque condition, un delta de MFI était déterminé. Les cellules étaient irradiées, ou non, à une dose unique de 6 Gy et le taux de ROS était ensuite déterminé à 1, 3 et 5h post-radiothérapie.

Le taux basal de ROS, à 0 Gy, apparaissait plus faible dans les cellules DIPG-012^{REV} comparées aux cellules DIPG-012, avec un ΔMFI de 61,1 et 40,5 pour les cellules DIPG-012 et DIPG-012^{REV} respectivement. Le niveau d'induction d'un stress oxydant était ensuite évalué dans chaque condition à différents temps (allant de 1 à 5h) après une dose unique de radiations ionisantes de 6 Gy. Si les cellules DIPG-012^{REV} parvenaient à maintenir un niveau de ROS équivalent à leur niveau basal jusqu'à 5h après traitement, le taux de ROS dans les cellules DIPG-012 avait tendance à augmenter dès 3h post-traitement (Figure 34). Ces résultats, bien que préliminaires, suggèrent que la réversion de la mutation entraînerait une diminution du taux basal de ROS, ainsi qu'une capacité de détoxification accrue par rapport aux cellules mutées H3.3K27M.

Discussion

DISCUSSION

Les gliomes de haut grade, et notamment les gliomes diffus localisés au tronc cérébral comptent parmi les tumeurs pédiatriques au pronostic le plus sombre, avec une médiane de survie de 12 mois environ et un taux de survie à 2 ans inférieur à 10%. Ces tumeurs n'offrent que peu, voire pas, de réponse aux traitements, avec une ré évolution quasi systématique. A ce jour, le traitement de référence de ces tumeurs reste donc un traitement palliatif reposant sur de la radiothérapie, associée ou non à un agent de chimiothérapie. Depuis de nombreuses années maintenant, et malgré de nombreux essais cliniques, aucune thérapie n'a ainsi pu apporter de bénéfice en termes de survie.

La découverte en 2012, au sein des DIPG, de mutations nommées H3K27M et quasi-exclusives à la pédiatrie, a permis de nombreuses avancées, notamment quant à la compréhension de l'émergence de ces tumeurs. En effet, ces mutations sont décrites comme un des premiers événements à apparaître lors de la genèse des DIPG. Des études montrent également leur rôle primordial, ou « driver », dans la tumorigénèse. Cependant, bien que le rôle de ces mutations ait été décrit dans diverses études, peu d'entre elles s'intéressent au rôle d'H3.3K27M dans la résistance aux traitements des DIPG, question centrale au sein du laboratoire. En effet, les études portant sur les impacts de cette mutation ne s'intéressent finalement que peu aux effets biologiques directs, mais plutôt aux mécanismes moléculaires altérés par l'introduction ou le retrait de cette dernière.

Ainsi, le laboratoire a initié un projet de recherche portant précisément sur l'impact des mutations H3K27M sur la résistance aux traitements des DIPG. Ce projet se devait toutefois de tenir compte d'un accès restreint aux échantillons biologiques. Les DIPG sont en effet des tumeurs qualifiées de rares puisque touchant environ 50 enfants par an en France. Or, afin d'étudier l'impact des mutations H3K27M, il nous fallait pouvoir comparer des cellules issues des patients H3K27 WT et H3K27M. Dans ce contexte, au faible nombre de patients H3K27 WT, s'ajoutait le fait qu'il peut être risqué de comparer des tumeurs issues de patients distincts. En effet, outre le statut mutationnel H3K27, ces tumeurs possèdent des profils génétiques différents, mais peuvent aussi avoir reçu, au préalable, divers protocoles de traitement. En ce sens, l'étude de Werbrouck et collaborateurs, publiée en 2019, montrait que la résistance à la radiothérapie des patients atteints de DIPG était davantage liée à la présence de mutations du gène *TP53* qu'à la mutation H3.3K27M (Werbrouck *et al.*, 2019). Afin de répondre précisément à notre question, à savoir l'impact de la mutation H3.3K27M sur la

DISCUSSION

résistance aux traitements des DIPG, et ce, avec les ressources biologiques dont nous disposions, il nous fallait créer des modèles cellulaires porteurs ou non de la mutation. Pour ce faire, deux approches s'offraient à nous :

- Introduire la mutation dans des cellules non mutées
- Corriger la mutation dans des cellules de DIPG originellement mutées.

Faute de lignées cellulaires de DIPG H3K27 WT, j'ai entrepris d'introduire la mutation H3.3K27M dans trois lignées cellulaires de gliomes pédiatriques sus-tentoriels et ce bien que la mutation soit présente en faible pourcentage au sein des gliomes hémisphériques (2,5%). Ces lignées présentaient des profils distincts, qui nous permettaient d'étudier la réponse des cellules selon leur grade OMS ou encore selon la présence d'altérations décrites dans les DIPG. Ainsi, si la lignée cellulaire Res259 (grade II) se distingue des lignées SF188 et KNS42 (grade IV) par son grade, la lignée KNS42 se distingue de la lignée SF188 notamment par la présence d'une amplification du gène *PI3KCA1*, dont les mutations sont retrouvées dans 14% des cas de DIPG (Buczkwicz *et al.*, 2014).

Pour ce faire, j'ai transfecté les cellules avec un plasmide contenant la séquence codante du gène *H3F3A* muté, en fusion avec la protéine fluorescente mCherry. Outre le fait de pouvoir vérifier sa localisation nucléaire, la présence de la protéine de fusion H3.3K27M-mCherry nous permettait d'effectuer un tri cellulaire afin d'obtenir une population cellulaire homogène, exprimant la mCherry et, de fait, la forme mutée de l'histone H3. L'introduction de cette protéine, sous le contrôle du promoteur fort pCMV, devait toutefois provoquer une surexpression de la protéine H3.3. C'est pourquoi, en guise de contrôle, j'ai transfecté les cellules avec la même construction mais codant la forme non mutée du gène *H3F3A*. Ainsi, lors de nos expériences, nous avons comparé les cellules dites « H3.3K27M » avec les cellules nommées « H3.3 », qui ne différaient que par la présence de la mutation. Par ailleurs, nous constatons que ces cellules présentaient un niveau de fluorescence (en cytométrie) et une quantité de protéines exogène (par western blot) équivalente.

Alors inédits, de tels modèles ont par la suite été cependant publiés en 2018 par Deng et collaborateurs. Leurs travaux reposaient ainsi sur l'induction de la mutation H3.3K27M au sein des lignées cellulaires Res259 et SF188 (Deng *et al.*, 2018). Dans cette étude, les auteurs transfectaient les cellules avec un plasmide contenant deux cassettes distinctes. La première

DISCUSSION

cassette contenait le gène *H3F3A* muté ou non, en fusion avec un tag. La seconde cassette contenait un gène de résistance à la généticine. Bien que proche, notre construction se distinguait de celle-ci par la présence d'une seule cassette (sous le contrôle d'un promoteur unique) regroupant la séquence codante du gène *H3F3A* en fusion avec la séquence codante de la protéine mCherry, séparée du gène de résistance à l'hygromycine B par une séquence IRES (*Internal ribosome entry site*). Toutefois, cette étude ne s'intéressait que très peu aux effets biologiques de l'induction de la mutation, se limitant à un test de croissance cellulaire et une estimation du niveau basal d'apoptose par cytométrie en flux. Plus récemment, une seconde étude s'intéressait, entre autres, à l'introduction de la mutation H3.3K27M dans la lignée SF188 par utilisation du système CRISPR-Cas9 (Chen *et al.*, 2020). Cette stratégie nécessitait, elle, de réaliser un screening d'un grand nombre de clones. Tout comme l'étude de Deng, cette étude ne s'intéressait finalement que très peu aux effets biologiques de la mutation, ne réalisant qu'un test de croissance et étudiant la tumorigénicité *in vivo*. Ces deux études se concentraient principalement sur l'étude de voies de signalisation impactées par la présence de la mutation, par l'intermédiaire du *Cancer Testis antigen VCX3A* ou de la voie Notch respectivement (Deng *et al.*, 2018 ; Chen *et al.*, 2020).

Dans notre cas, j'ai validé notre modèle dans trois lignées cellulaires en analysant par western blot l'expression du transgène, ainsi que le niveau de différentes marques épigénétiques dont les variations sont décrites comme inhérentes à la mutation. Il est toutefois à souligner que la lignée KNS42 présente une expression plus faible de la mutation et par extension, du transgène. Ce niveau plus faible était également constaté par cytométrie en flux, avec une médiane d'intensité de fluorescence dix fois plus faible pour la lignée KNS42, comparée à la lignée Res259. Cela suggère une régulation particulière de l'expression des transgènes à partir du promoteur CMV dans la lignée KNS42.

Si l'absence de variation de l'expression de la protéine H3.3 endogène suite à l'introduction de nos transgènes nous apparaît logique dans le cadre de notre modèle, Chen et collaborateurs observaient une forte augmentation du niveau d'expression du variant d'histone H3.3, alors qu'ils introduisaient la mutation en lieu et place d'un allèle sauvage, par CRISPR-Cas9 (Chen *et al.*, 2020). En ce qui concerne notre modèle, le niveau d'expression du variant d'histone H3.3 endogène n'apparaissait pas affecté par l'expression d'H3.3 exogène (de poids moléculaire différent), comme reporté également par Deng et al dans leur étude

DISCUSSION

(Deng *et al.*, 2018). Mais surtout, entre la condition contrôle (H3.3) et la condition mutée (H3.3K27M) le niveau d'expression de notre transgène apparaissait équivalent, présageant que les effets observés par la suite ne seront imputables qu'à la présence ou non de la mutation.

Afin d'évaluer la pertinence biologique de notre modèle cellulaire H3.3K27M induit, j'ai étudié le niveau de différentes marques épigénétiques. Le premier effet décrit de la mutation H3K27M consiste à engendrer une perte globale de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (Lewis *et al.*, 2013 ; Bender *et al.*, 2013). J'ai confirmé la perte de la triméthylation de ce résidu dans nos différents modèles. Si nous ne parvenions plus à détecter en western blot la marque H3K27me3 dans les lignées Res259 et SF188, nous constatons que celle-ci était toujours observable dans la lignée KNS42-H3.3K27M bien que plus faible que dans la condition KNS42-H3.3. Ceci peut être expliqué par le fait que la protéine mutée est bel et bien présente au sein des cellules KNS42 mais en quantité moindre, n'inhibant que partiellement la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 sans toutefois constituer un frein à l'utilisation du modèle KNS42. Une autre altération épigénétique décrite comme impactée par la présence des mutations H3K27M est la marque H3K27me2 (Lewis *et al.*, 2013 ; Harutyunyan *et al.*, 2019). Concernant celle-ci, nous observons une réduction de son niveau au sein de l'ensemble de nos modèles cellulaires mutés. Dans leur étude, Harutyunyan et collaborateurs observaient ce même phénomène.

Une troisième marque décrite comme altérée au sein des DIPG mutés H3K27M est l'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3. La mutation engendrerait en effet une augmentation de la marque H3K27ac (Krug *et al.*, 2019 ; Piunti *et al.*, 2017). Au sein de nos modèles, nous n'observons pas de différence d'intensité par western blot concernant cette marque. De même, l'étude de Chan *et al.*, publiée en 2013, ne constatait pas non plus d'augmentation, à la fois dans des échantillons de DIPG mais également lorsque la mutation était introduite dans la lignée cellulaire HEK293T (Chan *et al.*, 2013). Toutefois, l'étude de Lewis montrait quant à elle que l'introduction de la mutation dans cette même lignée, provoquait une modeste augmentation de cette marque (Lewis *et al.*, 2013).

Les profils transcriptomiques des cellules Res259-, SF188-, KNS42-H3.3 vs. -H3.3K27M ont été étudiés par *RNAseq*. L'analyse, *via* EnrichR, des facteurs de transcription et marques d'histones associés à ces profils, est cohérente quant aux effets attendus de l'induction de la

DISCUSSION

mutation H3K27M, puisqu'elle indique une signature de « type EZH2 » (facteur de transcription) et « H3K27me3 » (marque d'histone), confortant la spécificité des altérations induites dans nos 3 modèles cellulaires.

Fort de ces modèles, j'ai étudié l'impact de l'induction de la mutation sur différents paramètres cellulaires, à commencer par la croissance cellulaire. Le test que j'ai réalisé est une mesure quotidienne de la confluence par vidéomicroscopie, reflet de la croissance cellulaire. Les résultats ainsi obtenus étaient par ailleurs confirmés par un comptage cellulaire quotidien. J'ai pu montrer que les cellules Res259-H3.3K27M et SF188-H3.3K27M atteignent plus rapidement leur état de confluence que les cellules H3.3. Cependant, ce test révélait également que les pentes des courbes en phase exponentielle des différentes conditions étaient proches. De plus, l'analyse du cycle cellulaire sur les cellules en phase exponentielle de croissance ne montrait pas de différence significative quant à la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle entre les cellules H3.3 et les cellules H3.3K27M. En effet, plus que sur la vitesse de prolifération, la mutation semblait impacter le délai de reprise post-ensemencement des cellules. Notons que dans leurs études respectives, Deng *et al.* et Chen *et al.* n'observaient pas d'effet de la mutation sur la croissance des cellules SF188 (Deng *et al.*, 2018 ; Chen *et al.*, 2020). Dans l'étude de Deng *et al.*, les auteurs réalisaient un test de croissance par luminescence, en ensemençant une quantité de cellules 8 fois supérieure à la nôtre. La différence observée dans nos modèles pourrait donc s'expliquer par la différence de densité cellulaire à T0. Notre test de clonogénicité, réalisée avec une faible densité cellulaire initiale, montrait par ailleurs que les cellules mutées avaient une capacité accrue à former des colonies, et ce dans les lignées Res259 et SF188. Ainsi, à faible densité, les cellules porteuses de la mutation H3.3K27M étaient plus aptes à former des colonies, pouvant expliquer les différences observées dans nos courbes de croissance.

Or, dans une étude publiée en 2019, Silveira et collaborateurs montraient que des lignées cellulaires de DIPG, dont l'expression de H3.3, et donc de la mutation, était inhibée par shRNA, présentaient un profil plus différencié. Ils en concluaient que la présence de la mutation H3.3K27M permettait le maintien d'un statut cellule souche/progénéiteur (Silveira *et al.*, 2019). Chen et collaborateurs montraient, quant à eux, que la mutation provoquait une activation de la voie Notch, également responsable du contrôle de la différenciation cellulaire. Ces deux études permettent d'émettre l'hypothèse que la mutation participerait à maintenir un statut

DISCUSSION

peu différencié des cellules mutées H3.3K27M. Les résultats obtenus dans nos modèles vont d'ailleurs également dans ce sens, puisque la capacité à former des colonies est usuellement employée comme test révélateur d'un statut souche. Toutefois, une analyse préliminaire en cytométrie en flux du niveau d'expression membranaire du marqueur CD133 ne montrait pas de différence entre les cellules H3.3 et H3.3K27M quelle que soit la lignée cellulaire considérée (données non présentées). Bien que très préliminaires, des expériences de xénogreffes en embryons de poisson-zèbre, montraient des résultats tout à fait encourageants, suggérant que les cellules tumorales mutées H3.3K27M dissémineraient davantage à distance de la tumeur xénogreffée.

Le blocage des voies de différenciation cellulaire est une étape clé de la transformation tumorale, permettant notamment le maintien d'un compartiment souche plus ou moins important au sein de la tumeur. La voie BMP est notamment impliquée dans la différenciation des précurseurs gliaux. De manière intéressante, il a été montré dans la moelle épinière qu'il existe une boucle de rétroaction négative, par laquelle la tri-méthylation de H3K27 au niveau du promoteur du *Noggin*, inhibiteur de la voie BMP, impacte le niveau d'activation de cette voie (Akizu *et al.*, 2010). De la même manière, la résistance à la mort cellulaire est l'une des caractéristiques majeures des cellules cancéreuses, fortement impliquée dans la résistance aux traitements de celles-ci. De précédents travaux ont suggéré que l'expression de gènes impliqués dans les diverses voies de mort cellulaire puisse être modulée par le niveau d'activation d'H3K27 (Li *et al.*, 2017 ; Svtelis *et al.*, 2011; van Bavel *et al.*, 2011).

Une analyse de l'expression de 84 gènes par RT-qPCR, menée en collaboration avec le Dr Marie Castets (CRCL, Lyon), permettait de mettre en évidence à la fois une altération de la voie des BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*) mais également des voies apoptotiques. Ainsi nous observons une augmentation de l'expression des ligands BMP2 et BMP5 ainsi qu'une diminution de l'expression du ligand BMP7. Ces variations étaient confirmées lors de l'analyse en *RNAseq*. Il est intéressant de noter que ces ligands ont un rôle important dans le développement du système nerveux puisqu'ils induisent la différenciation de cellules souches neurales en astrocytes (BMP2-5-7) et neurones dopaminergiques (BMP5-7) (Jovanovic *et al.*, 2018 ; Brederlau *et al.*, 2002; Nakashima *et al.*, 2001). Or, dans une étude menée sur les gliomes, il a été observé qu'une augmentation de H3K27me3 dans les sous-populations cellulaires souches, conduisait, via la méthylation de son promoteur, à une expression plus

DISCUSSION

faible de BMP5 (Natsume *et al.*, 2013). Ces résultats sont concordants avec notre analyse puisque l'expression de BMP5 est augmentée dans un contexte d'hypométhylation de H3 suite à l'induction de la mutation H3.3K27M. L'ensemble de ces données suggère que la mutation H3.3K27M perturbe l'équilibre des voies BMP, avec des répercussions potentielles sur l'état de différenciation des cellules tumorales.

D'autre part, un PCR *array* similaire été réalisé sur 84 gènes impliqués dans l'apoptose. Nous observons qu'il n'y avait pas de désorganisation globale du profil d'expression du panel de gènes apoptotiques, mais une altération spécifique de certains gènes impliqués dans des voies précises. Les résultats obtenus nous laissaient entrevoir une profonde dérégulation des mécanismes de la voie intrinsèque de l'apoptose, avec une diminution de l'expression des gènes *BAK1*, *BNIP3L*, *BCL2A1*, *AIFM1*, *BNIP3*, gènes impliqués dans le contrôle de la perméabilité mitochondriale. Enfin, nous observons une diminution de l'expression des gènes codant pour les membres du complexe ligand/récepteur CD27/CD70, membres de la voie de signalisation du *Tumor Necrosis Factor* (TNF) impliquée dans l'inflammation (Wajant, 2016). Cette observation est concomitante avec une expression 3 fois plus importante dans la lignée mutante de la caspase 1, activée par l'inflammasome. Il est important de noter que ces variations étaient également confirmées lors de l'analyse du transcriptome par *RNAseq*. L'altération de la méthylation de H3K27 pourrait donc également perturber l'équilibre des voies de mort cellulaire et être à l'origine de points de résistance spécifiques, avec un impact potentiel sur la réponse aux traitements.

Le traitement de référence des DIPG étant la radiothérapie, j'ai réalisé un test permettant d'étudier la réponse des cellules aux radiations ionisantes en présence ou non de la mutation. Les cellules H3.3K27M présentaient ainsi une résistance accrue à la radiothérapie dans les lignées Res259 et KNS42, aussi bien dans un schéma monofractionné que fractionné. Dans la littérature, il est fait état d'une moindre réponse à la radiothérapie des DIPG pas tant liée à la mutation H3.3K27M qu'à la présence de mutations du gène *TP53* (Werbrouck *et al.*, 2019). Or, au cours de mes expériences, les cellules H3.3K27M et H3.3 ne différaient que par la présence de la mutation, la différence de réponse observée était ici indépendante du statut *TP53*. De plus, les cellules SF188 et KNS42, toutes deux de grade IV et mutées *TP53*, présentaient une réponse à la radiothérapie différente l'une de l'autre suite à l'induction de la mutation H3.3K27M. Ainsi, bien que la présence de mutations du gène *TP53* soit le signe

DISCUSSION

d'une résistance accrue des DIPG face à la radiothérapie, la mutation H3.3K27M apparaît capable d'accroître davantage cette résistance des cellules aux radiations ionisantes.

Dans un contexte où, encore à ce jour, aucune chimiothérapie n'a apporté de bénéfice significatif dans la prise en charge des DIPG, j'ai également évalué l'impact de la mutation H3.3K27M sur la chimiorésistance des cellules de gliomes pédiatriques. A travers une collaboration avec le Dr Eddy Pasquier (CRCM, Marseille), nous avons pu réaliser un screening pharmacologique d'une librairie de 80 composés initialement établie dans le cadre des cancers hématologiques (Collignon *et al.*, 2020). Bien qu'il n'existe pas de lien évident entre les cancers hématologiques et les DIPG, cette librairie contenait plusieurs types de composés potentiellement intéressants dans le cadre des DIPG. En effet, cette librairie comptait, entre autres, des épidrogues (dont le JQ1 et l'EPZ5676), un inhibiteur d'EZH2 (GSK126), des inhibiteurs de la voie des récepteurs tyrosine kinase (dont l'Afatinib et l'Erlotinib) ou encore des inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR (dont l'Idelalisib et le Temsirolimus). Le screening sur cette librairie nous permettait ainsi d'établir un spectre global de l'impact de la mutation sur la résistance aux différents agents de chimiothérapie. Par cette méthode prospective, seules 4 concentrations de drogues étaient utilisées, fournissant une approximation des valeurs d'IC₅₀. Cette méthode nous permettait toutefois de constater que l'induction de la mutation avait un pouvoir chimioprotecteur plus important dans la lignée de gliome de bas grade pédiatrique Res259 avec une IC₅₀ multipliée par au moins 2,5 pour 22 composés. Cet effet était plus modeste dans les deux autres lignées de pHGG. Néanmoins, nous avons pu identifier 4 composés dont les valeurs d'IC₅₀ étaient plus élevées dans la condition H3.3K27M à la fois dans la lignée Res259 et dans la lignée KNS42:

- **L'alisertib**, inhibiteur d'aurora kinase A, utilisé dans les lymphomes périphériques à cellules T en rechute ou réfractaires.
- **L'idelalisib**, inhibiteur de la PI3K, utilisé dans les leucémies lymphoïdes chroniques, ayant reçu au moins un traitement antérieur ou en première ligne en cas de délétion 17p ou de mutations *TP53*.
- **Le temsirolimus**, inhibiteur de mTOR, utilisé dans le carcinome rénal et dans les lymphomes des cellules du manteau en rechute et/ou réfractaire.

DISCUSSION

- **L'EPZ5676**, inhibiteur de DOT1L (méthyltransférase responsable de la méthylation de la lysine 79 de l'histone H3), utilisé dans les leucémies myéloïdes aigües avec un réarrangement du gène MLL.

Ces composés étaient d'autant plus intéressants que des altérations des voies qu'ils ciblent sont décrites au sein des DIPG. En effet, des altérations de la voie PI3K/mTOR sont retrouvés dans 30% des DIPG (Buczkwicz *et al.*, 2014 ; Mackay *et al.*, 2017). De façon concordante, l'analyse du transcriptome, par *RNAseq*, de nos modèles d'induction montrait que la voie PI3K-Akt-mTOR était communément dérégulée au sein des trois lignées. Ainsi, par cette analyse, nous montrions que 8 gènes impliqués dans cette voie (*IL2RG*, *GNGT2*, *HGF*, *CREB3L3*, *GNG8*, *ITGA2B*, *TNXB*, *IGF2*), présentaient une variation d'expression au sein des trois lignées. Les kinases Aurora sont quant à elles impliquées dans la prolifération des cellules et plus précisément dans la ségrégation des chromatides, et Buczkwicz *et al.* montraient par ailleurs que la kinase Aurora B était surexprimée dans 6 des 9 échantillons de DIPG analysés (Buczkwicz *et al.*, 2013). Les variations d'IC₅₀ observées lors de ce screening étaient confirmées pour ces 4 composés par la réalisation de tests de cytotoxicités.

Dans leur étude, Grasso *et al.* réalisaient un screening de 83 composés sur différentes lignées cellulaires de DIPG (1 WT, 4 mutées H3.1K27M et 9 mutées H3.3K27M) (Grasso *et al.*, 2015). Au sein cette librairie, l'effet de l'alisertib et du temsirolimus était évalué. Cependant, dans cette étude, les valeurs d'IC₅₀ n'étaient pas fournies, rendant impossible toute comparaison avec nos résultats. Mais surtout, cette étude ne comportait qu'un seul échantillon de DIPG H3K27 WT, n'autorisant aucune conclusion quant à l'effet de la mutation sur la réponse à ces différents composés. Notre étude constituait donc une première quant à l'évaluation de l'impact de la mutation H3.3K27M sur un panel d'agents pharmacologiques. L'étude de Grasso *et al.* montrait que les cellules de DIPG présentaient une sensibilité au panobinostat. Chen *et al.* renforçaient cette conclusion en montrant dans leur étude que les cellules H3.3K27M induites et les cellules H3.3K27 réversées ne présentaient pas de variation de sensibilité au panobinostat (Grasso *et al.*, 2015 ; Chen *et al.*, 2020). En ce sens, un test de cytotoxicité que nous avons réalisé sur nos modèles confirmait les résultats obtenus lors du screening, à savoir que l'induction de la mutation ne conférait ni sensibilité, ni résistance au panobinostat (données non présentées).

DISCUSSION

Bien que l'effet de la mutation sur un panel d'agents thérapeutiques n'ait pas été étudié, diverses études évaluaient l'effet de la mutation sur la sensibilité à certains composés spécifiques. Ainsi, l'étude de Chen *et al.* s'intéressait également à l'effet du DAPT (inhibiteur de la γ -sécrétase) sur leur modèle cellulaire de réversion de la mutation. Cette évaluation faisait écho à la mise en évidence au préalable de l'activation de la voie Notch en lien avec la mutation dans leur modèle. Ils montraient ainsi que les cellules réversées étaient moins sensibles au DAPT que les cellules mutées. Dans le même ordre d'idée, l'introduction de la mutation, dans des astrocytes humains ou encore dans la lignée SF188, conférait une sensibilité au DAPT, toutefois moins importante (Chen *et al.*, 2020). Enfin, une étude de 2015 portait sur l'effet du GSK-J4 (inhibiteur de la déméthylase JMJD3) dans l'optique de contrebalancer l'effet de la mutation sur l'apposition de la marque H3K27me3 (Hashizume *et al.*, 2014). Dans cette étude, les auteurs montraient que des astrocytes humains, dans lesquels la mutation avait été introduite, étaient rendus sensibles au GSK-J4. Néanmoins, au sein de nos modèles d'induction, nous n'observons aucune différence de sensibilité liée à la présence de la mutation (Données non présentées).

Bien que diverses études aient évalué l'effet de composés pharmacologiques et/ou de la radiothérapie sur les cellules de DIPG, nos travaux sont les premiers à traiter spécifiquement de l'effet de la mutation H3.3K27M sur la réponse à la chimio mais aussi à la radiothérapie. Nos modèles d'induction permettent en effet de conclure que les différents effets observés sont uniquement imputables à la présence de la mutation. Cependant, l'effet de la mutation apparaît contexte-dépendant, et pourrait être lié à la présence d'autres altérations ou encore à l'origine cellulaire. Notre panel de lignées cellulaires comportait 2 lignées de haut grade (SF188 et KNS42) et une lignée de bas grade (Res259). Si la mutation impactait fortement les caractéristiques des cellules Res259, les cellules des lignées SF188 et KNS42 semblaient finalement plus modestement affectées par la présence de la mutation. Ainsi la mutation H3.3K27M semble capable de conférer des propriétés prolifératives, chimio et radiorésistantes à des cellules originellement moins agressives. Il est probable que les cellules de gliomes de haut grade ont acquis un certain nombre d'altérations et/ou mutations qui leur confèrent des propriétés d'agressivité que ne possèdent pas les cellules de gliomes de bas grade. Il est donc compréhensible que l'ajout de la mutation H3.3K27M en surcroît n'apporte qu'un bénéfice réduit aux cellules de gliome de haut grade. En ce sens, l'analyse de Mosaab

DISCUSSION

et al. montrait que des patients atteints de gliomes pédiatriques jugés de bas grade sur des bases histologiques et mutés H3K27M, présentaient une survie globale plus faible (17,1 contre 25,7 mois pour les non mutés H3K27), et laissait également sous-entendre que ces tumeurs nécessitaient un traitement qui leur est propre (Mosaab *et al.*, 2020). Nos résultats suggèrent eux aussi une implication possible de la mutation dans le développement d'un caractère plus agressif, dans un contexte initial de bas grade.

Les cellules dans lesquelles j'ai introduit la mutation sont issues de gliomes sus-tentoriels de grades variés. Or, le contexte cellulaire des DIPG est différent de ces tumeurs avec notamment une identité cellulaire et des mutations partenaires distinctes. Ainsi, si des mutations H3G34R/V, BRAF-V600E ou encore IDH1 sont fréquemment retrouvées dans les gliomes hémisphériques, celles-ci sont quasiment absentes des DIPG (Mackay *et al.*, 2017). Comprendre le possible rôle de la mutation dans l'apparition, et ici dans l'évolution possible de la pathologie, est certes intéressant. Ce qui nous apparait l'être davantage, une fois la tumeur présente, avec son lot de mutations, son « histoire naturelle », c'est de savoir s'il est toujours bénéfique de cibler la mutation (ou plutôt ses effecteurs), et si oui comment. Pour ce faire, il nous fallait partir de cellules ayant ces mutations partenaires, et donc cette « histoire naturelle », pour leur ôter la mutation.

Pour ce faire, plusieurs approches étaient envisageables :

- Un *knock-down* de l'expression du gène *H3F3A* par shRNA
- Un *knock-out* de l'allèle *H3F3A* muté par la création d'InDel
- La réécriture de l'allèle muté pour restaurer un allèle WT

Une étude de 2019 visait ainsi à invalider l'expression de la protéine H3.3K27M par shRNA (Silveira *et al.*, 2019). Toutefois, cette approche souffre de ne pas cibler de manière suffisamment spécifique l'allèle muté réduisant ainsi le niveau d'expression total du variant d'histone H3.3. De plus, les shRNA n'induisent qu'un *knock-down* et les auteurs montraient ainsi une expression résiduelle de la mutation qui se comporte, rappelons-le, comme un dominant négatif. La seconde approche consiste à induire des mutations de type InDel, aboutissant à la formation d'une protéine tronquée non fonctionnelle, comme réalisée dans

DISCUSSION

l'étude d'Harutyunyan *et al.* (Harutyunyan *et al.*, 2019). Cette approche présente néanmoins l'inconvénient de réprimer l'expression d'un des deux allèles du gène *H3F3A*. A titre d'exemple, le variant H3.3 est impliqué dans la mise en place de mécanismes de réparation des dommages à l'ADN par NHEJ. Altérer son expression pourrait donc entraîner un biais notamment quant à l'étude de la mutation sur la résistance à la radiothérapie (Luijsterburg *et al.*, 2016).

Conscients de ces limites, nous avons entrepris de créer un modèle cellulaire de DIPG dans lequel la mutation serait « corrigée », et ce par *gene editing*. Bien qu'ambitieuse, cette approche nous apparaissait être la plus pertinente pour l'étude précise de l'impact de la mutation H3.3K27M, fournissant des cellules de DIPG identiques en tous points hormis l'absence de la mutation.

Dans un premier temps, j'ai établi une approche de réversion de la mutation, par utilisation de la technologie des TALEN. Avant tout, je me suis assuré que les cellules de DIPG dont je disposais autorisaient la réalisation d'une telle stratégie de *gene editing*. Un frein certain aurait été la présence de plusieurs copies de l'allèle *H3F3A* muté. Je me suis donc assuré, par cytométrie et FISH, que mes cellules n'étaient pas polyploïdes et ne présentaient pas plusieurs copies du gène *H3F3A*. Cette vérification faite, j'ai basé mon protocole sur une étude publiée en 2014 qui donnait les conditions optimales pour une recombinaison homologue par utilisation d'un oligonucléotide modèle, avec cependant quelques modifications visant à augmenter nos probabilités de réussite (Strouse *et al.*, 2014). Ainsi nous nous assurons de l'expression de chaque TALEN au sein des cellules par une coexpression des protéines fluorescentes GFP et mCherry. Quant à l'oligonucléotide modèle, j'y introduisais des mutations silencieuses permettant, par PCR, l'identification des clones ayant recombiné. Un screening par cytométrie en flux avec un anticorps anti-H3K27me3 nous permettait d'isoler 6 clones présentant *a priori* un retour de la triméthylation. Cependant, une analyse en western blot nous révélait que ces clones étaient en réalité des faux-positifs toujours porteurs de la mutation. Ce premier protocole, adapté en grande partie de l'étude de Strouse et collaborateurs, nous apparut perfectible d'un point de vue de la chronologie. En effet, la recombinaison homologue est un mécanisme ayant lieu uniquement dans les cellules en phase S et/ou G2 (San Filippo *et al.*, 2008). C'est pourquoi, j'ai établi un second protocole, dans lequel je transfectais les cellules puis réalisais une synchronisation afin que les TALEN

DISCUSSION

soient bien exprimées dans des cellules entrant en phase S et G2. Cependant, ce nouveau protocole ne me permettait pas d'isoler une population clonale présentant une perte de la mutation, cette fois-ci évaluée directement par western blot.

Malgré les améliorations qui y étaient apportées, l'échec de cette approche, mettait en exergue plusieurs difficultés que sont (i) le faible taux de transfection de nos lignées de DIPG, (ii) l'efficacité de coupure des TALEN et (iii) la rareté de l'évènement de recombinaison homologue. Additionnées, ces incertitudes portaient à un faible pourcentage nos chances d'obtenir, en une étape unique, des clones de DIPG ayant recombiné comme souhaité, et ce sans tenir compte du potentiel désavantage sélectif apporté par la perte de la mutation H3.3K27M.

Une étude, publiée en 2017, présentait une stratégie différente permettant de cibler un gène précis dans le but d'y apporter une mutation ponctuelle (Wassef *et al.*, 2017). Nous décidions donc d'entreprendre une approche similaire, non pas pour introduire une mutation mais bien pour la corriger. Le bénéfice majeur apporté par cette approche était de pouvoir sélectionner, par un antibiotique, les cellules ayant recombiné efficacement dans le site défini, et ainsi de s'absoudre de la rareté de cet évènement. Cette stratégie nous permettait également d'avancer par étapes, et de valider par différentes techniques le bon déroulement de celle-ci. Nous avons donc entrepris la création d'un modèle alors inédit de réversion de cellules de DIPG mutées H3.3K27M dans la lignée HSJD-DIPG-012. A l'heure où j'écris ces lignes, un modèle de réversion de la mutation H3.3K27M dans des lignées cellulaires de DIPG vient cependant d'être publié (Chen *et al.*, 2020). Dans cette étude, les auteurs utilisent une stratégie différente, en réalisant une cassure double brin, par utilisation de deux nickases, guidées par deux ARN guides distincts, leur permettant de diminuer les risques d'effets *off-target*. Cette stratégie nécessite néanmoins l'isolement et le séquençage d'un nombre très important de clones. Nous avons, quant à nous, visé l'obtention de trois sous-clones réversés, dérivant de trois clones distincts, nous permettant d'éviter un éventuel effet clonal indépendant de la mise en œuvre de notre stratégie, mais également de pallier un éventuel effet *off-target* dans un des clones. Après transfection, les cellules étaient sélectionnées avec de la généticine. La cassette de résistance n'étant pas sous le contrôle d'un promoteur, l'expression de celle-ci ne pouvait avoir lieu si la cassette s'insérait aléatoirement dans le génome. La résistance des cellules à la généticine était donc gage d'insertion de la cassette au

DISCUSSION

bon locus. Toutefois, j'ai validé par divers PCR la présence de celle-ci au sein du gène *H3F3A* dans les cellules généticine-résistantes. J'ai ensuite cloné et sélectionné les cellules ayant perdu la mutation, par western blot, et validé, de surcroît, la perte de la mutation d'un point de vue génomique, par séquençage. Bien qu'intéressante, cette configuration intermédiaire correspondait en réalité à un *knock-out* de l'allèle muté. Le retrait de la cassette de résistance était donc nécessaire et rendu possible grâce aux sites FRT l'entourant, et permettait de restaurer un allèle strictement identique à l'allèle WT mais contenant juste un site FRT résiduel au sein de l'intron 2. Ce site FRT résiduel se trouvant dans une région intronique, en dehors des sites d'épissage, l'impact de ce dernier était considéré comme négligeable.

Afin d'asseoir la pertinence de ces modèles cellulaires, je réalisais, dans un premier temps, leur caractérisation épigénétique. Outre la perte de la mutation H3.3K27M, l'analyse en western blot nous montrait, comme attendu, que le niveau d'H3.3 total restait équivalent entre les cellules mutées originelles et les cellules réversées. Or, de façon surprenante et inédite par rapport aux autres manipulations de la mutation H3K27M, Chen *et al.* mettaient en évidence une augmentation du niveau protéique d'H3.3 dans leurs cellules réversées alors qu'elles ne variaient théoriquement du modèle initial que par le remplacement d'un nucléotide, sans l'expliquer (Chen *et al.*, 2020). Cette variation du niveau d'H3.3 apportait ainsi un possible biais quant à la lecture de leurs résultats, laissant penser que les effets observés pourraient être liés à la variation du niveau d'H3.3 plutôt qu'à la perte de la mutation elle-même.

J'ai également évalué l'impact de la réversion de la mutation sur la marque H3K27me3. Je constatais que les cellules DIPG-012^{REV} présentaient une augmentation globale du niveau d'H3K27me3, comme observé dans les études invalidant le gène *H3F3A* (Silveira *et al.*, 2019 ; Chen *et al.*, 2020), traduisant du caractère réversible de l'effet de la mutation sur l'activité du complexe PRC2. Fort de ces résultats moléculaires, notre modèle constituait donc un modèle présentant une pertinence biologique et une cohérence épigénétique, permettant ainsi d'évaluer finement l'impact de la mutation H3.3K27M au sein des cellules de DIPG.

J'ai donc pu initier une caractérisation de ce modèle cellulaire au travers de tests préliminaires sur le seul sous clone disponible alors. Comme pour le modèle d'induction, je réalisais tout d'abord un test de croissance cellulaire par suivi de la confluence par vidéomicroscopie en conditions adhérentes. Nous constatons que la perte de la mutation H3.3K27M induisait un

DISCUSSION

ralentissement de la croissance cellulaire. Cet effet allait dans le sens des résultats observés avec le modèle d'induction de la mutation. Toutefois, le changement de conditions de culture des cellules DIPG-012, normalement cultivées en suspension, pouvait altérer des voies de signalisation, telle que la voie des récepteurs tyrosine kinase, ou encore la réponse aux agents de chimiothérapie (Meel *et al.*, 2017). Afin de nous replacer dans les conditions de culture initiales, j'ai donc entrepris d'évaluer l'effet de la perte de la mutation sur la croissance des gliosphères. Nous constatons que les sphères formées par les cellules DIPG-012^{REV} présentaient un retard de croissance notable. Cet effet négatif de la mutation sur la croissance avait aussi été mis en avant dans d'autres modèles *in vitro* mais également *in vivo* (Harutyunyan *et al.*, 2019 ; Silveira *et al.*, 2019). Nos résultats s'accompagnaient également d'une diminution des propriétés clonogéniques des cellules réversées, qui forment moins de sphères lors du test de croissance sans ancrage en agar mou.

Le métabolisme cellulaire semble jouer un rôle important dans les DIPG et pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle et novatrice (Shen *et al.*, 2020 ; Lin *et al.*, 2019; Chung *et al.*, 2020). Une des limites de l'étude de ce dernier est la difficulté d'évaluer le métabolisme dans des cultures en sphère. Au travers d'une collaboration avec le Dr Jérôme Kluza (UMR Canther, Lille), nous avons développé un protocole permettant la réalisation de mesures d'oxymétrie sur nos sphères, normalisées par rapport à leur diamètre. Les résultats préliminaires obtenus ne montraient pas de différence sur les paramètres de la phosphorylation oxydative entre les cellules DIPG-012 et DIPG-012^{REV}. Diverses améliorations techniques sont cependant actuellement en cours d'études afin d'obtenir des mesures plus fines de la phosphorylation oxydative sur nos modèles. Il semble également pertinent de s'intéresser à une autre voie métabolique, à savoir le métabolisme glycolytique, puisque ce dernier a été décrit comme pouvant être à l'origine d'une radiorésistance dans un contexte cancéreux (Tang *et al.*, 2018).

J'ai ensuite évalué l'effet de la mutation sur la radiorésistance des cellules. De façon surprenante, les cellules de DIPG étaient sensibles à des doses plus faibles de radiations ionisantes, comparées aux cellules de gliome sustentoriel du modèle d'induction, avec une dose maximale de 3 Gy vs. 8Gy pour les cellules Res259, SF188 et KNS42 dans un schéma mono fractionné. Nos résultats montraient qu'avec ce type de schéma, les cellules DIPG-012^{REV} ne présentaient pas de différence significative de sensibilité par rapport aux cellules parentales.

DISCUSSION

Néanmoins, ces cellules réversées présentait des taux de survie légèrement inférieurs aux doses de 2 et 3 Gy, comparées aux cellules DIPG-012 originelles. Cette tendance, si elle venait à se confirmer, irait également dans le sens des résultats obtenus avec les différents modèles d'induction, à savoir que la mutation H3.3K27M conférerait, à elle seule, une relative radiorésistance aux cellules qui en sont porteuses. En ce sens, l'étude de Katagi *et al.*, montrait que l'utilisation du GSK-J4, inhibiteur permettant de contrebalancer l'effet moléculaire des mutations H3K27M, avait un effet radio-sensibilisant *in vitro* et *in vivo* sur des cellules de DIPG (Katagi *et al.*, 2019).

Un des mécanismes décrits pour conférer une radiorésistance aux cellules est la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Bao *et al.*, 2006 ; Diehn *et al.*, 2009). Si les radiations ionisantes ont un effet direct sur la création de dommages à l'ADN, celles-ci sont également responsables de la radiolyse de l'eau, aboutissant à la production de ROS, qui provoquent également des cassures à l'ADN. L'évaluation de l'impact de la réversion de la mutation sur la détoxification des ROS montrait, de façon surprenante, que les cellules DIPG-012^{REV} avait un niveau basal de ROS notablement réduit par rapport aux cellules DIPG-012. De plus, nous constatons que les cellules DIPG-012^{REV} semblaient présenter des capacités de détoxification accrues des ROS en réponse aux irradiations. L'ensemble de ces résultats était confirmé avec l'utilisation d'un inducteur du stress oxydant, le tert-butyl-hydroperoxyde (données non présentées). Il sera intéressant de comprendre si les cellules présentant la mutation H3K27M peuvent bénéficier d'un avantage sélectif associé à une présence accrue de ROS. Cette augmentation des capacités des cellules réversées à détoxifier les ROS peut sembler surprenante lorsque comparée aux résultats obtenus lors de l'évaluation de l'effet de la mutation sur la radiorésistance. Toutefois, si les ROS sont en effet produits notamment en réponse à la radiothérapie, ils ne sont cependant pas les seuls responsables de la réponse cellulaire aux radiations ionisantes. En effet, la différence observée lors du test de radiosensibilité pourrait également être liée à l'activation des voies de réponse aux dommages de l'ADN ou encore à une altération des voies apoptotiques, comme observé dans nos modèles d'induction.

Même si ces résultats nécessitent d'être confirmés au sein de ce sous-clone mais aussi au sein des autres clones réversés obtenus dans la lignée DIPG-012, ils tendent à confirmer certains résultats obtenus avec nos modèles d'induction de la mutation. L'extension de ce modèle cellulaire à d'autres lignées de DIPG est actuellement en cours de réalisation, afin d'obtenir, à terme, un panel de cellules de DIPG H3.3K27M réversées.

Conclusion et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble de mes travaux de thèse, et les différents modèles d'étude originaux que j'ai été amené à établir au cours de celle-ci, m'ont permis de mettre au jour divers effets spécifiquement imputables à la mutation H3.3K27M. Ces résultats m'ont permis d'apporter un éclairage nouveau quant au rôle de cette mutation, et tout particulièrement dans la résistance aux traitements de chimio et de radiothérapie.

La finalisation en cours des modèles cellulaires de DIPG réversés et leur caractérisation complète, tant sur le plan moléculaire que phénotypique, devrait nous apporter une information précieuse quant au rôle exact de la mutation dans la maladie. Il sera alors intéressant de les mettre en regard de nos modèles d'induction obtenus dans les cellules de gliomes sustentoriels.

Gageons que l'ensemble des informations biologiques et omiques qu'offriront ces modèles originaux permettront d'identifier les mécanismes par lesquels la mutation H3.3K27M accroît l'agressivité des gliomes de l'enfant. Cibler ces mécanismes, et ainsi les DIPG, efficacement méritera néanmoins certainement de s'extraire du contexte cellulaire et de pleinement considérer la complexité tumorale de cette pathologie. Aussi, si le recours à l'expérimentation animale s'inscrit comme une évidence, l'émergence de modèles d'étude *ex vivo* multiparamétriques de type *tumor-on-a-chip* devrait représenter un atout certain dans la compréhension de la maladie. C'est au sein de ces nouvelles modalités de recherche que nos modèles cellulaires sophistiqués devraient à terme prendre toute leur place et leur dimension dans la lutte contre les gliomes malins de l'enfant.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun*, 9: 1911.
- Akizu, N., C. Estaras, L. Guerrero, E. Marti, and M. A. Martinez-Balbas. (2010). H3K27me3 regulates BMP activity in developing spinal cord. *Development*, 137: 2915-25.
- Allen, J., J. Siffert, B. Donahue, A. Nirenberg, R. Jakacki, P. Robertson, R. DaRosso, L. Thoron, M. Rosovsky, and R. Pinto. (1999). A phase I/II study of carboplatin combined with hyperfractionated radiotherapy for brainstem gliomas. *Cancer*, 86: 1064-9.
- Anderson, J. L., R. Muraleedharan, N. Oatman, A. Klotter, S. Sengupta, R. R. Waclaw, *et al.* (2017). The transcription factor Olig2 is important for the biology of diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro Oncol*, 19: 1068-78.
- Anderson, R. C., B. Kennedy, C. L. Yanes, J. Garvin, M. Needle, P. Canoll, N. A. Feldstein, and J. N. Bruce. (2013). Convection-enhanced delivery of topotecan into diffuse intrinsic brainstem tumors in children. *J Neurosurg Pediatr*, 11: 289-95.
- Bae, S., J. Park, and J. S. Kim. (2014). Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, 30: 1473-5.
- Bailey, S., A. Howman, K. Wheatley, D. Wherton, N. Boota, B. Pizer, *et al.* (2013). Diffuse intrinsic pontine glioma treated with prolonged temozolomide and radiotherapy-- results of a United Kingdom phase II trial (CNS 2007 04). *Eur J Cancer*, 49: 3856-62.
- Bao, S., Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A. B. Hjelmeland, M. W. Dewhirst, D. D. Bigner, and J. N. Rich. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444: 756-60.
- Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, and P. Horvath. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315: 1709-12.
- Bax, D. A., S. E. Little, N. Gaspar, L. Perryman, L. Marshall, M. Viana-Pereira, *et al.* (2009). Molecular and phenotypic characterisation of paediatric glioma cell lines as models for preclinical drug development. *PLoS One*, 4: e5209.
- Beccaria, K., M. Canney, G. Bouchoux, S. Puget, J. Grill, and A. Carpentier. (2020). Blood-brain barrier disruption with low-intensity pulsed ultrasound for the treatment of pediatric brain tumors: a review and perspectives. *Neurosurg Focus*, 48: E10.
- Berli, R. R., and C. F. Barbas, 3rd. (2002). Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nat Biotechnol*, 20: 135-41.
- Bender, S., Y. Tang, A. M. Lindroth, V. Hovestadt, D. T. Jones, M. Kool, *et al.* (2013). Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell*, 24: 660-72.
- Bennardo, N., A. Cheng, N. Huang, and J. M. Stark. (2008). Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet*, 4: e1000110.
- Berens, E. B., G. M. Sharif, A. Wellstein, and E. Glasgow. (2016). Testing the Vascular Invasive Ability of Cancer Cells in Zebrafish (*Danio Rerio*). *J Vis Exp*.
- Berger, S. L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, 447: 407-12.
- Bernier-Chastagner, V., J. Grill, F. Doz, S. Bracard, J. C. Gentet, A. Marie-Cardine, *et al.* (2005). Topotecan as a radiosensitizer in the treatment of children with malignant diffuse brainstem gliomas: results of a French Society of Paediatric Oncology Phase II Study. *Cancer*, 104: 2792-7.

BIBLIOGRAPHIE

- Bitinaite, J., D. A. Wah, A. K. Aggarwal, and I. Schildkraut. (1998). FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 10570-5.
- Boch, J., H. Scholze, S. Schornack, A. Landgraf, S. Hahn, S. Kay, T. Lahaye, A. Nickstadt, and U. Bonas. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326: 1509-12.
- Bogdanove, A. J., S. Schornack, and T. Lahaye. (2010). TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr Opin Plant Biol*, 13: 394-401.
- Bolotin, A., B. Quinquis, A. Sorokin, and S. D. Ehrlich. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151: 2551-61.
- Braun, K. A., Y. Lao, Z. He, C. J. Ingles, and M. S. Wold. (1997). Role of protein-protein interactions in the function of replication protein A (RPA): RPA modulates the activity of DNA polymerase alpha by multiple mechanisms. *Biochemistry*, 36: 8443-54.
- Brederlau, A., R. Faigle, P. Kaplan, P. Odin, and K. Funa. (2002). Bone morphogenetic proteins but not growth differentiation factors induce dopaminergic differentiation in mesencephalic precursors. *Mol Cell Neurosci*, 21: 367-78.
- Broniscer, A., J. N. Baker, M. Tagen, A. Onar-Thomas, R. J. Gilbertson, A. M. Davidoff, *et al.* (2010). Phase I study of vandetanib during and after radiotherapy in children with diffuse intrinsic pontine glioma. *J Clin Oncol*, 28: 4762-8.
- Broniscer, A., L. Iacono, M. Chintagumpala, M. Fouladi, D. Wallace, D. C. Bowers, C. Stewart, M. J. Krasin, and A. Gajjar. (2005). Role of temozolomide after radiotherapy for newly diagnosed diffuse brainstem glioma in children: results of a multiinstitutional study (SJHG-98). *Cancer*, 103: 133-9.
- Broniscer, A., C. C. Leite, V. L. Lanchote, T. M. Machado, and L. M. Cristofani. (2000). Radiation therapy and high-dose tamoxifen in the treatment of patients with diffuse brainstem gliomas: results of a Brazilian cooperative study. Brainstem Glioma Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 18: 1246-53.
- Brouns, S. J., M. M. Jore, M. Lundgren, E. R. Westra, R. J. Slijkhuis, A. P. Snijders, M. J. Dickman, K. S. Makarova, E. V. Koonin, and J. van der Oost. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 321: 960-4.
- Buczkowicz, P., C. Hoeman, P. Rakopoulos, S. Pajovic, L. Letourneau, M. Dzamba, *et al.* (2014). Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nat Genet*, 46: 451-6.
- Buczkowicz, P., M. Zarghooni, U. Bartels, A. Morrison, K. L. Misuraca, T. Chan, E. Bouffet, A. Huang, O. Becher, and C. Hawkins. (2013). Aurora kinase B is a potential therapeutic target in pediatric diffuse intrinsic pontine glioma. *Brain Pathol*, 23: 244-53.
- Capecchi, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 244: 1288-92.
- Carvalho, D., K. R. Taylor, N. G. Olaciregui, V. Molinari, M. Clarke, A. Mackay, *et al.* (2019). ALK2 inhibitors display beneficial effects in preclinical models of ACVR1 mutant diffuse intrinsic pontine glioma. *Commun Biol*, 2: 156.
- Castel, D., C. Philippe, R. Calmon, L. Le Dret, N. Truffaux, N. Boddaert, *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: 815-27.
- Cavazos, D. A., and A. J. Brenner. (2016). Hypoxia in astrocytic tumors and implications for therapy. *Neurobiol Dis*, 85: 227-33.

BIBLIOGRAPHIE

- Chan, K. M., D. Fang, H. Gan, R. Hashizume, C. Yu, M. Schroeder, *et al.* (2013). The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev*, 27: 985-90.
- Chawla, S. P., L. D. Cranmer, B. A. Van Tine, D. R. Reed, S. H. Okuno, J. E. Butrynski, D. R. Adkins, A. E. Hendifar, S. Kroll, and K. N. Ganjoo. (2014). Phase II study of the safety and antitumor activity of the hypoxia-activated prodrug TH-302 in combination with doxorubicin in patients with advanced soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol*, 32: 3299-306.
- Chen, K. Y., K. Bush, R. H. Klein, V. Cervantes, N. Lewis, A. Naqvi, A. M. Carcaboso, M. Lechpammer, and P. S. Knoepfler. (2020). Reciprocal H3.3 gene editing identifies K27M and G34R mechanisms in pediatric glioma including NOTCH signaling. *Commun Biol*, 3: 363.
- Chen, Z., S. Li, S. Subramaniam, J. Y. Shyy, and S. Chien. (2017). Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers. *Annu Rev Biomed Eng*, 19: 195-219.
- Chiang, K. L., K. P. Chang, Y. Y. Lee, P. I. Huang, T. R. Hsu, Y. W. Chen, F. C. Chang, and T. T. Wong. (2010). Role of temozolomide in the treatment of newly diagnosed diffuse brainstem glioma in children: experience at a single institution. *Childs Nerv Syst*, 26: 1035-41.
- Chung, C., S. R. Sweha, D. Pratt, B. Tamrazi, P. Panwalkar, A. Banda, *et al.* (2020). Integrated Metabolic and Epigenomic Reprograming by H3K27M Mutations in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas. *Cancer Cell*, 38: 334-49 e9.
- Cohen, K. J., N. Jabado, and J. Grill. (2017). Diffuse intrinsic pontine gliomas-current management and new biologic insights. Is there a glimmer of hope?, *Neuro Oncol*, 19: 1025-34.
- Collignon, A., M. A. Hospital, C. Montersino, F. Courtier, A. Charbonnier, C. Saillard, *et al.* (2020). A chemogenomic approach to identify personalized therapy for patients with relapse or refractory acute myeloid leukemia: results of a prospective feasibility study. *Blood Cancer J*, 10: 64.
- Cox, D. B., R. J. Platt, and F. Zhang. (2015). Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*, 21: 121-31.
- Creyghton, M. P., A. W. Cheng, G. G. Welstead, T. Kooistra, B. W. Carey, E. J. Steine, *et al.* (2010). Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 21931-6.
- Deng, H., J. Zeng, T. Zhang, L. Gong, H. Zhang, E. Cheung, C. Jones, and G. Li. (2018). Histone H3.3K27M Mobilizes Multiple Cancer/Testis (CT) Antigens in Pediatric Glioma. *Mol Cancer Res*, 16: 623-33.
- Desjarlais, J. R., and J. M. Berg. (1992). Toward rules relating zinc finger protein sequences and DNA binding site preferences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 7345-9.
- Deveau, H., R. Barrangou, J. E. Garneau, J. Labonte, C. Fremaux, P. Boyaval, D. A. Romero, P. Horvath, and S. Moineau. (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, 190: 1390-400.
- Diehn, M., R. W. Cho, N. A. Lobo, T. Kalisky, M. J. Dorie, A. N. Kulp, *et al.* (2009). Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*, 458: 780-3.
- Doyle, E. L., A. W. Hummel, Z. L. Demorest, C. G. Starker, D. F. Voytas, P. Bradley, and A. J. Bogdanove. (2013). TAL effector specificity for base 0 of the DNA target is altered in a complex, effector- and assay-dependent manner by substitutions for the tryptophan in cryptic repeat -1. *PLoS One*, 8: e82120.

BIBLIOGRAPHIE

- Drean, A., N. Lemaire, G. Bouchoux, L. Goldwirt, M. Canney, L. Goli, *et al.* (2019). Temporary blood-brain barrier disruption by low intensity pulsed ultrasound increases carboplatin delivery and efficacy in preclinical models of glioblastoma. *J Neurooncol*, 144: 33-41.
- Duchatel, R. J., E. R. Jackson, F. Alvaro, B. Nixon, H. Hondermarck, and M. D. Dun. (2019). Signal Transduction in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Proteomics*, 19: e1800479.
- Dudley, R. W., M. R. Torok, D. R. Gallegos, J. M. Mulcahy-Levy, L. M. Hoffman, A. K. Liu, M. H. Handler, and T. C. Hankinson. (2015). Pediatric low-grade ganglioglioma: epidemiology, treatments, and outcome analysis on 348 children from the surveillance, epidemiology, and end results database. *Neurosurgery*, 76: 313-9; discussion 19; quiz 19-20.
- Dueva, Rositsa, and George Iliakis. (2013). Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Translational cancer research*, 2: 163-77.
- Dupret, B., and P. O. Angrand. (2014). [Targeted genome modifications using TALEN]. *Med Sci (Paris)*, 30: 186-93.
- El-Khouly, F. E., S. E. M. Veldhuijzen van Zanten, V. Santa-Maria Lopez, N. H. Hendrikse, G. J. L. Kaspers, G. Loizos, *et al.* (2019). Diagnostics and treatment of diffuse intrinsic pontine glioma: where do we stand?, *J Neurooncol*, 145: 177-84.
- Felix, F. H., O. L. de Araujo, K. M. da Trindade, N. M. Trompieri, and J. B. Fontenele. (2014). Retrospective evaluation of the outcomes of children with diffuse intrinsic pontine glioma treated with radiochemotherapy and valproic acid in a single center. *J Neurooncol*, 116: 261-6.
- Filatova, A., T. Acker, and B. K. Garvalov. (2013). The cancer stem cell niche(s): the crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment. *Biochim Biophys Acta*, 1830: 2496-508.
- Filbin, M. G., I. Tirosh, V. Hovestadt, M. L. Shaw, L. E. Escalante, N. D. Mathewson, *et al.* (2018). Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq. *Science*, 360: 331-35.
- Filipescu, D., E. Szenker, and G. Almouzni. (2013). Developmental roles of histone H3 variants and their chaperones. *Trends Genet*, 29: 630-40.
- Fontebasso, A. M., S. Papillon-Cavanagh, J. Schwartzentruber, H. Nikbakht, N. Gerges, P. O. Fiset, *et al.* (2014). Recurrent somatic mutations in ACVR1 in pediatric midline high-grade astrocytoma. *Nat Genet*, 46: 462-6.
- Freeman, C. R., J. P. Krischer, R. A. Sanford, M. E. Cohen, P. C. Burger, R. del Carpio, E. C. Halperin, L. Munoz, H. S. Friedman, and L. E. Kun. (1993). Final results of a study of escalating doses of hyperfractionated radiotherapy in brain stem tumors in children: a Pediatric Oncology Group study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 27: 197-206.
- Fu, Y., J. A. Foden, C. Khayter, M. L. Maeder, D. Reyon, J. K. Joung, and J. D. Sander. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 31: 822-6.
- Funato, K., T. Major, P. W. Lewis, C. D. Allis, and V. Tabar. (2014). Use of human embryonic stem cells to model pediatric gliomas with H3.3K27M histone mutation. *Science*, 346: 1529-33.
- Gallitto, M., S. Lazarev, I. Wasserman, J. M. Stafford, S. L. Wolden, S. A. Terezakis, R. S. Bindra, and R. L. Bakst. (2019). Role of Radiation Therapy in the Management of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: A Systematic Review. *Adv Radiat Oncol*, 4: 520-31.

BIBLIOGRAPHIE

- Ganjoo, K. N., L. D. Cranmer, J. E. Butrynski, D. Rushing, D. Adkins, S. H. Okuno, G. Lorente, S. Kroll, V. K. Langmuir, and S. P. Chawla. (2011). A phase I study of the safety and pharmacokinetics of the hypoxia-activated prodrug TH-302 in combination with doxorubicin in patients with advanced soft tissue sarcoma. *Oncology*, 80: 50-6.
- Garneau, J. E., M. E. Dupuis, M. Villion, D. A. Romero, R. Barrangou, P. Boyaval, C. Fremaux, P. Horvath, A. H. Magadan, and S. Moineau. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468: 67-71.
- Georger, B., D. Hargrave, F. Thomas, A. Ndiaye, D. Frappaz, F. Andreiuolo, *et al.* (2011). Innovative Therapies for Children with Cancer pediatric phase I study of erlotinib in brainstem glioma and relapsing/refractory brain tumors. *Neuro Oncol*, 13: 109-18.
- Grasso, C. S., Y. Tang, N. Truffaux, N. E. Berlow, L. Liu, M. A. Debily, *et al.* (2015). Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Med*, 21: 555-9.
- Grau, J., J. Boch, and S. Posch. (2013). TALENoffer: genome-wide TALEN off-target prediction. *Bioinformatics*, 29: 2931-2.
- Grill, J., S. Puget, F. Andreiuolo, C. Philippe, L. MacConaill, and M. W. Kieran. (2012). Critical oncogenic mutations in newly diagnosed pediatric diffuse intrinsic pontine glioma. *Pediatr Blood Cancer*, 58: 489-91.
- Guglielmi, L., C. Cinnella, M. Nardella, G. Maresca, A. Valentini, D. Mercanti, A. Felsani, and I. D'Agnano. (2014). MYCN gene expression is required for the onset of the differentiation programme in neuroblastoma cells. *Cell Death Dis*, 5: e1081.
- Haas-Kogan, D. A., A. Banerjee, T. Y. Poussaint, M. Kocak, M. D. Prados, J. R. Geyer, *et al.* (2011). Phase II trial of tipifarnib and radiation in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro Oncol*, 13: 298-306.
- Haeussler, M., K. Schonig, H. Eckert, A. Eschstruth, J. Mianne, J. B. Renaud, *et al.* (2016). Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol*, 17: 148.
- Hamisch, C., P. Kickingreder, M. Fischer, T. Simon, and M. I. Ruge. (2017). Update on the diagnostic value and safety of stereotactic biopsy for pediatric brainstem tumors: a systematic review and meta-analysis of 735 cases. *J Neurosurg Pediatr*, 20: 261-68.
- Han, H. J., P. Jain, and A. C. Resnick. (2018). Shared ACVR1 mutations in FOP and DIPG: Opportunities and challenges in extending biological and clinical implications across rare diseases. *Bone*, 109: 91-100.
- Hargrave, D., U. Bartels, and E. Bouffet. (2006). Diffuse brainstem glioma in children: critical review of clinical trials. *Lancet Oncol*, 7: 241-8.
- Harutyunyan, A. S., B. Krug, H. Chen, S. Papillon-Cavanagh, M. Zeinieh, N. De Jay, *et al.* (2019). H3K27M induces defective chromatin spread of PRC2-mediated repressive H3K27me2/me3 and is essential for glioma tumorigenesis. *Nat Commun*, 10: 1262.
- Hashizume, R., N. Andor, Y. Ihara, R. Lerner, H. Gan, X. Chen, *et al.* (2014). Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat Med*, 20: 1394-6.
- Hassan, H., A. Pinches, S. V. Picton, and R. S. Phillips. (2017). Survival rates and prognostic predictors of high grade brain stem gliomas in childhood: a systematic review and meta-analysis. *J Neurooncol*, 135: 13-20.
- Hoeman, C. M., F. J. Cordero, G. Hu, K. Misuraca, M. M. Romero, H. J. Cardona, *et al.* (2019). ACVR1 R206H cooperates with H3.1K27M in promoting diffuse intrinsic pontine glioma pathogenesis. *Nat Commun*, 10: 1023.

BIBLIOGRAPHIE

- Huang, P., A. Xiao, M. Zhou, Z. Zhu, S. Lin, and B. Zhang. (2011). Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol*, 29: 699-700.
- Huse, J. T., and E. C. Holland. (2010). Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer*, 10: 319-31.
- Hutter, S., S. Bolin, H. Weishaupt, and F. J. Swartling. (2017). Modeling and Targeting MYC Genes in Childhood Brain Tumors. *Genes (Basel)*, 8.
- Iliakis, G., H. Wang, A. R. Perrault, W. Boecker, B. Rosidi, F. Windhofer, W. Wu, J. Guan, G. Terzoudi, and G. Pantelias. (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res*, 104: 14-20.
- Ishii, N., D. Maier, A. Merlo, M. Tada, Y. Sawamura, A. C. Diserens, and E. G. Van Meir. (1999). Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol*, 9: 469-79.
- Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, and A. Nakata. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 169: 5429-33.
- Jakacki, R. I., J. Siffert, C. Jamison, L. Velasquez, and J. C. Allen. (1999). Dose-intensive, time-compressed procarbazine, CCNU, vincristine (PCV) with peripheral blood stem cell support and concurrent radiation in patients with newly diagnosed high-grade gliomas. *J Neurooncol*, 44: 77-83.
- Jansen, R., J. D. Embden, W. Gastra, and L. M. Schouls. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 43: 1565-75.
- Jenkin, R. D., C. Boesel, I. Ertel, A. Evans, R. Hittle, J. Ortega, *et al.* (1987). Brain-stem tumors in childhood: a prospective randomized trial of irradiation with and without adjuvant CCNU, VCR, and prednisone. A report of the Childrens Cancer Study Group. *J Neurosurg*, 66: 227-33.
- Jennings, M. T., R. Sposto, J. M. Boyett, L. G. Vezina, E. Holmes, M. S. Berger, *et al.* (2002). Preradiation chemotherapy in primary high-risk brainstem tumors: phase II study CCG-9941 of the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol*, 20: 3431-7.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337: 816-21.
- Jones, C., L. Perryman, and D. Hargrave. (2012). Paediatric and adult malignant glioma: close relatives or distant cousins?, *Nat Rev Clin Oncol*, 9: 400-13.
- Jovanovic, V. M., A. Salti, H. Tilleman, K. Zega, M. M. Jukic, H. Zou, *et al.* (2018). BMP/SMAD Pathway Promotes Neurogenesis of Midbrain Dopaminergic Neurons In Vivo and in Human Induced Pluripotent and Neural Stem Cells. *J Neurosci*, 38: 1662-76.
- Justin, N., Y. Zhang, C. Tarricone, S. R. Martin, S. Chen, E. Underwood, *et al.* (2016). Structural basis of oncogenic histone H3K27M inhibition of human polycomb repressive complex 2. *Nat Commun*, 7: 11316.
- Katagi, H., N. Louis, D. Unruh, T. Sasaki, X. He, A. Zhang, *et al.* (2019). Radiosensitization by Histone H3 Demethylase Inhibition in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Clin Cancer Res*, 25: 5572-83.
- Kay, S., S. Hahn, E. Marois, G. Hause, and U. Bonas. (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 318: 648-51.
- Khuong-Quang, D. A., P. Buczkowicz, P. Rakopoulos, X. Y. Liu, A. M. Fontebasso, E. Bouffet, *et al.* (2012). K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct

BIBLIOGRAPHIE

- subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol*, 124: 439-47.
- Kim, Y. G., J. Cha, and S. Chandrasegaran. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 1156-60.
- Kleinstiver, B. P., V. Pattanayak, M. S. Prew, S. Q. Tsai, N. T. Nguyen, Z. Zheng, and J. K. Joung. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529: 490-5.
- Koschmann, C., A. A. Calinescu, F. J. Nunez, A. Mackay, J. Fazal-Salom, D. Thomas, *et al.* (2016). ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma. *Sci Transl Med*, 8: 328ra28.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128: 693-705.
- Krug, B., N. De Jay, A. S. Harutyunyan, S. Deshmukh, D. M. Marchione, P. Guilhamon, *et al.* (2019). Pervasive H3K27 Acetylation Leads to ERV Expression and a Therapeutic Vulnerability in H3K27M Gliomas. *Cancer Cell*, 35: 782-97 e8.
- Larson, J. D., L. H. Kasper, B. S. Paugh, H. Jin, G. Wu, C. H. Kwon, *et al.* (2019). Histone H3.3 K27M Accelerates Spontaneous Brainstem Glioma and Drives Restricted Changes in Bivalent Gene Expression. *Cancer Cell*, 35: 140-55 e7.
- Lassiter, K. R., E. Alexander, Jr., C. H. Davis, Jr., and D. L. Kelly, Jr. (1971). Surgical treatment of brain stem gliomas. *J Neurosurg*, 34: 719-25.
- Leblond, P., M. Vinchon, V. Bernier-Chastagner, and P. Chastagner. (2010). [Diffuse intrinsic brain stem glioma in children: current treatment and future directions]. *Arch Pediatr*, 17: 159-65.
- Lemmon, M. A., and J. Schlessinger. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141: 1117-34.
- Lewis, P. W., M. M. Muller, M. S. Koletsky, F. Cordero, S. Lin, L. A. Banaszynski, B. A. Garcia, T. W. Muir, O. J. Becher, and C. D. Allis. (2013). Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science*, 340: 857-61.
- Li, J., F. He, P. Zhang, S. Chen, H. Shi, Y. Sun, *et al.* (2017). Loss of Asxl2 leads to myeloid malignancies in mice. *Nat Commun*, 8: 15456.
- Lin, G. L., K. M. Wilson, M. Ceribelli, B. Z. Stanton, P. J. Woo, S. Kreimer, *et al.* (2019). Therapeutic strategies for diffuse midline glioma from high-throughput combination drug screening. *Sci Transl Med*, 11.
- Liu, Q., J. D. Sun, J. Wang, D. Ahluwalia, A. F. Baker, L. D. Cranmer, *et al.* (2012). TH-302, a hypoxia-activated prodrug with broad in vivo preclinical combination therapy efficacy: optimization of dosing regimens and schedules. *Cancer Chemother Pharmacol*, 69: 1487-98.
- Louis, D. N., A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W. K. Cavenee, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, P. Kleihues, and D. W. Ellison. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 131: 803-20.
- Ludwig, K., and H. I. Kornblum. (2017). Molecular markers in glioma. *J Neurooncol*, 134: 505-12.
- Luijsterburg, M. S., I. de Krijger, W. W. Wiegant, R. G. Shah, G. Smeenk, A. J. L. de Groot, *et al.* (2016). PARP1 Links CHD2-Mediated Chromatin Expansion and H3.3 Deposition to DNA Repair by Non-homologous End-Joining. *Mol Cell*, 61: 547-62.
- Lulla, R. R., A. M. Saratsis, and R. Hashizume. (2016). Mutations in chromatin machinery and pediatric high-grade glioma. *Sci Adv*, 2: e1501354.

BIBLIOGRAPHIE

- Luzzi, S., A. Elia, M. Del Maestro, S. K. Elbabaa, S. Carnevale, F. Guerrini, M. Caulo, P. Morbini, and R. Galzio. (2019). Dysembryoplastic Neuroepithelial Tumors: What You Need to Know. *World Neurosurg*, 127: 255-65.
- Mackay, A., A. Burford, D. Carvalho, E. Izquierdo, J. Fazal-Salom, K. R. Taylor, *et al.* (2017). Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell*, 32: 520-37 e5.
- Maeder, M. L., S. Thibodeau-Beganny, A. Osiak, D. A. Wright, R. M. Anthony, M. Eichinger, *et al.* (2008). Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell*, 31: 294-301.
- Mali, P., L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville, and G. M. Church. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339: 823-6.
- Marraffini, L. A., and E. J. Sontheimer. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 322: 1843-5.
- Marzluff, W. F., P. Gongidi, K. R. Woods, J. Jin, and L. J. Maltais. (2002). The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics*, 80: 487-98.
- Massimino, M., F. Spreafico, V. Biassoni, F. Simonetti, D. Riva, G. Trecate, *et al.* (2008). Diffuse pontine gliomas in children: changing strategies, changing results? A mono-institutional 20-year experience. *J Neurooncol*, 87: 355-61.
- Maze, I., K. M. Noh, A. A. Soshnev, and C. D. Allis. (2014). Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nat Rev Genet*, 15: 259-71.
- McGhee, J. D., and G. Felsenfeld. (1980). Nucleosome structure. *Annu Rev Biochem*, 49: 1115-56.
- Meel, M. H., A. C. P. Sewing, P. Waranecki, D. S. Metselaar, L. E. Wedekind, J. Koster, D. G. van Vuurden, G. J. L. Kaspers, and E. Hulleman. (2017). Culture methods of diffuse intrinsic pontine glioma cells determine response to targeted therapies. *Exp Cell Res*, 360: 397-403.
- Meng, F., J. W. Evans, D. Bhupathi, M. Banica, L. Lan, G. Lorente, *et al.* (2012). Molecular and cellular pharmacology of the hypoxia-activated prodrug TH-302. *Mol Cancer Ther*, 11: 740-51.
- Michalski, A., E. Bouffet, R. E. Taylor, D. Hargrave, D. Walker, S. Picton, K. Robinson, B. Pizer, and S. Bujkiewicz. (2010). The addition of high-dose tamoxifen to standard radiotherapy does not improve the survival of patients with diffuse intrinsic pontine glioma. *J Neurooncol*, 100: 81-8.
- Miller, J. C., M. C. Holmes, J. Wang, D. Y. Guschin, Y. L. Lee, I. Rupniewski, *et al.* (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 25: 778-85.
- Miura, H., C. B. Gurusurthy, T. Sato, M. Sato, and M. Ohtsuka. (2015). CRISPR/Cas9-based generation of knockdown mice by intronic insertion of artificial microRNA using longer single-stranded DNA. *Sci Rep*, 5: 12799.
- Mladenov, E., S. Magin, A. Soni, and G. Iliakis. (2013). DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. *Front Oncol*, 3: 113.
- Mohammad, F., S. Weissmann, B. Leblanc, D. P. Pandey, J. W. Hojfeldt, I. Comet, *et al.* (2017). EZH2 is a potential therapeutic target for H3K27M-mutant pediatric gliomas. *Nat Med*, 23: 483-92.

BIBLIOGRAPHIE

- Mojica, F. J., C. Diez-Villasenor, J. Garcia-Martinez, and E. Soria. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, 60: 174-82.
- Mojica, F. J., C. Diez-Villasenor, E. Soria, and G. Juez. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol*, 36: 244-6.
- Monje, M., S. S. Mitra, M. E. Freret, T. B. Raveh, J. Kim, M. Masek, *et al.* (2011). Hedgehog-responsive candidate cell of origin for diffuse intrinsic pontine glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 4453-8.
- Mosaab, A., M. El-Ayadi, E. N. Khorshed, N. Amer, A. Refaat, M. El-Beltagy, Z. Hassan, S. H. Soror, M. S. Zaghloul, and S. El-Naggar. (2020). Histone H3K27M Mutation Overrides Histological Grading in Pediatric Gliomas. *Sci Rep*, 10: 8368.
- Nagaraja, S., M. A. Quezada, S. M. Gillespie, M. Arzt, J. J. Lennon, P. J. Woo, *et al.* (2019). Histone Variant and Cell Context Determine H3K27M Reprogramming of the Enhancer Landscape and Oncogenic State. *Mol Cell*, 76: 965-80 e12.
- Nakashima, K., T. Takizawa, W. Ochiai, M. Yanagisawa, T. Hisatsune, M. Nakafuku, K. Miyazono, T. Kishimoto, R. Kageyama, and T. Taga. (2001). BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 5868-73.
- Natsume, A., M. Ito, K. Katsushima, F. Ohka, A. Hatanaka, K. Shinjo, *et al.* (2013). Chromatin regulator PRC2 is a key regulator of epigenetic plasticity in glioblastoma. *Cancer Res*, 73: 4559-70.
- Nikbakht, H., E. Panditharatna, L. G. Mikael, R. Li, T. Gayden, M. Osmond, *et al.* (2016). Spatial and temporal homogeneity of driver mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Commun*, 7: 11185.
- Nussenzweig, A., and M. C. Nussenzweig. (2007). A backup DNA repair pathway moves to the forefront. *Cell*, 131: 223-5.
- Osley, M. A. (1991). The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu Rev Biochem*, 60: 827-61.
- Ostrom, Q. T., G. Cioffi, H. Gittleman, N. Patil, K. Waite, C. Kruchko, and J. S. Barnholtz-Sloan. (2019). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol*, 21: v1-v100.
- Packer, R. J., M. Krailo, M. Mehta, K. Warren, J. Allen, R. Jakacki, J. G. Villablanca, A. Chiba, and G. Reaman. (2005). Phase 1 study of concurrent RMP-7 and carboplatin with radiotherapy for children with newly diagnosed brainstem gliomas. *Cancer*, 104: 1281-7.
- Packer, R. J., M. Prados, P. Phillips, H. S. Nicholson, J. M. Boyett, J. Goldwein, *et al.* (1996). Treatment of children with newly diagnosed brain stem gliomas with intravenous recombinant beta-interferon and hyperfractionated radiation therapy: a childrens cancer group phase I/II study. *Cancer*, 77: 2150-6.
- Pathania, M., N. De Jay, N. Maestro, A. S. Harutyunyan, J. Nitarska, P. Pahlavan, *et al.* (2017). H3.3(K27M) Cooperates with Trp53 Loss and PDGFRA Gain in Mouse Embryonic Neural Progenitor Cells to Induce Invasive High-Grade Gliomas. *Cancer Cell*, 32: 684-700 e9.
- Pattanayak, V., S. Lin, J. P. Guilinger, E. Ma, J. A. Doudna, and D. R. Liu. (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, 31: 839-43.

BIBLIOGRAPHIE

- Paugh, B. S., A. Broniscer, C. Qu, C. P. Miller, J. Zhang, R. G. Tatevossian, *et al.* (2011). Genome-wide analyses identify recurrent amplifications of receptor tyrosine kinases and cell-cycle regulatory genes in diffuse intrinsic pontine glioma. *J Clin Oncol*, 29: 3999-4006.
- Pavletich, N. P., and C. O. Pabo. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*, 252: 809-17.
- Perri, F., S. Pisconti, and G. Della Vittoria Scarpati. (2016). P53 mutations and cancer: a tight linkage. *Ann Transl Med*, 4: 522.
- Piunti, A., R. Hashizume, M. A. Morgan, E. T. Bartom, C. M. Horbinski, S. A. Marshall, *et al.* (2017). Therapeutic targeting of polycomb and BET bromodomain proteins in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Nat Med*, 23: 493-500.
- Pollack, I. F., R. I. Jakacki, S. M. Blaney, M. L. Hancock, M. W. Kieran, P. Phillips, *et al.* (2007). Phase I trial of imatinib in children with newly diagnosed brainstem and recurrent malignant gliomas: a Pediatric Brain Tumor Consortium report. *Neuro Oncol*, 9: 145-60.
- Pollack, I. F., C. F. Stewart, M. Kocak, T. Y. Poussaint, A. Broniscer, A. Banerjee, J. G. Douglas, L. E. Kun, J. M. Boyett, and J. R. Geyer. (2011). A phase II study of gefitinib and irradiation in children with newly diagnosed brainstem gliomas: a report from the Pediatric Brain Tumor Consortium. *Neuro Oncol*, 13: 290-7.
- Polo, S. E., D. Roche, and G. Almouzni. (2006). New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells. *Cell*, 127: 481-93.
- Puget, S., K. Beccaria, T. Blauwblomme, T. Roujeau, S. James, J. Grill, M. Zerah, P. Varlet, and C. Sainte-Rose. (2015). Biopsy in a series of 130 pediatric diffuse intrinsic Pontine gliomas. *Childs Nerv Syst*, 31: 1773-80.
- Puget, S., C. Philippe, D. A. Bax, B. Job, P. Varlet, M. P. Junier, *et al.* (2012). Mesenchymal transition and PDGFRA amplification/mutation are key distinct oncogenic events in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *PLoS One*, 7: e30313.
- Ran, F. A., P. D. Hsu, C. Y. Lin, J. S. Gootenberg, S. Konermann, A. E. Trevino, *et al.* (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154: 1380-9.
- Reyes-Botero, G., M. Giry, K. Mokhtari, M. Labussiere, A. Idbah, J. Y. Delattre, F. Laigle-Donadey, and M. Sanson. (2014). Molecular analysis of diffuse intrinsic brainstem gliomas in adults. *J Neurooncol*, 116: 405-11.
- Reyon, D., S. Q. Tsai, C. Khayter, J. A. Foden, J. D. Sander, and J. K. Joung. (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol*, 30: 460-5.
- Rigueur, D., S. Brugger, T. Anbarchian, J. K. Kim, Y. Lee, and K. M. Lyons. (2015). The type I BMP receptor ACVR1/ALK2 is required for chondrogenesis during development. *J Bone Miner Res*, 30: 733-41.
- Robison, N. J., and M. W. Kieran. (2014). Diffuse intrinsic pontine glioma: a reassessment. *J Neurooncol*, 119: 7-15.
- Rouet, P., F. Smih, and M. Jasin. (1994). Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol*, 14: 8096-106.
- Rouhi, P., L. D. Jensen, Z. Cao, K. Hosaka, T. Lanne, E. Wahlberg, J. F. Steffensen, and Y. Cao. (2010). Hypoxia-induced metastasis model in embryonic zebrafish. *Nat Protoc*, 5: 1911-8.

BIBLIOGRAPHIE

- Sadighi, Z., and J. Slopis. (2013). Pilocytic astrocytoma: a disease with evolving molecular heterogeneity. *J Child Neurol*, 28: 625-32.
- Salloum, R., M. DeWire, A. Lane, S. Goldman, T. Hummel, L. Chow, *et al.* (2015). Patterns of progression in pediatric patients with high-grade glioma or diffuse intrinsic pontine glioma treated with Bevacizumab-based therapy at diagnosis. *J Neurooncol*, 121: 591-8.
- Samadani, U., and K. D. Judy. (2003). Stereotactic brainstem biopsy is indicated for the diagnosis of a vast array of brainstem pathology. *Stereotact Funct Neurosurg*, 81: 5-9.
- San Filippo, J., P. Sung, and H. Klein. (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem*, 77: 229-57.
- Sander, J. D., E. J. Dahlborg, M. J. Goodwin, L. Cade, F. Zhang, D. Cifuentes, *et al.* (2011). Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat Methods*, 8: 67-9.
- Sanghavi, S. N., M. N. Needle, M. D. Krailo, J. R. Geyer, J. Ater, and M. P. Mehta. (2003). A phase I study of topotecan as a radiosensitizer for brainstem glioma of childhood: first report of the Children's Cancer Group-0952. *Neuro Oncol*, 5: 8-13.
- Sapranaukas, R., G. Gasiunas, C. Fremaux, R. Barrangou, P. Horvath, and V. Siksnys. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 39: 9275-82.
- Saratsis, A. M., M. Kambhampati, K. Snyder, S. Yadavilli, J. M. Devaney, B. Harmon, *et al.* (2014). Comparative multidimensional molecular analyses of pediatric diffuse intrinsic pontine glioma reveals distinct molecular subtypes. *Acta Neuropathol*, 127: 881-95.
- Sawan, C., and Z. Herceg. (2010). Histone modifications and cancer. *Adv Genet*, 70: 57-85.
- Schreck, K. C., S. Ranjan, N. Skorupan, C. Bettegowda, C. G. Eberhart, H. M. Ames, and M. Holdhoff. (2019). Incidence and clinicopathologic features of H3 K27M mutations in adults with radiographically-determined midline gliomas. *J Neurooncol*, 143: 87-93.
- Schroeder, K. M., C. M. Hoeman, and O. J. Becher. (2014). Children are not just little adults: recent advances in understanding of diffuse intrinsic pontine glioma biology. *Pediatr Res*, 75: 205-9.
- Schumacher, M., J. Schulte-Monting, P. Stoeter, M. Warmuth-Metz, and L. Solymosi. (2007). Magnetic resonance imaging compared with biopsy in the diagnosis of brainstem diseases of childhood: a multicenter review. *J Neurosurg*, 106: 111-9.
- Schwartzentruber, J., A. Korshunov, X. Y. Liu, D. T. Jones, E. Pfaff, K. Jacob, *et al.* (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*, 482: 226-31.
- Shen, H., M. Yu, M. Tsoli, C. Chang, S. Joshi, J. Liu, *et al.* (2020). Targeting reduced mitochondrial DNA quantity as a therapeutic approach in pediatric high-grade gliomas. *Neuro Oncol*, 22: 139-51.
- Silveira, A. B., L. H. Kasper, Y. Fan, H. Jin, G. Wu, T. I. Shaw, *et al.* (2019). H3.3 K27M depletion increases differentiation and extends latency of diffuse intrinsic pontine glioma growth in vivo. *Acta Neuropathol*, 137: 637-55.
- Slaymaker, I. M., L. Gao, B. Zetsche, D. A. Scott, W. X. Yan, and F. Zhang. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 351: 84-8.
- Smithies, O., R. G. Gregg, S. S. Boggs, M. A. Koralewski, and R. S. Kucherlapati. (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, 317: 230-4.

BIBLIOGRAPHIE

- Solomon, D. A., M. D. Wood, T. Tihan, A. W. Bollen, N. Gupta, J. J. Phillips, and A. Perry. (2016). Diffuse Midline Gliomas with Histone H3-K27M Mutation: A Series of 47 Cases Assessing the Spectrum of Morphologic Variation and Associated Genetic Alterations. *Brain Pathol*, 26: 569-80.
- Stafford, J. M., C. H. Lee, P. Voigt, N. Descostes, R. Saldana-Meyer, J. R. Yu, *et al.* (2018). Multiple modes of PRC2 inhibition elicit global chromatin alterations in H3K27M pediatric glioma. *Sci Adv*, 4: eaau5935.
- Streubel, J., C. Blucher, A. Landgraf, and J. Boch. (2012). TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nat Biotechnol*, 30: 593-5.
- Strouse, B., P. Bialk, R. A. Niamat, N. Rivera-Torres, and E. B. Kmiec. (2014). Combinatorial gene editing in mammalian cells using ssODNs and TALENs. *Sci Rep*, 4: 3791.
- Sturm, D., H. Witt, V. Hovestadt, D. A. Khuong-Quang, D. T. Jones, C. Konermann, *et al.* (2012). Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell*, 22: 425-37.
- Sun, J. D., Q. Liu, J. Wang, D. Ahluwalia, D. Ferraro, Y. Wang, *et al.* (2012). Selective tumor hypoxia targeting by hypoxia-activated prodrug TH-302 inhibits tumor growth in preclinical models of cancer. *Clin Cancer Res*, 18: 758-70.
- Svetelits, A., S. Bianco, J. Madore, G. Huppe, A. Nordell-Markovits, A. M. Mes-Masson, and N. Gevry. (2011). H3K27 demethylation by JMJD3 at a poised enhancer of anti-apoptotic gene BCL2 determines ERalpha ligand dependency. *EMBO J*, 30: 3947-61.
- Szenker, E., D. Ray-Gallet, and G. Almouzni. (2011). The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res*, 21: 421-34.
- Tang, L., F. Wei, Y. Wu, Y. He, L. Shi, F. Xiong, *et al.* (2018). Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. *J Exp Clin Cancer Res*, 37: 87.
- Tate, M. C., R. A. Lindquist, T. Nguyen, N. Sanai, A. J. Barkovich, E. J. Huang, D. H. Rowitch, and A. Alvarez-Buylla. (2015). Postnatal growth of the human pons: a morphometric and immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol*, 523: 449-62.
- Taylor, K. R., A. Mackay, N. Truffaux, Y. Butterfield, O. Morozova, C. Philippe, *et al.* (2014). Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Genet*, 46: 457-61.
- Taylor, K. R., M. Vinci, A. N. Bullock, and C. Jones. (2014). ACVR1 mutations in DIPG: lessons learned from FOP. *Cancer Res*, 74: 4565-70.
- Teng, Y., X. Xie, S. Walker, D. T. White, J. S. Mumm, and J. K. Cowell. (2013). Evaluating human cancer cell metastasis in zebrafish. *BMC Cancer*, 13: 453.
- Thomas, K. R., K. R. Folger, and M. R. Capecchi. (1986). High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, 44: 419-28.
- Tsai, S. Q., N. Wyvekens, C. Khayter, J. A. Foden, V. Thapar, D. Reyon, M. J. Goodwin, M. J. Aryee, and J. K. Joung. (2014). Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 32: 569-76.
- Tsai, S. Q., Z. Zheng, N. T. Nguyen, M. Liebers, V. V. Topkar, V. Thapar, *et al.* (2015). GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol*, 33: 187-97.
- Urnov, F. D., E. J. Rebar, M. C. Holmes, H. S. Zhang, and P. D. Gregory. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 11: 636-46.
- van Bavel, C. C., J. W. Dieker, Y. Kroeze, W. P. Tamboer, R. Voll, S. Muller, J. H. Berden, and J. van der Vlag. (2011). Apoptosis-induced histone H3 methylation is targeted by autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 70: 201-7.

BIBLIOGRAPHIE

- Veringa, S. J., D. Biesmans, D. G. van Vuurden, M. H. Jansen, L. E. Wedekind, I. Horsman, *et al.* (2013). In vitro drug response and efflux transporters associated with drug resistance in pediatric high grade glioma and diffuse intrinsic pontine glioma. *PLoS One*, 8: e61512.
- Vinci, M., A. Burford, V. Molinari, K. Kessler, S. Popov, M. Clarke, *et al.* (2018). Functional diversity and cooperativity between subclonal populations of pediatric glioblastoma and diffuse intrinsic pontine glioma cells. *Nat Med*, 24: 1204-15.
- Vogelstein, B., D. Lane, and A. J. Levine. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408: 307-10.
- Wajant, H. (2016). Therapeutic targeting of CD70 and CD27. *Expert Opin Ther Targets*, 20: 959-73.
- Walker, J. R., R. A. Corpina, and J. Goldberg. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412: 607-14.
- Warren, K. E. (2012). Diffuse intrinsic pontine glioma: poised for progress. *Front Oncol*, 2: 205.
- Warren, K. E., K. Killian, M. Suuriniemi, Y. Wang, M. Quezado, and P. S. Meltzer. (2012). Genomic aberrations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro Oncol*, 14: 326-32.
- Wassef, M., A. Luscan, A. Battistella, S. Le Corre, H. Li, M. R. Wallace, M. Vidaud, and R. Margueron. (2017). Versatile and precise gene-targeting strategies for functional studies in mammalian cell lines. *Methods*, 121-122: 45-54.
- Werbrouck, C., C. C. S. Evangelista, M. J. Lobon-Iglesias, E. Barret, G. Le Teuff, J. Merlevede, *et al.* (2019). TP53 Pathway Alterations Drive Radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG). *Clin Cancer Res*, 25: 6788-800.
- West, S. C. (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 435-45.
- Wong, L. H., J. D. McGhie, M. Sim, M. A. Anderson, S. Ahn, R. D. Hannan, A. J. George, K. A. Morgan, J. R. Mann, and K. H. Choo. (2010). ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Res*, 20: 351-60.
- Wu, G., A. Broniscer, T. A. McEachron, C. Lu, B. S. Paugh, J. Becksfort, *et al.* (2012). Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet*, 44: 251-3.
- Wu, G., A. K. Diaz, B. S. Paugh, S. L. Rankin, B. Ju, Y. Li, *et al.* (2014). The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet*, 46: 444-50.
- Wu, R. S., and W. M. Bonner. (1981). Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell*, 27: 321-30.
- Wu, R. S., S. Tsai, and W. M. Bonner. (1982). Patterns of histone variant synthesis can distinguish G0 from G1 cells. *Cell*, 31: 367-74.
- Yeh, J. J., and W. Y. Kim. (2015). Targeting tumor hypoxia with hypoxia-activated prodrugs. *J Clin Oncol*, 33: 1505-8.
- Yoshimi, K., Y. Kunihiro, T. Kaneko, H. Nagahora, B. Voigt, and T. Mashimo. (2016). ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat Commun*, 7: 10431.
- Zaghloul, M. S., E. Eldebawy, S. Ahmed, A. G. Mousa, A. Amin, A. Refaat, I. Zaky, N. Elkhateeb, and M. Sabry. (2014). Hypofractionated conformal radiotherapy for pediatric diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG): a randomized controlled trial. *Radiother Oncol*, 111: 35-40.

BIBLIOGRAPHIE

- Zarghooni, M., U. Bartels, E. Lee, P. Buczkowicz, A. Morrison, A. Huang, E. Bouffet, and C. Hawkins. (2010). Whole-genome profiling of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas highlights platelet-derived growth factor receptor alpha and poly (ADP-ribose) polymerase as potential therapeutic targets. *J Clin Oncol*, 28: 1337-44.
- Zhang, L., L. H. Chen, H. Wan, R. Yang, Z. Wang, J. Feng, *et al.* (2014). Exome sequencing identifies somatic gain-of-function PPM1D mutations in brainstem gliomas. *Nat Genet*, 46: 726-30.
- Zou, L., and S. J. Elledge. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, 300: 1542-8.

Annexes

L'art de la guerre appliquée aux DIPG : connais ton ennemi

Quentin Bailleul^{1,2}, Andria Rakotomalala^{1,2}, Isabelle Ferry^{1,2}, Pierre Leblond³, Samuel Meignan^{1,2,*} and Alessandro Furlan^{1,2,*}

1. Unité Tumorigénèse et Résistance aux Traitements, Centre Oscar Lambret, F-59000 Lille, France

2. Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut de Recherche contre le Cancer de Lille, UMR9020 – UMR-S 1277 - Canther – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

3. Département de Cancérologie pédiatrique, Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique, Lyon, France

* correspondance à adresser à : a-furlan@o-lambret.fr , s-meignan@o-lambret.fr

Résumé

Les tumeurs cérébrales pédiatriques représentent la principale cause de mortalité par cancer chez l'enfant. Alors que l'exérèse complète a une valeur pronostique dans certains gliomes de haut grade, les DIPG (*Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas*) ne peuvent en bénéficier du fait d'une localisation critique au niveau du tronc cérébral et de leur caractère infiltrant. La radiothérapie demeure le traitement de référence contre ces tumeurs depuis bientôt cinquante ans, et les tentatives pour améliorer le pronostic vital des patients à l'aide de chimiothérapies ou de thérapies ciblées se sont révélées infructueuses. La connaissance des altérations moléculaires dans ces gliomes a fortement progressé lors de la dernière décennie grâce aux progrès du séquençage à haut débit, et permis de mettre en évidence des entités distinctes au niveau moléculaire et de préciser les diagnostics. Dans cette revue, nous faisons le point sur ces nouvelles connaissances et les perspectives qu'elles apportent en termes de stratégies cliniques.

Abstract

Pediatric brain cancers represent the most frequent solid tumors and the leading cause of cancer-driven mortality in children. Pediatric High Grade Gliomas display a very poor prognosis. Among these, DIPG (Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas), localized to the brain stem, cannot benefit from a total exeresis due to this critical location and to their highly infiltrating nature. Radiotherapy remains the standard treatment against these tumors for almost five decades, and attempts to improve the prognosis of patients with chemotherapy or targeted therapies have failed. Thanks to the rise of high throughput sequencing, the knowledge of molecular alterations in pediatric gliomas strongly progressed and allowed to highlight distinct biomolecular entities and to establish more accurate diagnoses. In this review, we summarize this new information and the perspectives that it brings for clinical strategies.

Introduction

Sun Tze (dans son livre *L'art de la Guerre*) soulignait l'importance de connaître son ennemi pour mieux le vaincre : « Si tu ignores à la fois ton ennemi et toi-même, tu ne compteras tes combats que par tes défaites ». Cette maxime s'est malheureusement appliquée à la lutte contre certaines tumeurs pédiatriques malignes, pour lesquelles les cliniciens n'ont disposé pendant longtemps que de peu d'informations quant aux mécanismes tumorigéniques mis en jeu. Cette revue vise à synthétiser les découvertes récentes sur la biologie des Gliomes Infiltrants du Tronc

Cérébral (GITC) et à discuter comment ces nouvelles données pourraient être mises à profit à moyen terme pour lutter contre ces cancers.

En France, chaque année, environ 1700 enfants âgés de 0 à 14 ans sont diagnostiqués avec un cancer (données du Registre National des Cancers de l'Enfant, RNCE). Bien que les probabilités de survie de ces enfants se soient améliorées entre 2000 et 2014, les cancers restent la cause principale de mortalité associée à une maladie pour cette tranche d'âge [1]. Les tumeurs du système nerveux central représentent le type de cancers solides le plus

fréquent. Il en est de même dans la plupart des pays industrialisés dont les Etats-Unis [2]. Il s'agit le plus souvent de gliomes, une classe hétérogène de tumeurs ayant en commun de se développer à partir de cellules gliales ou de leurs précurseurs. On y retrouve des formes très différentes en terme d'anatomo-pathologie, de comportement biologique et de pronostic vital.

La plupart de ces gliomes se révèle d'histologie bénigne et présente un très bon pronostic, comme c'est le cas pour les astrocytomes pilocytiques, des tumeurs généralement faiblement évolutives. Il existe cependant des formes malignes (encore appelées de haut grade). Ces gliomes ont été historiquement diagnostiqués sur des bases histologiques [3], toutefois ce type d'analyse peut porter à des difficultés d'interprétation du fait de la forte hétérogénéité observée dans certaines tumeurs et de la quantité parfois réduite de matériel à analyser.

Les récentes découvertes tant sur le profil génétique qu'épigénétique dans les gliomes de haut grade a permis de mieux caractériser ces tumeurs et de mieux décrire leur hétérogénéité. La caractérisation de chacune de ces entités par l'intégration de données de biologie moléculaire apporte un diagnostic de précision, permet de définir des groupes homogènes de tumeurs et constitue la première étape vers une meilleure connaissance de la biologie de ces pathologies et la possibilité de développer pour chacune d'entre elles de nouvelles stratégies thérapeutiques inédites. La classification des tumeurs cérébrales et du système nerveux central de l'OMS de 2016 prend désormais en compte les caractéristiques moléculaires des gliomes de haut grade. L'intégration de ces données représente un changement majeur en pathologie tumorale cérébrale. Pour la première fois, de nouvelles entités tumorales spécifiques caractérisées par un profil moléculaire unique sont décrites. C'est le cas des gliomes de haut grade pédiatriques infiltrants de la ligne médiane caractérisés par la mutation H3K27M, sur lesquels nous reviendrons plus en détails.

confirmés. Les techniques comme la CED (*Convection Enhanced Delivery*) visant améliorer la diffusion des agents dans la tumeur n'ont pas apporté le bénéfice espéré [9], mais continuent d'être optimisées dans le but

Il est important de mentionner que malgré des similitudes histologiques, les gliomes pédiatriques diffèrent fortement des gliomes de l'adulte quant aux mécanismes moléculaires sur lesquels repose le caractère tumoral [4].

Cette différence par rapport aux gliomes de l'adulte repose notamment sur le fait que les gliomes de l'enfant se développent à partir de cellules qui suivent des programmes spécifiques nécessaires à la maturation du système nerveux chez cet enfant. Ceci explique que certaines formes de gliomes comme les astrocytomes pilocytiques, les épendymomes et les gliomes infiltrants du tronc cérébral (GITC, ou DIPG en anglais pour *Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas*) entre autres se développent essentiellement dans des tranches d'âge restreintes.

Parmi les gliomes pédiatriques malins, les gliomes infiltrants de la ligne médiane (ou DMG pour *Diffuse Midline Gliomas*), incluant les DIPG, représentent malheureusement un défi clinique qui est toujours d'actualité. En effet, malgré de nombreux essais basés sur des résultats pré-cliniques prometteurs, la radiothérapie demeure depuis 50 ans le seul traitement de référence ayant montré un bénéfice en terme de survie pour les patients atteints de DIPG, dont la médiane de survie reste cependant de l'ordre d'une année.

Divers essais ont été réalisés pour combiner à cette radiothérapie des agents de chimiothérapie, notamment avec des radiosensibilisants dont le topotecan, mais ils se sont révélés infructueux [5]. Suite à l'utilisation du temozolomide combiné à la radiothérapie pour traiter les glioblastomes chez l'adulte [6], des essais cliniques ont évalué cette stratégie pour des enfants atteints de DIPG mais celle-ci n'a malheureusement pas amélioré leur survie [7]. De même, malgré quelques cas initiaux prometteurs [8], les espoirs basés sur l'utilisation de composés anti-angiogéniques n'ont pas pour l'instant été

d'améliorer l'efficacité des traitements actuels et futurs.

Une certaine méconnaissance des DIPG a contribué aux échecs répétés des luttes contre ces cancers, conformément aux préceptes de Sun Tze. Nos connaissances de cet ennemi se

sont heureusement améliorées au cours de la dernière décennie, et de nombreuses découvertes primordiales ont été réalisées dans

Vers une description moléculaire des gliomes pédiatriques

Comme déjà évoqué précédemment, nous sommes passés au cours des dernières années à un diagnostic intégré des gliomes pédiatriques, prenant en compte les informations complémentaires d'histologie, d'imagerie et de biologie moléculaire (mutations, fusions et amplifications détectées dans ces tumeurs).

Cette évolution dans la classification repose sur deux raisons majeures. D'une part, l'essor des techniques de séquençage à haut débit permet maintenant de réaliser des séquençages de génome entier avec une grande rapidité et pour un coût nettement moins élevé qu'il y a dix ans. En parallèle, les analyses de ces séquençages ont rapidement mis en évidence des mutations spécifiques permettant de guider le diagnostic et la prise en charge des patients. Avec l'accumulation des données et leur mise en corrélation avec divers paramètres de la maladie, l'analyse du génome d'une tumeur à partir d'une biopsie peut maintenant renseigner sur son origine, ses probabilités d'évolution et les signalisations cellulaires perturbées qui pourraient servir de cibles sur le plan thérapeutique [10]. Des stratégies de thérapies ciblées ont ainsi pu être élaborées afin d'attaquer certains cancers sur les mécanismes dont ils sont particulièrement dépendants. En d'autres termes, l'utilisation d'armes adaptées à l'adversaire plutôt que celle de l'artillerie lourde peut se révéler judicieuse pour abattre spécifiquement cet ennemi.

Les mutations détectées dans les gliomes de l'enfant diffèrent fortement de celles observées dans les gliomes de l'adulte [4]. On retrouve ainsi très peu de mutations dans les gènes *IDH*, alors qu'une grande majorité des astrocytomes de l'adulte en présentent [11]. De même, l'amplification et/ou la surexpression du récepteur à l'EGF (*Epithelial Growth Factor*) est beaucoup moins fréquente dans les gliomes de l'enfant comparés à ceux de l'adulte. En revanche, on retrouve presque toujours dans les astrocytomes pilocytiques de l'enfant des altérations de la voie des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) avec très souvent un

le contexte des DIPG, qui changent la donne en termes de stratégies thérapeutiques.

réarrangement chromosomique menant à une protéine de fusion portant le domaine kinase de B-Raf [12]. Ces altérations pourraient d'ailleurs être à l'origine de la faible évolution de ces tumeurs pédiatriques (alors que les astrocytomes adultes ont beaucoup plus tendance à évoluer vers des formes malignes) via un mécanisme d'OIS (*Oncogene-Induced Senescence*) [13]. Des inhibiteurs ciblant ces kinases existent et sont en phase d'essais cliniques [14]. Les oligodendrogliomes représentent un autre exemple des différences moléculaires franches entre gliomes pédiatriques et adultes : la perte des fragments de chromosomes 1p et 19q est en effet très rare dans ces tumeurs chez l'enfant alors qu'elle en caractérise la majorité chez l'adulte [15]. Il est aussi important de signaler que certaines altérations moléculaires sont associées aux gliomes de l'adolescent et du jeune adulte, qui diffèrent à la fois des gliomes de l'enfant et de l'adulte [16].

Dans le cadre des DIPG, le séquençage du génome a mis en évidence de manière frappante des mutations dans les gènes *H3F3A* et *HIST1H3B*, codant respectivement pour les histones H3.1 et H3.3, induisant un changement du résidu lysine 27 en méthionine (K27M) dans la queue de ces histones [17,18]. Ces mutations des gènes d'histones représentent des événements initiaux dans la tumorigenèse des DIPG [19]. Le fait que la mutation K27M intervienne sur le variant H3.1 ou H3.3 va influencer sur les caractéristiques de la tumeur. Les tumeurs H3.1 mutées présentent en effet un phénotype mésenchymateux et semblent mieux répondre à la radiothérapie que les tumeurs H3.3 mutées qui présentent un phénotype oligodendrogial et une signature prométastatique [20]. Il est important de noter que ces dernières sont fréquemment associées à des mutations de *TP53* et reprogressent plus rapidement après radiothérapie [21].

Ces découvertes moléculaires amenèrent l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) à introduire en 2016 dans sa classification une nouvelle entité basée à la fois sur des critères histologiques et moléculaires, les « diffuse midline gliomas H3 K27M-mutant » [22]. La mutation H3K27M est effectivement associée à des signatures de

transcriptomique et de méthylation communes, quelle que soit la position de la tumeur le long de la ligne médiane [23].

D'autres mutations, menant à un remplacement du résidu Glycine 34 de H3.3 en Arginine ou Valine (H3.3 G34R/V), sont quant à elles associées à des gliomes de haut grade hémisphériques.

Une étude réalisée sur un millier de gliomes de haut grade chez l'enfant et le jeune adulte, dont la moitié environ de « diffuse midline gliomas H3 K27M-mutant », a encore amélioré notre connaissance des mutations associées à ces tumeurs [24]. Elle confirma que la mutation H3.3G34R était confinée aux tumeurs des hémisphères cérébraux, dans lesquelles elle était détectée dans environ 15% des cas, et le plus souvent chez les adolescents. Dans cette même étude, la mutation H3.3K27M a été détectée dans environ 60% des DIPG et autres gliomes de la ligne médiane, et corrèle avec un pronostic vital réduit pour ces patients dont la médiane de survie est de 11 mois. Les mutations K27M des histones H3.1 et H3.2 quant à elles étaient essentiellement retrouvées dans le tronc cérébral de patients plus jeunes dont la médiane de survie était légèrement supérieure, à savoir 15 mois. Divers réarrangements chromosomiques récurrents ont aussi été mis en évidence dans cette étude, de même que des amplifications des loci des gènes *PDGFRA*, *KIT*, *KDR*, *MYCN*, *EGFR* et *MET*, qui pourraient ainsi servir de cibles thérapeutiques pour ces sous-groupes.

Les DIPG ne peuvent pas bénéficier de la chirurgie d'exérèse de par l'impossibilité d'extirper totalement ces tumeurs qui infiltrerent des zones cruciales du système nerveux [25], et la réalisation de biopsies stéréotaxiques a longtemps été réservée aux cas où les résultats d'imagerie et/ou la présentation clinique étaient atypiques. Toutefois, ces pratiques se sont répandues et perfectionnées, présentant une morbidité relativement faible [26]. Même si un nombre important de praticiens n'y fait encore peu ou pas recours [27], certains experts recommandent maintenant de les mettre en œuvre systématiquement afin d'obtenir un profil moléculaire, établir un diagnostic de certitude, mieux comprendre la biologie de ces tumeurs et pouvoir à terme les cibler de manière personnalisée [28].

Les histones et la régulation épigénétique dans les DIPG

Les modifications post-traductionnelles des histones constituent un code histone qui régule l'ouverture de la chromatine et la transcription (pour revue, voir [29]). Suite à la découverte des mutations récurrentes dans les DIPG des gènes de variants d'histones, les chercheurs ont rapidement mis en évidence que ces mutants perturbaient la physiologie des cellules en altérant leur régulation épigénétique de l'expression des gènes. Une revue parue en 2012 dans *Médecine&Sciences* discutait de ces mutations et des hypothèses sur leur rôle dans l'épigénétique des cellules [30]. Depuis, il a été démontré que l'histone mutée H3K27M inhibe l'activité méthyltransférase de PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) via une interaction avec sa sous-unité EZH2. En conséquence, on observe une perte importante des marques de triméthylation K27me³ des histones H3 dans les cellules mutées [31]. Des études complémentaires ont révélé que cette perte était accompagnée d'une hypométhylation de l'ADN et que ces deux modifications altéraient l'expression des gènes dans les cellules [32]. La perte de triméthylation de H3K27 s'accompagne aussi d'une hausse de l'acétylation des histones [33]. Les mutations K27M des histones H3 remanient ainsi globalement l'épigénome des cellules de DIPG, notamment au niveau des superenhancers de gènes associés à la signalisation des facteurs de croissance et à la différenciation [34].

Des mutations du résidu K27 des histones H3 ont également été détectées dans des cas de leucémies myéloïdes aiguës, où elles aboutissent là aussi à une perturbation des marques de triméthylation, affectent la prolifération et la différenciation des cellules et promeuvent l'agressivité des leucémies [35].

Par ailleurs, la perte de triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 est également observée dans d'autres types de gliomes, à savoir les épendymomes de fosse postérieure. Dans ces tumeurs, il n'y a pas eu de mutations récurrentes identifiées mais un certain nombre de cas présentent des altérations épigénétiques dont la perte globale de triméthylation K27me³ de H3 [36]. Comme dans les gliomes mutés H3K27M, on observe une hypométhylation globale de l'ADN et la perte de triméthylation est associée à un mauvais pronostic. Dans ces

tumeurs, ce serait la surexpression de la protéine EZHIP (*Enhancer of Zeste Homologs Inhibitory Protein*) qui serait responsable de l'inhibition de PRC2 en interagissant avec EZH2 comme peut le faire l'oncohistone H3K27M [37].

De nouveaux modèles pré-cliniques pertinents

Une des clés pour la réussite du transfert de connaissances biologiques vers une efficacité clinique repose sur l'utilisation de modèles pré-cliniques reproduisant le mieux possible la physiologie des tumeurs chez les patients.

Les lignées cellulaires cultivées sur plastique ont longtemps été et restent un outil utile pour appréhender des questions de biologie cellulaire en cancérologie. Leur simplicité d'utilisation en fait un modèle de choix pour les criblages à spectre large de composés anti-cancéreux. En parallèle se sont répandues des méthodes de culture de cellules dérivées de patients dans des milieux propices aux cellules souches neurales, sur membrane de laminine [38] ou sous forme de sphères/organoïdes [39,40]. Ces méthodes permettent de mieux conserver les caractéristiques initiales des tumeurs dont elles sont dérivées. Bien que proches en terme de biologie cellulaire et moléculaire de la tumeur d'origine, ces cultures *in vitro* ne reproduisent toutefois pas complètement l'environnement des tumeurs endogènes d'un point de vue structural et biochimique. De plus, les interactions avec les autres types cellulaires de leur microenvironnement natif, dont les astrocytes, les neurones et les cellules endothéliales sont absentes dans ces systèmes.

Pour pallier à ce manque, les modèles de culture de cellules de patients dans des modèles de souris se sont développés. Une collection de modèles de ce type a notamment été mise en place à l'Institut Gustave Roussy, avec des xénogreffes orthotopiques (c'est-à-dire dans le tissu équivalent à celui d'origine) de cellules de patients atteints de DIPG, qui réussissent dans environ 60% des cas et reproduisent bien les caractéristiques histopathologiques et cliniques des tumeurs d'origine [41]. L'utilisation de ces modèles s'est répandue pour tester de nouvelles stratégies contre les DIPG, souvent avec les modèles de croissance les plus rapides pour

accélérer les recherches, ce qui limite en conséquence l'évaluation de la stratégie aux tumeurs les plus agressives [42]. L'inclusion dans de telles études des modèles à la croissance plus lente, bien que ralentissant les recherches, pourrait permettre d'identifier des stratégies adaptées à cette catégorie de tumeurs.

Il sera nécessaire d'évaluer correctement dans ces modèles si la barrière hématoencéphalique (BHE) est comparable à celle des tumeurs chez l'enfant et si le modèle reproduit bien une diffusion des composés anti-cancéreux similaire à celle qui pourrait être obtenue en clinique. Un modèle d'injection orthotopique chez le rat avait permis de conclure que la croissance et l'infiltration des tumeurs développées n'avaient affecté ni l'intégrité ni la fonctionnalité de la BBB [43]. Lors de la réalisation des xénogreffes orthotopiques chez la souris, la BHE n'a pas non plus montré de différence fonctionnelle entre les cerveaux sains ou greffés [41]. Dans une étude proche, l'injection orthotopique en souris de cellules tumorales mutées H3K27M ou non a montré que la perméabilité de la BHE des tumeurs développées dépendait fortement de la localisation du site tumoral, plus que de la présence ou non de la mutation [44].

Dans la pratique clinique, les DIPG se caractérisent en imagerie par une absence de réhaussement du signal suite à l'administration de l'agent de contraste, ce qui suggère une faible perfusion de ces tumeurs. Néanmoins, une certaine hétérogénéité interindividuelle et intraindividuelle dans la prise de contraste en IRM [20,45], laisse envisager une qualité de perfusion hétérogène des DIPG. Celle-ci est sans doute à mettre en lien avec une certaine hypoxie observée dans les gliomes pédiatriques de haut grade [47] et corrélée avec une récurrence tumorale plus rapide [48]. En outre, des anomalies de développement veineux ont été observées de manière plus fréquente chez les patients atteints de DIPG [46]. Des études supplémentaires sont nécessaires pour continuer à mieux caractériser les propriétés de perfusion des DIPG et vérifier la pertinence des modèles pré-cliniques quant à cet aspect.

Pour en revenir aux modèles pré-cliniques, des modèles de souris transgéniques ont aussi été établis à partir des principales mutations observées chez les enfants. L'expression de l'histone H3.3 K27M grâce à

un système de recombinaison dans les cellules souches neurales accélère ainsi le développement de DIPG dans des souris présentant une déficience en P53 et une activation de PDGFRA [49]. Toutefois, cette recombinaison induit en l'absence d'activation de PDGFRA la formation de médulloblastomes, qui se développent à partir d'un type cellulaire différent de celui d'origine des DIPG. Etant donné que le stade de différenciation de la cellule dans laquelle une mutation H3.3 K27M est induite va impacter sur son analogie avec les DIPG natifs [34], ceci invite à une certaine prudence quant à la pertinence du modèle murin proposé. De plus, des différences inter-espèces existent quant au développement du système nerveux et quant aux interactions entre types cellulaires au sein d'un tissu entre l'humain et la souris. Enfin, il est important de souligner que de tels modèles transgéniques ne peuvent pas reproduire l'hétérogénéité moléculaire observée chez les patients [50].

Chacun des modèles discutés présente donc des avantages et des inconvénients les uns par rapport aux autres (cf tableau 1). Nous pensons qu'il est nécessaire dans les approches actuelles de combiner ces différents modèles pour cumuler les informations complémentaires qu'ils apportent.

Vers de nouvelles stratégies thérapeutiques

La découverte des mutations récurrentes des histones et des remodelages associés de la chromatine dans les DIPG a suscité un fort intérêt dans la recherche translationnelle contre ces tumeurs. L'importance des modifications épigénétiques dans les DIPG et la possibilité de les contrecarrer grâce à des épiprodrugs a ainsi fait l'objet de nombreuses études. Elle a notamment été validée dans un screening qui a identifié le panobinostat, un inhibiteur des histone désacétylases, comme efficace contre les DIPG [51].

Modèle	Avantages	Inconvénients
Lignées cellulaires en monocouche sur plastique	Simplicité d'utilisation et coût Modèles de choix pour criblage Facilité à imager	Microenvironnement physiologique absent
Cultures propices aux cellules souches (monocouche sur laminine et sphères/organoïdes)	Meilleure préservation des caractéristiques tumorales Agencement intercellulaire plus pertinent	Absence des différents types cellulaires et structures matricielles présents dans le microenvironnement natif
Xéno greffes sous-cutanées	Facilité de suivi de la croissance	Environnement non pertinent Système immunitaire déficient
Xéno greffes orthotopiques	Environnement cérébral pertinent Interactions avec autres types cellulaires natifs Barrière hémato-encéphalique (perméabilité dépendante du site d'implantation)	Réussite de prise tumorale variable Coûts financier et éthique Modèles rapides privilégiés Système immunitaire déficient Différence d'espèce (homme-souris) Difficulté à imager en-dessous d'une taille déjà trop importante
Modèles de souris transgéniques	Meilleure reproductibilité de développement Types cellulaires de la même espèce dans le microenvironnement Précision des altérations moléculaires Système immunitaire présent	Difficulté à maîtriser précisément le stade de différenciation des cellules à l'origine des tumeurs Coûts financier et éthique Difficulté à imager en-dessous d'une taille déjà trop importante Pas de représentation de l'hétérogénéité moléculaire

Tableau I. Modèles pré-cliniques utilisés pour l'étude des DIPG

Une étude récente a mis en évidence que l'efficacité du panobinostat pouvait même être améliorée par une combinaison avec le marizomib, un inhibiteur du protéasome [42]. Un essai est en cours pour évaluer l'efficacité clinique contre les DIPG du panobinostat sous forme de nanoparticules (NCT03566199). La perte de triméthylation de H3K27 dans les DIPG est aussi associée à une hausse de l'acétylation des histones au niveau des gènes déréprimés [33]. La famille des protéines BET (Bromodomain and ExtraTerminal domain) est réputée pour intervenir au niveau des histones acétylées, et l'inhibition de leur fixation sur ces zones grâce à l'inhibiteur JQ1 a fortement réduit la croissance des cellules de DIPG *in vitro* et dans des modèles de xéno greffes en souris. Le composé GSKJ4, un inhibiteur de la déméthylase JMJD3 a également démontré son efficacité dans des modèles proches [52], ainsi que sa capacité à augmenter l'efficacité de la radiothérapie dans des modèles de souris [53]. Dans l'ensemble, les épidroques semblent donc être des pistes thérapeutiques intéressantes.

D'autres mutations que celles des histones sont fréquemment co-détectées dans les DIPG. On retrouve ainsi souvent dans les cas mutés H3.3 K27M des mutations des gènes *TP53* et *PDGFRA* [14]. Les mutations de *TP53* définissent une sous-population répondant moins bien à la radiothérapie et confèrent un pronostic péjoratif [21]. Celles de *PDGFRA* pourraient servir de cibles, mais les essais cliniques utilisant l'Imatinib mesylate, un de ses inhibiteurs, dans les gliomes pédiatriques ont été interrompus à cause d'un risque accru d'hémorragies [54]. Un inhibiteur du *PDGFRA* développé plus récemment, le dasatinib, a également été évalué et a lui aussi démontré une toxicité limitante [55].

Des mutations d'*ACVRI*, le gène codant pour le récepteur à l'activine ALK2, sont détectées dans environ 20% des DIPG [56]. Elles sont plutôt associées aux mutations H3.1 K27M, et l'utilisation d'inhibiteurs d'ALK2 réduit la croissance des tumeurs mutées pour ce gène dans des modèles pré-cliniques [57].

D'autres mutations, amplifications ou fusions sont co-détectées chez un nombre plus restreint de patients, comme c'est le cas pour les gènes de récepteurs tyrosine kinases tels que EGFR, MET ou TRK, et on peut envisager que ces patients pourraient bénéficier du

développement clinique d'inhibiteurs de ces kinases [4,14]. Ainsi, un essai a par exemple testé la combinaison d'inhibiteurs récemment développés de PDGFR et MET mais a malheureusement mis en évidence une absence de réponse des tumeurs et une trop forte toxicité [55]. D'autres essais cliniques ciblant ces récepteurs ont eu lieu [58] ou sont en cours, comme l'essai BIOMEDE (*Biological Medicine for DIPG Eradication*) piloté par l'Institut Gustave Roussy.

La voie PI3K/Akt/mTOR est activée en réponse à différentes des altérations moléculaires fréquentes dans les DIPG, et son ciblage par la périfosine et le temsirolimus est également à l'étude [59].

La surexpression du récepteur à la dopamine DRD2 dans les DIPG ouvre aussi une piste pour un ciblage de ces tumeurs avec le composé ONC201 [60]. Enfin, le ganglioside disialylé GD2 est fortement exprimé dans les DIPG, et son utilisation comme cible en immunothérapie avec les récepteurs chimériques (pour revue, voir [61]) a montré des résultats spectaculaires en modèles DIPG de souris mais aussi de rares réactions létales qui doivent être investiguées avant d'envisager son application en clinique [62].

Comme nous venons de le voir, les stratégies prometteuses ne manquent pas (cf figure 1) mais leur mise en œuvre en clinique nécessite de surmonter plusieurs obstacles pour éviter les déceptions et les échecs de précédents essais cliniques. D'une part, l'accès des composés à la tumeur dans le contexte des DIPG est problématique, en lien notamment avec une barrière hémato-encéphalique très peu perméable dans le tronc cérébral et une faible diffusion dans l'espace extracellulaire du cerveau, et nécessite une réflexion poussée sur la manière d'administrer ces agents [63]. En plus de la méthode de CED déjà évoquée, des approches basées sur des ultrasons pulsés sont en développement [64].

D'autre part, les essais cliniques nécessitent généralement des cohortes importantes pour avoir une puissance statistique suffisante. Les DIPG sont diagnostiqués chez une cinquantaine d'enfants par an en France, et donc chaque sous-type peut être considéré comme une maladie orpheline. Au niveau européen, un sondage réalisé l'année dernière

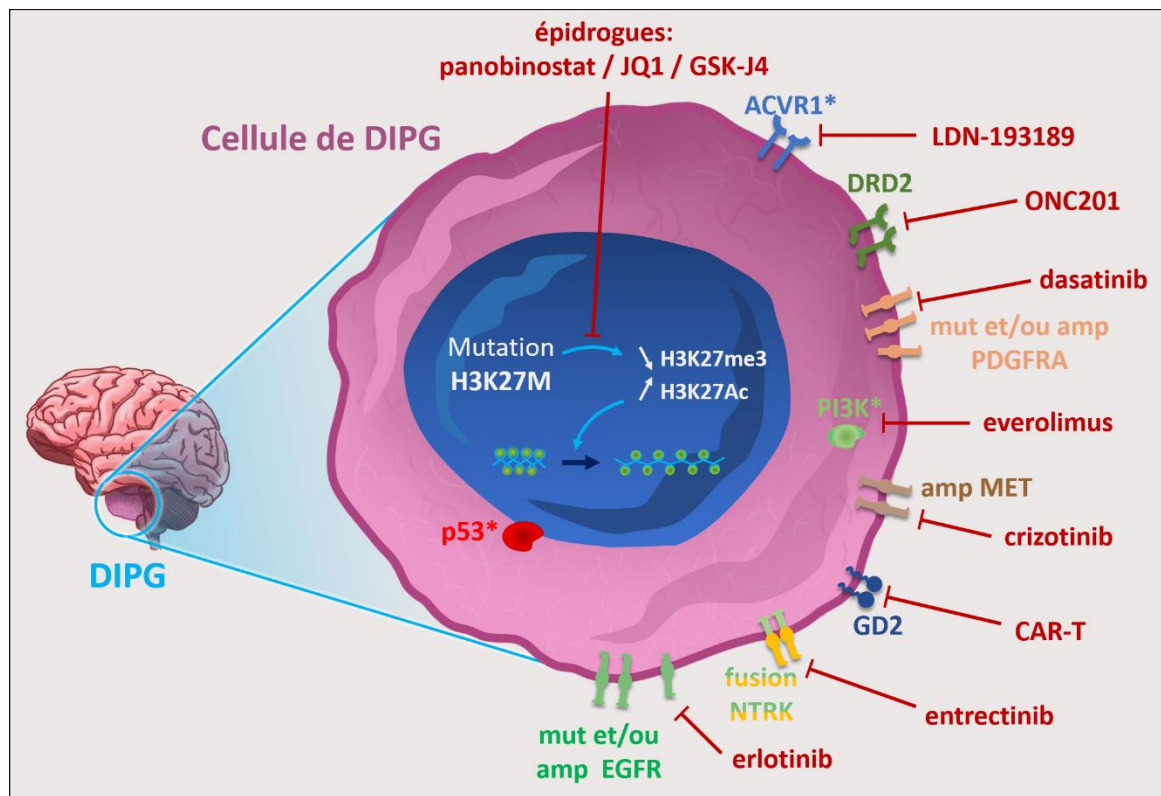


Figure 1. Principales altérations moléculaires des DIPG et stratégies thérapeutiques associées. La grande majorité des DIPG présente une mutation driver K27M de l’histone H3, qui aboutit à des remaniements épigénétiques affectant l’accessibilité de la chromatine et l’expression des gènes. Plusieurs épidrologues peuvent agir au niveau des mécanismes épigénétiques pour contrer la croissance des cellules de DIPG. En parallèle, on détecte fréquemment dans les DIPG des co-altérations (mutations, amplifications, fusions, surexpressions) de gènes de récepteurs membranaires. Différentes thérapies ciblées (exemples en rouge) ont été évaluées en modèles pré-cliniques et pourraient servir de base à une médecine personnalisée en fonction du profil moléculaire des patients. L’immunothérapie à l’aide de cellules T reconnaissant le ganglioside GD2 représente aussi une stratégie prometteuse.

après de professionnels de santé spécialistes des DIPG a révélé qu’une majorité des répondants traitaient moins de 5 cas par an et qu’une minorité de ces cas était incluse dans des essais cliniques, pour des raisons potentiellement éthiques, logistiques ou culturelles [27]. Une coordination internationale est donc sans doute nécessaire pour réussir des essais cliniques basés sur des altérations spécifiques [65], comme c’est le cas par exemple pour l’étude BIOMEDE.

Conclusion/perspectives

L’analyse moléculaire des gliomes pédiatriques a révolutionné nos connaissances sur la biologie de ces tumeurs. Les nouvelles découvertes laissent enfin entrevoir de

nouvelles manières de cibler ces gliomes, et notamment les DIPG. Loin de crier victoire devant un ennemi qui s’est déjà tant de fois démontré intraitable, nous avons souhaité mettre en lumière ici les stratégies porteuses d’espoir en cours de développement.

Une meilleure compréhension de la tolérance des patients aux traitements et de la réelle accessibilité et biodisponibilité des agents anti-cancéreux dans les DIPG reste nécessaire pour le transfert vers la clinique de ces nouvelles stratégies. Comme le conseillait Sun Tze dans *L’art de la guerre*, « connais ton ennemi et connais-toi toi-même » devrait permettre d’optimiser les chances de réussite contre ce terrible ennemi.

Bibliographie

1. Lacour B, Goujon S, Guissou S, *et al.* Childhood cancer survival in France, 2000-2008. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP* 2014 ; 23 : 449-457.
2. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro-Oncol.* 2019 ; 21 : v1-v100.
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 2007 ; 114 : 97-109.
4. Braunstein S, Raleigh D, Bindra R, *et al.* Pediatric high-grade glioma: current molecular landscape and therapeutic approaches. *J. Neurooncol.* 2017 ; 134 : 541-549.
5. Bernier-Chastagner V, Grill J, Doz F, *et al.* Topotecan as a radiosensitizer in the treatment of children with malignant diffuse brainstem gliomas: results of a French Society of Paediatric Oncology Phase II Study. *Cancer* 2005 ; 104 : 2792-2797.
6. Stupp R, Mason WP, Bent MJ van den, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2005 ; 352 : 987-996.
7. Cohen KJ, Heideman RL, Zhou T, *et al.* Temozolomide in the treatment of children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine gliomas: a report from the Children's Oncology Group. *Neuro-Oncol.* 2011 ; 13 : 410-416.
8. Aguilera DG, Mazewski C, Hayes L, *et al.* Prolonged survival after treatment of diffuse intrinsic pontine glioma with radiation, temozolamide, and bevacizumab: report of 2 cases. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2013 ; 35 : e42-46.
9. Anderson RCE, Kennedy B, Yanes CL, *et al.* Convection-enhanced delivery of topotecan into diffuse intrinsic brainstem tumors in children. *J. Neurosurg. Pediatr.* 2013 ; 11 : 289-295.
10. Cohen KJ, Jabado N, Grill J. Diffuse intrinsic pontine gliomas-current management and new biologic insights. Is there a glimmer of hope? *Neuro-Oncol.* 2017 ; 19 : 1025-1034.
11. Yan H, Parsons DW, Jin G, *et al.* IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* 2009 ; 360 : 765-773.
12. Jones DTW, Kocialkowski S, Liu L, *et al.* Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res.* 2008 ; 68 : 8673-8677.
13. Jacob K, Quang-Khuong D-A, Jones DTW, *et al.* Genetic aberrations leading to MAPK pathway activation mediate oncogene-induced senescence in sporadic pilocytic astrocytomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2011 ; 17 : 4650-4660.
14. Sturm D, Pfister SM, Jones DTW. Pediatric Gliomas: Current Concepts on Diagnosis, Biology, and Clinical Management. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2017 ; 35 : 2370-2377.
15. Kreiger PA, Okada Y, Simon S, *et al.* Losses of chromosomes 1p and 19q are rare in pediatric oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 2005 ; 109 : 387-392.
16. Roux A, Pallud J, Saffroy R, *et al.* High-grade gliomas in adolescents and young adults highlight histomolecular differences with their adult and paediatric counterparts. *Neuro-Oncol.* 2020 ;
17. Schwartzenuber J, Korshunov A, Liu X-Y, *et al.* Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 2012 ; 482 : 226-231.
18. Wu G, Broniscer A, McEachron TA, *et al.* Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat. Genet.* 2012 ; 44 : 251-253.
19. Nikbakht H, Panditharatna E, Mikael LG, *et al.* Spatial and temporal homogeneity of driver mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Commun.* 2016 ; 7 : 11185.
20. Castel D, Philippe C, Calmon R, *et al.* Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 2015 ; 130 : 815-827.
21. Werbrouck C, Evangelista CCS, Lobón-Iglesias M-J, *et al.* TP53 Pathway Alterations Drive Radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG). *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2019 ; 25 : 6788-6800.
22. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, *et al.* The 2016 World Health Organization

- Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 2016 ; 131 : 803–820.
23. Castel D, Philippe C, Kergrohen T, *et al.* 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.* 2018 ; 6 : 117.
 24. Mackay A, Burford A, Carvalho D, *et al.* Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* 2017 ; 32 : 520-537.e5.
 25. Caretti V, Bugiani M, Freret M, *et al.* Subventricular spread of diffuse intrinsic pontine glioma. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 2014 ; 128 : 605–607.
 26. Puget S, Beccaria K, Blauwblomme T, *et al.* Biopsy in a series of 130 pediatric diffuse intrinsic Pontine gliomas. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* 2015 ; 31 : 1773–1780.
 27. El-Khouly FE, Veldhuijzen van Zanten SEM, Santa-Maria Lopez V, *et al.* Diagnostics and treatment of diffuse intrinsic pontine glioma: where do we stand? *J. Neurooncol.* 2019 ; 145 : 177–184.
 28. Williams JR, Young CC, Vitanza NA, *et al.* Progress in diffuse intrinsic pontine glioma: advocating for stereotactic biopsy in the standard of care. *Neurosurg. Focus* 2020 ; 48 : E4.
 29. Ray-Gallet D, Gérard A, Polo S, *et al.* [Variations on the topic of the “histone code”]. *Med. Sci. MS* 2005 ; 21 : 384–389.
 30. Khuong-Quang D-A, Gerges N, Jabado N. [Mutations in histone H3.3 and chromatin remodeling genes drive pediatric and young adult glioblastomas]. *Med. Sci. MS* 2012 ; 28 : 809–812.
 31. Lewis PW, Müller MM, Koletsky MS, *et al.* Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science* 2013 ; 340 : 857–861.
 32. Bender S, Tang Y, Lindroth AM, *et al.* Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell* 2013 ; 24 : 660–672.
 33. Piunti A, Hashizume R, Morgan MA, *et al.* Therapeutic targeting of polycomb and BET bromodomain proteins in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Nat. Med.* 2017 ; 23 : 493–500.
 34. Nagaraja S, Quezada MA, Gillespie SM, *et al.* Histone Variant and Cell Context Determine H3K27M Reprogramming of the Enhancer Landscape and Oncogenic State. *Mol. Cell* 2019 ; 76 : 965-980.e12.
 35. Boileau M, Shirinian M, Gayden T, *et al.* Mutant H3 histones drive human pre-leukemic hematopoietic stem cell expansion and promote leukemic aggressiveness. *Nat. Commun.* 2019 ; 10 : 2891.
 36. Bayliss J, Mukherjee P, Lu C, *et al.* Lowered H3K27me3 and DNA hypomethylation define poorly prognostic pediatric posterior fossa ependymomas. *Sci. Transl. Med.* 2016 ; 8 : 366ra161.
 37. Jain SU, Do TJ, Lund PJ, *et al.* PFA ependymoma-associated protein EZHIP inhibits PRC2 activity through a H3 K27M-like mechanism. *Nat. Commun.* 2019 ; 10 : 2146.
 38. Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, *et al.* Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* 2009 ; 4 : 568–580.
 39. Cockle JV, Picton S, Levesley J, *et al.* Cell migration in paediatric glioma; characterisation and potential therapeutic targeting. *Br. J. Cancer* 2015 ; 112 : 693–703.
 40. Nagaraja S, Vitanza NA, Woo PJ, *et al.* Transcriptional Dependencies in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* 2017 ; 31 : 635-652.e6.
 41. Plessier A, Le Dret L, Varlet P, *et al.* New in vivo avatars of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) from stereotactic biopsies performed at diagnosis. *Oncotarget* 2017 ; 8 : 52543–52559.
 42. Lin GL, Wilson KM, Ceribelli M, *et al.* Therapeutic strategies for diffuse midline glioma from high-throughput combination drug screening. *Sci. Transl. Med.* 2019 ; 11 .
 43. Chaves C, Declèves X, Taghi M, *et al.* Characterization of the Blood-Brain Barrier Integrity and the Brain Transport of SN-38 in an Orthotopic Xenograft Rat Model of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Pharmaceutics* 2020 ; 12 .
 44. Subashi E, Cordero FJ, Halvorson KG, *et al.* Tumor location, but not H3.3K27M, significantly influences the blood-brain-barrier permeability in a genetic mouse

- model of pediatric high-grade glioma. *J. Neurooncol.* 2016 ; 126 : 243–251.
45. Aboian MS, Solomon DA, Felton E, *et al.* Imaging Characteristics of Pediatric Diffuse Midline Gliomas with Histone H3 K27M Mutation. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 2017 ; 38 : 795–800.
 46. Roux A, Boddaert N, Grill J, *et al.* High Prevalence of Developmental Venous Anomaly in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas: A Pediatric Control Study. *Neurosurgery* 2020 ; 86 : 517–523.
 47. Nguyen A, Moussallieh FM, Mackay A, *et al.* Characterization of the transcriptional and metabolic responses of pediatric high grade gliomas to mTOR-HIF-1 α axis inhibition. *Oncotarget* 2017 ; 8 : 71597–71617.
 48. Evans SM, Judy KD, Dunphy I, *et al.* Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2004 ; 10 : 8177–8184.
 49. Larson JD, Kasper LH, Paugh BS, *et al.* Histone H3.3 K27M Accelerates Spontaneous Brainstem Glioma and Drives Restricted Changes in Bivalent Gene Expression. *Cancer Cell* 2019 ; 35 : 140–155.e7.
 50. Welby JP, Kaptzan T, Wohl A, *et al.* Current Murine Models and New Developments in H3K27M Diffuse Midline Gliomas. *Front. Oncol.* 2019 ; 9 : 92.
 51. Grasso CS, Tang Y, Truffaux N, *et al.* Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Med.* 2015 ; 21 : 555–559.
 52. Hashizume R, Andor N, Ihara Y, *et al.* Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat. Med.* 2014 ; 20 : 1394–1396.
 53. Katagi H, Louis N, Unruh D, *et al.* Radiosensitization by Histone H3 Demethylase Inhibition in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2019 ; 25 : 5572–5583.
 54. Pollack IF, Jakacki RI, Blaney SM, *et al.* Phase I trial of imatinib in children with newly diagnosed brainstem and recurrent malignant gliomas: a Pediatric Brain Tumor Consortium report. *Neuro-Oncol.* 2007 ; 9 : 145–160.
 55. Broniscer A, Jia S, Mandrell B, *et al.* Phase 1 trial, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of dasatinib combined with crizotinib in children with recurrent or progressive high-grade and diffuse intrinsic pontine glioma. *Pediatr. Blood Cancer* 2018 ; 65 : e27035.
 56. Buczkowicz P, Hoeman C, Rakopoulos P, *et al.* Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nat. Genet.* 2014 ; 46 : 451–456.
 57. Carvalho D, Taylor KR, Olaciregui NG, *et al.* ALK2 inhibitors display beneficial effects in preclinical models of ACVR1 mutant diffuse intrinsic pontine glioma. *Commun. Biol.* 2019 ; 2 : 156.
 58. Georger B, Hargrave D, Thomas F, *et al.* Innovative Therapies for Children with Cancer pediatric phase I study of erlotinib in brainstem glioma and relapsing/refractory brain tumors. *Neuro-Oncol.* 2011 ; 13 : 109–118.
 59. Becher OJ, Gilheeny SW, Khakoo Y, *et al.* A phase I study of perifosine with temsirolimus for recurrent pediatric solid tumors. *Pediatr. Blood Cancer* 2017 ; 64 .
 60. Hall MD, Odia Y, Allen JE, *et al.* First clinical experience with DRD2/3 antagonist ONC201 in H3 K27M-mutant pediatric diffuse intrinsic pontine glioma: a case report. *J. Neurosurg. Pediatr.* 2019 ; 1–7.
 61. Catros V. [Next generation engineered T cells for cell therapy: from lymphoma to solid tumors]. *Med. Sci. MS* 2019 ; 35 : 316–326.
 62. Mount CW, Majzner RG, Sundaresh S, *et al.* Potent antitumor efficacy of anti-GD2 CAR T cells in H3-K27M+ diffuse midline gliomas. *Nat. Med.* 2018 ; 24 : 572–579.
 63. Warren KE. Beyond the Blood:Brain Barrier: The Importance of Central Nervous System (CNS) Pharmacokinetics for the Treatment of CNS Tumors, Including Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front. Oncol.* 2018 ; 8 : 239.
 64. Beccaria K, Canney M, Bouchoux G, *et al.* Blood-brain barrier disruption with low-intensity pulsed ultrasound for the treatment of pediatric brain tumors: a review and perspectives. *Neurosurg. Focus* 2020 ; 48 : E10.
 65. Jones C, Karajannis MA, Jones DTW, *et al.* Pediatric high-grade glioma: biologically

and clinically in need of new thinking.
Neuro-Oncol. 2017 ; 19 : 153–161.

The Hypoxia-Activated Prodrug Evofosfamide is Effective in Pediatric HGG and DIPG Cell Lines as a Monotherapy and in Combination

Pauline NAVARIN^{1,2,*}, Quentin BAILLEUL^{1,2,*}, Mélanie ARCICASA^{1,2}, Christine BAL-MAHIEU^{1,2}, Nicole LEMAHIEU^{1,2}, Angel Montero CARCABOSO⁵, Samuel MEIGNAN^{1,2}, Pierre LEBLOND^{1,2,3}.

(1) Tumorigenesis and Resistance to Treatment Unit, Oscar Lambret Comprehensive Cancer Center, SIRIC ONCOLille, Lille, France.

(2) INSERM U908, Lille, France

(3) Pediatric Oncology Unit, Oscar Lambret Comprehensive Cancer Center, SIRIC ONCOLille, Lille, France.

(4) Academic Radiation Oncology Department, Oscar Lambret Comprehensive Cancer Center, SIRIC ONCOLille, Lille, France.

(5) Institut de Recerca Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain.

(*) These authors contributed equally to this work.

Keywords: high grade glioma, evofosfamide, hypoxia, radiotherapy, child

ABSTRACT

Background

The prognosis of children with pediatric high grade glioma (pHGG) and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG) remains poor despite aggressive multidisciplinary therapeutic approaches. Current standard treatment combines surgery when possible, radiation therapy and often alkylating agents, such as temozolomide. Evofosfamide (Evo, previously known as TH-302) is a 2-nitroimidazole hypoxia-activated prodrug of the cytotoxic bromo-isophosphoramidate mustard. Evo has been shown to exhibit preclinical and clinical activities against solid tumors including adult's glioblastoma. We present here the first data with Evo in pediatric high grade glioma and DIPG cell lines.

Materials and methods

Evo was evaluated in 3 pHGG and 4 DIPG well-characterized cell lines growing under normoxic or hypoxic conditions (1% O₂). The cytotoxicity of Evo, used as a single drug or in association with SN38, doxorubicin and etoposide, was evaluated *in vitro* using a MTS assay. The synergism was analyzed by the Chou and Talalay method. Radio-sensitizing effects were investigated *in vitro* using clonogenic assays.

Results

Growth of all cell lines was inhibited by Evo as a single agent, and as expected, the cytotoxicity of Evo was higher under hypoxic conditions (IC₅₀ were 2-13 fold higher in normoxic *vs.* hypoxic conditions). In pHGG cell lines, we found a strong synergism between Evo and doxorubicin, SN38 or etoposide, three drugs widely used in pediatric oncology (CI≤0.5). Finally, concomitant Evo treatment has a radio-sensitizing effect in the SF188 cell line exposed to a fractionated irradiation schedule, as well as exposed to a 0-8Gy mono-fractionated irradiation schedule.

Conclusion

Hypoxia is a well-known phenomenon leading to glioma cell resistance to cytotoxic drugs. We report here the first preclinical data about a novel hypoxia-activated prodrug Evo in pediatric high grade glioma and DIPG. Interestingly, Evo appears effective in hypoxic glioma cells and the synergistic effects observed with SN38, doxorubicin and etoposide as the radio-sensitizing effect are of interest for pediatric oncology.

INTRODUCTION

Brain tumors are the most frequent solid tumors developing in children and adolescents and high-grade glioma (HGG) and diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG) account for 8 to 20% of them (1). Pediatric HGG (pHGG) and principally DIPG are well known for demonstrating very different biological profile than adults HGG, making inappropriate extrapolation of data obtained from adult patients and requiring the achievement of specific pediatric studies (2,3). Therefore, pHGG and DIPG remain a formidable challenge for pediatric oncologists. Indeed, despite numerous clinical trials, the prognosis of children with pHGG or DIPG remains very poor and the median survival for patients with DIPG is currently no longer than 12 months. DIPG appear unresectable due to location to the pons and diffuse spread into the near brain tissue, highly resistant to conventional cytotoxic agents, and poorly sensitive to radiation therapy which remains the standard of care. Patients with pHGG underwent surgical resection when feasible followed by radiation therapy and often alkylating chemotherapy such as temozolomide (4). However, with less than 20% of response to chemotherapy, the pHGG chemosensitivity remains very low (5).

A major cause of this treatment resistance should be the presence of hypoxic areas in the tumor, which is a hallmark of HGG. While physiological oxygen concentrations in healthy brain vary from 0.5% to 7.5%, most of the HGG are characterized by concentrations lower to 2.5% O₂ with the presence of extreme severe hypoxic areas around 0.1% O₂ (6). Indeed, hypoxia is well known to play a central role in tumors aggressiveness through resistance to radiotherapy and chemotherapy. Thereby, hypoxia appears as a negative prognostic factor in several clinical studies (7–9).

In this context, strategies have been developed to specifically target hypoxic tumor cells. Among these, hypoxia-activated prodrugs (HAPs) weakly cytotoxic in oxygenated tissues, are designed to generate a more cytotoxic compound specifically in a poor O₂ environment (10). Several HAPs are currently in clinical trials for patients with different cancers including adult HGG. Currently, there is no strategy targeting hypoxia developed in the specific field of pediatric brain tumors.

Evofofosamide, also called Evo or TH-302 (Threshold Pharmaceuticals), is a second generation HAP which is maximally activated under severe hypoxic conditions. Evo is a 2-nitroimidazole prodrug generating a cytotoxic bromo-Isophosphoramidate mustard (Br-IMP) as follows: Evo is reduced at the nitroimidazole site by cellular ubiquitous reductases such as the flavoprotein cytochrome P450 oxidoreductase (POR). This reduced state persists in the absence of oxygen and leads to a fragmentation releasing the alkylating agent Br-IMP (11). Evo may also exert a local cytotoxic bystander effect by diffusion to the adjacent less-hypoxic tumor cells (12).

Preclinical studies have evaluated, *in vitro* and *in vivo*, the therapeutic effects of Evo used as a single agent or in combination with conventional cytotoxic drugs in different cancers (13,14). Therefore, it has been shown that Evo leads to tumor growth reduction in a hypoxia dependent manner and appears to improve efficiency of some cytotoxic drugs, when used in combination.

Several phase I and II clinical trials have demonstrated the safety and preliminary efficacy of Evo when used as a single agent as well as in combination with multiple conventional agents in adult patients (15–17). Phase III trials are currently ongoing for soft tissue sarcomas and pancreatic cancer. In adults with refractory glioblastoma multiform, a phase 1/2 trial associating Evo and bevacizumab showed 18% objective response (Brenner et al., SNO congress 2014).

Here, we evaluate for the first time, the Evofofosamide cytotoxic potential, when used as a single agent, in combination with common cytotoxic drugs widely used in pediatric oncology, as well as concomitantly with ionizing radiations in pHGG and DIPG cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and molecules

Human pediatric high grade glioma cell lines, SF188, KNS42 and UW479, were kindly provided by Chris Jones (The Institute of Cancer Research, Sutton, UK). DIPG cell lines, HSJD-DIPG007, HSJD-DIPG012, HSJD-DIPG013 and HSJD-DIPG014 were kindly provided by Angel Montero Carcaboso (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain). All pHGG cell lines were grown as monolayer in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, non-essential amino acid solution and antibiotics cocktail (Life Technologies). DIPG cells were cultured as tumor spheres in Tumor Stem Base Medium (Life Technologies) supplemented with B-27 (Life technologies) and human growth factors EGF, FGF-basic, PDGF (Peprotech). All cell lines were free of mycoplasma contamination. Cells were incubated in a humid atmosphere at 37 ° C with 5% CO₂.

Oxygenation parameters were modified using a hypoxia station (Don Witley Hypoxystation H35). Cells were incubated for 24 hours under 1% O₂ prior to experiments conducted under hypoxic conditions.

Evofosfamide was kindly provided by Threshold Pharmaceuticals. Doxorubicin, etoposide and SN38 were purchased from Sigma-Aldrich.

Western blot analysis

For western blot analysis of HIF-1 α , cells were incubated in 21% or 1% O₂ for 96h. Briefly, samples were collected in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCL, pH 7.9, 120 mM NaCl, 1% Nonidet, 1 mM EDTA, 5 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0.04 mM AEBSF), and protein concentration was determined by BCA Assay (Bio-Rad). Western blot analysis was performed using the following antibodies: Mouse anti-HIF-1 α diluted 1/500 (BD Bioscience) and rabbit anti-actin diluted 1/5000 (Santa Cruz).

Growth inhibition assay

Cells were seeded in 96 well plates (5x10³ cells/well for KNS42, 4x10³ cells/well for UW479, 1.5x10³ cells/well for SF188 and 1x10⁴ cells/well for DIPG cells) and placed under hypoxic (1% O₂) or normoxic (21% O₂) conditions. After 24 hours, cells were treated with increasing concentrations of compounds. After 72 hours of incubation in 1% vs. 21% O₂, the proportion of viable cells was revealed by MTS assay according to manufacturer instruction (Promega). Absorbance was read at 492 nm using spectrophotometer (SPECTRAMax, Molecular Devices). IC₅₀ values were obtained from the cytotoxicity curves using SOFTmax PRO software.

Apoptosis/necrosis detection

KNS-42 and HSJD-DIPG014 cells were incubated for 48 hours with or without 20 μ M Evo under 1% O₂ hypoxia respectively as monolayer in LabTek chamber slide, or as gliospheres in suspension. Then, cell death analysis was assessed using apoptosis/necrosis detection kit according to manufacturer instructions (Enzo Life Sciences). Briefly, cells were washed then incubated with a buffer containing Annexin V-Cyanine 3 and the Necrosis Detection Reagent (Red), a far red emitting DNA-intercalating dye. KNS-42 slide was mounted with DAPI staining for nucleus detection and observed under confocal microscope (LSM880, Zeiss). HSJD-DIPG014 cells were analyzed by flow cytometry using a 488nm laser with fluorescence detection with FL2 (Apoptosis Detection Reagent) and FL3 (Necrosis Detection Reagent) channels (Cyan ADP, Beckman Coulter). Cells undergoing apoptosis appeared Annexin V-cyanine 3 positive and NDR negative while cells undergoing late-stage apoptosis and early necrosis where Annexin V-Cyanine 3 and Necrosis Detection Reagent positive.

Drugs synergy evaluation

Growth inhibition induced by drug combinations was assessed *in vitro* using MTS assay as previously described. Experiments were performed with Evo combined with etoposide, doxorubicin or SN38 (active metabolite of irinotecan). IC₅₀ values of etoposide, doxorubicin and SN38 were beforehand determined (Data not shown). The cells were seeded in 96-well microtiter plates as previously described and placed under hypoxia (1% O₂). After 24 hours, cells were treated with increasing concentrations of compounds (0.0625 to 8 fold IC₅₀) alone and in combination at equitoxicity concentration. After cell viability measurement for each condition, the Combination Index (CI) was calculated according to Chou and Talalay method using CalcuSyn software (Biosoft) (18). CI value is the quantitative measure of the degree of drug interaction in terms of antagonistic effect (CI > 1), additive effect (CI = 1), moderate synergism (0.7 < CI < 1), synergism (0.3 < CI < 0.8) or strong synergism (CI < 0.3). Experimental measurements were considered as significant if $r > 0.9$.

Clonogenic assay

SF188 cells were seeded into 12-well culture plates (225 cells/well) and placed under hypoxia (1% O₂). After 24 hours of incubation at 37°C, cells were treated with 0, 0.05 or 0.1 μ M Evo. Six hours later, cells were irradiated with fractions of 0, 1 or 2 Grays per day for 3 consecutive days or with 0, 2, 4, 6, 8 Grays as single fraction using an 80 keV photon contact irradiator (Darpac 2000). After irradiation, cells were maintained for 10 days under hypoxia 1% O₂ and 37°C, then colonies were revealed by crystal violet staining and counted with the naked eye with a cutoff of fifty viable cells per colony. The Plating Efficiency (PE) is the ratio [number of colonies at 0 Gray / number of seeded cells] and the Survival Fraction (SF) is the ratio [number of colonies after irradiation / (PE x number of seeded cells)]. The results were represented as a survival curve (SF depending on the irradiation dose) in a logarithmic scale.

Statistical analysis

IC₅₀ values are presented as the mean \pm Standard Deviation. The statistical significance was evaluated with Student's t test. Irradiation survival rates were compared with Student's t test. A $p < 0.05$ was considered as significant.

RESULTS

Evo is more cytotoxic under hypoxia than under normoxia

Growth inhibition assay showed that Evo IC₅₀ values were reproducible but highly heterogeneous among the different cell lines. Nevertheless, in all tested cell lines, Evo IC₅₀ values were significantly decreased under 1% O₂ hypoxia compared to normoxic conditions (Fig. 1A). The Evo IC₅₀ ratio (Evo IC₅₀ value obtained in normoxia/ Evo IC₅₀ value obtained in hypoxia) reflects the Evo cytotoxicity gain under hypoxic conditions compared to normoxic conditions. Thus, for pHGG cell lines, Evo cytotoxicity appeared 5, 4.8 and 2.6 higher under hypoxia compared to normoxia in KNS42, UW479 and SF188 cells respectively. In DIPG cell lines, Evo IC₅₀ ratio was higher (9.6, 8, 7.1 and 13.5 in DIPG-007, DIPG-012, DIPG-013 and DIPG-014 respectively), indicating an ever better benefit under hypoxia.

Considering the difference of Evo cytotoxic gain between pHGG and DIPG cell lines, we checked the cellular response under our *in vitro* hypoxic experimental conditions in pHGG cell lines. For this, we analyzed the Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) expression level by western blot (Fig. 1B). In the 3 tested cell lines, HIF-1 α expression was higher when cells were incubated under 1% O₂ for 96 hours compared to normoxic conditions.

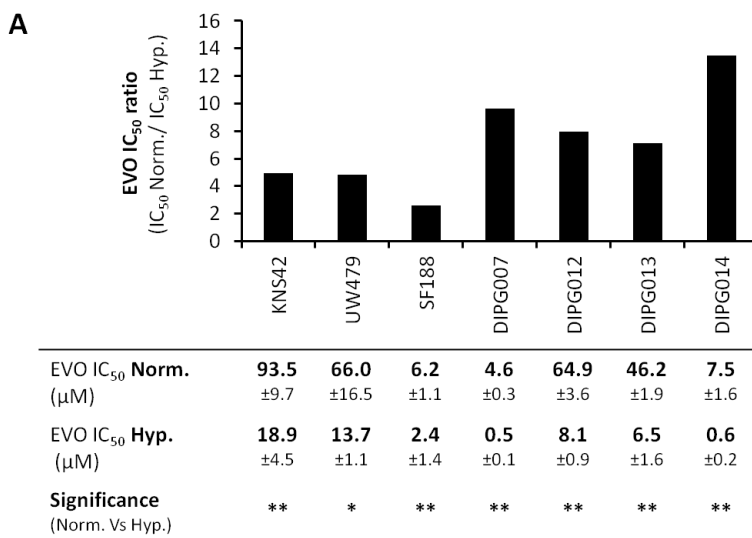
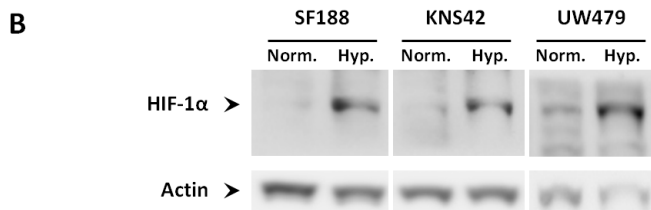


Figure 1: Evo cytotoxicity under hypoxia vs. normoxia in pHGG and DIPG cell lines. A. Determination of Evo IC₅₀ value at 72h in pHGG and DIPG cell lines. IC₅₀ are compared for each cell line between the normoxic condition (Norm.) and hypoxic condition 1% O₂ (Hyp.) to calculate an Evo IC₅₀ ratio. Values are the means of three independent experiments. ** p < 0.001; * p < 0.05. **B.** HIF-1 α expression level assessed by western blot in pHGG cell lines exposed to 96 hours incubation under hypoxia 1% O₂ (Hyp.) compared to normoxia (Norm.).



Evo induces late apoptosis after 48h of treatment under hypoxia

Apoptosis/necrosis staining observed by microscopy revealed that, after 48 hours of treatment with 20 μ M Evo under hypoxia 1% O₂, most of the KNS-42 pHGG cells were positive for both stains indicating a late-stage apoptosis. As a control, untreated cells did not show significant staining for apoptosis or necrosis (Fig. 2A). The same staining was performed on the non-adherent HSJD-DIPG014 cells and analyzed by flow cytometry. As a control, untreated HSJD-DIPG014 cells showed 23.5% of apoptotic cells rate and 4.7% of late apoptosis/necrosis after 48 hours of culture under hypoxic conditions. In presence of 20 μ M Evo, the rates increased to 38.6% of apoptotic cells and 42.6% of late apoptosis/necrosis (Fig. 2B). Thus, in both tested cell lines, Evo induced early and/or late-stage apoptosis at 48h of treatment.

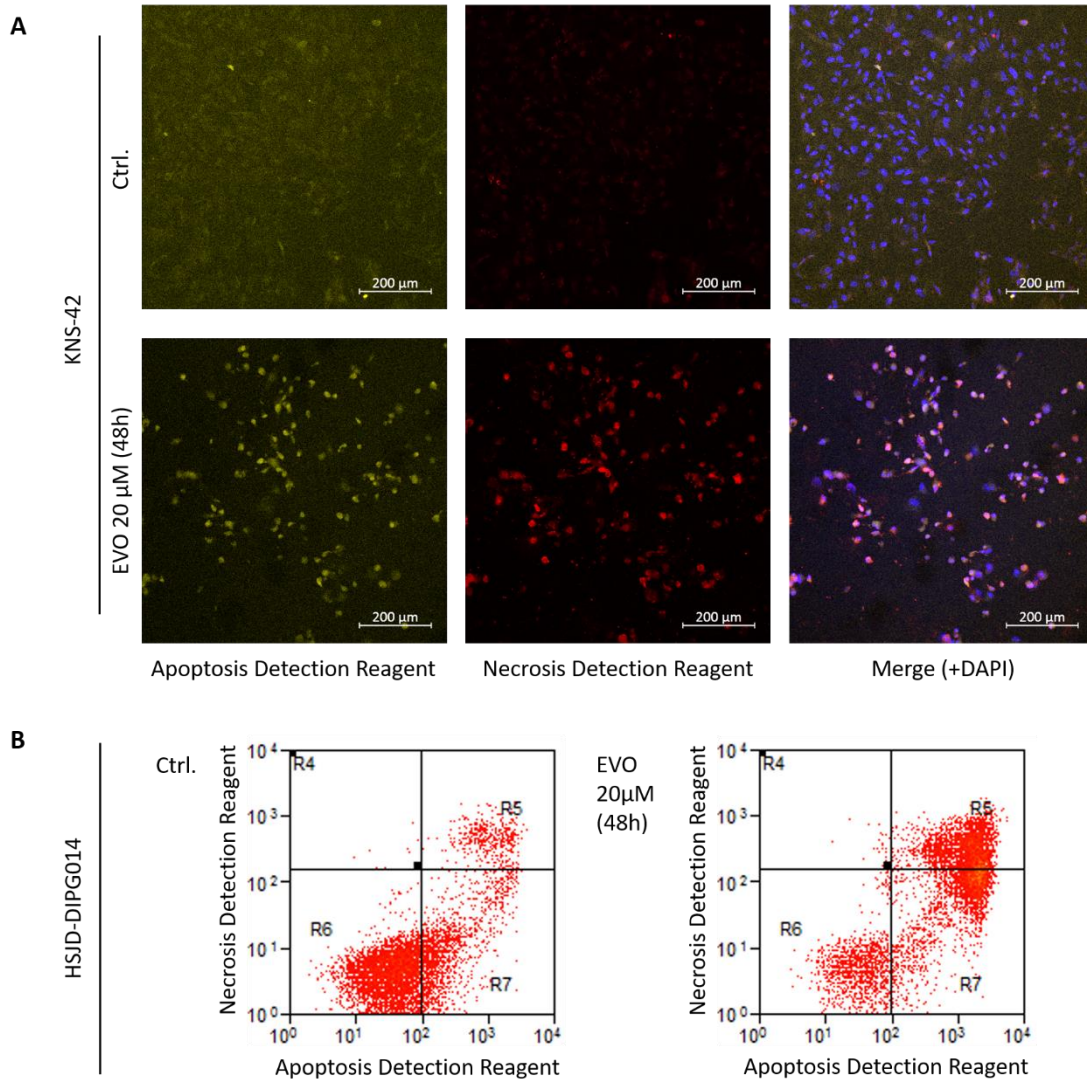


Figure 2: Apoptosis/necrosis detection after treatment with Evo. After treatment with 20 μ M EVO for 48 hours under hypoxia 1% O₂, apoptotic and necrotic cells were stain with fluorescent detection kit. **A.** Observation of KNS-42 cells staining by confocal microscopy. **B.** Quantification of HSJD-DIPG014 cells staining by flow cytometry.

Evo cytotoxic effect is synergistic with etoposide, doxorubicin and SN38

We tested the combination of Evo with three cytotoxic drugs widely used in pediatric oncology, frequently associated with alkylating agent and belonging different classes of antitumor drugs: doxorubicin (DNA intercalating agent and topoisomerase II inhibitor), etoposide (topoisomerase II inhibitor) and SN38 (topoisomerase I inhibitor). For each combination performed in the three pHGG cell lines tested, the Chou and Talalay's method reveals a significantly synergistic effect, with CI mean values between 0.08 and 0.56, whatever the Dose Effect (ED) considered (Fig 3).

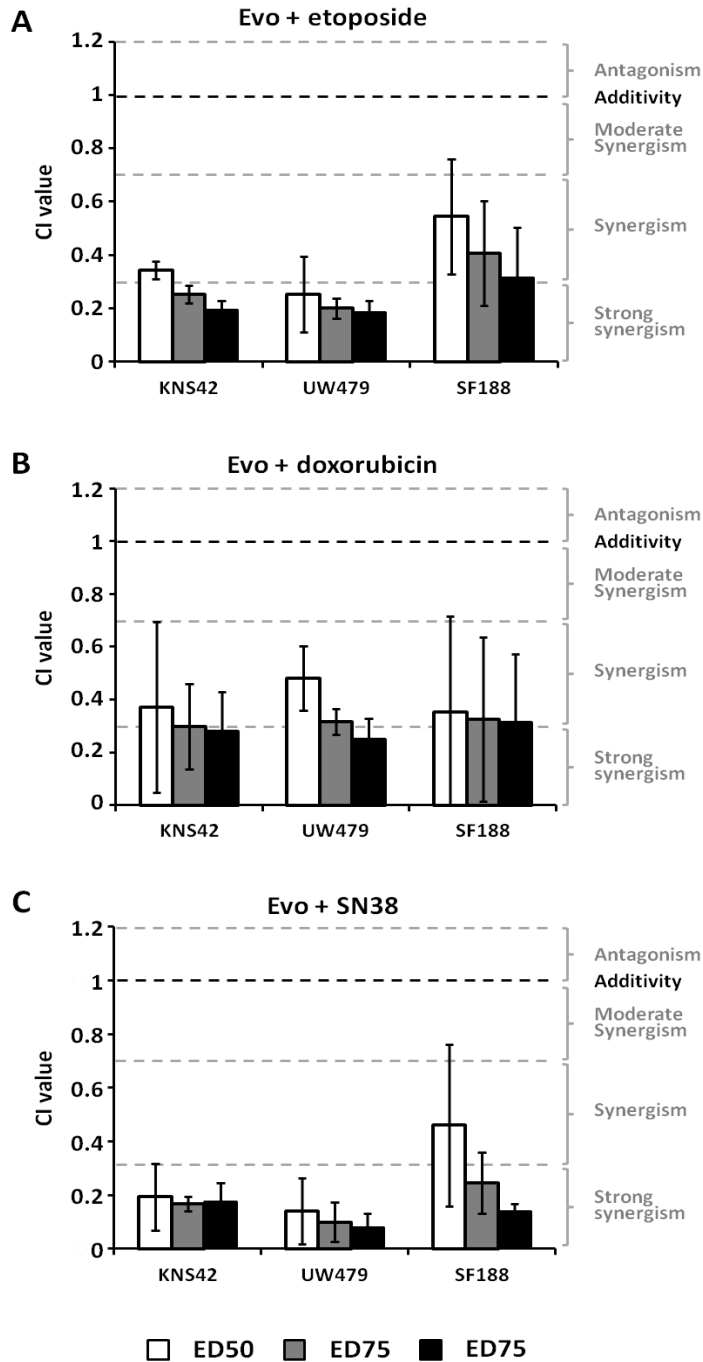


Figure 3: Determination of synergy between Evo and cytotoxic agents. Synergistic effect of Evo was evaluated in combination with etoposide (A) doxorubicin (B) and SN38 (C) in pHGG cell lines. Cytotoxicity was determined after 72 hours drugs exposure under 1% O₂ and the synergistic effect was analyzed by Chou and Talalay's method using CalcuSyn software. Histograms represent the mean of 3 independent experiments. Results are presented as Combination Index (CI) at ED50 (white), ED75 (grey) and ED90 (black). A combination is considered as synergistic if CI < 1.

Concomitant Evo improves the efficiency of ionizing radiations in SF188 cell line

Given the major role of radiation therapy in the treatment of pHGG, we evaluated the radiosensitizing potential of Evo in pHGG cells. We performed a clonogenic assay on SF188 cell line exposed to Evo in combination with mono fractionated or fractionated irradiation schedule.

Survival curves did not show any significant difference in the survival fraction between untreated cells and cells treated with 0.05 μ M Evo. However, we demonstrated a significant difference in the survival fraction between untreated cells and cells treated with 0.1 μ M Evo using both irradiation schedules. These results show that concomitant 0.1 μ M Evo treatment has a radio-sensitizing effect in the SF188 cell line exposed to a fractionated irradiation schedule, as well as exposed to a 0 to 8Gy mono-fractionated irradiation schedule (Fig. 4).

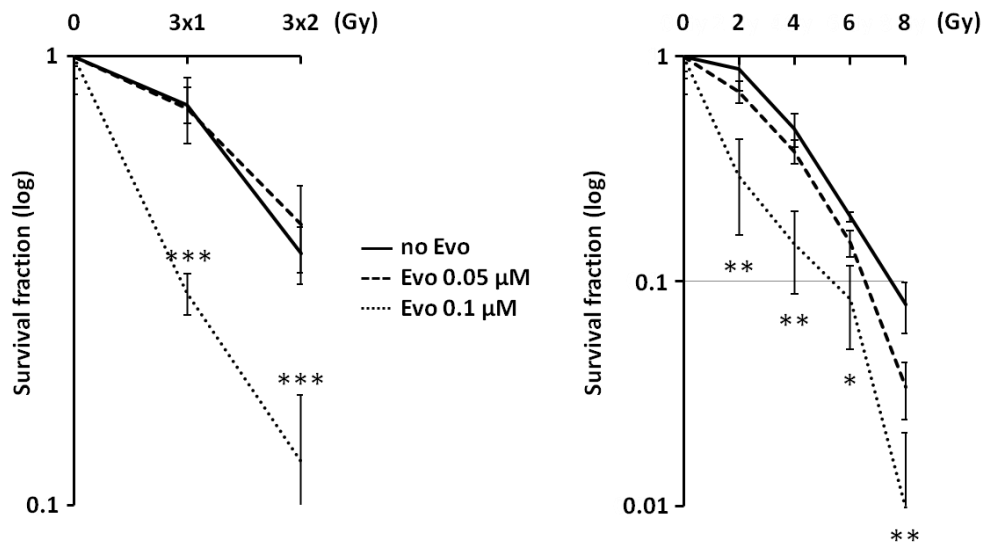


Figure 4: Radio-sensitizing effect of Evo on SF188 cell line. The combination effect of Evo with ionizing radiation was determined by clonogenic assay. Cells were treated with 0, 0.05 or 0.1 μM Evo under 1% O_2 hypoxia. Six hours later, cells were irradiated with fractions of 0, 1 or 2 Grays (Gy) each day for 3 consecutive days or with 0, 2, 4, 6, 8 Grays as single fractions. After 10 days under 1% O_2 hypoxia, colonies were counted. Results are representative of 3 independent experiments. *** $p < 0.0001$; ** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

DISCUSSION

Despite intensive and multidisciplinary management, the prognosis of children with high-grade glioma remains very poor, requiring new therapeutic approaches. Most of children treated for a HGG or DIPG, experience a disease relapse few months after initial standard treatment. The presence of hypoxic areas in pHGG and DIPG, as well as in many tumor types, might participate in chemo- and radio-resistance (19). Thus, different strategies targeting these hypoxic regions have been developed for many years as the use of hypoxia activated prodrugs (HAPs)(20). Among them, tirapazamine was one of the first widely evaluated in clinical trials until the development of second generation HAPs such as Evofosfamide. The use of these HAPs allows to intensify doses at the tumor site while limiting systemic toxicity of the molecule (10). The results of phase II studies using Evo when combined with other drugs in different types of advanced cancers in adults (such as Soft Tissue Sarcoma, pancreatic cancer, non-small cell lung cancer, glioblastomas), are promising and enable its development in pHGG and DIPG (17,21)(Brenner et al., 2014 SNO Congress). Here, we demonstrated for the first time the therapeutic potential of Evo, used as a single agent or in combination, in a large panel of pHGG and DIPG cell lines.

First, we determined the IC_{50} values of Evofosfamide under normoxic *versus* hypoxic conditions (1% O_2) in our 3 pHGG and 4 DIPG cell lines. We showed a significant variability between the different cell lines regarding Evo IC_{50} values whether under hypoxia or normoxia. This variability could be partially explained by the difference in cell growth rates between cell lines impacting the effectiveness of alkylating drugs such as Evo. In this sense, the study of Meng and colleagues conducted on a panel of 32 cancer cell lines had also shown a great variability of Evo cytotoxicity, under normoxia as well as under anoxia, between different types of cancer but also between different cell lines from the same type of cancer. Indeed, beyond the capacity of growth and lineage-specific survival, several mechanisms were described to be possibly involved in Evo's activation and effect. Among them, the reductase activity of the cytochrome P450 reductase (POR), which is necessary to Evo activation under hypoxia, can differ according to the model (12). Recently, a study concluded that POR expression level was a major determinant for SN30000 activity, a new HAP, in three different cancer cell lines. Thus POR expression level could be a predictive value of HAP efficiency in hypoxic tumors (22).

Despite this heterogeneity, we observed in all pHGG and DIPG cell lines tested, a significant increase of Evo cytotoxicity under 1% O_2 hypoxia compared to normoxic conditions. Indeed, Evo appeared about 3 to 5 fold more cytotoxic under hypoxia in pHGG cell lines and about 7 to 13 fold more cytotoxic under hypoxia in DIPG cell lines compared to normoxic conditions. In this sense, Meng and collaborators, who treated cells under anoxia, described a Evo IC_{50} ratio up to 600 in the SK-MEL-5 melanoma cell line and a Evo IC_{50} ratio of 11 in the U87-MG adult glioblastoma cell line (12).

Nevertheless, to validate our experimental conditions we checked the cellular hypoxia by measuring HIF-1 α accumulation after 96h cell growth under 1% O₂. Considering the lower Evo cytotoxicity gain obtained in pHGG cells, Western blot analysis were performed in the 3 pHGG cell lines and confirmed an increased HIF-1 α level under our hypoxic conditions. This result validated the use of these hypoxic conditions for the complementary experiments. In this sense, Meng previously showed that Evo cytotoxic activity is inversely related to the oxygen rate (12). Indeed, Evo is a second generation HAP and its cytotoxicity is optimal at very low O₂ concentrations, up to anoxia (for a short period). However, we chose to perform our *in vitro* experiments under a 1% O₂ level which induces a relevant cellular hypoxia while allows an adequate cells proliferation. Furthermore, considering the intratumoral oxygen level measured in gliomas between 0.1% and 2.5% O₂ (6) the results obtained in our study at 1% O₂, leads us to believe in a higher clinical effect.

In pHGG cells (KNS-42) as well as in DIPG ones (HSJD-DIPG014), Evo treatment for 48h under hypoxia mainly led cells to apoptosis and/or late-stage apoptosis in agreement to Yamazaki's works on Evo.

The current first adjuvant treatment of pHGG after surgical resection is radiotherapy. Few chemotherapies have a little place in second line treatment, mainly Temozolomide (TMZ) an alkylating agent. Nevertheless, the pHGG chemosensitivity remains very low and the results of the last two COG'S (Children's Oncology Group) studies are conflicting. In the ACNS0126 trial, the adjunction of concomitant TMZ with radiotherapy followed by adjuvant TMZ did not show survival rate improvement (23). However, in the recent ACNS0423 study, the addition of alkylating agent CCNU to TMZ and radiotherapy appears to confer a significant survival benefit (24). Thus, Bouffet recently emphasize the important role of old chemotherapy drugs as alkylating agents used in combination in pHGG treatment (25). These recent considerations confirm the interest of testing Evo's anti-tumoral potential in pHGG and DIPG cell lines as it releases a Br-IMP alkylating compound. Thus, in the event of a clinical development of Evofosfamide in pHGG and DIPG, it could be used as a second line treatment in combination with other anticancer drugs or in association with radiotherapy as radiosensitizing agent.

Thus, we evaluated the synergistic potential of Evo combined with three cytotoxic drugs widely used in pediatric oncology: etoposide, a topoisomérase II inhibitor, doxorubicin, a DNA intercalating agent and topoisomerase II inhibitor, and SN38 (the active metabolite of irinotecan), a topoisomerase I inhibitor. These three molecules are commonly associated to alkylating drugs. Irinotecan has been used as a second line treatment of adults with HGG in combination with bevacizumab (26), even if a phase II study demonstrated that these combinations had to date a minimal efficacy in children with recurrent malignant glioma and brainstem glioma (27).

Based on the statistical method of Chou and Talalay (18), we showed a strong synergistic cytotoxic effect of Evo combined with etoposide, doxorubicin as well as with SN38 in all pHGG cell lines tested. These results are consistent with previous studies which demonstrated an antitumor effect of Evo used in combination with doxorubicin in a mouse model of non-small cancer cell lung xenograft (14). Evofosfamide and doxorubicin are also being used in combination in a clinical phase III trial in the treatment of soft tissue sarcomas in adults. Here, we showed for the first time a statistically synergistic effect of the combination of Evo with three different alkylating molecules.

The standard treatment of childhood HGG and DIPG currently being ionizing radiations, we then evaluated the radiosensitizing potential of Evo (4,28). Indeed, the active form of Evo is part of the alkylating agent family, described to provide a radiosensitizing effect in different models (29).

Here, we demonstrated that Evo radiosensitizes hypoxic SF188 pHGG cells from 2 Gy when using a mono fractionated schedule and from 3x1 Gy when using a fractionated schedule. This was not observed when we used a non-concomitant Evo treatment (data not shown) which confirms the time-dependance of Evo activation under hypoxia. Indeed, Meng team previously showed that *in vitro* activation and effectiveness of Evo were dependent of the drug exposure duration; the longer the exposure was, the higher the activity of the molecule was (12). A recently published study by Peeters, also shown for the first time an *in vivo* antitumor effect of Evo combined with radiotherapy in two mouse tumor models (rhabdomyosarcoma and lung cancer) (30). In fact, the combination of Evo with a single dose of irradiation at 4, 8 or 12 Gy, allowed a greater tumor growth inhibition compared to treatment with single Evo. This effect was inversely correlated to the level of oxygenation of the tumor. Here, we demonstrated for the first time a real *in vitro* significant radiosensitizing effect of Evo.

In conclusion, we report the first preclinical data about a novel hypoxia-activated prodrug, Evo, in pediatric HGG and DIPG. Interestingly, Evo appears effective in hypoxic glioma cells. The synergistic effects observed with SN38, doxorubicin and etoposide and the radio-sensitizing effect are of interest for pediatric HGG and DIPG treatment.

REFERENCES

1. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005–2009. *Neuro-Oncol.* 2012 Nov;14(Suppl 5):v1–49.
2. Paugh BS, Qu C, Jones C, Liu Z, Adamowicz-Brice M, Zhang J, et al. Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2010 Jun 20;28(18):3061–8.
3. Jones C, Karajannis MA, Jones DTW, Kieran MW, Monje M, Baker SJ, et al. Pediatric high-grade glioma: biologically and clinically in need of new thinking. *Neuro-Oncol.* 2016 Jun 9;now101.
4. Adamski J, Tabori U, Bouffet E. Advances in the management of paediatric high-grade glioma. *Curr Oncol Rep.* 2014 Dec;16(12):414.
5. Chastagner P, Kalifa C, Doz F, Bouffet E, Gentet JC, Ruchoux MM, et al. Outcome of children treated with preradiation chemotherapy for a high-grade glioma: results of a French Society of Pediatric Oncology (SFOP) Pilot Study. *Pediatr Blood Cancer.* 2007 Nov;49(6):803–7.
6. Filatova A, Acker T, Garvalov BK. The cancer stem cell niche(s): the crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Feb;1830(2):2496–508.
7. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1996 Oct 1;56(19):4509–15.
8. Evans SM, Koch CJ. Prognostic significance of tumor oxygenation in humans. *Cancer Lett.* 2003 May 30;195(1):1–16.
9. Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. “Pseudopalisading” necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006 Jun;65(6):529–39.
10. Yeh JJ, Kim WY. Targeting tumor hypoxia with hypoxia-activated prodrugs. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2015 May 1;33(13):1505–8.
11. Cavazos DA, Brenner AJ. Hypoxia in astrocytic tumors and implications for therapy. *Neurobiol Dis.* 2016 Jan;85:227–33.
12. Meng F, Evans JW, Bhupathi D, Banica M, Lan L, Lorente G, et al. Molecular and cellular pharmacology of the hypoxia-activated prodrug TH-302. *Mol Cancer Ther.* 2012 Mar;11(3):740–51.
13. Sun JD, Liu Q, Wang J, Ahluwalia D, Ferraro D, Wang Y, et al. Selective tumor hypoxia targeting by hypoxia-activated prodrug TH-302 inhibits tumor growth in preclinical models of cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2012 Feb 1;18(3):758–70.
14. Liu Q, Sun JD, Wang J, Ahluwalia D, Baker AF, Cranmer LD, et al. TH-302, a hypoxia-activated prodrug with broad in vivo preclinical combination therapy efficacy: optimization of dosing regimens and schedules. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012 Jun;69(6):1487–98.
15. Weiss GJ, Infante JR, Chiorean EG, Borad MJ, Bendell JC, Molina JR, et al. Phase 1 study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of TH-302, a hypoxia-activated prodrug, in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2011 May 1;17(9):2997–3004.
16. Ganjoo KN, Cranmer LD, Butrynski JE, Rushing D, Adkins D, Okuno SH, et al. A phase I study of the safety and pharmacokinetics of the hypoxia-activated prodrug TH-302 in combination with doxorubicin in patients with advanced soft tissue sarcoma. *Oncology.* 2011;80(1–2):50–6.
17. Chawla SP, Cranmer LD, Van Tine BA, Reed DR, Okuno SH, Butrynski JE, et al. Phase II study of the safety and antitumor activity of the hypoxia-activated prodrug TH-302 in combination with doxorubicin in patients with advanced soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2014 Oct 10;32(29):3299–306.
18. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984;22:27–55.

19. Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Feb 21;93(4):266–76.
20. Phillips RM. Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;77:441–57.
21. Borad MJ, Reddy SG, Bahary N, Uronis HE, Sigal D, Cohn AL, et al. Randomized Phase II Trial of Gemcitabine Plus TH-302 Versus Gemcitabine in Patients With Advanced Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2015 May 1;33(13):1475–81.
22. Hunter FW, Young RJ, Shalev Z, Vellanki RN, Wang J, Gu Y, et al. Identification of P450 Oxidoreductase as a Major Determinant of Sensitivity to Hypoxia-Activated Prodrugs. *Cancer Res.* 2015 Oct 1;75(19):4211–23.
23. Cohen KJ, Pollack IF, Zhou T, Buxton A, Holmes EJ, Burger PC, et al. Temozolomide in the treatment of high-grade gliomas in children: a report from the Children’s Oncology Group. *Neuro-Oncol.* 2011 Mar;13(3):317–23.
24. Jakacki RI, Cohen KJ, Buxton A, Krailo MD, Burger PC, Rosenblum MK, et al. Phase 2 study of concurrent radiotherapy and temozolomide followed by temozolomide and lomustine in the treatment of children with high-grade glioma: a report of the Children’s Oncology Group ACNS0423 study. *Neuro-Oncol.* 2016 Oct;18(10):1442–50.
25. Bouffet E, Ramaswamy V. Old chemotherapy makes a comeback: dual alkylator therapy for pediatric high-grade glioma. *Neuro-Oncol.* 2016 Oct;18(10):1333–4.
26. Xu T, Chen J, Lu Y, Wolff JE. Effects of bevacizumab plus irinotecan on response and survival in patients with recurrent malignant glioma: a systematic review and survival-gain analysis. *BMC Cancer.* 2010;10:252.
27. Gururangan S, Chi SN, Young Poussaint T, Onar-Thomas A, Gilbertson RJ, Vajapeyam S, et al. Lack of efficacy of bevacizumab plus irinotecan in children with recurrent malignant glioma and diffuse brainstem glioma: a Pediatric Brain Tumor Consortium study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2010 Jun 20;28(18):3069–75.
28. Leblond P, Vinchon M, Bernier-Chastagner V, Chastagner P. [Diffuse intrinsic brain stem glioma in children: current treatment and future directions]. *Arch Pédiatrie Organe Off Société Fr Pédiatrie.* 2010 Feb;17(2):159–65.
29. Kellie SJ, Plowman PN, Malpas JS. Radiation recall and radiosensitization with alkylating agents. *Lancet Lond Engl.* 1987 May 16;1(8542):1149–50.
30. Peeters SGJA, Zegers CML, Biemans R, Lieuwes NG, van Stiphout RGPM, Yaromina A, et al. TH-302 in Combination with Radiotherapy Enhances the Therapeutic Outcome and Is Associated with Pretreatment [18F]HX4 Hypoxia PET Imaging. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2015 Jul 1;21(13):2984–92.

Annexe 3

Molécules	1srt dose (µM)	Classe	Molécules	1srt dose (µM)	Classe
DNA			Microtubule		
Cladribine	0.2		Docetaxel	0.2	Antimitotique
Clofarabine	20	Antimetabolite	Vincristine	2	
Cytarabine	20		Proteasome		
Bleomycine sulfate	50	DNA damage	17-AAG	50	anti heatshock protein
Nelarabine	50	Purine analogue	Bortezomib	0.2	Proteasom inhibitor
Topotecan		Inhibition topoisomerase I	Carfilzomib	0.2	
daunorubicin	2		Luminespib	0.02	HSP90 inhibitor
Etoposide	20	Inhibition topoisomerase II	Small kinases		
Idarubicin	0.2		Alisertib		Aurora A inhibitor
Epigenetic			VX680	20	Aurora inhibitor
GSK126	50	EZH2 inhibitor	AT9283	20	JAK 2/3 inhibitor
EPZ5676	50	DOTL1 inhibitor	Ruxolitinib	50	Janus kinase 1/2 inhibitor
GSK2879552	50	LSD1 inhibitor	Trametinib	2	MEK MAPK/Erk Kinase inhibitor
JQ1	20		Ponatinib	20	multi target BCR ABL kinase inhibitor
OTX015	20	BET bromodomain inhibitor	Vemurafenib	50	B-Raf inhibitor
Azacitidine	50		Imatinib	20	v-abl. c-kit. PDGFR inhibitor
Decitabine	50		Volasertib		Polo like kinase inhibitor
SGI110	50	DNA hypo methylating agent	Bosutinib	20	Scr/abl inhibitor
SGI-1027	20		Nilotinib	20	BCR ABL kinase inhibitor
AGI-5198	50	IHD1 inhibitor	Dasatinib	20	SFK et ABL family inhibitor
Enasidenib (AG-221)	50	IHD2 inhibitor	Receptor tyrosine kinases		
Entinostat (MS-275)	20		Afatinib	50	
Vorinostat (SAHA)	20	HDAC inhibitor	Erlotinib	20	EGFR family inhibitor
Panobinostat	0.02		Gefitinib	50	
Apoptosis			Masitinib	20	c-kit PDGF inhibitor
Navitoclax	2		Lapatinib	20	EGFR et HER2 inhibitor
Venetoclax	0.02	anti BCL2	Regorafenib	50	multi target BCR ABL kinase inhibitor
Nutlin 3	50	MDM2 inhibitor	SGI-1776	50	PIM. Flt3 inhibitor
idasanutlin	50	p53/MDM2 inhibitor	Rigosertib	2	Plk1 et PI3K inhibitor
palbociclib	50	CDK4/6 inhibitor	Midostaurin	20	anti FLT3. multi target TK inhibitor
Seliciclib	50	CDK inhibitor	Crenolanib	50	FLT3/ PDGFR inhibitor
Olaparib	20	PARP inhibitor	Gilteritinib	20	FLT3/AXL inhibitor
Prima1	20	re activator of mutant p53	Quizartinib	20	Fms like TK3 inhibitor
Birinapant	2	XIAP cIAP inhibitor	Sorafenib tosylate	20	multi target FLT3 inhibitor
Others			Sunitinibmalate	20	
Dexamethasone	20	immunomodulator	PI3K pathway		
Metformin	24000	AMPK activation. inhibition mTOR	Everolimus	50	Mtor inhibitor
hydroxychloroquine	100	autophagy	Temsirolimus	20	
Selinexor	2	CRM1 inhibitor	MK-2206	20	Pan-Ak tinhibitor
Tretinoin	2	Cells differenciation	BKM 120	20	PAN-PI3K inhibitor
Cyclopamine	50	Smo antagonist	Idelalisib	50	PI3K inhibitor
Tipifarnib	50	Farnesyl transeferase inhibitor			
L-Asparaginase	50	Asparagine depletion			
Cyclopamine	50	Smo antagonist			
Arsenic	50	Degradation PML/RARA			

Résumé

Les DIPG (*Diffuse Intrinsic Pontine Glioma*) sont des tumeurs cérébrales pédiatriques au pronostic des plus sombres, et ce notamment du fait de la résistance des cellules aux différents traitements de chimio et de radiothérapie. Une des caractéristiques majeures des cellules de DIPG est qu'elles sont quasi systématiquement porteuses d'une mutation mono-allélique de l'histone H3 au niveau de sa lysine 27, et ce majoritairement sur le variant d'histone H3.3. Cette mutation, H3.3K27M, inhibe la triméthylation en K27 de l'histone H3 (H3K27me3) par un effet dominant négatif, ayant pour conséquence une réorganisation de la chromatine et ainsi une modification profonde de l'expression des gènes. Actuellement, et bien que les mutations H3K27M soient décrites comme étant un élément « *driver* » dans la genèse des DIPG, leur implication dans la résistance aux traitements n'a toutefois pas été pleinement établie. Afin de décrypter finement les implications de la mutation H3.3K27M, l'établissement de modèles cellulaires complémentaires d'induction mais aussi de réversion de la mutation apparaissait nécessaire.

Dans ce contexte, j'ai, par transfection plasmidique, induit la mutation H3.3K27M dans trois lignées cellulaires de gliome pédiatrique sustentoriel initialement non mutées. De façon complémentaire, j'ai créé un modèle de réversion de la mutation dans des cellules de DIPG mutées H3.3K27M par la mise en place d'une stratégie utilisant le système CRISPR/Cas9, générant une cassure double brin au niveau du site de la mutation, combinée à une approche de « *gene trapping* » visant à restaurer la forme sauvage du gène *H3F3A*. Ces deux stratégies d'induction et de réversion de la mutation nous ont permis de constituer un ensemble de modèles cellulaires disponible avec et sans la mutation H3.3K27M. Fort de ceux-ci, j'ai pu entreprendre d'évaluer le rôle exact de la mutation H3.3K27M sur la résistance aux traitements de chimio et radiothérapie, la croissance cellulaire ou encore les propriétés clonogéniques.

Concernant le modèle d'induction, les effets épigénétiques liés à la mutation étaient confirmés au sein des trois lignées cellulaires établies. La présence de la mutation avait alors un effet sur la croissance cellulaire dans deux des trois lignées cellulaires, et ce concomitamment avec un pouvoir clonogénique accru par l'introduction de la mutation. Ces mêmes lignées cellulaires présentaient une résistance supérieure à la radiothérapie et un screening de chimiothérapies permettait de mettre en évidence plusieurs composés pour lesquels la mutation H3.3K27M conférait une résistance. D'un point de vue plus global, il semblerait que la mutation confère un caractère agressif et résistant principalement dans un contexte de gliome de bas grade. En parallèle, j'ai pu valider la création d'un modèle de réversion de la mutation dans une lignée cellulaire de DIPG originellement mutée. Dans celui-ci, les cellules ne diffèrent que par l'absence de la mutation et présentent un retour de la marque H3K27me3. Une évaluation préliminaire des effets de la réversion de la mutation tendait à confirmer ceux obtenus avec le modèle d'induction.

Le décryptage des mécanismes sous-jacents aux effets biologiques observés, nous permettra d'évaluer et de comprendre pleinement le rôle de la mutation H3.3K27M dans l'agressivité et la résistance aux traitements des DIPG et d'identifier de possibles nouvelles stratégies de traitement des gliomes malins pédiatriques du tronc cérébral.

Abstract

Diffuse Intrinsic Pontine Glioma is one of the worst pediatric brain tumors regarding prognosis due to cell resistance to chemo and radiotherapy. One of DIPG cells main characteristics is a mono-allelic mutation on the lysine 27 of histone H3 (H3K27M). This mutation inhibits the trimethylation of this lysine that leads to strong modifications of gene expression. Even though this mutation seems to be a driver event in tumorigenesis, its role in cell resistance to treatment has not been deciphered. To accomplish this, we needed to establish complementary cellular models of induction but also the reversion of the mutation.

This way, to evaluate the role of the mutation on resistance to treatment, we first induced the mutation in three H3K27-unmutated pediatric glioma cell lines. In parallel, using the CRISPR/Cas9 technology and gene trapping approaches, we establish DIPG cellular models in which the mutation has been reversed to restore an H3F3A wild type gene. These two strategies allowed us to have a panel of available cellular models with or without mutation. Basis on these models, we evaluated the precise role of H3.3K27M mutation on chemo and radioresistance but also on cell growth and clonogenic properties.

For the model of induction, we confirmed the epigenetics impact of the mutation. Next, we showed an increased cell growth due to the mutation in two cell lines, concomitantly with an increase of clonogenic properties. H3.3K27M mutation had an impact on resistance to both chemotherapy or ionizing radiation in the same cell lines. We could identify several drugs for which the mutation increases cell resistance. We observed that H3.3K27M could improve cell resistance and aggressiveness, especially in a low-grade glioma context. Concerning the mutation reversion, we validated the loss of the mutation in one DIPG cell line. In this way, we succeeded in restoring the H3K27me3 mark. Our preliminary assays on cell growth and clonogenic properties exhibit results that are in adequacy with those obtained on the induction model.

To sum up, these different models would allow us to decipher cellular and molecular mechanisms induced by the H3.3K27M mutation in DIPG cells, including resistance to treatment, and possibly identify putative therapeutic targets.