



HAL
open science

Characterization of new therapeutic targets against pediatric invasive gliomas

Farah Rahal

► **To cite this version:**

Farah Rahal. Characterization of new therapeutic targets against pediatric invasive gliomas. Human health and pathology. Université de Bordeaux, 2021. English. NNT : 2021BORD0146 . tel-04108392

HAL Id: tel-04108392

<https://theses.hal.science/tel-04108392>

Submitted on 27 May 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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Par Farah RAHAL

**Caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques contre
les gliomes invasifs pédiatriques**

Sous la direction de : Martin HAGEDORN

Soutenue le 27 mai 2021

Membres du jury :

Mme MOREAU, Violaine

Mme OREND, Gertraud

Mme BOURDOULOUS, Sandrine

M. HAGEDORN, Martin

Directrice de Recherche - Université de Bordeaux

Chargée de recherche – INSERM1109

Directrice de recherche – Institut Cochin

Maitre de conférences – Université de Bordeaux

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

Cette thèse a été réalisée dans le laboratoire :

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



Équipe Méthodes et Innovations pour la
Recherche sur les Cancers De l'Enfant - MIRCaDE
Bâtiment 3B, 1ère étage – Carreire Zone Nord
146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

Équipe
MIRCADE
Méthodes et
Innovations pour la
Recherche sur les
Cancers De l'Enfant
BMGIC-U1035

Et a été financée par l'association **Eva pour la vie**



« La réussite, c'est un peu de savoir, un peu de savoir-faire et beaucoup de faire-savoir »

- Jean Nohain

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury de leur participation et de l'intérêt porté à mon travail ainsi que d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse : Pr. Violaine Moreau, Dr. Sandrine Bourdoulous et Dr. Gertraud Orend.

J'adresse mes remerciements à mon directeur de thèse, Dr. Martin Hagedorn qui m'a permis de réaliser ce travail de recherche. Merci pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Sa confiance a été un élément moteur pour moi. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec lui.

Je remercie le directeur de l'équipe MiRCaDe, Dr. Christophe Grosset, de m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour ses conseils et son soutien durant ma thèse.

J'associe à ces remerciements l'association « Eva pour la vie » qui a fait confiance à mon travail et m'a soutenue en tant que financeur durant mes années de thèse.

Je remercie Julien Izotte pour son aide dans les « manips souris », pour les bons moments et les fous rires ensemble. Un merci aussi à Benoît Rousseau pour m'avoir aidée sur ce « projet souris » ainsi que pour ses conseils.

Je tiens vivement à remercier les membres de l'équipe MiRCaDe. Plus particulièrement Dr. Véronique Trézequet-Busquet comme étant ma plus grande supportrice dans mon travail et pour tous ses conseils tout au long de mon projet, et surtout la relecture de mon manuscrit. Un grand merci Véronique. Merci à tous mes collègues du labo surtout Fatma, Sandra, Hala, Nicolas mais également Amani pour les bons moments vécus ensemble dans le labo et nos sorties hors labo, pour leur aide et pour les discussions actives qu'on a eu ensemble.

Un grand merci à Malak pour m'avoir aidée pendant mes années de thèse pour les manips, d'avoir partagé ses connaissances et d'être toujours prête quand j'en ai besoin. Merci pour tous les beaux moments que nous avons passés ensemble en dehors du travail.

Je désire en outre remercier mon super stagiaire, Guillaume, de son aide pour finir mon projet, sa confiance, son soutien, et son accompagnement dans la période difficile qu'est l'écriture d'une thèse. Merci pour les bons moments passés au laboratoire et nos fous rires. Je n'oublierai jamais : à chaque problème sa solution.

Le temps passé à Bordeaux m'a permis d'atteindre mon objectif, mais m'a également donné l'occasion de rencontrer une amie qui est comme une quatrième sœur pour moi. Merci Fatima du fond du cœur, d'avoir toujours été à côté de moi et de m'avoir aidée dès que tu le pouvais. Merci d'avoir été là dans mes pires moments durant lesquels j'ai toujours pu compter sur toi. Merci de ton soutien psychologique à tout moment.

Un grand merci à mes amis à Bordeaux : Aya, Mohammad, Sara, Rana... pour les bons moments et les beaux souvenirs ensemble.

Mes chaleureux remerciements vont aussi à ma famille (Mon père, Ma mère, et mes sœurs) qui grâce à leur soutien et leur confiance m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final.

Table des matières

Tables des illustrations	1
Abréviations	2
Introduction.....	6
Chapitre 1 : Le gliome infiltrant du tronc cérébral, un cancer pédiatrique	7
I. Principales caractéristiques des tumeurs malignes	7
II. Les cancers pédiatriques	8
III. Les tumeurs cérébrales pédiatriques	9
IV. Le gliome infiltrant du tronc cérébral ou DMG (Diffuse Midline Glioma).....	10
1. Épidémiologie	11
2. Localisation anatomique des DMG.....	11
3. Diagnostic et signes cliniques du DMG.....	12
a. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).....	12
b. Biopsie.....	14
c. Classification	14
4. Causes du DIPG : la neurogenèse post-natale.....	17
5. Altérations génétiques associées au DMG	18
a. L'histone H3	18
i. La mutation H3K27M	20
ii. Conséquence de la mutation	21
b. Autres altérations génétiques des DMG.....	23
6. Comparaison entre gliome de l'adulte et ceux de l'enfant.....	26
7. Traitement du DMG.....	27
a. Radiothérapie.....	27
b. Chimiothérapie	27
c. Thérapies ciblées.....	28
d. Immunothérapie	30
e. Systèmes de délivrance au niveau de la barrière hémato-encéphalique	32
8. Modèles expérimentaux pour étudier le gliome infiltrant.....	33
a. Modèles cellulaires	33
b. Un nouveau modèle préclinique du DMG chez l'embryon de poulet.....	34
c. Cellules modifiées et implantées chez les souris.....	35
d. Xénogreffe orthotopique chez la souris	35
e. Souris génétiquement modifiées.....	36
9. Principales difficultés associées à l'étude des DMG.....	37

Chapitre 2 : La régulation épigénétique des histones dans le DIPG	38
I. Régulation épigénétique des histones : méthylation et acétylation	39
1. L'acétylation.....	39
a. Mécanisme d'action.....	39
b. Les histones acétylases (HAT)	40
c. Les histones désacétylases (HDAC).....	40
2. La méthylation	41
a. Mécanisme d'action.....	41
b. La méthylation de la lysine en position 27 de l'histone H3	43
II. Le complexe PRC2	45
1. Composition et structure.....	45
2. Rôle de PRC2.....	49
3. Le complexe PRC1.....	49
4. Recrutement du complexe PRC2	50
III. La protéine EZH2.....	51
1. EZH2 en tant qu'activateur transcriptionnel	51
a. Interactions avec AKT et le récepteur des androgènes	51
b. Interactions avec la voie AKT et JAK/STAT	52
2. Interactions avec E2F1.....	52
3. Interactions avec PAF/ β -caténine	53
4. EZH2 en tant que cofacteur	53
IV. Rôle de EZH2 dans la physiopathologie.....	55
1. Implications pathologiques dans le cancer	55
2. Mutations de EZH2 et développement tumoral	57
3. EZH2, un oncogène ou un suppresseur de la progression tumorale	59
V. Inhibiteurs de EZH2/PRC2	61
1. Inhibiteurs EZH2	61
2. Inhibiteurs du complexe PRC2.....	62
VI. GSK126 – un inhibiteur de EZH2.....	64
1. Structure et mode d'action	64
2. Études cliniques	66
VII. Conclusion	67
Chapitre 3 : Le cholestérol dans l'homéostasie physiologique et dans le cancer	68
I. Le cholestérol	68
1. Structure	68

2. Sources.....	69
3. Biosynthèse.....	70
4. Rôles physiologiques	71
5. Homéostasie	71
II. Cholestérol cérébral	74
1. Le cholestérol : constituant principal de la myéline.....	74
2. Modulation de la fluidité et de la rigidité membranaire par le cholestérol.....	74
3. Régulation des processus neuronaux.....	74
III. Cholestérol et cancer	75
IV. Cholestérol dans les gliomes	76
V. Les statines : inhibiteurs de la voie du mévalonate	77
1. Mode d'action des statines	78
2. Usages des statines.....	78
3. Statines et glioblastome	79
Chapitre 4 : Ciblage thérapeutique	81
I. Le système de vectorisation	81
II. Étapes de la vectorisation	82
1. Ciblage du microenvironnement tumoral	82
2. Le processus de libération de la drogue.....	83
a. Stratégies d'activation chimique	83
b. Stratégies d'activation enzymatique	83
3. Les vecteurs glucuronylés.....	83
Objectifs	86
Résultats.....	91
Autres résultats et discussion	144
I. Effet de l'inhibition de EZH2 sur la croissance des cellules de DMG	145
II. Analyses de l'étude protéomique	148
III. Etudes <i>in vivo</i>	151
IV. Vectorisation des drogues	154
Conclusions et perspectives	157
Références.....	159

Tables des illustrations

Figure 1 : Caractéristiques du cancer.....	7
Figure 2 : Coupe du cerveau montrant ses différentes parties dont le tronc cérébral.	10
Figure 3 : Caractéristiques de l'IRM de DMG	13
Figure 4 : Evaluation immunohistochimique des différents types de gliomes infiltrants (coloration à l'hématoxyline et l'éosine)	15
Figure 5 : Classification moléculaire du DMG.	16
Figure 6 : Schéma représentant la chromatine condensée formée d'ADN enroulé autour du nucléosome et stabilisée par l'histone H1.	18
Figure 7 : Modification post-traductionnelle de l'expression des gènes.....	19
Figure 8 : Modèle de réduction globale de la méthylation de H3K27 dans le DMG porteur de la mutation H3K27M	21
Figure 9 : Occupation des mêmes sites de l'ADN par H3K27M et H3K27ac et exclusion de H3K27M des cibles du complexe PRC2.	23
Figure 10 : Thérapies épigénétiques potentielles pour traiter le DMG	30
Figure 11 : L'acétylation et la méthylation des histones.	43
Figure 12 : Effet de la mutation H3K27M sur le complexe PRC2	45
Figure 13 : Structure du complexe PRC2 et ses interactions.	47
Figure 14 : Représentation schématique du mécanisme d'action la triméthylation.....	48
Figure 15 : Modèle hiérarchique classique de recrutement complexe PCG.....	50
Figure 16 : Activité de EZH2 en tant qu'activateur	54
Figure 17 : Altérations de PRC2 dans les cancers.....	59
Figure 18 : Inhibition de EZH2.	63
Figure 19 : Structure de GSK126.	64
Figure 20 : Structure du cholestérol.....	68
Figure 21 : Circulation du cholestérol dans le corps.	69
Figure 22 : Étapes de la biosynthèse du cholestérol.....	70
Figure 23 : Homéostasie du cholestérol.....	73
Figure 24 : Effets potentiels induisant l'apoptose des statines dans le cancer.	80
Figure 25 : Principe de la vectorisation d'une drogue comparée à la chimiothérapie classique	81
Figure 26 : Mode d'action du système de vectorisation avec la MMAE.....	85
Figure 27 : Chronologie du modèle de l'embryon de poulet et principales étapes des expérimentations.	89
Figure 28 : Effet de l'inhibition de EZH2 sur la prolifération cellulaire.....	145
Figure 29 : Évaluation de l'effet des traitements sur les tumeurs SU-DIPG-IV dans un modèle sous-cutané de souris NOD-SCID.	152
Figure 30 : Application du système de vectorisation du MMAE sur les 2 lignées de DMG... ..	156
Tableau 1 : Mutations les plus importantes identifiées dans les DMG.	24
Tableau 2 : Caractéristiques cliniques et moléculaires des tumeurs DMG.	33
Tableau 3 : Rôle de EZH2 dans différents cancers	60
Tableau 4 : Quelques inhibiteurs de EZH2 et leur spécificité.	62

Abréviations

A

ABCA1:	ATP-binding cassette A1
ABCG2:	ATP-binding cassette super-family G member 2
Ac:	Acétylation
ACAT:	Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase
ACSS2:	Acyl-CoA Synthetase Short Chain Family Member 2
ACVR1:	Activin A receptor type1
ADAM:	A Desintegrine and Metalloproteinase
AEBP2:	Adipocyte Enhancer-Binding Protein
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ALK-2:	Anaplastic lymphoma kinase 2
AR :	Récepteur des androgens
ATRX :	Transcriptional regulator ATRX

B

BD:	Bromodomain
BET:	Bromodomain and Extra-Terminal
BHE:	Barrière hématoencéphalique
BMP:	Bone morphogenic protein
BRD2:	Bromodomain-containing protein 2
BURR1:	Mitotic spindle checkpoint protein BUBR1

C

CAM :	Membrane chorio-allantoidienne de poulet
CAR-T:	Chemeric antigen receptor
CDK:	Cyclin dependant kinase
CDKN:	Cyclin dependant kinase inhibitor
CED:	Convection enhanced delivery

D

DAB2IP:	Disabled homolog 2-interacting protein
Daxx:	Death domain-associated protein 6
DMG :	Diffuse midline glioma
DNMT :	DNA (cytosine 5) méthyltransferase
DOT1-Like:	Disruptor of telomeric silencing 1-Like

E

EED:	Embryonic ectoderm development
EGFR:	Epidermal growth factor receptor
EMT:	Epithelio-Mesenchymal Transition
ER :	Récepteur à œstrogène
ERK:	Extracellular signal-Regulated Kinase
EZH2:	Enhancer of zeste homolog 2

F

FOP: Fibrodysplasie ossifiante progressive
FOXC1: Forkhead box C1

G

GBM: Glioblastome
GD2: Disialoganglioside
GSK: GlaxoSmithKline
GTPase: Guanosine tri-phosphatase

H

H3 : Histone 3
H3K27 : Lysine en position 27 de l'histone H3
H3K27Ac : Acétylation de la lysine 27 sur l'histone H3
H3K27M : Mutation de l'histone H3 au niveau de la lysine 27 remplacée par une méthionine
H3K27me3 : Triméthylation de la lysine sur l'histone H3
HAT: Histones acétyltransférases
HDAC : Histone Désacétylase
HDACi : Inhibiteur des histones désacétylases
HDL: High Density Lipoprotein
HDM: Histone Déméthylase
HGFR: Hepatocyte growth factor receptor
HGG: High grade glioma
Hh: Signalisation Hedgehog
HMG-coA: 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
HMT: Histone méthyl-transférase

I

ID2: DNA-binding protein inhibitor ID-2
IDH1: Isocitrate dehydrogenase (NADP) cytoplasmic
INSIG1: Insulin-induced gene 1 protein
IRM: Imagerie par résonance magnétique

J

JAK3 : Tyrosine-protein kinase JAK3
JHDM: Jumonji domain-containing histone demethylation protein 1B
JMJD3: Jumonji Domain-Containing Protein 3 Histone Lysine Demethylase

L

LDL: Low Density Lipoprotein
LSD1: Lysine-specific histone demethylase 1A
LXR: Liver oxysterol receptor

K

KDM1: Lysine-specific histone demethylase 1
KMT: Lysine méthyl-transférase

KO: Knock out

M

MDM2 : Mouse double minute 2 homolog
me1: Monométhylation
me2: Diméthylation
me3: Triméthylation
MGMT : Méthylguanine méthyltransférase
MM : Myélome Multiple
MMAE: Monométhylauristatine E
MMP: Métalloprotéase
MRS: Magnetic resonance spectroscopie
MSMB: Beta-microseminoprotein
mtor: Mammalian Target of Rapamycin
MYC: V-myc myelocytomatosis varial oncogene homolog
MYCN: V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog

N

NF-KB: Nuclear Factor-kappa B
NK: Natural killer
NOD-SCID: Non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency-interleukin 2 receptor gamma null mice
NPC: Niemann-Pick disease
NSC: Neuronal stem cell

O

Olig2 : Oligodendrocyte transcription factor 2
OMS : Organisation mondial de la santé

P

PAF: Platelet-activating factor
Pax3 : Paired box protein Pax-3
PcG: Protéine du groupe polycomb
PD-1: Programmed death-1
PDGFRA: Platelet-derived growth factor receptor alpha
PD-L1: Programmed cell death 1 ligand 1
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
PIK3CA: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform
PIK3RI: Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha
PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3: Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PPM1D: Protein phosphatase magnesium dependent 1 delta
PRC2: Polycomb repressive complex 2
PRM1: Protein arginine N-methyltransferase 1
PTEN: Phosphatase and tensin homolog

R

RbAp48:	Retinoblastoma-binding protein 4
RCAS/tv-a:	Replication-competent avian sarcoma-leucosis virus long terminal repeat with splice acceptor/Tumor Virus A
RING:	Really Interesting New Gene
RoR-α:	Retinoic acid receptor alpha
RKIP:	Raf kinase inhibitor protein
RUNX3:	Runt-related transcription factor 3

S

S1P:	Sphingosine-1-phosphate
S2P:	Sphingosine-2-phosphate
SAM:	S-adénosyl-L-méthionine
SCAP:	Sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein
SET:	Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax
SMAD3:	Mothers against decapentaplegic homolog 3
SNC :	Système Nerveux Central
SNS :	Système Serveux Sympathique
Src:	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
SREBP:	Sterol regulatory element-binding proteins
SRSF2:	Serine and Arginine Rich Splicing Factor 2
STAT3:	Signal transducer and activator of transcription 3
SUV39H1:	Suppressor of Variegation 3-9 Homolog 1
SUZ12:	Polycomb protein SUZ12

T

TIMP-2:	Tissue inhibitor of metalloproteinases 2
TGF-β:	Transforming growth factor beta
TP53:	Tumor protein 53

U

UTX:	Ubiquitously-Transcribed TPR Protein On the X Chromosome
-------------	--

V

VEGF:	Vascular endothelial growth factor
VEGFR:	Vascular endothelial growth factor receptor

W

Wnt:	Wingless Integration site
-------------	---------------------------

Introduction

Chapitre 1: Le gliome infiltrant du tronc cérébral, un cancer pédiatrique

I. Principales caractéristiques des tumeurs malignes

Malgré le très grand nombre de recherches menées depuis plus de 50 ans et le développement rapide des connaissances observé au cours de la dernière décennie, le cancer reste une maladie mortelle à travers le monde entier. Il est dû soit à des facteurs internes (mutations héréditaires, conditions hormonales et immunitaires), soit à des facteurs externes (tabac, alimentation, radiations et organismes infectieux) (Anand et al., 2008).

La caractéristique essentielle des cellules cancéreuses est leur capacité à proliférer rapidement. En effet, elles peuvent déréguler la libération de signaux favorisant leur croissance et permettant leur entrée dans un nouveau cycle cellulaire et deviennent ainsi maîtresses de leur propre destin. Une cellule tumorale se caractérise aussi par sa résistance à la mort cellulaire, l'invasion, l'induction de l'angiogenèse, la métastase et l'activation de l'immortalité répliative (**Figure 1**). Douglas Hanahan et Robert Weinberg ont ajouté deux autres caractéristiques en 2011 qui sont l'échappement au système immunitaire et la reprogrammation du métabolisme énergétique (Hanahan and Weinberg, 2011) (**Figure 1**).

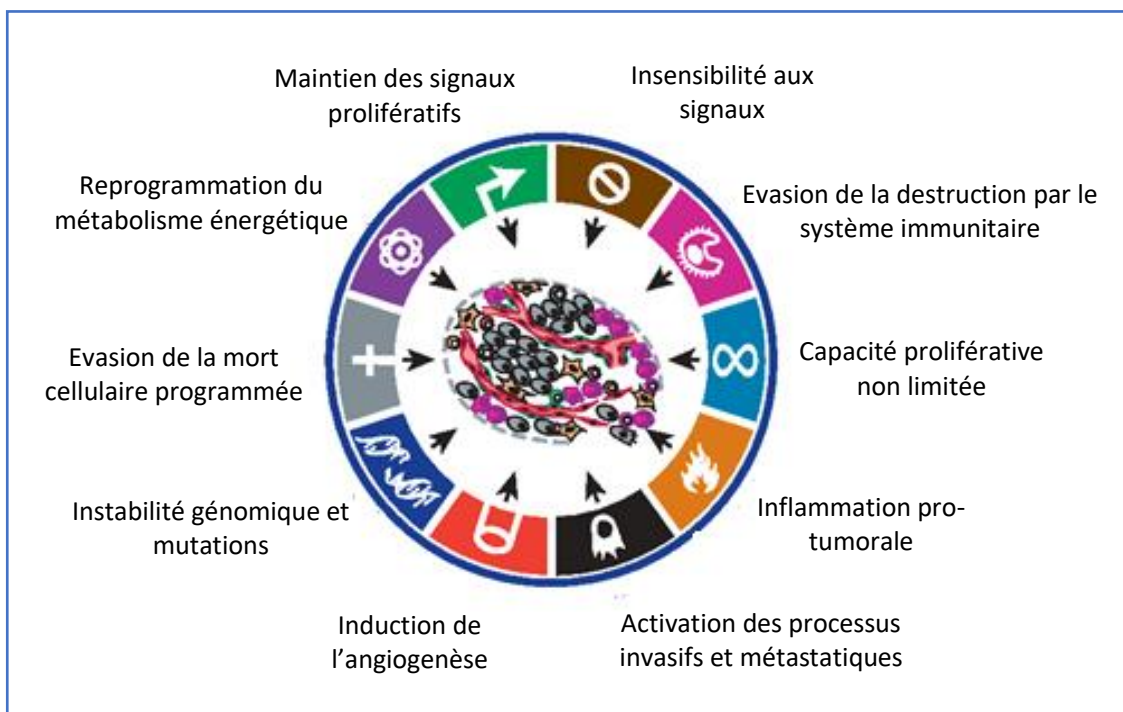


Figure 1 : Caractéristiques du cancer.

Adapté de (Hanahan and Weinberg, 2011).

Ces caractéristiques des cellules cancéreuses ont pour origine des altérations génétiques et de nombreux articles ont plus récemment mis en évidence l'importance des processus épigénétiques, en particulier ceux qui entraînent l'inactivation de gènes régulateurs clés, montrant ainsi que la génétique et l'épigénétique coopèrent à tous les stades du développement du cancer (Jones and Baylin, 2007).

Des changements génétiques se produisent dans le génome des cellules cancéreuses pendant la tumorigenèse, ce qui conduit à une hétérogénéité génomique compliquée par la nature polyclonale de la plupart des carcinomes. En effet, les populations de cellules tumorales présentent des altérations génétiques qui diffèrent de celles du génome hôte et des autres cellules de la tumeur. Cette hétérogénéité intratumorale peut affecter toutes les étapes de la prise en charge du cancer allant du diagnostic au traitement (Ellsworth et al., 2017).

II. Les cancers pédiatriques

Le cancer de l'enfant est une maladie rare, avec 13 500 cas et environ 1 500 décès par an dans le monde parmi les enfants âgés de 0 à 14 ans. En France, le diagnostic de cancer pédiatrique est posé chaque année pour 2 500 enfants dont 500 décèdent, et le cancer pédiatrique représente 1 à 2 % de l'ensemble des cancers. Les cancers les plus répandus chez les enfants sont en premier les leucémies représentant 33 % des cancers pédiatriques, les tumeurs du système nerveux central (24 %), les lymphomes (environ 11 %), les neuroblastomes (7 %), les cancers des os (ostéosarcome et sarcome d'Ewing) qui représentent 4 % des cas de cancers pédiatriques (Revue générale des cancers pédiatriques - 2019). Les cancers pédiatriques diffèrent des cancers de l'adulte et en France ils constituent la première cause de décès par maladie chez les enfants. La rareté et la diversité des cancers infantiles rendent difficile la détermination de la meilleure stratégie thérapeutique. La survie après le diagnostic et le traitement dépend du type du cancer et les meilleures survies globales à 5 ans (> 85 %) ont été observées pour les rétinoblastomes, les carcinomes, les néphroblastomes, les neuroblastomes et les hépatoblastomes. La survie globale à 5 ans est plus basse pour les leucémies myéloïdes aiguës, les tumeurs du SNC et les leucémies lymphoïdes montrent (<65 %) (Desandes et al., 2020). Ces pourcentages de survie globale après un cancer pédiatrique cachent des disparités entre les pays : il est de plus de 80 %

dans les pays développés à revenu élevé, alors qu'il est beaucoup plus faible dans les pays à revenu faible ou pauvres (Bhakta et al., 2019).

III. Les tumeurs cérébrales pédiatriques

Comme pour les autres types de cancer, il existe des différences entre les tumeurs cérébrales adultes et pédiatriques. Les gliomes et méningiomes malins prédominent chez les adultes tandis que les médulloblastomes et les astrocytomes de bas grade sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez les enfants (Reith et al., 2017). Les tumeurs cérébrales pédiatriques sont les tumeurs solides les plus fréquentes chez l'enfant avec le taux de mortalité le plus élevé à cause de leur état malin (Tsangaris and Anagnostopoulos, 2018). Elles sont classées d'après des caractères épigénétiques en médulloblastome, épendymome, astrocytome, gliome de haut grade, tumeur térétoïde / rhabdoïde atypique et tumeurs embryonnaires du SNC. L'astrocytome est le plus fréquent et représente 40 % des tumeurs cérébrales chez l'adulte et l'enfant. C'est une des tumeurs de bas grade qui surviennent dans le cerveau, la moelle épinière et le cervelet. Le médulloblastome est le plus répandu chez l'enfant (20 % des tumeurs de SNC). Il se développe d'une façon rapide et envahissante dans le tronc cérébral et le cervelet. Le médulloblastome est le plus souvent diagnostiqué avant l'âge de 15 ans et a une prédominance masculine. A l'inverse, les épendymomes sont des tumeurs à progression lente formant 8 à 10 % des tumeurs du SNC, touchant le système ventriculaire et se propageant dans le tronc cérébral (Kumar et al., 2018; Udaka and Packer, 2018; Wells and Packer, 2015).

Les tumeurs cérébrales sont une des principales causes de décès lié aux cancers infantiles. Le progrès et le développement des traitements et des thérapies chirurgicales ont amélioré la survie et, pour des enfants atteints de gliome de bas grade et de médulloblastome, le taux de survie dépasse 75 %, tandis que pour d'autres tumeurs cérébrales comme le gliome infiltrant du tronc cérébral (DMG, diffuse midline glioma) et le gliome de haut grade (High Grade Glioma, HGG), le pronostic reste peu favorable et ces tumeurs sont toujours mortelles. De nos jours, la recherche continue d'explorer les différentes voies de signalisation ainsi que les molécules clés qui jouent un rôle dans les tumeurs cérébrales infantiles (Pollack et al., 2019 ; Khatua et al., 2012).

IV. Le gliome infiltrant du tronc cérébral ou DMG (Diffuse Midline Glioma)

Le gliome infiltrant du tronc cérébral, (appelé auparavant Diffuse Intrinsic Pontine Glioma, DIPG), appartient aux HGG. Il se développe presque exclusivement chez l'enfant et le jeune adulte, avec un âge médian de 6 à 9 ans, et la survie moyenne est de 9 mois. En effet, les DMG sont des gliomes très agressifs généralement localisés au niveau ventral du pont dans la région du tronc cérébral (**Figure 2**). La tumeur peut envahir et diffuser à travers les tissus sains environnants. Son caractère infiltrant rend impossible toute chirurgie, et il ne répond que transitoirement à la radiothérapie (Coutel, 1959 ; Johung & Monje, 2017). En effet, après la radiothérapie, la plupart des enfants décèdent dans les deux ans suivant le diagnostic.

Depuis une dizaine d'années, de nombreux essais cliniques chez l'enfant combinant chimiothérapie, radiothérapie et plus récemment de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été inspirés par des protocoles thérapeutiques conçus pour l'adulte. A l'heure actuelle, les principales cibles pour traiter le DMG sont les modulateurs épigénétiques, les récepteurs de la tyrosine kinase, les cibles de l'immunothérapie (Meel et al., 2019). Des études biologiques récentes, réalisées surtout à partir de matériel provenant d'autopsies et dont la première a été publiée en 2010 (Zarghooni et al., 2010), ont permis de découvrir des anomalies biologiques qui pourraient aider à mieux redéfinir les traitements à explorer.

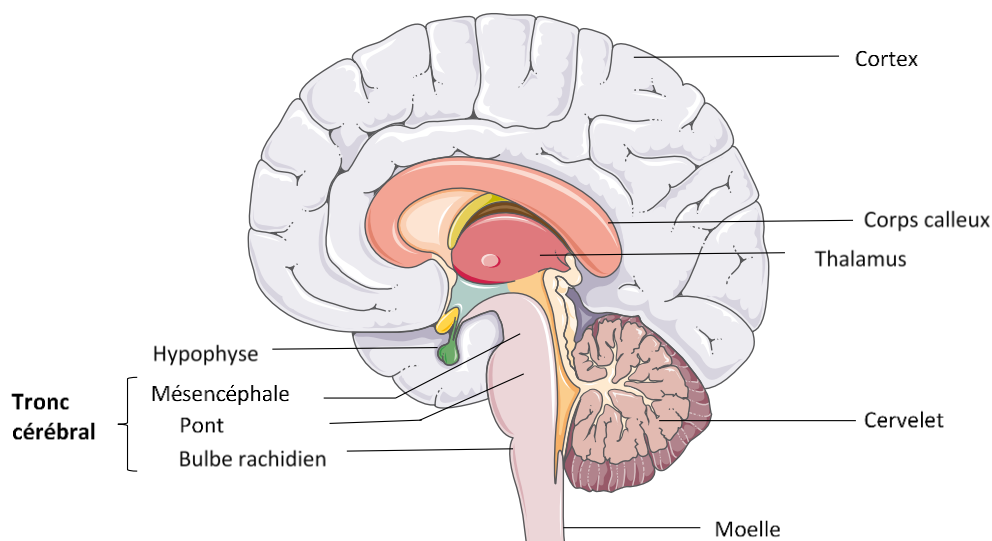


Figure 2 : Coupe du cerveau montrant ses différentes parties dont le tronc cérébral.

1. Épidémiologie

Les tumeurs du système nerveux central représentent les tumeurs les plus fréquentes parmi les tumeurs solides en pédiatrie après les cancers hématologiques. 15% affectent le tronc cérébral et parmi elles, 80% sont des DMG (Rashed et al., 2019). L'âge médian du début est 6 ans et demi et la survie est inférieure à 1 an. Les DMG adultes sont moins agressifs et biologiquement différents de ceux des enfants, avec une durée de survie relativement plus longue (30 à 40 mois, Grimm & Chamberlain, 2013). Le DMG est généralement diagnostiqué dans les 3 mois suivant l'apparition des symptômes (Vanan and Eisenstat, 2015). A ce jour, son incidence n'est pas bien définie dans les registres en l'absence de preuve histologique (Wolff et al., 2008). Aucune différence entre les sexes n'a été démontrée ni de corrélation avec l'origine géographique des malades. La France estime qu'il y a entre 40 et 50 nouveaux cas par an sur son territoire (Veldhuijzen van Zanten et al., 2017).

2. Localisation anatomique des DMG

Les symptômes du DMG sont en majorité liés à la localisation de la tumeur. En effet il se développe dans une zone particulière du tronc cérébral nommée le pont, et notamment dans sa partie ventrale. Il est donc essentiel de connaître les fonctions vitales que régule le tronc cérébral pour interpréter et comprendre les symptômes.

Le tronc cérébral est localisé dans la fosse crânienne postérieure de l'encéphale, sous le diencephale, en avant du cervelet et son prolongement caudal est la moelle épinière (**Figure 2**). C'est une région centrale qui permet de faire la liaison entre les différents compartiments du cerveau et qui relie les différents éléments du système nerveux : le cerveau, le cervelet et la moelle épinière (Angeles Fernández-Gil et al., 2010) Le tronc cérébral est une zone d'émergence des différents nerfs crâniens.

Le tronc cérébral est aussi une région de passage des voies sensibles et motrices ainsi qu'un centre de contrôle de la douleur. Il est composé de 3 parties : le mésencéphale, le pont et le bulbe rachidien ou (la moelle allongée). Il est responsable de la régulation de la respiration et du rythme cardiaque, de la commande des mouvements et des réflexes. Il existe d'autres rôles moteurs tels que la déglutition, la salivation, la mastication, le vomissement, la toux, l'éternuement mais aussi le mouvement des yeux (Hurley et al., 2010). Le DMG se développe

au niveau ventral du pont mais il peut aussi envahir le mésencéphale, le thalamus ou le cervelet (Green and Kieran, 2015).

3. Diagnostic et signes cliniques du DMG

Le diagnostic d'un gliome pontique intrinsèque diffus (DMG) chez un enfant reste l'un des plus difficiles parmi les cancers pédiatriques. Les enfants mourront de leur maladie entre 6 mois et 2 ans à compter du diagnostic initial. Les caractéristiques cliniques les plus classiques sont de trois types : les déficits des nerfs crâniens (diplopie et asymétrie faciale), les signes cérébelleux (perte de l'équilibre et de la coordination, ataxie, dysmétrie et dysarthrie) et l'atteinte des voies longues (perte sensorielle ou surtout motrice des extrémités et du tronc) (Cohen et al., 2017). La paralysie du nerf oculomoteur abducens (nerf crânien VI) est presque toujours le premier signe clinique et elle est un facteur prédictif très sensible du DMG. Une masse engendrée dans le pont se manifeste dans 50 % des cas.

Du fait de cette localisation, d'autres symptômes liés aux déficits des nerfs crâniens sont détectés tels que des problèmes oculaires conduisant à des mouvements anormaux des yeux ainsi que des problèmes de mastication ou de déglutition (Schroeder et al., 2014).

Le délai entre les premiers symptômes et le diagnostic est relativement court (inférieur à deux mois) et ce dernier est complété par les résultats de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) détaillée ci-dessous.

a. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

L'IRM est la modalité d'imagerie médicale de référence pour diagnostiquer le DMG et elle peut être considérée comme une méthode précise non invasive. Ces tumeurs sont hyperintenses et se manifestent par un signal élevé sur les images pondérées en T2 et FLAIR, et iso-intenses ou hypointenses (un signal faible) sur les images pondérées en T1, (Tisnado et al., 2016). L'IRM de la **Figure 3**, montre ce changement de signal (Recinos et al., 2007).

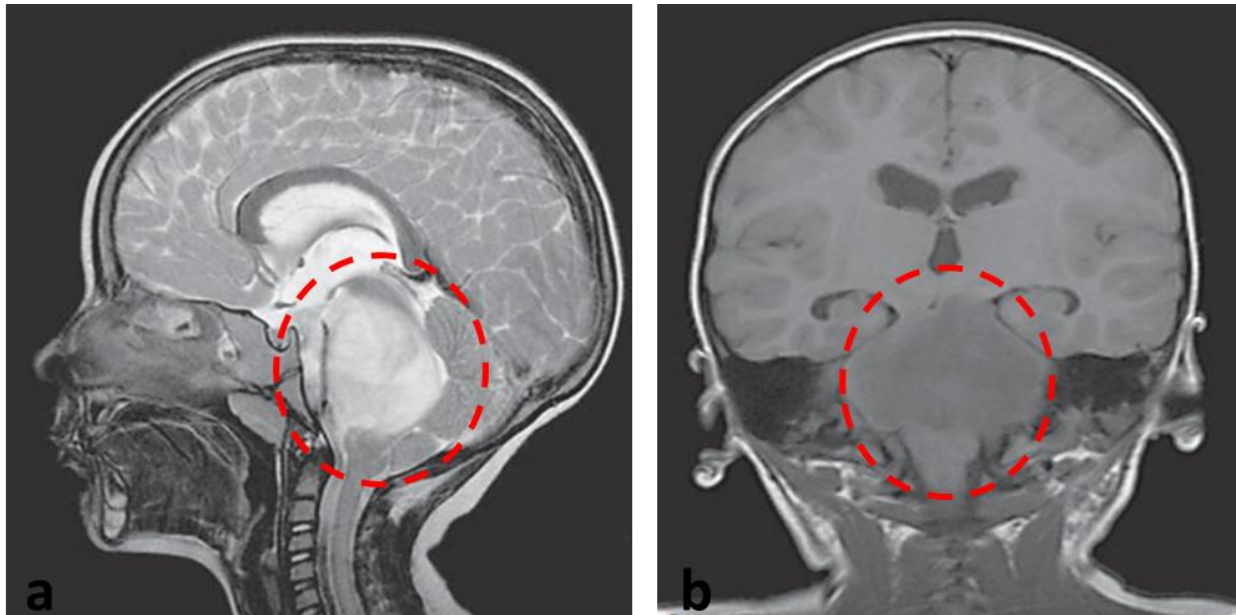


Figure 3 : Caractéristiques de l'IRM de DMG

a) Coupe sagittale T2 montrant le changement du signal hyperintense (blanc) dans le pont. b) Image coronale pondérée T1 confirmant l'infiltration hypointense (noir) dans le tronc cérébral. Adapté de (Recinos et al., 2007)

Afin d'améliorer le diagnostic du DMG, plusieurs recherches sont en cours quant à l'utilisation de techniques d'imagerie avancées. Une approche par Spectroscopie de Résonance Magnétique du proton (MRS) qui permet de mesurer des concentrations de métabolites dans les tissus peut venir en complément de l'IRM. La MRS fournit des informations uniques et importantes sur la biochimie dans les tumeurs cérébrales inopérables et pourrait compléter les données neuropathologiques, le diagnostic (soit haut ou bas grade), guider les biopsies et améliorer la compréhension des options thérapeutiques (Zarifi and Tzika, 2016).

À titre d'exemple, la mesure du taux de citrate augmente dans les tissus malins en comparaison des tissus sains. Quelques équipes ont exploré la possibilité de mesurer le citrate dans les gliomes infiltrant du tronc cérébral pédiatriques (Blüml et al., 2011 ; Sedlacik et al., 2013 ; Seymour et al., 2008). Une étude récente combine l'imagerie IRM et l'injection de méthionine radiomarquée au ^{11}C pour diagnostiquer le DMG, et trouve son utilité pour évaluer l'évolution de la tumeur après traitement par irradiation. Cette méthode est basée sur un métabolisme plus actif et donc une absorption supérieure de la ^{11}C -méthionine par le tissu tumoral par rapport au cerveau normal (Tinkle et al., 2019). L'espoir est que les

techniques d'imagerie avancées permettront de mieux diagnostiquer le DMG et notamment les rechutes après la radiothérapie.

b. Biopsie

L'absence de progrès dans le traitement du DMG malgré des décennies de recherches a mis en évidence un manque dans la compréhension et la connaissance des aspects biologiques fondamentaux de cette maladie. Il est alors apparu nécessaire de réaliser des biopsies, pratique écartée pendant des années parce que le diagnostic était malgré tout relativement simple à poser.

Aujourd'hui, de plus en plus de biopsies sont réalisées avant traitement afin de comprendre les caractéristiques moléculaires de la tumeur. Plusieurs centres hospitaliers (Cage et al., 2013 ; Gupta et al., 2018 ; Hamisch et al., 2017 ; Puget et al., 2015) ont démontré la faisabilité de la procédure grâce à l'utilisation de la chirurgie stéréotaxique, dont les risques sont minimes, et la biopsie peut être utile surtout si les résultats radiographiques ne sont pas clairs (Johung and Monje, 2017).

Une étude de 130 biopsies du tronc cérébral montre qu'il n'y a eu aucun décès dû à la biopsie et moins de 4 % des patients présentaient une morbidité transitoire (Puget et al., 2015).

Plusieurs autres études ont également été réalisées, et de nouvelles techniques de biopsies permettent de fournir des tissus non seulement pour le diagnostic mais aussi pour la culture primaire et l'étude moléculaire (Vanan and Eisenstat, 2015).

c. Classification

Les tumeurs (gliomes) ont d'abord été classées en fonction de leur histologie. Selon ce critère, le DMG correspond à un gliome de haut grade avec un mauvais pronostic (Masui et al., 2016). En 2016, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a introduit un changement fondamental dans la classification des tumeurs du système nerveux central en prenant en compte le génotype pour une large part de ces tumeurs (Wesseling and Capper, 2018). Les gliomes diffus sont classés comme des astrocytomes diffus, des oligodendrogliomes ou des tumeurs mixtes astrocytaires et oligodendrogliales et, selon ces sous-groupes, est attribué un grade/stade de malignité (II, III ou IV) (Wesseling and Capper, 2018). L'activité mitotique, la prolifération microvasculaire et la nécrose sont des caractéristiques aidant à la classification et l'attribution des grades (**Figure 4**) (Perry and Wesseling, 2016).

Actuellement tous les gliomes infiltrants diffus sont regroupés plus précisément en fonction de mutations dans différents gènes (Louis et al., 2016). Les DMG sont des tumeurs survenant principalement chez les enfants et ont d'abord été caractérisés par la mutation K27M des histones H3.3 (H3F3A) et, moins fréquemment, H3.1 (HIST1H3B et HIST1H3C) (Khuong-Quang et al., 2012). C'est une des caractéristiques moléculaires prises en compte depuis 2016 dans la classification. Elle représente 80 % des cas de DMG et elle est toujours associée à un mauvais pronostic (Nagaraja et al., 2019).

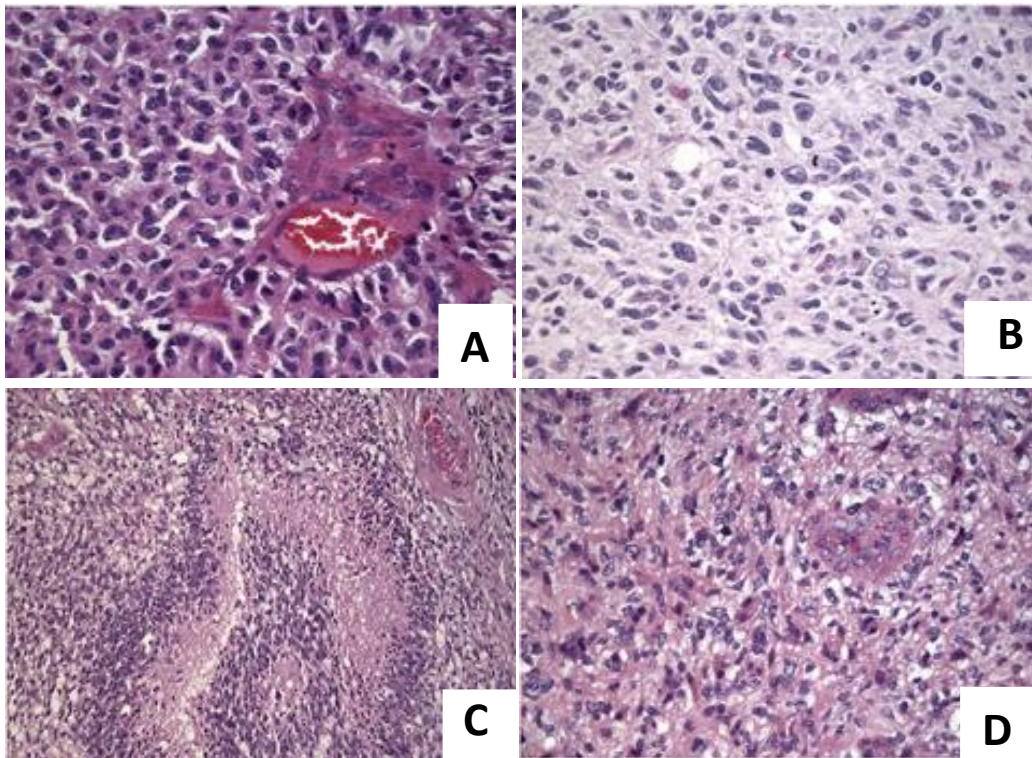


Figure 4 : Evaluation immunohistochimique des différents types de gliomes infiltrants (coloration à l'hématoxyline et l'éosine)

A) Oligodendrogliome diffus de grade III montrant une densité élevée des cellules tumorales avec des noyaux de structure anormale. B) Astrocytome diffus de grade III caractérisé par moins de cellule et une légère diversité du noyau. C) Glioblastome de grade IV avec des cellules tumorales pléomorphes, mitotiques et un aspect pseudo-palissadique des cellules autour d'un foyer de nécrose. D) Gliome diffus médian ou DMG, mutant H3K27M, à infiltration diffuse avec prolifération microvasculaire. Adapté de (Masui et al., 2016).

La systématisation des biopsies a pu conduire à ces différentes classifications basées sur des critères moléculaires et histologiques et pas uniquement sur la morphologie (Buczkwicz and Hawkins, 2015).

Les DMG ont été classés en trois sous-groupes moléculaires distincts sur la base du niveau de méthylation des îlots CpG : H3K27M, silencieux et MYCN (Buczkowicz et al., 2014). Le sous-groupe MYCN ne présente pas de mutation mais est caractérisé par une hyperméthylation, des remaniements complexes du chromosome 2p conduisant à une activation récurrente de haut niveau du facteur de transcription MYCN et du régulateur transcriptionnel ID2. Ce groupe ne présente aucune mutation de l'histone H3 mais l'expression de MYCN et ID2 est augmentée par rapport aux autres sous-groupes. Le second sous-groupe, silencieux de bas grade, est diagnostiqué à un âge plus jeune et caractérisé par un taux de mutation plus faible que les deux autres groupes et une surexpression de la voie Wnt et des gènes MDM2, MSP et ADAM33. 44 % des tumeurs de ce groupe présentent la mutation H3K27M. Le plus important en nombre est le troisième groupe, H3K27M, qui se caractérise par la mutation de l'histone H3.3 ou H3.1 avec des mutations dans divers autres gènes tels que *PVT-1*, *PDGFRA*, *ACVR1*, *TP53*, *ATRX*, *PI3KCA*... (Buczkowicz and Hawkins, 2015). Sont associés à ce groupe une très grande instabilité génomique, l'allongement des télomères et un enrichissement des mutations de *TP53* (Figure 5).

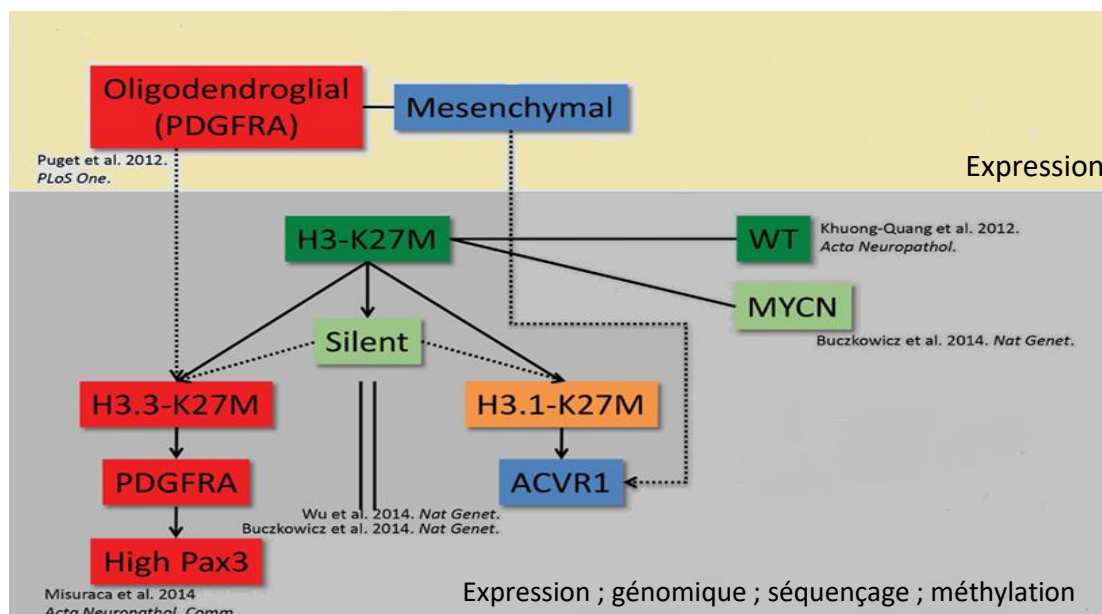


Figure 5 : Classification moléculaire du DMG.

Des analyses récentes de l'expression génique, mutationnelle et épigénétique d'échantillons de patients DMG ont révélé des sous-groupes distincts présents dans la maladie. En 2012, la classification du DMG a défini 2 sous-groupes : Le premier est défini par un phénotype pro-neural et une différenciation oligodendrogliale associée à l'amplification du gène *PDGFRA* et *Pax3* et le deuxième groupe qui présente un phénotype mésenchymateux. En 2014, une classification plus

précise a permis de définir trois groupes potentiels selon l'analyse du génome, l'histopathologie et les données cliniques H3K27M, silent et MYCN. Le groupe MYCN ne présente pas la mutation H3K27M. Le groupe, H3K27M, qui se caractérise par la mutation de l'histone H3.3 ou H3.1 avec des mutations dans divers autres gènes tels que PDGFRA, ACVR1. ; WT : Wild type. Adapté de (Misuraca et al., 2015).

4. Causes du DIPG : la neurogenèse post-natale

Les DMG surviennent dans une zone particulière du tronc cérébral et pendant une période précoce de l'enfance. Cela suggère la dérégulation d'un processus de neurogenèse postnatal. Des chercheurs ont en effet identifié une population de précurseurs neuraux exprimant des marqueurs phénotypiques de type « Cellule Souche Neurale » (NSC) dans le tronc cérébral humain et murin et liés à l'apparition des DMG (Monje et al., 2011). Cette population de cellules présentes au niveau du pont exprime les 2 marqueurs Nestine et Vimentine. La moitié de ces cellules expriment aussi le facteur de transcription Olig2 qui est associé aux précurseurs des cellules oligodendrogiales. Les cellules Nestine+, Vimentine+ et Olig2+ au niveau du tronc cérébral changent au cours des années. Elles sont d'abord présentes au niveau ventral du pont avant de décroître vers l'âge de 2 ans et leur nombre réaugmente pour atteindre un pic à l'âge de 6 ans, ce qui semble correspondre à l'âge d'incidence du DMG. De plus, on peut noter également l'implication de la voie de signalisation Hedgehog (Hh) dans la cancérogenèse et sa dérégulation qui entraîne une hypertrophie des ponts (Monje et al., 2011). L'expression d'Olig2 est régulée par l'activité de la protéine Sonic Hedgehog. La voie Hh est un élément important de développement des cellules souches précurseurs et dans la physiopathologie du DMG mais elle ne suffit pas à elle seule à provoquer ce cancer. Différentes études ont été faites pour comprendre les origines cellulaires et moléculaires du DMG, mais l'étude de sa biologie a cependant été limitée par le manque de tissu tumoral disponible (Monje et al., 2011). D'autres altérations génétiques doivent jouer un rôle dans le développement de la tumeur. Cependant, l'altération la plus importante dans les DMG est la mutation de l'histone H3.

5. Altérations génétiques associées au DMG

a. L'histone H3

Le nucléosome est un octamère constitué de deux copies de chacune des histones de base H2A, H2B, H3 et H4 autour duquel est enroulé l'ADN sur environ 146 pb. Les histones H2A et H2B forment deux dimères flanquant un tétramère (H3-H4) (Mendiratta et al., 2019). Les modifications post-traductionnelles des histones régulent l'expression des gènes grâce à la formation de l'hétérochromatine (chromatine condensée) ou l'euchromatine (chromatine ouverte) (Figure 6).

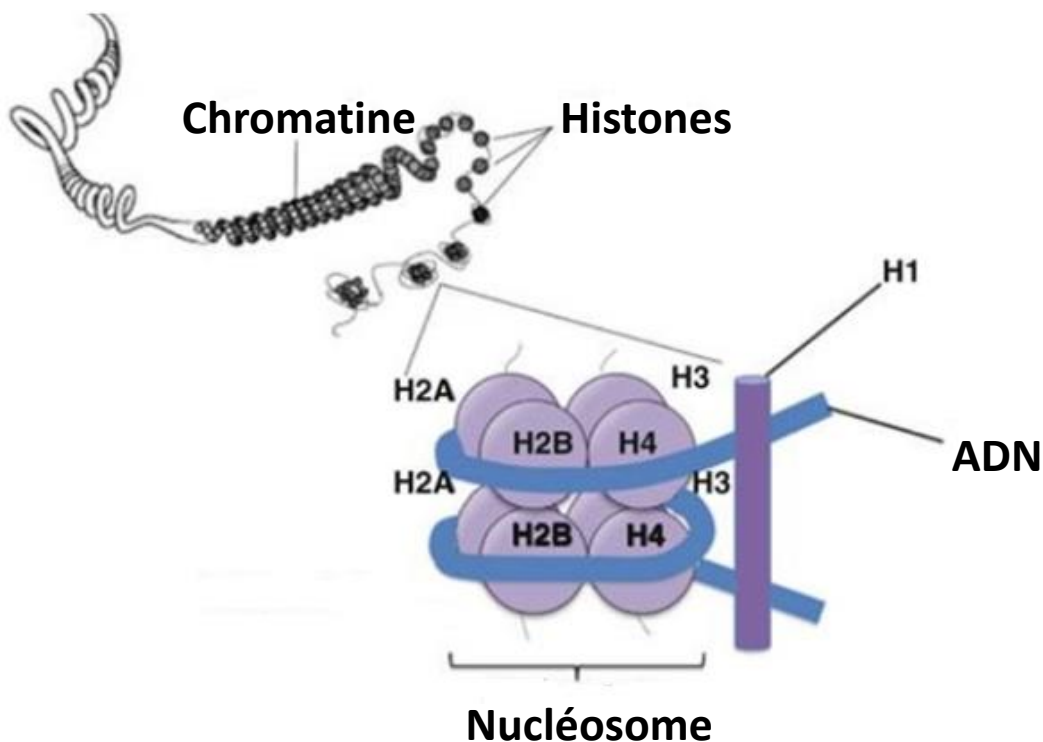


Figure 6 : Schéma représentant la chromatine condensée formée d'ADN enroulé autour du nucléosome et stabilisée par l'histone H1.

Le nucléosome se compose d'un octamère avec deux copies de chacune des histones de base H2A, H2B, H3 et H4 autour desquelles est enroulé l'ADN sur environ 146 pb. Les histones H2A et H2B forment deux dimères flanquant un tétramère (H3-H4).

Le gène H3 est présent dans le génome en de multiples copies organisées en clusters pour H3.1 (HIST1HA-J) et H3.2 (HIST2H3A, C ou D) et le variant H3.3 est codé par deux gènes distincts (H3F3A et H3F3B). Les modifications de l'histone H3, notamment de la lysine 27, conduisent soit à l'activation soit à la répression des gènes. H3K27 est acétylée par des histones acétyltransférases (HAT) aux sites de transcription active ce qui permet l'expression

de gènes, tandis que la méthylation (H3K27me) est une modification généralement associée à la répression des gènes et retrouvée aux loci réduits au silence par les protéines du groupe Polycomb et surtout par le complexe nommé “polycomb repressive complex 2” (PRC2) et plus précisément par une enzyme, la méthyl-transférase “enhancer of zeste homolog 2” (EZH2) qui sera détaillée dans le chapitre II (**Figure 7**) (Leatham-Jensen et al., 2019 ; Nichol et al., 2016).

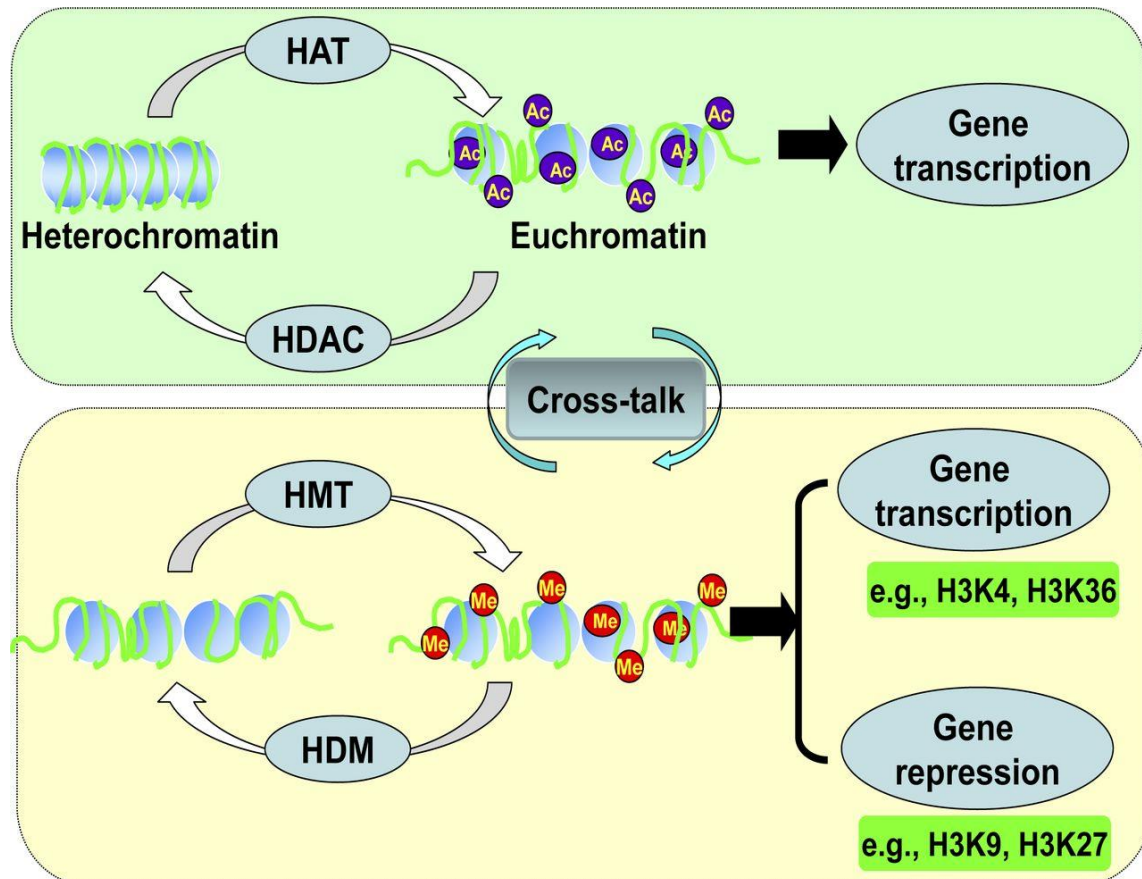


Figure 7 : Modification post-traductionnelle de l'expression des gènes

En général, l'acétylation des queues N-terminales des histones centrales par les HAT a pour conséquence la modification de l'état de l'ADN (hétérochromatine en euchromatine) ce qui peut augmenter l'accessibilité des facteurs de transcription et conduire à une activation ultérieure de la transcription. A l'inverse, le retour à l'état d'hétérochromatine se fait par les HDAC. La méthylation des histones module l'activation ou la répression des gènes selon le site de modification. La méthylation est catalysée par les enzymes HMT alors que la déméthylation est catalysée par les HMD. La méthylation sur les lysines 4 et 36 permet l'activation de la transcription tandis que la méthylation des lysines 9 et 27 induit sa répression. HMT : méthyltransférase d'histone, HDM : histone déméthylase, HAT : Histone acétyltransférase, HDAC : désacétylase d'histone (Yao and Li, 2015).

i. La mutation H3K27M

Les altérations de H3K27 apparaissent comme l'événement à l'origine de la pathogenèse du DMG. Ce sont des mutations dans les deux variants principaux (H3.1 ainsi que H3.3) de l'histone H3 qui entraînent deux programmes oncogènes distincts (Castel et al., 2015). La mutation K27M a également été découverte dans HIST2H3C et une substitution de la lysine 27 en isoleucine (K27I) dans H3F3A. La mutation K27M de H3.3 est associée à une plus faible réponse à la radiothérapie et un plus grand risque de rechute par rapport aux patients pour lesquels H3.1 est muté (Castel et al., 2015).

Les DMG possédant la mutation H3.3-K27M présentent un phénotype proneural / oligodendrogial avec activation du gène PDGFRA et mutation de TP53 tandis que les tumeurs possédant la mutation H3.1-K27M présentent un phénotype mésenchymateux / astrocytaire associé à une mutation de ACVR1 et de PI3K (Castel et al., 2015). De plus, des différences de méthylation sont aussi observées dans les variantes de DMG (Buczkwicz et al., 2014 ; Castel et al., 2018 ; Fontebasso et al., 2014 ; Mackay et al., 2017 ; Sturm et al., 2012 ; Taylor et al., 2014).

La mutation H3K27M est présente dans seulement 4 à 18 % des histones H3 dans les tumeurs DMG, ce qui sous-entend qu'environ 90 % des histones H3 sont fonctionnelles. La méthylation de H3K27 induit l'inactivation du complexe PRC2 (**Figure 8**) (Lewis et al., 2013).

Les mutations de H3.1 et H3.3 induisent également des caractéristiques cliniques différentes. Les tumeurs portant la mutation H3.1K27M se produiront à un âge plus jeune (l'âge moyen au moment du diagnostic est de 4 à 5 ans), seront plus fréquentes chez les filles et seront associées à une survie légèrement plus longue (15 mois) par rapport aux tumeurs portant la mutation H3.3K27M (Johung and Monje, 2017).

Une reprogrammation épigénétique significative contribuant au cancer est associée à la substitution de la lysine 27 par la méthionine. K27M perturbe des modifications post-traductionnelles et modifie en conséquence l'expression des gènes liés au cancer (Lu et al., 2018 ; Mosaab et al., 2020). Elle diminue la triméthylation de H3K27 (H3K27me3) réactivant ainsi la transcription dans tout le génome. Il a récemment été montré que H3K27M augmente l'acétylation de l'histone H4 et la méthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36) (Nagaraja et al., 2019).

Des études fonctionnelles réalisées *in vitro* ou *in vivo* avec des modèles animaux montrent que la mutation H3K27M stimule ou accélère la croissance des DMG (Cordero et al., 2017 ; Larson et al., 2019 ; Pathania et al., 2017). Outre son rôle dans le maintien du DMG, H3K27M empêche la différenciation cellulaire et la cellule est ainsi bloquée dans un état correspondant à un stade épigénétique précoce, se multipliant sans pouvoir se différencier (Harutyunyan et al., 2019).

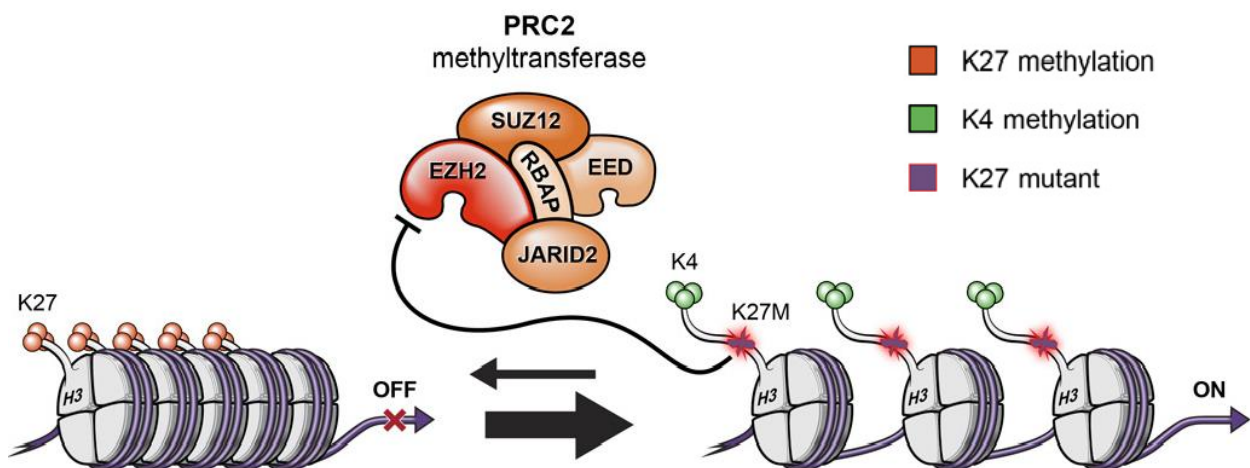


Figure 8 : Modèle de réduction globale de la méthylation de H3K27 dans le DMG porteur de la mutation H3K27M

L'histone H3K27M séquestre la méthyltransférase d'histone, PRC2, et l'inactive fonctionnellement, ce qui conduit à une réduction globale de la méthylation de H3K27 avec comme conséquence une structure ouverte de la chromatine qui favorise l'augmentation de la transcription génétique. Adapté de (Lulla et al., 2016)

ii. Conséquence de la mutation

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

Effet de la méthylation

Le polycomb repressing complex 2 (PRC2) est la seule méthyltransférase de mammifère connue qui catalyse la mono-, la di- et la triméthylation de H3K27 (H3K27me1 / me2 / me3) (Lee et al., 2019). Ce complexe existe également chez les plantes et la drosophile.

La répression des gènes est due à la méthylation de H3K27. Cette réduction au silence transcriptionnel est liée à la triméthylation de H3K27 (H3K27me3) par des complexes du groupe Polycomb (Leatham-Jensen et al., 2019) dont la mutation est associée à l'oncogenèse.

Des études biochimiques ont démontré que le mutant H3K27M se liait au site catalytique de la sous-unité EZH2 du complexe PRC2 et en inhibait son activité enzymatique entraînant ainsi une hypométhylation des autres histones H3 (Lewis et al., 2013 ; Stafford et al., 2018). H3K27M exerce un effet inhibiteur persistant et durable sur PRC2 mais ce phénomène n'est pas uniforme sur le génome.

Dans le contexte du DMG, les niveaux de H3K27me3 sont considérablement réduits (Fang et al.), ce qui est censé être un événement moteur de l'oncogenèse du DMG. Cependant, la façon dont H3K27M réduit le taux de H3K27me3 reste mal comprise. Malgré une perte de triméthylation, une quantité non négligeable d'activité PRC2 peut encore être détectée dans les cellules de DMG possédant la forme mutante H3K27M. Cette activité résiduelle est requise pour maintenir la prolifération des cellules de DMG (Mohammad et al., 2017). (Piunti et al., 2017) ont également émis l'hypothèse d'un rôle clé de la mutation H3K27M dans la gliomagenèse par l'inhibition catalytique de PRC2 et de ses sous-unités EZH2, EED et SUZ12. Mais ils ont aussi montré que l'inhibition de PRC2 diminuait la croissance tumorale des cellules DMG ce qui suggère un rôle important de PRC2 dans le développement du DMG (Piunti et al., 2017). De même, la diminution de l'expression des sous-unités de PRC2, SUZ12 et EED, induit une réduction de la croissance cellulaire des DMG (Piunti et al., 2017). De plus, cette étude a aussi montré que H3K27M augmente les niveaux d'acétylation H3K27 (**Figure 9**).

Effet de l'acétylation

La lysine K27 de l'histone H3 peut également être acétylée, et cette modification est mutuellement exclusive avec la méthylation. La diminution du taux de triméthylation (H3K27me3) et la perte d'activité de PRC2 entraînent une augmentation de l'acétylation de

H3K27 (H3K27ac) et la réactivation des gènes. Les acétyltransférases catalysent cette réaction et, par conséquent, antagonisent la méthylation et la répression de la transcription par le complexe PRC2. Ainsi les acétyltransférases sont-elles essentielles au développement oncogénique (Pasini et al., 2010). Les mécanismes qui impliquent l'hyperacétylation ou l'hyperméthylation de certains loci ne sont pas encore clairement compris (Creasy, 2017).

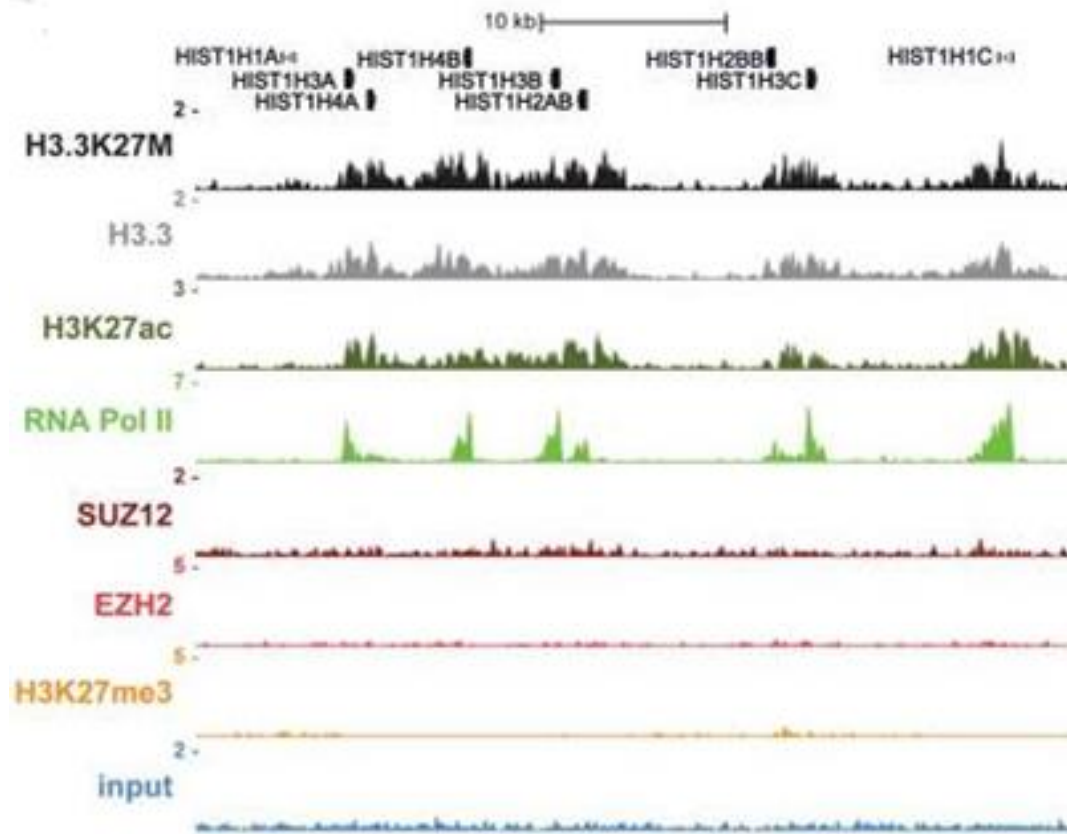


Figure 9 : Occupation des mêmes sites de l'ADN par H3K27M et H3K27ac et exclusion de H3K27M des cibles du complexe PRC2.

Sont représentées les régions génomiques enrichies après immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) en ciblant les histones, les modifications post-traductionnelles des histones et les protéines du complexe PRC2 dans une lignée DMG SF8628. "input" : contrôle négatif (Piunti et al., 2017) .Chaque pic représente la présence de la protéine associée à la chromatine. On peut observer la co-localisation de H3K27Ac, de l'ARN polymérase II et de l'histone H3.3.

b. Autres altérations génétiques des DMG

D'autres mutations ont été identifiées dans le gliome et les altérations les plus importantes sont présentées dans le Tableau I ci-après :

Tableau 1 : Mutations les plus importantes identifiées dans les DMG.

Adapté de (Lapin et al., 2017).

Mutation	Incidence (%)	Conséquences	Résultats cliniques
<u>H3.3 (H3F3A)</u>	60-71	Hypométhylation de l'histone H3, inhibition de PRC2, initiation de l'oncogenèse	Survie médiane = 9mois ↓ réponse à la radiothérapie ↑ métastases
<u>H3.1 (HIST1H3B)</u>	12-18	Hypométhylation de l'histone H3, inhibition de PRC2, initiation de l'oncogenèse	Survie médiane = 15mois ↓ réponse à la radiothérapie ↑ métastases
<u>ACVR1</u>	20-32	Activation de la voie BMP	Mutation associée à H3.1, meilleure survie
<u>TP53</u>	22-40	TP53 muté dans le cadre de l'histone H3.3 permet d'éviter la mort cellulaire	Mutation associée à H3.3, meilleure survie
<u>PDGFRA</u>	32	Activation en aval des voies PI3K et MAPK	Mutation associée à H3.3, cliniquement agressif
<u>PIK3R1/PIK3CA</u>	15	Permet l'angiogenèse	Mutation associée à H3.3 ↑ angiogenèse ↑ formation des cellules souches

ACVR1

La substitution H3K27M est associée à une mutation somatique récurrente de gain de fonction dans ACVR1 (récepteur de l'activine A type 1), le troisième gène le plus souvent muté dans le DMG, avec une fréquence de 20 à 32 %. ACVR1 code pour le récepteur de l'activine A (ALK-2) qui dans le cas où ACVR1 est muté conduit à une activation aberrante de la signalisation BMP (protéine morphogénique osseuse). BMP joue un rôle important dans le développement du cerveau et surtout dans la différenciation des astrocytes par la phosphorylation de SMAD1, aidant à la transcription de gènes responsables de la croissance tumorale. Alors que la mutation somatique ACVR1 est relativement unique à DMG, des mutations analogues sont connues pour provoquer la fibrodysplasie ossifiante progressive (FOP), un trouble musculo-squelettique héréditaire. En revanche, peu d'études décrivent le rôle de cette mutation dans les tumeurs DMG. Cependant, assez rarement, la mutation ACVR1 est observée dans les tumeurs en l'absence de H3K27M. Il se peut qu'elle agisse avec d'autres altérations génétiques ou épigénétiques, mais cette interaction reste

incomplètement comprise. Des études réalisées par Taylor et ses collègues ont mis en évidence une forte prédominance de filles dans le groupe DMG-ACVR1 mutant par rapport à la distribution par sexe dans les DMG de façon générale, et une survie globale plus longue (Buczkwicz et al., 2014 ; Fontebasso et al., 2014 ; Johung & Monje, 2017 ; Taylor et al., 2014 ; Valer et al., 2019).

TP53

La mutation H3K27M est aussi associée à des mutations dans le gène suppresseur de tumeur TP53, et elle est considérée comme la plus courante, avec un taux d'incidence allant de 42 à 77 % dans les DMG. Cette mutation est associée à un mauvais pronostic, mais elle n'est pas responsable de l'initiation des DMG (Duchatel et al., 2019). H3K27M est également associée de façon unique à des amplifications ou des mutations de gain de fonction dans le gène du PDGFRA (récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes de type alpha, un composant de la voie Ras / PI3K / AKT). La mutation dans PPM1D (Protein phosphatase magnesium dependent 1 Delta) peut aussi être associée à la mutation de TP53 (Johung and Monje, 2017). Il a été montré récemment que l'altération de la voie TP53 dans les cellules dont H3 est mutée est le moteur principal de la résistance aux radiothérapies (Werbrouck et al., 2019).

PDGFRA

L'amplification du gène PDGFRA a clairement été identifiée dans le cas des DMG, avec une fréquence pouvant atteindre 36 % selon les études (Paugh et al., 2013 ; Puget et al., 2012 ; Zarghooni et al., 2010). Cette altération augmente fortement la phosphorylation de certaines protéines impliquées dans la voie de signalisation PI3K-Akt, RAS/MAPK et Src kinase qui sont impliquées dans la formation tumorale (Buczkwicz & Hawkins, 2015 ; Paugh et al., 2013). C'est le gène récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) le plus communément amplifié dans les DMG et des mutations activatrices se produisent dans 10 % de DMG (Truffaux et al., 2015).

PI3K

Les PI3-Kinases (PI3K) sont une famille d'enzymes qui jouent un rôle important dans la transduction des signaux de croissance cellulaire en catalysant la phosphorylation du lipide

membranaire PIP2 en PIP3. Une étude a révélé que le gène PI3K est le premier oncogène muté dans des tumeurs DMG avec un taux de 15 % (Duchatel et al., 2019 ; Grill et al., 2012). De plus, près de 50 % des DMG présentent des amplifications dans la voie de la protéine kinase (AKT) /mTOR (mammalian target of rapamycin). La mutation H3K27M est retrouvée associée à des mutations de p53 et des protéines chaperonnes de l'histone H3, ATRX et DAXX (Schwartzentruber et al., 2012). L'amplification de gènes du cycle cellulaire (CCND2, CDK4 et CDK6) a également été décrite (Hoeman et al., 2018 ; Lapin et al., 2017). D'autre part, plusieurs oncogènes dont MYC et MYCN sont altérés dans les DMG. Ils sont des régulateurs transcriptionnels qui permettent l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la pathologie (Lapin et al., 2017). Enfin, la mutation H3.3K27M est également associée à la surexpression d'OLIG1 et d'OLIG2, facteurs de transcription des lignées oligodendrocytiques (Buczakowicz and Hawkins, 2015).

6. Comparaison entre gliome de l'adulte et ceux de l'enfant

Bien que les gliomes malins de l'adulte et de l'enfant partagent des caractéristiques histologiques, ils présentent également d'importantes différences parmi lesquelles on peut citer :

- le gliome adulte est angiogénique et infiltrant contrairement au DMG qui est juste infiltrant
- dans les DMG, l'amplification de PDGFRA est la plus fréquente tandis que l'amplification et la mutation du gène EGFR est la plus observée chez l'adulte (Buczakowicz and Hawkins, 2015).
- chez l'adulte, la mutation IDH1/2 a été très largement décrite dans les gliomes. Elle n'est cependant que très rarement retrouvée dans le DMG ou dans 14 % des cas de gliomes pédiatriques de haut-grade non DMG (Panditharatna et al., 2015).
- la méthylguanine méthyltransférase (MGMT) est une enzyme importante dans le processus de réparation des lésions de l'ADN, et elle est exprimée plus fortement dans les tumeurs pédiatriques que dans les tumeurs adultes (Chassot et al., 2012 ; Zarghooni et al., 2010).
- le gène suppresseur de tumeur PTEN est décrit muté dans 15 à 40 % des gliomes malins de l'adulte (Smith et al., 2001) alors que c'est rarement le cas pour les gliomes pédiatriques.

- il existe des différences de profils chromosomiques notables entre les tumeurs pédiatriques et les tumeurs adultes.

En conclusion, les DMG se définissent par un gain de fonction des protéines codées par les gènes des régions chromosomiques 1q, 8q et 9q et la délétion des régions 14q, 16q, 17p et 20q alors que le gain de fonction de la région 7q est plus caractéristique du glioblastome adulte (Buczkwicz and Hawkins, 2015).

7. Traitement du DMG

Comme le DMG est un cancer invasif qui infiltre le tronc cérébral contrairement à d'autres tumeurs du cerveau, la chirurgie peut difficilement être envisagée. Le seul traitement standard actuel est donc la radiothérapie.

Historiquement, les DMG étaient traités comme des gliomes adultes mais avec la facilité croissante du séquençage de l'ADN, l'analyse génétique a mis en évidence les altérations génétiques pédiatriques qui étaient différentes de celles des adultes (Hoeman et al., 2018). C'est pourquoi plus de 250 essais cliniques sur le DMG, n'ont jamais démontré un minimum de bénéfice pour augmenter la survie par rapport au traitement standard par irradiation (Lapin et al., 2017).

a. Radiothérapie

Le traitement standard le plus utilisé pour les patients atteints de DMG reste la radiothérapie conventionnelle avec une dose de 54 à 60 grays (GY) sur une période de 6 semaines. Ce traitement améliore la fonction neurologique et la survie (Schroeder et al., 2014). Auparavant, le traitement se faisait par la radiothérapie hyperfractionnée avec des doses plus élevées (7560 cGy) deux fois par jour. Elle n'a pas montré de bénéfice sur la survie (Packer et al., 1994).

La radiothérapie hypofractionnée a permis d'améliorer la qualité de vie des enfants atteints de DMG. En limitant le rayonnement à 3 GY par jour pendant 3 semaines (en totalité 39 GY), on peut réduire le temps passé par les enfants à l'hôpital ainsi que la toxicité sans modifier la survie globale (Janssens et al., 2013).

b. Chimiothérapie

Plusieurs protocoles de chimiothérapie ont été évalués : avant, pendant et après la radiothérapie. Malgré tous les efforts, aucune amélioration de la survie globale n'a été

démontrée. L'échec de la chimiothérapie a été dû à la résistance des cellules tumorales et à la présence de la barrière hémato-encéphalique qui empêche certains médicaments d'atteindre leur cible (Johung and Monje, 2017). Les traitements utilisant des agents alkylants de l'ADN, tels que le cisplatine, le témozolomide ou le carboplatine, ont échoué, que ce soit seuls ou associés à la radiothérapie. Le témozolomide n'a démontré aucune efficacité dans ces tumeurs chez l'enfant (Clymer and Kieran, 2018).

En particulier, il n'a pas été démontré que la norme de soins applicable au glioblastome adulte, et qui comprend la radiothérapie avec du témozolomide concomitant et adjuvant, ait un effet bénéfique pour les patients DMG nouvellement diagnostiqués (Clymer and Kieran, 2018).

c. Thérapies ciblées

Une thérapie ciblée utilise un médicament anticancéreux qui cible un récepteur ou un mécanisme précis de la tumorigenèse et présente moins d'effets secondaires qu'une chimiothérapie.

Dans le cas des DMG, les différentes altérations génétiques identifiées ont conduit à la recherche d'inhibiteurs spécifiques. L'activation aberrante de la voie de signalisation PI3K-Akt a d'abord été ciblée par le dasatinib qui est un inhibiteur des tyrosines kinases. Il induit une diminution de la prolifération cellulaire *in vitro* grâce à la diminution de l'activité du récepteur à tyrosine kinase, le "platelet-derived epidermal growth factor" ou PDGF α (Truffaux et al., 2015). La combinaison de dasatinib et de cabozantinib, un inhibiteur du MET (Tyrosine-protein kinase Met) ou HGFR (hepatocyte growth factor receptor) qui est muté ou amplifiée dans 5 à 10 % des cas de DMG, a été explorée pour des effets synergiques potentiels sur la prolifération et la migration/invasion des lignées cellulaires primaires de DMG (NEM157, NEM163, NEM165 et NEM168) (Truffaux et al., 2015). L'évérolimus et l'AZD2014 sont deux inhibiteurs de l'oncogène mTOR dans les lignées cellulaires tumorales ; alors que l'évérolimus a montré une efficacité antitumorale minimale, l'AZD2014 s'est révélé être un inhibiteur tumoral plus puissant (Flannery et al., 2018). La thérapie avec le bevacizumab (inhibiteur du VEGF) n'a pas réussi à améliorer de manière sensible la survie des patients atteints de DMG (Clymer and Kieran, 2018).

D'autres agents thérapeutiques sont en cours d'essai comme le ONC201 (un antagoniste des récepteurs de dopamine) qui a été testé sur une patiente DMG. Le traitement avec ONC201

a réduit le volume de la tumeur et la patiente était toujours vivante 22 mois après le diagnostic, avec une amélioration clinique considérable (Hall et al., 2019).

La mutation H3K27M, fréquemment rencontrée dans les DMG, conduit à une activation transcriptionnelle des gènes et une élévation de l'activité des désacétylases d'histones. Des essais cliniques sont en cours pour contourner ce défaut d'inhibition avec des agents tels que l'acide valproïque, l'entinostat et le panobinostat (LHB589) pour le traitement des enfants atteints de DMG récidivant ou progressif. Alors que les données précliniques pour les modifications des histones ont été très encourageantes, les concentrations chez l'homme ayant un effet inhibiteur sont supérieures aux doses toxiques, ce qui limite leur utilisation clinique (Clymer and Kieran, 2018).

Une autre étude a associé un inhibiteur de EZH2 (EPZ6438) et un inhibiteur des protéines BET (JQ1) qui sont impliquées dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire (Zhang et al., 2017). Les deux drogues ont été plus efficaces ensemble qu'individuellement pour inhiber la croissance cellulaire de cellules de DMG. De la même façon, leur combinaison a été plus efficace pour induire l'apoptose par la régulation épigénétique de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs pour augmenter la survie de souris modèles (**Figure 10**) (Zhang et al., 2017).

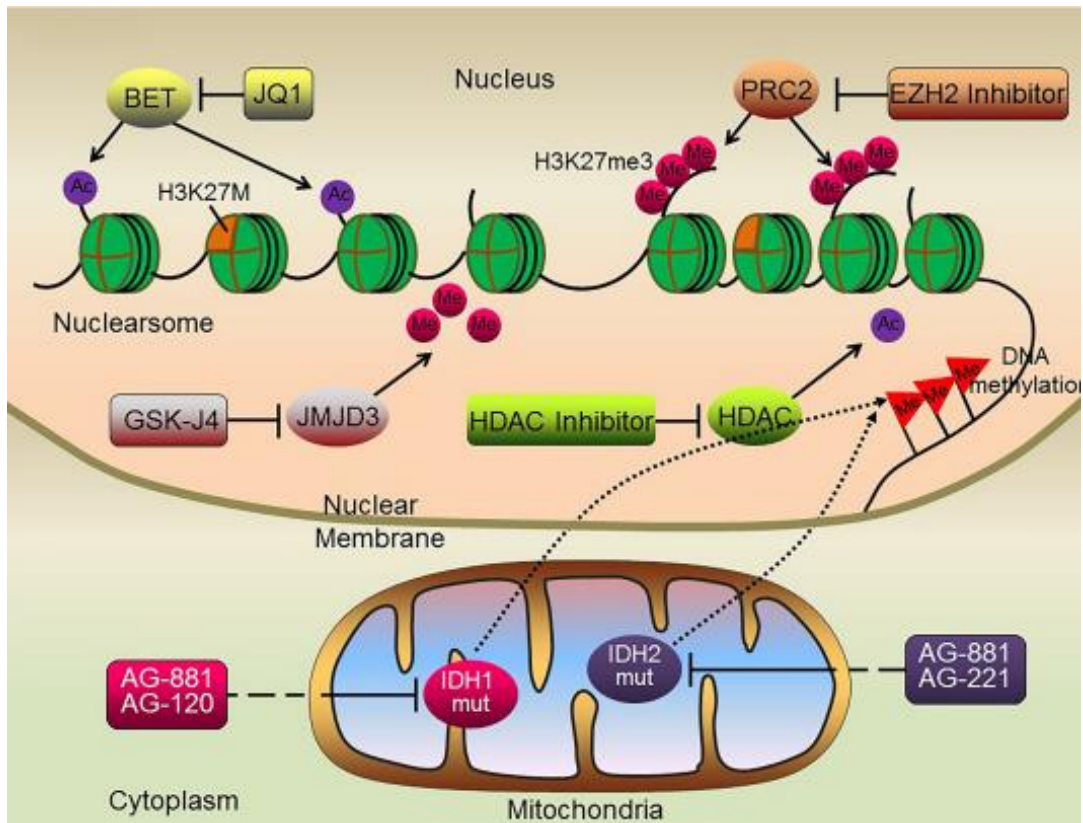


Figure 10 : Thérapies épigénétiques potentielles pour traiter le DMG

Les inhibiteurs de l'histone méthylase et de la déméthylase, les inhibiteurs de l'acétylase d'histone, les inhibiteurs de protéine BET et les inhibiteurs de méthylation de l'ADN sont tous des inhibiteurs ciblant des protéines impliquées dans la pathogénèse des DMG. Ces inhibiteurs peuvent servir de cibles potentielles pour traiter le DMG (Long et al., 2017).

d. Immunothérapie

Malgré plus d'une centaine d'essais cliniques, aucune chimiothérapie, seule ou en association avec la radiothérapie, n'a permis une amélioration de la survie globale des patients DMG par rapport à la radiothérapie seule. En raison de sa capacité à cibler spécifiquement les cellules tumorales en utilisant des produits du système immunitaire, l'immunothérapie est une stratégie particulièrement attractive pour traiter le DMG. Elle a le potentiel d'éliminer les cellules tumorales en gardant intactes les autres structures du tronc cérébral (Lieberman et al., 2019). Mais une inquiétude demeure car cette thérapie soulève le problème de l'autoimmunité et de l'inflammation du tronc cérébral entraînant une mortalité importante (Schuelke et al., 2019).

Chheda et al (Chheda et al., 2018) ont réussi à développer une thérapie efficace à base de cellules T transduites pour cibler un épitope contenant la mutation H3.3K27M dans les DMG

et qui produisent un néo-antigène présenté par le HLA-A*02:01 (CMH de classe I dans les cellules DMG). Il est reconnu par les lymphocytes T cytotoxiques ce qui aboutit à la dégradation des cellules tumorales.

Un autre traitement est en phase d'essai clinique, le NCT02960230. Il consiste en une vaccination des patients avec le peptide correspondant à la mutation H3.K27M (Scutti, 2018).

D'autres recherches ont utilisé la vaccination sous-cutanée par des antigènes spécifiques du gliome (EphA2, IL-13R α 2 et survivin). Les patients ont bien toléré la vaccination qui semblait donc non toxique, mais son efficacité était limitée (Goodwin et al., 2016 ; Pollack et al., 2014).

L'absence de lymphocytes T CD3+, de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires dans le microenvironnement immunitaire du DMG est à l'origine d'une inertie du système immunitaire (Lin et al., 2018). Une stratégie a donc été développée impliquant l'utilisation de cellules chimériques du récepteur antigène T (CAR-T) qui reconnaissent les antigènes associés aux tumeurs. Dans le cas du DMG, les cellules portant la mutation H3-K27M présentent une expression élevée du disialoganglioside GD2. Mount et al. ont montré dans un modèle murin de DMG que des cellules artificielles CAR T anti-GD2 produisant leurs propres cytokines et détruisent des cellules tumorales qui produisent des GD2 *in vitro* et *in vivo* (Mount et al., 2018).

Comme les cellules cancéreuses sont capables d'échapper au système immunitaire, une stratégie clinique possible est de produire des anticorps contre les points de contrôle immunitaires. Par exemple, dans le cancer des poumons et le mélanome, les cellules cancéreuses expriment des ligands de la famille B7 (CD80 et CD86) et le ligand PD-L1 qui se lie aux récepteurs CTLA-4 et PD-1, respectivement. La liaison des récepteurs des lymphocytes T avec ces ligands induit l'endormissement du système immunitaire et donc l'échappement des cellules tumorales à la dégradation (Scutti, 2018). Des études précliniques ont permis de montrer que PD-L1 est exprimé dans 80 % des glioblastomes. Le traitement de ces patients avec des agents ciblant PD-1 permet d'augmenter le taux de survie. En revanche, dans les DMG, le ligand PD-L1 et PD-1 ne sont pas surexprimés (Lin et al., 2018).

L'environnement tumoral du DMG est peu inflammatoire et inerte d'un point de vue immunologique. Lieberman et al. suggèrent que les immunothérapies pour traiter le DMG

doivent viser à recruter des cellules immunitaires au niveau de la tumeur (Lieberman et al., 2019). En effet, ils ont montré que des cellules NK (Natural Killer) peuvent tuer les cellules de DMG qui expriment le ligand MICA/B activateur de NKG2D, probablement par l'induction de la production des cytokines nécessaires à combattre le cancer (Lieberman et al., 2019).

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

L'un des problèmes majeurs du DMG est l'inefficacité des chimiothérapies qui s'explique par une méconnaissance de la biologie de la tumeur mais aussi par l'imperméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette barrière est importante pour la protection du cerveau des infections bactériennes et des substances toxiques et certaines protéines du sang.

Mais la présence de cette barrière est un obstacle aussi important à l'arrivée et l'efficacité des médicaments. De nouvelles techniques sont en cours d'élaboration pour améliorer la délivrance des traitements. La délivrance par convection améliorée (CED pour convection-enhanced delivery) est une technique conçue pour délivrer des médicaments à des concentrations élevées directement dans le cerveau par l'implantation stéréotaxique d'un cathéter au niveau de la tumeur. En pratique, le médicament est distribué d'une façon homogène par une pompe à travers le microcathéter.

Dans le cas des DMG, le CED est une méthode attrayante, surtout quand on pense au tronc cérébral. Quelques essais cliniques de CED au niveau du tronc cérébral sont actuellement en cours en utilisant des macromolécules ciblées telles que des anticorps et des immunotoxines. Les développements futurs de cette technique dans le traitement du DMG doivent considérer plusieurs critères tels que le choix des bons agents pour la perfusion et l'amélioration des instruments pour un ciblage chirurgical plus aisé et précis (Gwak & Park, 2017 ; Zhou et al., 2017).

La technique CED a été utilisée pour administrer IL-13-PE38 à 46 patients atteints de glioblastome au cours d'un premier essai. La moitié de ces patients a vu sa survie augmenter d'une douzaine de semaines. Ces résultats encourageants n'ont pas été retrouvés sur une cohorte plus importante, ce qui souligne la nécessité de mettre au point le placement des cathéters, le nombre utilisé, etc. (Zhou et al., 2017).

Plusieurs études visent aujourd'hui à augmenter la perméabilité de la BHE par des composés tels que la morphine ou la méthamphétamine (Kluiver et al., 2020). Une autre nouvelle

technologie prometteuse, bien qu'elle ne soit pas encore appliquée au DMG, est la perturbation de la BHE par des ultrasons focalisés en combinaison avec des microbulles administrées, ce qui perméabilise la BHE de façon transitoire (Kluiver et al., 2020).

8. Modèles expérimentaux pour étudier le gliome infiltrant

a. Modèles cellulaires

Un obstacle majeur à l'étude du DMG a été le manque de tissu tumoral disponible pour la recherche. Pour résoudre ce problème, a été développée une stratégie de récolte de tissus de patients prélevés après décès ou provenant de biopsies de patients atteints de DMG. Les cellules ainsi prélevées sont cultivées dans des milieux spécifiques (Hashizume et al., 2012 ; Lin & Monje, 2017 ; Monje et al., 2011 ; Thirant et al., 2011).

Ces modèles peuvent être utilisés pour étudier les profils génétiques et rechercher des cibles thérapeutiques pour traiter le DMG.

Pour assurer une propagation *in vitro* durable, les cellules tumorales ont été modifiées avec hTERT (transcriptase inverse de la télomérase humaine) et avec un rapporteur de luciférase pour permettre l'imagerie par bioluminescence non invasive (Hashizume et al., 2012).

Une nouvelle lignée de DMG nommée BxDMG1 dont l'histone H3 (H3.1) est mutée a été établie dans notre laboratoire à partir d'une biopsie prélevée d'une jeune patiente âgée de 10 ans le 15/03/2018 au CHU Pellegrin à Bordeaux. C'est une lignée primaire de DMG dont le caractère tumoral a été montré (ce point est détaillé dans la partie Résultats).

La liste des cellules utilisées dans notre laboratoire et leurs caractéristiques sont décrites dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques cliniques et moléculaires des tumeurs DMG.

Nom des cellules	Âge au diagnostic (ans)/sexe	Histone H3	Grade OMS	Traitement	SG patient (mois)	Collecte des tissus
NEM 157	5/F	H3.3K27M	II	RT + erlotinib	11	Diagnostic
NEM 163	5/H	H3.3K27M	II	RT + erlotinib	10	Diagnostic
NEM 168	9/F	H3.3K27M	III	Chimiothérapie puis RT + erlotinib	8	Diagnostic
SU-DIPG IV	2/F	H3.1K27M	IV	RT + cétuximab/irinotecan	8	Autopsie
SU-DIPG VI	7/F	H3.3K27M	III	RT + vorinostat	6	Autopsie
SU-DIPG XIII	6/F	H3.3K27M	IV	RT	4	Autopsie

Ces cellules ont gracieusement été données par le laboratoire du Dr Michelle Monje (Université de Stanford) et le laboratoire du Dr Jacques Grill (Hôpital Necker Enfants Malades). H : Homme, F : Femme, SG : survie globale, RT : Radiothérapie.

b. Un nouveau modèle préclinique du DMG chez l'embryon de poulet

La membrane chorioallantoïde (CAM) est une membrane richement vascularisée qui se forme lors du développement de l'embryon de poulet. Il assure les échanges gazeux entre l'embryon et le milieu extérieur. Depuis quelques années, ce modèle est utilisé pour l'étude de la croissance tumorale, l'administration de médicaments, l'analyse toxicologique des drogues... La CAM est un modèle simple et facile à mettre en place, avec un coût très faible et une durée d'expérimentation courte en comparaison des modèles *in vivo*. Il est génétiquement proche de l'homme et naturellement immunodéficient. En effet, l'embryon de poulet peut recevoir des transplantations de différents tissus et espèces sans développer de réponse immunitaire (Balke et al., 2010; Ribatti, 2016; Vargas et al., 2007).

Pour l'étude du glioblastome (GBM), les modèles existants sont soit l'injection des cellules tumorales dans les cerveaux des souris, soit la création d'un modèle de souris transgéniques avec une expression d'une protéine impliquée dans la pathogenèse. Néanmoins, ces modèles des désavantages parmi lesquels la pénétration qui est insuffisante, une obstruction pour la collection des échantillons de la tumeur pour des expériences à profil génétique. De plus, les modèles souris ont besoin d'un nombre élevé des animaux pour exploiter les expériences sans négliger la souffrance animale. Pour ces raisons, la création d'un modèle CAM du GBM permettra la validation des nouvelles cibles thérapeutiques en son rapidité, son reproductibilité et son nombre limité d'animaux (Hagedorn et al., 2005)

Une étude sur le glioblastome en disposant du modèle CAM, la croissance du gliome est fortement favorisée par une régulation positive de l'angiogenèse par le VEGF et le FGF-2, or en utilisant la métastatine qui est un inhibiteur de l'angiogenèse qui a montré une efficacité en réduisant l'angiogenèse (Hagedorn et al., 2002).

Une autre étude faite sur le glioblastome en utilisant le modèle CAM après injection de cellules tumorales du glioblastome U87 traitées avec la combinaison de l'anti Interleukine 6 et un inhibiteur du facteur de croissance VEGF (Avastin) entraîne une plus grande inhibition de la croissance tumorale et abroge complètement la vascularisation (Saidi et al., 2009).

Une étude sur le glioblastome en disposant du modèle CAM, la croissance du gliome est fortement favorisée par une régulation positive de l'angiogenèse par le VEGF et le FGF-2, or en utilisant la métastatine qui est un inhibiteur de l'angiogenèse qui a montré une efficacité en réduisant l'angiogenèse (Hagedorn et al., 2002).

c. Cellules modifiées et implantées chez les souris

Pour mieux comprendre la biologie sous-jacente des DMG et évaluer de nouvelles thérapies potentielles, certains groupes de chercheurs ont recours à des modèles *in vivo* qui sont des souris génétiquement modifiées pour créer des altérations qui miment celles décrites dans le DMG comme, par exemple, la surexpression du PDGFB pour imiter l'amplification de PDGFRA qui est particulièrement observée à l'autopsie (Plessier et al., 2017).

Une autre voie explorée en 2017 consistait en une électroporation en présence de vecteurs portant le gène H3.3K27M ou l'induction de souris *KO* pour TP53 par la technique de CRISPR/Cas9. Ces vecteurs sont injectés au stade embryonnaire dans les cellules progénitrices neurales des souris. Elles développent alors des tumeurs prolifératives et diffuses qui ressemblent à des tumeurs de gliome. La surexpression du récepteur PDGFRA augmente significativement la survenue de la tumeur quand elle est associée à la surexpression du gène muté H3.3K27M. Les cellules modifiées ont aussi été injectées chez la souris adulte et utilisées pour un criblage de drogues (Pathania et al., 2017).

d. Xénogreffe orthotopique chez la souris

La mutation de l'histone H3 dans le cas du DMG génère des tumeurs chez les souris immunodéficientes. Deux modèles de xénogreffe directe et indirecte chez la souris ont été développés.

Les biopsies prélevées sont soit directement « xénogreffées » dans le thalamus ou les pons de souris « nude », soit cultivées en parallèle *in vitro*, marquées puis injectées dans les pons de souris « nude » (Plessier et al., 2017).

Un autre développement possible est une xénogreffe orthotopique dérivée des cellules (CDOX pour patient-derived orthotopic xenograft) et une xénogreffe orthotopique de cellules dérivées du patient (PDOX pour patient-derived orthotopic xenograft).

Les modèles CDOX ont été générés par des injections stéréotaxiques de cellules cultivées à partir d'autopsies DMG (Monje et al., 2011). Plus récemment, a été développé avec succès un modèle PDOX après injection directe de cellules tumorales DMG provenant d'une

autopsie (Kambhampati et al., 2015). Le modèle PDOX est plus avantageux pour limiter la pression sélective du milieu exercée sur les cellules (Mathew and Rutka, 2018).

Une autre étude a signalé le développement d'un modèle de tumeur orthotopique chez le rat athymique en introduisant des cellules de gliomes. Diverses drogues ont été testées dans ce modèle pour examiner leurs effets thérapeutiques (Aoki et al., 2012 ; Marigil et al., 2017). Ces modèles orthotopiques présentent l'avantage de respecter le microenvironnement tumoral contrairement à une étude *in vitro*. En revanche, l'implantation se limite à seulement une partie de la tumeur car le DMG est très hétérogène. Un autre désavantage est l'absence de système immunitaire chez ces souris, ce qui favorise considérablement le développement de la tumeur.

e. Souris génétiquement modifiées

Une des premières souris génétiquement modifiées pour l'induction de tumeurs DMG a été créée par l'utilisation du système RCAS-TVA ("replication-competent avian sarcomaleucosis virus long terminal repeat with splice acceptor/Tumor Virus A"). Le système RCAS-TVA est un outil puissant pour modéliser efficacement les tumeurs humaines. Le virus RCAS est utilisé dans des souris modifiées pour exprimer le récepteur TVA qui est naturellement absent des cellules de mammifères. Le gène d'intérêt pour l'étude est inséré dans le génome du virus RCAS qui est injecté dans des cellules en culture pour se répliquer. Le rétrovirus est ensuite injecté dans les souris modifiées génétiquement et il pénètre juste dans les cellules qui expriment le récepteur TVA. L'ADN du gène d'intérêt s'intègre dans les cellules et l'exprime (Ahronian and Lewis, 2014).

Dans une étude réalisée en 2017, en utilisant ce système RCAS-TVA, les chercheurs ont développé un modèle de souris de DMG *in vivo* incorporant la mutation H3.3K27M et l'activation du facteur de croissance dérivé des plaquettes-B (PDGFB), avec p53 normal ou KO. En utilisant la modélisation génétique, ils ont pu montrer que la mutation H3K27M en coopérant avec le facteur PDGF accélère le développement du DMG (Cordero et al., 2017).

PD-0332991 est l'un des nombreux inhibiteurs de CDK4 et CDK6 actuellement en développement clinique pour le traitement de divers cancers, mais pas encore utilisé pour le DMG. En s'appuyant sur la technique des souris modifiées génétiquement, une étude a visé ce système en utilisant 2 modèles surexprimant PDGF-B et Ink4a-ARF et CDK4/6 avec soit une mutation de p53, soit une déficience en p53. L'ajout de PD-0332991 a pu montrer un

arrêt de prolifération des cellules tumorales dans les souris mutées en p53 tandis que celles déficientes en p53 étaient résistantes au traitement (Barton et al., 2013).

Ce modèle d'études possède des avantages dont la capacité de former des tumeurs avec des altérations génétiques bien définies dans diverses maladies dans un contexte d'immunocompétence, qui sera similaire aux maladies humaines. Il sert aussi pour le criblage de nouveaux agents (Ahronian and Lewis, 2014; Halvorson et al., 2015).

9. Principales difficultés associées à l'étude des DMG

La difficulté la plus fondamentale dans l'étude des DMG est son hétérogénéité intratumorale, confirmée par diverses études montrant l'existence de sous-clones tumoraux porteurs de mutations et d'amplifications génétiques différentes (Testa et al., 2018).

La localisation de la tumeur dans le tronc cérébral entraîne des risques inacceptables de mortalité dus à l'ablation chirurgicale. Parallèlement à cela, la nature infiltrante de la tumeur rend impossible une résection complète. L'absence de tissu primaire provenant de la biopsie a contribué à la mauvaise compréhension depuis longtemps de la biologie des DMG et à l'absence de systèmes de modèles expérimentaux représentatifs (Mathew and Rutka, 2018). Tous ces obstacles rendent l'étude de DMG très compliquée et explique peut-être pourquoi les DMG ont été résistants aux divers traitements et ciblage thérapeutiques proposés jusqu'à présent.

Chapitre 2 : La régulation épigénétique des histones dans le DIPG

Nous savons que toutes nos cellules portent la même information génétique alors qu'elles n'ont pas toutes la même fonction. En effet, les cellules du foie diffèrent de celles d'un neurone, du pancréas, des cellules musculaires... Comment peut-on expliquer cette variété ? Une cellule souche pluripotente possède un potentiel de pluripotence nécessaire pour se différencier en différents types de cellules et pour générer des cellules souches pluripotentes induites grâce à un réseau génétique et une régulation moléculaire élargis par des facteurs régulateurs de la transcription au cours du développement et par des molécules transmembranaires impliquées dans la signalisation et l'adhésion cellulaires. Cela favorise le destin d'une cellule vers un phénotype particulier. Or, une cellule différenciée est caractérisée par la transcription de gènes spécifiques (T. Chen et al., 2017; L. Xu et al., 2014). Comment l'activation et le « silençage » des gènes sont-ils précisément régulés lors du choix du destin cellulaire ? La découverte d'une clé mystérieuse appelée épigénétique a permis de répondre, au moins en partie, à cette question. Le mot épigénétique était défini à l'origine par C.H. Waddington comme étant « les interactions causales entre les gènes et leurs produits, qui donnent naissance au phénotype » (Qin et al., 2016). Cette définition a évolué au cours du temps grâce à la mise en évidence de l'importance de l'épigénétique dans divers processus biologiques. Elle se définit depuis récemment comme étant l'étude des changements dans l'expression et l'activité des gènes sans modifier la séquence primaire de l'ADN. Elle contrôle la différenciation cellulaire en activant ou inhibant l'expression des gènes. Ces processus sont transmissibles et irréversibles. Elle est essentielle au développement normal et son altération peut entraîner des modifications dans les fonctions génétiques qui peuvent conduire à diverses pathologies jusqu'au développement d'un cancer. Des études ont été menées pour caractériser les altérations dans le cancer comme la méthylation de l'ADN, les modifications des histones, l'hypoacétylation de la chromatine, le positionnement des nucléosomes et les ARN non codants, en particulier l'expression des micro ARN (Sharma et al., 2010; Weinberg, 2014).

J'ai déjà mentionné que, dans le cas du cancer DMG, l'histone H3 présente une mutation qui induit une altération de la régulation épigénétique. C'est pourquoi il est important de connaître les mécanismes de régulation impliqués dans les modifications post-traductionnelles des histones et plus particulièrement de la lysine 27. L'acétylation et la

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

I. Régulation épigénétique des histones : méthylation et acétylation

La méthylation et l'acétylation des histones jouent un rôle essentiel dans le développement du cancer. L'acétylation des histones se produit lorsque l'enzyme acétyltransférase d'histone (HAT), ajoute un groupe acétyle sur l'histone, alors que la méthylation est catalysée par les méthyltransférases d'histone (HMT) qui ajoutent un groupe méthyle. Ces modifications sont réversibles par l'action d'enzymes appelées "erasers" qui sont les déméthylases d'histone (HDM) et les désacétylases d'histone (HDAC) (Daskalaki et al., 2018; Howie et al., 2019).

1. L'acétylation

a. Mécanisme d'action

La mutation H3K27M des DMG est associée à une hyperacétylation des histones H3. La modification des histones par acétylation joue un rôle clé dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes et est contrôlée par l'équilibre entre les désacétylases d'histone (HDAC) et les acétyltransférases d'histone (HAT).

L'acétylation neutralise les lysines chargées positivement par l'ajout d'un groupe acétyle sur son groupement ϵ -amino en utilisant l'acétylcoenzyme A. Elle affecte les interactions des histones avec d'autres protéines et/ou avec l'ADN et agit en partie pour « ouvrir » la chromatine condensée. Cette chromatine « ouverte » est appelée euchromatine. L'acétylation par les acétyltransférases d'histones (HAT) permet une transcription active des gènes. Inversement, la désacétylation des histones se produit lorsque la désacétylase d'histone (HDAC) supprime ce groupe acétyle ce qui induit un enroulement de l'ADN, formant une structure de chromatine condensée et « fermée » (hétérochromatine), qui permet une inhibition et une répression de l'expression des gènes (Baeza et al., 2016; Howie et al., 2019; Sternglanz and Schindelin, 1999). Les facteurs de transcription, les protéines cytoplasmiques et des protéines impliquées dans des processus cellulaires peuvent également être acétylés.

b. Les histones acétylases (HAT)

Il existe 17 HAT humaines, qui sont divisées en cinq familles distinctes selon les similarités de leur séquence primaire : la famille GNAT (Gcn5-related N-acetyl transferase), la famille p300/CBP, le groupe MYST (MOZ, YBF2/SAS3, SASS2 et TIP60), le groupe SRC (steroid coactivator receptors) qui sont des coactivateurs de récepteurs nucléaires et un dernier groupe dont les membres ne peuvent pas être rattachés à une des autres familles (Haery et al., 2015). Les HAT peuvent fonctionner comme des suppresseurs de tumeurs, en contrôlant en partie la prolifération cellulaire, ou comme des oncogènes. En effet, un dysfonctionnement de l'acétylation peut conduire à l'activation de protéines malignes et induire ainsi divers cancers comme les cancers du sein, colorectaux ou gastriques... (Di Cerbo and Schneider, 2013). L'acétylation des histones induit le recrutement de protéines contenant un bromodomaine (BD). Par exemple, BRD4, qui est un membre de la famille des protéines à BET (Bromodomain and Extraterminal), lie les histones hyperacétylées avec une forte affinité, ce qui permet d'augmenter la transcription (initiation et élongation), et joue un rôle dans la régulation des gènes (Dey et al., 2003). La découverte récente d'inhibiteurs spécifiques des BD a provoqué un bond en avant dans les recherches oncologiques et ils sont maintenant en phase d'essai clinique (Filippakopoulos and Knapp, 2014). À titre d'exemple, l'inhibiteur JQ1 en combinaison avec le panobinostat inhibe dans une certaine mesure la viabilité du DMG, et la combinaison de JQ1 avec MRK003 (l'inhibiteur de la F-sécrétase) inhibent la croissance du DMG et induisent l'apoptose (Nagaraja et al., 2017; Taylor et al., 2015).

L'utilisation d'inhibiteurs de protéines BET, ciblant les activateurs transcriptionnels BRD2 et BRD4 dans le DMG, induit une diminution de la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* en prolongeant la survie de souris porteuses de DMG (Piunti et al., 2017)

c. Les histones désacétylases (HDAC)

Les désacétylases d'histone (HDAC) sont responsables de l'élimination des groupes acétyle des résidus de N-ε-acétyllysine. 18 HDAC ont été identifiées et regroupées en quatre classes en fonction de leur structure, la spécificité du substrat, le mécanisme enzymatique et la localisation subcellulaire : classe I (HDAC 1, 2, 3 et 8), classe II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 et 10), classe III ou Sirtuins (Sirt 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7) et classe IV (HDAC11). L'activité des HDAC des classes 1, 2 et 4 dépend du Zn^{2+} tandis que celle de la classe 3 dépend du NAD^+ (Daskalaki et

al., 2018; Haery et al., 2015). Les HDAC peuvent également désacétyler des facteurs de transcription spécifiques. Une augmentation de l'activité des HDAC a été constatée dans de nombreux cancers, ce qui en fait des cibles thérapeutiques potentielles et des inhibiteurs HDAC (HDACi) sont utilisés en clinique pour traiter différents lymphomes (Haery et al., 2015). Par ailleurs, dans le cas des DMG, le panobinostat, un inhibiteur des désacétylases d'histone, s'est avéré efficace contre la croissance de cellules tumorales dérivées de patients (Grasso et al., 2015). De plus, la combinaison de la radiothérapie avec le CDUC-907, un inhibiteur de la classe I des HDAC et de PI3K, exerce une importante activité cytotoxique antitumorale contre les cellules de DMG (Pal et al., 2018). L'étude récente en 2019 d'Anastas et al., dans laquelle est utilisé le Corin, un inhibiteur bifonctionnel des HDAC et de la LSD1 (déméthylase spécifique des lysines 1), a montré une inhibition de la croissance cellulaire des DMG avec un arrêt du cycle cellulaire suivi d'une augmentation des niveaux d'acétylation des H3K27 liée à une élévation des niveaux de triméthylation de H3K27 (H3K27me3) conduisant ainsi à une prolongation de la survie des patients atteints de DMG (Anastas et al., 2019) (**Figure 11**).

De plus, les travaux de notre équipe ont montré qu'en réponse à un traitement par le panobinostat, les cellules DMG surexpriment deux protéines d'échafaudage : EBP50 (ERM-Binding Phosphoprotein 50) et IRSp53 (Insulin receptor substrate p53). Notre équipe a également démontré que l'utilisation de la combinaison d'un inhibiteur de HDAC, le panobinostat, avec des inhibiteurs des deux protéines d'échafaudage EBP50 et IRSp53 conduit à une réduction plus efficace de la croissance cellulaire *in vitro* et *in vivo* comparée au panobinostat seul (Capdevielle et al., 2020).

2. La méthylation

a. Mécanisme d'action

Les méthylations des histones sont catalysées par les enzymes méthyltransférases d'histone (HMT), qui sont capables d'ajouter un groupe méthyle provenant de la S-adénosylméthionine à leur résidu cible, une lysine ou une arginine (Gong and Miller, 2019). La première méthyltransférase d'histone identifiée, SUV39H1, contient un domaine catalytique SET (Su (var) 3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax), et depuis, plusieurs autres méthyltransférases ont été découvertes qui contiennent ou non un domaine SET.

Actuellement, environ 60 HMT ont été identifiées et classées en deux familles selon qu'elles méthylent une lysine (KMT) ou une arginine (PRMT). Les KMT sont subdivisées en deux sous-familles selon qu'elles contiennent ou non un domaine SET. Ces dernières méthylent une lysine dans le corps globulaire des histones et sont des protéines « DOT1-like » (Disruptor of telomeric silencing 1-like). Il existe trois états de méthylation de la lysine : mono-, di- et triméthylée (me1, me2 et me3, respectivement) qui confèrent une transcription active ou répressive en fonction de l'acide aminé modifié et de son état de méthylation. En général, les méthylations des lysines 4, 36 et K79 de H3 sont associées à une transcription active, tandis que les méthylations de K9 et K27 de H3 et la méthylation de K20 de H4 sont associées à une chromatine silencieuse (Gong and Miller, 2019; Jubierre et al., 2018).

Les déméthylases d'histone (HDM) peuvent éliminer des groupes méthyle ajoutés sur les résidus lysine et arginine des protéines par les HMT (Gong and Miller, 2019). Il en existe deux familles, la famille des KDM1 qui déméthylent les lysines me1 ou me2 et la famille des JHDM qui déméthylent les lysines me3 (Jubierre et al., 2018). Les plus décrites sont les enzymes UTX et JMJD3 qui déméthylent H3K27.

En plus des histones qui peuvent être méthylées, la méthylation de l'ADN se produit également en position C5 de la cytosine, principalement dans le contexte des dinucléotides CpG, mais aussi dans les régions non CpG des cellules souches (Castillo-Aguilera et al., 2017). Cette méthylation conduit à une répression de la transcription stable à long terme. Les 4 ADN méthyltransférases existant chez les mammifères sont DNMT1, DNMT3a, DNMT3b et DNMT3L (Jubierre et al., 2018).

De nombreuses études ont montré que la mutation ou la mauvaise régulation de la méthylation des histones, des méthyltransférases ou des déméthylases est associée à diverses maladies et cancers (Hyun et al., 2017).

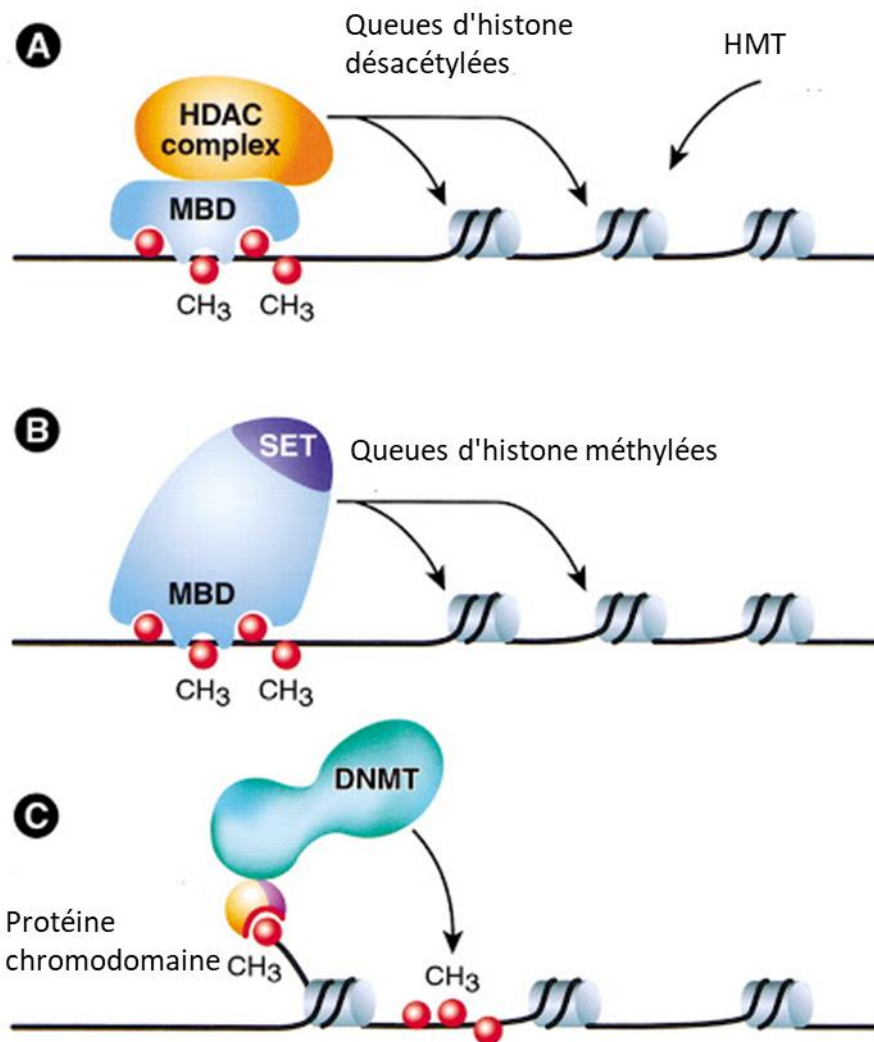


Figure 11 : L'acétylation et la méthylation des histones.

A) Les protéines de liaison méthyl-CpG recrutent le complexe HDAC pour désacétyler l'histone pour que les queues d'histone soient adaptées à la méthylation ultérieure par HMT. B) Dans le domaine de la chromatine où les histones sont hypoacétylées, les HMT contenant le domaine MBD peuvent directement se lier et méthyler les histones. C) Les queues d'histones méthylées peuvent recruter des DNMT (DNA methyltransferase) pour la méthylation de l'ADN pour le silençage génique à long terme (Zhang and Reinberg, 2001).

b. La méthylation de la lysine en position 27 de l'histone H3

La lysine 27 de l'histone H3 peut être mono- (H3K27me1), di- (H3K27me2) ou tri-méthylée (H3K27me3) ou acétylée (H3K27ac). Les protéines du groupe Polycomb (PcG) sont responsables de la régulation génomique par le biais des trois états de méthylation de H3K27. Le Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) catalyse la méthylation de H3K27 et

réprime ainsi la transcription des gènes (**Figure 12**). Le rôle de H3K27me1 est moins bien compris, certains rapports suggérant qu'il permettrait l'activation transcriptionnelle (Lowe et al., 2019). La H3K27 méthylée est très abondante, avec environ 50 % de l'histone H3 di-méthylée, 15 % tri-méthylée et 15 % mono-méthylée dans les cellules souches embryonnaires (Margueron and Reinberg, 2011).

La méthylation de H3K27 est régulée par les méthylases PRC2-EZH2 et par les déméthylases UTX (KDM6A) et (KDM6B) L'effet de la mutation K27M pourrait être inversé en inhibant la déméthylation de H3K27 (Romani et al., 2018).

La méthylation de H3K27 est un médiateur important de la suppression des gènes de transition et contribue à d'importants processus biologiques, notamment l'inactivation du chromosome X, l'empreinte génomique, le maintien des cellules souches, la structure corporelle animale, le rythme circadien et le cancer (Van der Meulen et al., 2014). Par conséquent, la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 a été considérée comme une cible thérapeutique potentielle, et les essais cliniques de plusieurs inhibiteurs de ce processus ont montré des résultats prometteurs.

Comme je l'ai déjà mentionné, les protéines PcG sont responsables de la méthylation. Elles sont retrouvées au sein de 2 complexes répressifs, Polycomb 1 et 2 (PRC1 et PRC2). Ces groupes modulent l'expression des gènes liés au développement à un stade précoce grâce à la régulation de la structure de la chromatine (Yan et al., 2019). Ils maintiennent la répression de la transcription des gènes homéotiques (gènes Hox) intervenant dans l'identité des différentes parties de l'embryon au niveau de l'axe antéro-postérieur (Margueron and Reinberg, 2011).

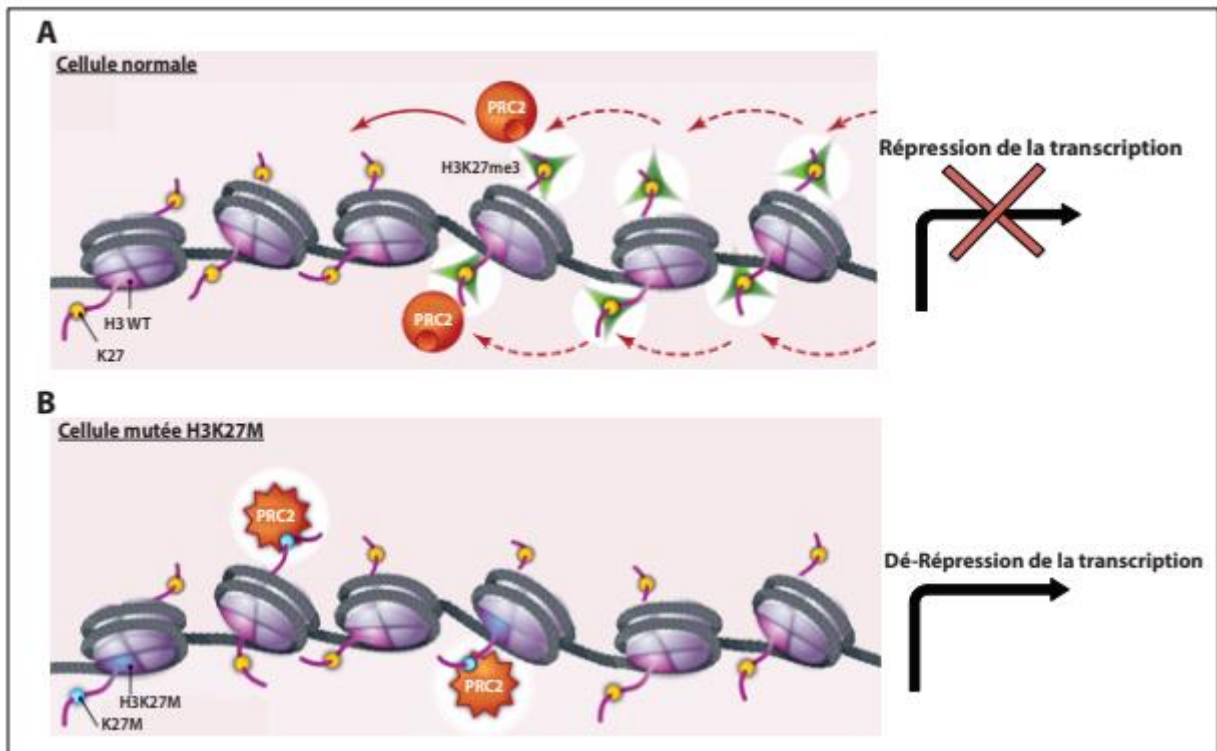


Figure 12 : Effet de la mutation H3K27M sur le complexe PRC2

(A) Dans une cellule normale (non mutée), PRC2 est recruté sur les gènes cibles pour effectuer la triméthylation (vert) de la lysine 27 (jaune) de l'histone H3 (H3K27me3) au niveau du gène réprimé.
 (B) Dans une cellule mutée H3K27M, PRC2 se lie plus fortement au peptide muté (bleu) induisant un défaut de triméthylation et une dé-répression des gènes cibles. Adapté de (Morgan and Shilatifard, 2013).

II. Le complexe PRC2

1. Composition et structure

Le complexe répressif 2 Polycomb (PRC2) est un complexe épigénétique multiprotéique impliqué dans la régulation de l'expression des gènes. Il est formé par un noyau tétramérique favorisant une activité de méthyltransférase, lui permettant de mono-, di- et tri-métyler l'histone H3 sur la lysine 27 (Chammas et al., 2020).

Le complexe comprend les sous-unités de développement embryonnaire d'ectoderme (EED), le suppresseur de Zeste 12 (SUZ12) et une sous-unité catalytique Enhancer de Zeste Homolog 1 ou 2 (EZH1 ou EZH2) qui possède un domaine SET catalytique (Moritz and Trievel, 2018). Ce complexe de base peut s'associer à des sous-unités supplémentaires, dont la protéine de liaison au rétinoblastome 4 ou 7 (RBBP4/7, également connue sous le nom de

RBAP48/46), la protéine de liaison à l'activateur d'adipocytes 2 (AEBP2), Jumonji et le domaine d'interaction riche en AT 2 (JARID2) (**Figure 12**) (Moritz and Trievel, 2018).

La sous-unité EZH2 : Le composant clé de PRC2, c'est une protéine à domaine SET capable de triméthyliser la lysine 27 de l'histone H3, favorisant ainsi la répression des gènes (Cao and Zhang, 2004).

La sous-unité EED : elle est constituée d'une séquence de 466 acides aminés caractérisée par son domaine de liaison EBD (EED Binding Domain) qui permet l'interaction de EED avec EZH2. Elle contient également des régions de répétition WD40 qui sont absolument nécessaires à cette interaction. Il a été démontré que l'interaction EED-EZH2, ou EBD-EZH2, avec WD40 est requise pour l'activité méthyltransférase (Han et al., 2007; Margueron et al., 2009).

La sous-unité SUZ12 : c'est une protéine de 741 acides aminés contenant un domaine VEFS qui sert de facteur de stabilisation pour PRC2 par la liaison avec EZH2. Elle possède également un domaine delta-VEFS ciblant les autres sous-unités de PRC2 (Chanvivattana et al., 2004; Yamamoto et al., 2004). Cependant, l'altération de VEFS, conduit à une perte de l'activité méthyltransférase d'histone alors que l'assemblage complet du complexe PRC2 est maintenu (Ketel et al., 2005).

Ainsi, pour que EZH2 puisse exercer son activité méthyltransférase, la présence physique de EED ainsi que de SUZ12 est nécessaire et leur absence provoque une auto-inhibition de EZH2 ainsi qu'une inactivation de son domaine SET. EED se lie à H3K27me3 via son domaine WD40 après la triméthylation de H3K27 par EZH2 et, grâce à cette liaison, PRC2 se propage aux nucléosomes voisins pour induire la triméthylation de H3K27 (Antonyamy et al., 2013; Mierlo et al., 2019; Wu et al., 2013).

RBBP4 et RBBP7 : ces sous-unités sont nécessaires à la liaison de PRC2 aux nucléosomes non modifiés et sont considérées comme indispensables à l'activité complète de la méthyltransférase (Mierlo et al., 2019) (**Figure 13**).

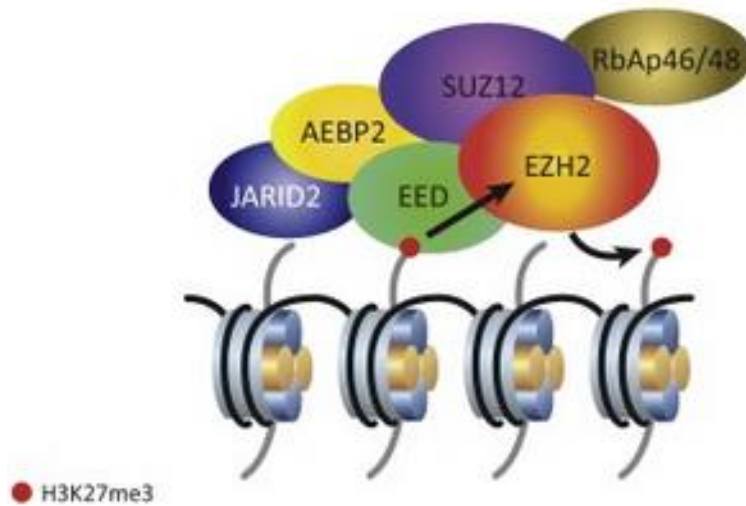


Figure 13 : Structure du complexe PRC2 et ses interactions.

PRC2 est composé de 6 protéines : EED (embryonic Ectoderm Development), SUZ12 (Suppressor of Zeste 12), EZH2 (Enhancer of Zeste 2) qui est responsable de l'activité catalytique de triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27, Enhancer of Zeste Trithorax, la protéine RBAP48 (Retinoblastoma binding protein 48), la protéine de liaison à l'activateur d'adipocytes 2 (AEBP2) et JARID2 (Holoch and Margueron, 2017).

Après l'assemblage de PRC2, EZH2 catalyse par l'intermédiaire de son domaine SET le transfert du groupement méthyl à partir d'un donneur de méthyl, la S-adénosyl-L-méthionine (SAM) pour produire la S- adénosyl-L-homocystéine (SAH) (Copeland et al., 2009). Le domaine SET permet le transfert de 3 méthyls successifs pour former la H3K27me3 (**Figure 14**). On parle alors de « dépôt de marque H3K27me3 ». Le domaine SET contient un résidu clé, Y641, dont la mutation en histidine (Y641H) diminue l'activité enzymatique et est associée au développement de tumeurs telles que des lymphomes (Morin et al., 2010).

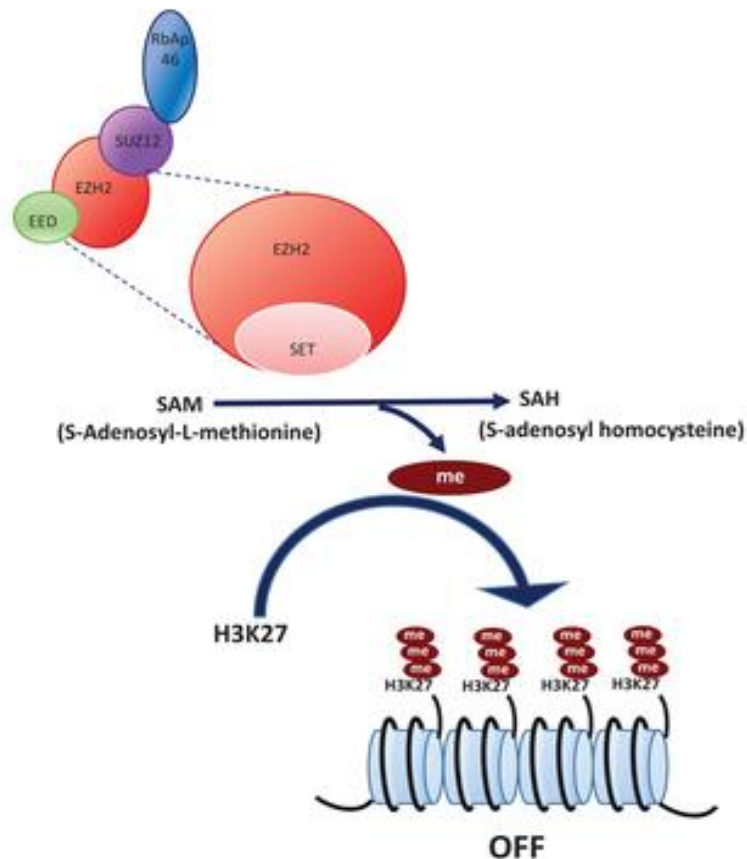


Figure 14 : Représentation schématique du mécanisme d'action la triméthylation

Le domaine SET est le domaine catalytique de la méthyltransférase EZH2. Il catalyse le transfert d'un groupe méthyle à partir d'un donneur de méthyle universel, la SAM (S-Adénosyl-L-méthionine), sur la lysine 27 de l'Histone H3 (H3K27) associée à une chromatine plus condensée. Cela conduit à la répression transcriptionnelle des gènes (Gulati et al., 2018).

Un homologue de EZH2 a été découvert, EZH1, dont la séquence en acides aminés est similaire à 65 % à celle de EZH2. EZH1 est exprimée d'une façon ubiquitaire tandis que EZH2 est exprimé par les cellules en prolifération. Le complexe PRC2 contient soit EZH1, soit EZH2 (PRC2-EZH2/PRC2-EZH1). Contrairement à EZH2, EZH1 présente une faible activité méthyltransférase, mais il réprime la transcription des gènes en compactant la chromatine (Margueron et al., 2008).

2. Rôle de PRC2

PRC2 peut présenter à la fois une activité oncogénique et une activité de suppression tumorale. Dans certains cancers, PRC2 joue sur la régulation des protéines de contrôle en réprimant la différenciation, la réparation des dommages de l'ADN ainsi que l'adhésion cellulaire conduisant à une perte de contrôle et une croissance tumorale accrue (Moritz and Trievel, 2018).

De plus, PRC2 réprime de nombreux facteurs de transcription régulateurs nécessaires au développement des cellules souches embryonnaires. Or il est indispensable pour maintenir une pluripotence cellulaire et son inactivation provoque un silence inefficace et des complications de développement (Margueron and Reinberg, 2011).

L'épuisement et/ou la mutation des sous-unités du complexe PRC2 peut entraîner des anomalies graves de développement, voire même de la létalité. Ces mutations peuvent être trouvées dans divers cancers ainsi que dans des maladies génétiques rares comme le syndrome de Weaver qui se traduit par une prolifération excessive. Ces mutations aboutissent à des changements dans la transcription des gènes suppresseurs de tumeurs ou des gènes oncogéniques (Chammas et al., 2020).

3. Le complexe PRC1

Le complexe PRC1 contient une ubiquitine ligase E3 qui mono-ubiquitine la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119ub1). Il est composé des protéines chromoBox (CBX), qui reconnaissent la marque H3K27me3, une protéine PCGF (Polycomb group RING finger protein), des homologues de polyhoméotique (HPHc) et l'enzyme RING responsable de l'ubiquitination (Blackledge et al., 2020; Cao et al., 2005; Rose et al.). PRC1 se lie à H3K27me3 en fonction de PRC2 et H2AK119ub1 pourrait stimuler l'activité catalytique de PRC2.

PRC1 est également nécessaire pour rassembler les extrémités des grands groupes de gènes Hox chez les mammifères, favorisant la répression des gènes (Kundu et al., 2017).

Des études ont montré que la sous-unité RING pourrait jouer un rôle dans l'activation de la transcription des gènes (Gil and O'Loghlen, 2014).

4. Recrutement du complexe PRC2

La répression des gènes se fait par la coopération des deux complexes PRC1 et PRC2. Comment se fait cette suppression de la transcription ? La triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 est induite par l'incorporation de PRC2 dans la chromatine, puis PRC1, via RING, catalyse l'ubiquitination de l'histone H2AK119. Le résultat serait une compaction de la chromatine et une répression génique (Koubi et al., 2017). Cela conduit à l'hypothèse d'un fonctionnement de PRC1 en aval de PRC2 (Margueron and Reinberg, 2011).

En revanche, une autre étude a montré l'enchaînement inverse qui débute par un recrutement de PRC1 qui sera capable de lier la chromatine sans la présence de la triméthylation, puis d'ubiquitiner l'histone H2AK119 qui sera ensuite reconnue par les deux protéines AEBP2 et JARID2 de PRC2, permettant une installation de PRC2 sur un site normal (Blackledge et al., 2014; Holoch and Margueron, 2017) . Les deux complexes sont également capables d'interagir ensemble, permettant leur fixation sur des gènes cibles communs (Figure 15).

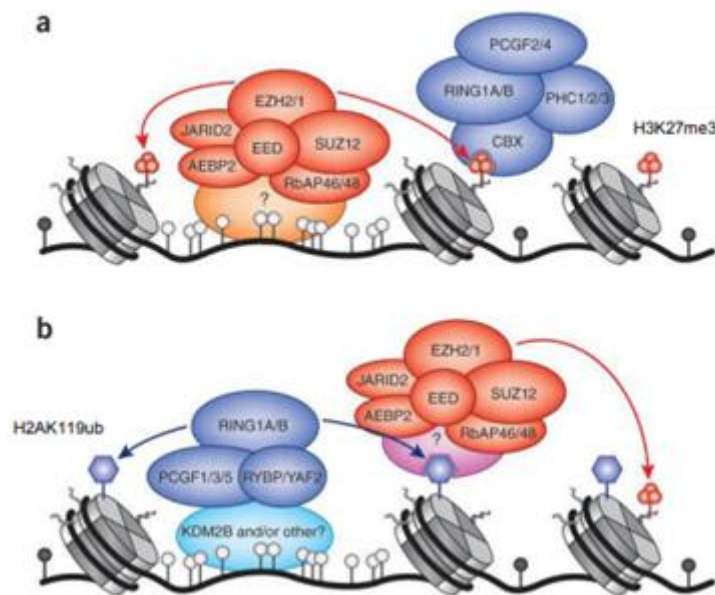


Figure 15 : Modèle hiérarchique classique de recrutement complexe PCG.

a) PRC2, en complexe avec JARID2 et AEBP2, est recruté dans des CGI (îlots CpG) non méthylés (ronds blancs, cytosines non méthylées ; ronds noirs, cytosines méthylées) par un mécanisme mal compris qui peut impliquer d'autres phénomènes tels que la liaison des protéines à l'ADN (marqué "?"). Le recrutement de PRC2 conduit à H3K27me3 (cercles rouges). Les sous-unités canoniques CBX de PRC1 peuvent se lier à H3K27me3, conduisant ainsi au recrutement de ce complexe et à une faible quantité

de mono-ubiquitination de K119 de H2A. (b) Le nouveau modèle hiérarchique proposé par Blackledge et al. (2014) et Cooper et al. (Blackledge et al., 2014; Cooper et al., 2014) suggère que les variants de PRC1 sont recrutés dans les CGI non méthylés, par exemple par KDM2B. Cela conduit à la monoubiquitination de H2AK119 et au recrutement de PRC2 par un mécanisme inconnu, impliquant éventuellement des facteurs inconnus (marqués "?"). H2AK119ub1 stimule en outre l'activité catalytique de PRC2. Les barres obliques signifient "ou". (Comet and Helin, 2014)

III. La protéine EZH2

Un des principaux composants de PRC2 est une protéine de 751 acides aminés appelée EZH2 et dont le gène est situé sur le chromosome 7q35 (Ernst et al., 2010). EZH2 triméthyle l'histone H3K27 et recruterait également des ADN méthyltransférases, des histones désacétylases ou d'autres complexes Polycomb pour réduire l'expression génique de gènes spécifiques, contribuant ainsi à la différenciation et la régénération des cellules souches, au devenir cellulaire, à la régulation du cycle cellulaire, à la sénescence et à la cancérogenèse (Chien et al., 2018; Chou et al., 2015; Li et al., 2017; Shirahata-Adachi et al., 2017).

EZH2 a également des fonctions indépendantes du complexe PRC2.

1. EZH2 en tant qu'activateur transcriptionnel

a. Interactions avec AKT et le récepteur des androgènes

Une autre fonction indépendante de son activité méthyltransférase d'histone est d'agir comme un activateur transcriptionnel. Cela a été montré dans le cancer de la prostate et certains cancers de sein. Dans les cancers du sein de type basal et négatifs pour les récepteurs d'œstrogènes (RE), EZH2 interagit avec le facteur nucléaire kappaB (NF-κB) permettant son activation constitutive. De plus la fonction oncogène de EZH2 dans le cancer de la prostate résistant à la castration (CPRC) est indépendante de son rôle de répresseur transcriptionnel et EZH2 est alors un activateur pour le récepteur des androgènes (RA) (Lee et al., 2011; Xu et al., 2012). Une autre étude montre que la phosphorylation de EZH2 par la voie PI3K/AKT inhibe son activité méthyltransférase et bloque la liaison de EZH2 avec H3 diminuant ainsi la triméthylation et perturbant le silençage favorisant l'oncogénèse (Cha et al., 2005).

b. Interactions avec la voie AKT et JAK/STAT

Dans le glioblastome, la phosphorylation de la sérine 21 de EZH2 (pS21-EZH2) catalysée par AKT, favorise la méthylation du facteur de transcription STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) ce qui permet son activation et contribue ainsi à la malignité du glioblastome. STAT3 à son tour est capable d'activer AKT (Kim et al., 2013; Völkel et al., 2015).

Dans les lymphomes, la phosphorylation de la tyrosine 244 de EZH2 par JAK3 favorise la dissociation du PRC2 ce qui induit une diminution de l'activité méthyltransférase et des niveaux globaux de H3K27me3 (Yan et al., 2016). De plus, JAK3 peut phosphoryler la tyrosine 641 de EZH2 provoquant sa dégradation. EZH2 pourrait également être phosphorylé au niveau de plusieurs résidus de thréonine. En particulier, les kinases cycline-dépendantes (CDK1/2) phosphorylent T350 et T492 de EZH2 (Chen et al., 2010). Dans ces mêmes lymphomes EZH2 favorise directement la transcription de la cycline D1 stimulant la prolifération cellulaire et cet effet est indépendant de son activité enzymatique (Yan et al., 2013).

La surexpression de EZH2 est observée dans le cancer du sein triple négatif qui se lie au promoteur de NOTCH1 augmentant ainsi l'expression et la signalisation de la transcription NOTCH1. Cette liaison est indépendante de l'activité catalytique de EZH2 et accélère la croissance des tumeurs (Gonzalez et al., 2014).

EZH2 active la transcription de c-Myc et de la cycline D1 dans certaines cellules cancéreuses du sein et interagit avec les composants des voies œstrogène et Wnt (β -caténine) pour favoriser la prolifération cellulaire dans ces cellules cancéreuses (Shi et al., 2007).

L'activation de l'axe de signalisation de JAK/STAT et la phosphorylation de EZH2 sont des étapes potentiellement cruciales dans la génération de cellules souches cancéreuses (Rojanasakul, 2013).

2. Interactions avec E2F1

Une analyse ultérieure a révélé une interaction entre EZH2 et le facteur de transcription E2F1 qui contrôle l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération. E2F1 colocalise avec EZH2 sur des sites dépourvus de H3K27me3, permettant l'activation des

gènes nécessaires à la prolifération du cancer, surtout dans les CPRC et dans les lymphomes (Xu et al., 2016).

Dans le glioblastome, E2F1 est présent et induit la transcription de EZH2, favorisant la tumorigénicité de ce cancer (Qiu et al., 2013).

Une coopération fonctionnelle entre EZH2 et le facteur de transcription E2F1 est aussi décrite dans les carcinomes corticosurrénaux humains et leur coopération stimule l'expression des gènes associés à l'agressivité de ce cancer (Tabbal et al., 2019). Toutefois, le rôle de l'activité méthyltransférase de EZH2 dans ce contexte n'est pas encore établi.

3. Interactions avec PAF/ β -caténine

PAF (PCNA-associated factor) est un facteur impliqué dans la synthèse d'ADN translésionnelle (TLS) qui est un processus de réparation de l'ADN. Il est exprimé dans les cancers où la voie Wnt/ β -caténine est hyperactive avec pour conséquence l'aggravation de la situation tumorale. Dans le cancer du côlon, PAF est surexprimé, activant ainsi la voie Wnt qui régule positivement l'expression de la β -caténine. Ensuite, PAF recrute EZH2 pour former un complexe avec la β -caténine, améliorant ainsi la transactivation du gène Wnt indépendamment de l'activité de méthyltransférase de , et induit la tumeur intestinale (Jung et al., 2013).

4. EZH2 en tant que cofacteur

EZH2 est connu pour jouer un rôle clé dans l'inactivation du chromosome X et le développement embryonnaire

Une fonction indépendante de l'activité de la méthyltransférase de EZH2 est son implication dans le point de contrôle de la division cellulaire. EZH2 agit avec la protéine du point de contrôle BubR1 qui assure l'assemblage des kinétochores aux microtubules pour la séparation des chromosomes au cours des divisions cellulaires (mitose et méiose). A l'état normal, BubR1 inhibe l'anaphase tant que le cytosquelette n'est pas prêt. Au moment où ce dernier est prêt, BubR1 est dégradé et l'anaphase commence. BubR1 est acétylé par l'acétyltransférase d'histone PCAF ce qui évite sa dégradation. Indépendamment de son complexe PRC2, EZH2 réagit avec BubR1 et le facteur PCAF pour réguler la mitose et le point

de contrôle cellulaire. Si EZH2 est dérégulé, la division conduira à des cellules aneuploïdes (Figure 16).

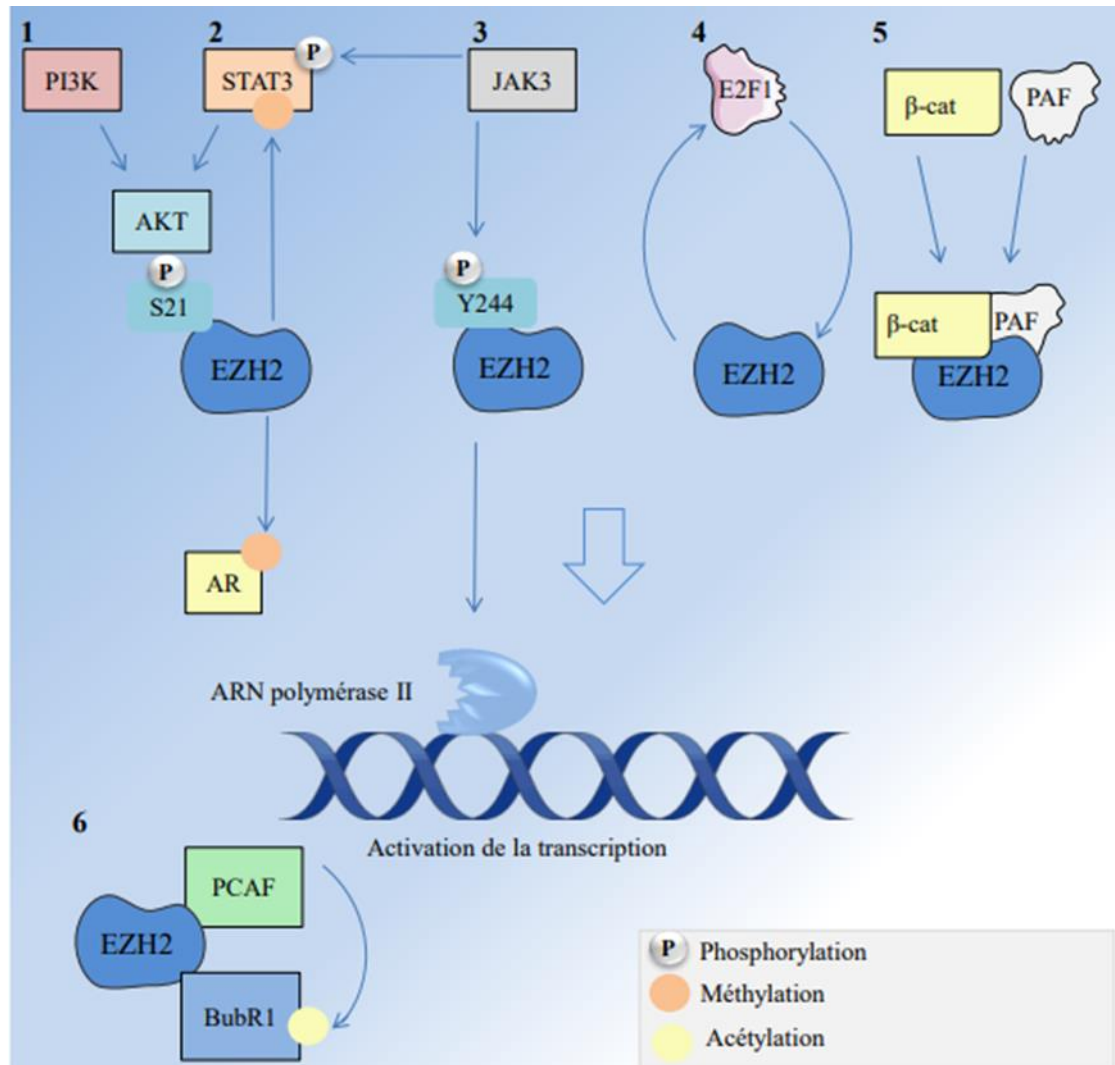


Figure 16 : Activité de EZH2 en tant qu'activateur

L'activité transcriptionnelle de EZH2 peut être déclenchée par la phosphorylation de la sérine 21 par la Kinase AKT, suite à l'activation de la voie PI3K-AKT (1), permettant à EZH2 de méthyler le récepteur aux androgènes (AR) afin d'activer son activité transcriptionnelle. pS21-EZH2 méthyle également le facteur de transcription STAT3 (2), induisant son activation. Comme STAT3 est lui-même capable d'activer AKT, on peut imaginer que son activation par EZH2 conduit à l'activation de la phosphorylation de la sérine 21 de EZH2 par AKT. JAK3 permet normalement l'activation des protéines STAT via leur phosphorylation. De même, JAK3 peut phosphoryler EZH2 sur la tyrosine 244 (3) qui va alors s'associer à l'ARN polymérase II afin de stimuler la transcription de certains gènes. Le facteur de transcription E2F1 stimule l'expression de EZH2 qui peut s'associer en retour à E2F1 afin de stimuler la transcription de gènes (4). Le complexe PAF-β-caténine-EZH2 est recruté au niveau des promoteurs de gènes cibles de la voie Wnt/β-caténine entraînant leur activation (5). BubR1 est un

point de contrôle de l'assemblage des kinétochores lors de la mitose. Afin de ne pas être dégradé précocement, il doit être acétylé par PCAF. Pour cela, EZH2 doit s'associer à ces protéines (6) (Extrait de (Tabbal, 2018).

En effet, l'inhibition de l'activité méthyltransférase de EZH2 par deux inhibiteurs (DZNep et GSK343) a entraîné une diminution de l'activité de la méthyltransférase mais n'a pas eu d'effet sur la migration des chromosomes et la division cellulaire. En revanche si EZH2 est surexprimé, elle entraîne une aneuploïdie cellulaire et un désalignement chromosomique, ce qui suggère que c'est la présence de EZH2 qui est nécessaire et pas son activité méthyltransférase.

Une fonction anormale de EZH2 peut provoquer des troubles liés à la reproduction chez les souris femelles et entraîner une infertilité chez les femmes (Qu et al., 2016).

IV. Rôle de EZH2 dans la physiopathologie

1. Implications pathologiques dans le cancer

Des études montrant une corrélation positive entre le niveau d'expression de EZH2 et le grade tumoral dans différents types de cancers (leucémie, lymphome, cancers de la prostate, du sein, du poumon et du rein). La surexpression de EZH2 a été signalée comme favorisant la prolifération cellulaire à la fois *in vitro* et *in vivo* et peut également stimuler l'invasion cellulaire et les métastases et compromettre la réparation des dommages à l'ADN, conduisant alors à un mauvais pronostic (Comet et al., 2016). Cette surexpression conduit à une accumulation accrue de H3K27me3 au niveau de gènes cibles régulés par les PRC2 normaux, ce qui entraîne une répression des gènes et surtout des gènes suppresseurs de tumeurs.

Chez des patients atteints de cancer du poumon à petites cellules, des études ont montré une expression élevée de EZH2 associée à une progression des métastases et une répression des niveaux de H3K27me3 et des gènes suppresseurs de tumeurs comme JUB (Sato et al., 2013). De même, EZH2 dans le carcinome épidermoïde de la tête et du cou entraîne une condensation de la chromatine ainsi qu'une hyperméthylation en inhibant le gène suppresseur de tumeur Rap1GAP qui est un membre de la sous-famille ras des petites GTPases impliquées dans les voies de signalisation contrôlant la croissance et la

différenciation cellulaires (Banerjee et al., 2012). La surexpression de EZH2 dans le cancer pourrait être liée à un mécanisme intéressant de silençage par la répression de gènes différenciateurs tels que p16, p19 et E-cadhérine (Deb et al., 2014). Dans le cancer de l'ovaire, la surexpression de EZH2 provoque l'angiogenèse en réduisant l'expression de la vasohibine1 (VASH1) qui est un régulateur négatif spécifique des cellules endothéliales de l'angiogenèse, ce qui provoque une augmentation de la vascularisation et de la prolifération tumorale (Lu et al., 2010). Dans le cancer du sein, la surexpression de EZH2 provoque une inhibition de RAD51 qui est un gène de réparation de l'ADN ce qui provoque l'accumulation de défauts génomiques en dérégulant la signalisation RAF1-ERK- β -caténine (Chang et al., 2011). De même, des niveaux élevés de EZH2 entraînent la répression transcriptionnelle de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs tels que FOXC1, RKIP, CDKIC, RUNX3 qui sont impliqués dans la migration, l'invasion et la croissance des cellules tumorales du sein. De plus, dans le cancer de la prostate, la surexpression de EZH2 conduit à la désactivation associée à la méthylation de H3K27 des gènes suppresseurs de tumeurs critiques, tels que DAB2IP, MSMB, SLIT, TIMP-2 et TIMP-3, qui contribuent au phénotype invasif (Deb et al., 2013).

La dégradation de la matrice extracellulaire est nécessaire à l'initiation des métastases, et est déterminée par un équilibre entre l'action des MMPs (Matrix metalloproteinases) et de leurs inhibiteurs, les TIMPs (Tissue Inhibitors of metalloproteinases). La surexpression de EZH2 favorise la dégradation de la matrice dans le cancer de la prostate en inhibant les TIMP (Shin and Kim, 2012).

D'autre part, dans le cancer du poumon, l'acétylation de la lysine 348 de EZH2 augmente la migration et l'invasion des cellules cancéreuses ce qui est associé à un mauvais pronostic (Wan et al., 2015).

En outre, des études récentes montrent que EZH2 est surexprimée dans le DMG exprimant le mutant H3K27M, condition requise pour favoriser la croissance des cellules tumorales en réduisant le niveau de H3K27me3 et en réprimant la protéine p16 qui est un régulateur critique de la transition de phase G0-G1 à S (Cordero et al., 2017; Tatavosian et al., 2018; Zhang et al., 2017).

De plus, EZH2 facilite la dégradation dépendant de la méthylation de ROR α , inhibant ainsi le rôle de suppresseur de tumeur exercé par ROR α qui est un récepteur nucléaire orphelin lié à

l'acide rétinoïque α (ROR α) qui agit comme un inhibiteur de la croissance du cancer (Lee et al., 2012).

Ces données mettent en lumière le rôle de EZH2, dépendant ou non de PRC2 et de son activité méthyltransférase, mais EZH2 peut aussi exercer des actions indépendantes de ses propriétés de méthylation. A titre d'exemple, dans le cancer du sein, le gène suppresseur de tumeur BRCA1 est contrôlé par EZH2, dont la surexpression conduit à l'exportation nucléaire de BRCA1 et est suffisante pour déclencher une mitose aberrante et des modifications chromosomiques. Cette exportation nécessite l'activation du signal PI3K/Akt-1 (Gonzalez et al., 2011).

2. Mutations de EZH2 et développement tumoral

Dans certains types de cancer, on rencontre des mutations gain de fonction de EZH2, surtout dans les lymphomes, et des mutations perte de fonction dans certaines leucémies.

Les mutations gain de fonction : dans les lymphomes folliculaires et les lymphomes diffus à cellules B, des mutations somatiques de la Tyr641 de EZH2 peuvent entraîner une augmentation de l'état triméthylé de l'histone H3K27. Cette augmentation est due à la coopération de EZH2 de type sauvage (WT) - qui catalyse la méthylation de H3K27m0 plus efficacement que celle de H3K27m1 ou H3K27m2 - et du mutant EZH2, qui a une efficacité catalytique faible avec H3K27m0 comme substrat mais bien plus élevée que celle de EZH2 WT pour H3K27me1 ou 2. Par conséquent, le développement du cancer nécessite deux formes de EZH2 : WT et mutée. Il s'agit du premier exemple de maladie humaine qui dépend de l'activité coordonnée de fonctions enzymatiques mutantes et normales (Sneeringer et al., 2010). Une autre mutation de EZH2 qui remplace l'alanine 677 par une glycine (A677G) entraîne une augmentation du niveau de H3K27me3. Cependant, contrairement aux mutants Y641, qui perdent leur activité avec le substrat H3K27me0, cette substitution préserve l'interaction clé dans EZH2 WT, mais « agrandirait » le site de liaison permettant ainsi à EZH2 mutant d'utiliser aussi H3K27m1 ou H3K27m2 comme substrats de méthylation. Cette mutation offre une solution inédite pour les cellules pour déréguler la méthylation de H3K27 sans avoir à coopérer avec EZH2 WT, contrairement aux mutants Y641 de EZH2 (McCabe et al., 2012a).

Les mutations de perte de fonction de EZH2 : elles correspondent à des codons d'arrêt prématurés ou des changements dans le cadre de lecture (Nikoloski et al., 2010). Des

mutations dans d'autres gènes peuvent affecter le niveau de EZH2 ou son activité. A titre d'exemple, des mutations affectant les protéines splicéosomales telles que le facteur d'épissage SRSF2 (Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 2) modifieront l'épissage de , entraînant une régulation négative continue de l'expression de la protéine EZH2 et donc de H3K27me3 entier, favorisant ainsi le développement des leucémies (Kim et al., 2015) . Des mutations de perte de fonction ont également été décrites dans les 2 sous-unités de PRC2, SUZ12 et EED, dans la tumeur maligne du nerf périphérique (MPNST). On peut ajouter que la perte de SUZ12 stimule également le développement d'autres types de tumeurs, y compris le sarcome histiocytaire, le gliome de haut grade, le lymphome et l'angiosarcome, suggérant une fonction suppressive de tumeur potentielle de SUZ12 dans plusieurs types de tumeurs. Enfin, les mutations K27M sont décrites dans environ 80 % des gliomes (DMG), G34R dans 30 % des astrocytomes pédiatriques de haut grade, G34W/L dans 90 % des tumeurs à cellules géantes de l'os et K36M dans 95 % des chondrosarcomes. En ce qui concerne les DMG, sujets d'études de cette thèse, la mutation H3K27M inhibe l'activité de PRC2 et entraîne une diminution globale de l'abondance de H3K27me3 (Wassef and Margueron, 2017).

De plus des mutations inactivantes de EZH2 suggèrent une fonction suppressive de EZH2 dans les syndromes myélodysplasiques et myéloprolifératifs, la myélofibrose, la leucémie myélo-myocytaire chronique (LMC), la leucémie myéloïde chronique atypique, où ces mutations inactivantes de EZH2 contribuent à la formation et l'aggravation du cancer ainsi qu'à un mauvais pronostic (Hervioui et al., 2015; Iwama, 2017).

Des études récentes suggèrent que EZH2 pourrait avoir un double rôle dans la pathogenèse des cancers, agissant comme un oncogène ou un suppresseur de tumeur selon le type de cancer.

Pour conclure, toutes les mutations décrites ci-dessus aboutissent à la progression du cancer mettant en évidence le rôle crucial d'EZH2 ainsi que de PRC2 dans la cancérogenèse (**Figure 17**).

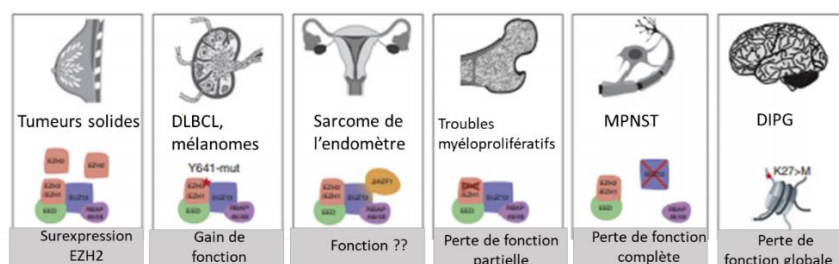


Figure 17 : Altérations de PRC2 dans les cancers.

Adapté de (Wassef & Margueron, 2017).

3. EZH2, un oncogène ou un suppresseur de la progression tumorale

Diverses études menées sur EZH2 dans plusieurs cancers ont montré son double rôle selon le type ou l'état de la tumeur. De nombreux modèles animaux ont été développés afin de déterminer si EZH2 est plus impliqué dans la l'activation ou l'inhibition de la progression tumorale. Dans ces modèles, la stratégie de l'expérimentateur consiste à supprimer ou surexprimer EZH2 ou d'autres sous-unités de PRC2.

Des cellules du cancer de la prostate humain exprimant EZH2 ont été injectées dans des souris. Ces expériences ont mis en évidence le rôle de EZH2 dans l'initiation et le déclenchement des métastases par l'inhibition de DAB2IP, conduisant à l'activation de la voie de signalisation Ras et NF- κ B. Ces expériences ont montré le rôle oncogénique de EZH2 (Min et al., 2010).

De même, l'utilisation d'inhibiteurs de EZH2, par exemple EPZ-6438, a montré que EZH2 est nécessaire pour la croissance tumorale dans un modèle murin de xénogreffe de cellules cancéreuses du rein (G-401) (Knutson et al., 2013). De plus, dans un modèle murin de xénogreffe de myélome, l'injection sous cutanée des cellules cancéreuses après l'ajout de l'inhibiteur de EZH2 UNC1999 a remarquablement inhibé la croissance des cellules de myélome *in vivo* (Rizq et al., 2017).

L'inactivation de EZH2 par un ARN interférent *in vivo* dans des cellules de cancer d'ovaire humain injectées dans des souris réduit la prolifération et l'angiogenèse tumorale (Lu et al., 2010).

EZH2 est un suppresseur de tumeur dans d'autres contextes de cancer.

La suppression de EZH2 dans le pancréas d'un modèle présentant une mutation de KRas induit la formation des tumeurs pancréatiques et un échec de la régénération pancréatique. Dans ce cas on peut conclure que, EZH2 a un rôle de suppresseur de tumeur (Mallen-St. Clair et al., 2012).

L'activité suppressive de tumeur de EZH2 a été validée *in vivo* chez la souris par l'inactivation conditionnelle de EZH2 ; son absence est corrélée à une diminution notable des niveaux globaux de H3K27me2/3 et au développement d'une leucémie T-cell (T-ALL) avec augmentation du volume de la rate et des ganglions lymphatiques (Simon et al., 2012).

Dans un cas, EZH2 présente une fonction oncogénique alors que dans un autre, il agira plutôt comme un suppresseur de tumeur. Pourtant d'autres données suggèrent que les choses sont bien plus complexes qu'il n'y paraît.

Dans le cancer du sein, l'absence de EZH2 ainsi que l'altération de l'activité de PRC2 peut augmenter la tumorigenèse et favoriser l'instabilité transcriptomique dans des modèles murins (Wassef et al., 2015). On peut dire que EZH2 protège les tissus mammaires. En revanche, dans un modèle xéno greffe de cellules tumorales, la surexpression de EZH2 est liée à la progression du cancer et perturbe les protéines de réparation des dommages à l'ADN ce qui conduit à l'accumulation du gène RAF1 ainsi qu'à l'activation de la p-ERK- β -caténine (Chang et al., 2011). Dans un même tissu, le sein, EZH2 possède donc deux fonctions différentes. De même, dans le sang, dans un modèle de souris développant des leucémies myéloïdes aigües, l'inhibition de EZH2 réduit considérablement le développement du cancer. Dans ce contexte, on peut donc supposer que EZH2 agit comme un oncogène (Tanaka et al., 2012). Toutefois, l'invalidation de EZH2 dans la moelle osseuse de souris induit le développement de leucémies (Simon et al., 2012), suggérant que dans le même contexte cellulaire, EZH2 est potentiellement un suppresseur de tumeurs.

En conclusion, pour un tissu donné, la fonction de EZH2 dépend du stade de la tumeur ainsi que de son microenvironnement.

Tableau 3 : Rôle de EZH2 dans différents cancers

EZH2		
	Oncogène	Suppresseur de tumeur
Type de cancer	Sein	Syndrome myéloprolifératif et myélodysplasique
	Foie	Pancréas
	Ovaires	Leucémie T cell
	Prostate	
	Poumons	
	Lymphomes diffus à grandes cellules B	
	Lymphomes folliculaires	
	Diffuse midline glioma	

V. Inhibiteurs de EZH2/PRC2

1. Inhibiteurs EZH2

Comme diverses études ont montré l'implication de EZH2 dans le développement de plusieurs types de cancers, des drogues ciblant cette protéine ont été développées. Parmi ces inhibiteurs, la 3-désazaneplanocine A (DZNep), un inhibiteur de la S-adénylhomocystéine hydrolase, a été utilisée pour traiter plusieurs cancers (Dagd Demir et al., 2016; Sha et al., 2015; Tan et al., 2007) . Il a été rapporté que DZNep inhibe la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) et la lysine 20 de l'histone H4 (H4K20me3) levant ainsi la répression des gènes (Miranda et al., 2009). DZNep n'est cependant pas spécifique de EZH2.

Des efforts importants ont été déployés au cours des dernières années pour obtenir des composés qui soient puissants et hautement sélectifs pour EZH2.

La famille des EPZ (Epizyme) : les mutations de Y641 et A677 qui rendent EZH2 hyperactive sont retrouvées dans les lymphomes. Plusieurs inhibiteurs compétitifs pour la SAM ont été testés et parmi eux le composé EPZ005687 qui inhibe l'activité méthyltransférase de EZH2 et détruit sélectivement les cellules de lymphome en favorisant l'apoptose. EPZ005687 est 500 fois plus spécifique pour EZH2 que pour d'autres méthyltransférases d'histones et 50 fois plus spécifique de EZH2 que de EZH1 (Knutson et al., 2012). Un autre inhibiteur oral de EZH2, EPZ6438 (tazémétostat), est actuellement en cours d'évaluation dans un essai clinique de phase 1/2 chez des patients atteints de lymphomes à cellules B et de tumeurs solides avancées (Yamagishi and Uchimar, 2017). DS-3201b est un nouvel inhibiteur double EZH1/2 disponible par voie orale, et il est évalué cliniquement chez les patients atteints de lymphomes non hodgkiniens (Yamagishi and Uchimar, 2017).

UNC1999 : c'est le premier inhibiteur biodisponible oralement qui a une activité contre EZH2 très élevée *in vitro*. Il est doublement sélectif de EZH1 et EZH2, réduit fortement les niveaux de H3K27me3 dans les cellules et induit sélectivement la mort des cellules de lymphome porteuses de la mutation Y641N (Tan et al., 2014).

La famille des GSK (GlaxoSmithKline) : ces composés de GlaxoSmithKline sont des inhibiteurs compétitifs de la SAM (Diaz et al., 2012). L'un d'eux, GSK-A, réduit l'abondance de la marque H3K27me3 dans les cellules cancéreuses du sein. Il est à la base du développement d'autres inhibiteurs compétitifs du site SAM.

Un inhibiteur puissant de EZH2 est le GSK126 qui a été utilisé dans différents types de cancers et a prouvé son efficacité *in vitro* et *in vivo*, comme dans les lymphomes et les gliomes pédiatriques où il y a entraîné une diminution de la croissance tumorale. Le GSK126 est 1000 fois plus spécifique de EZH2 que d'autres histones méthyltransférases et 150 fois plus spécifique de EZH2 que de EZH1 qui possède un domaine SET identique à 96 %. Le GSK126 est l'un des nombreux composés candidats actuellement en cours d'évaluation dans des essais précliniques et cliniques (Huang et al., 2019 ; McCabe, Ott, et al., 2012). Ses caractéristiques sont développées plus loin dans mon manuscrit.

Plusieurs autres inhibiteurs dirigés contre EZH2 ont été développés depuis lors, y compris GSK503, GSK343 et CPI-1205. Les GSK343 et GSK503 sont structurellement apparentés à GSK126 et inhibent à la fois EZH2 WT et mutant avec une efficacité similaire. CPI-1205 est un inhibiteur de EZH2 disponible par voie orale avec une sélectivité d'environ 23 fois supérieure pour EZH2 que pour EZH1 (Lue and Amengual, 2018).

Tableau 4 : Quelques inhibiteurs de EZH2 et leur spécificité.

D'après Lue & Amengual (2018).

	Spécificité	Progrès Cliniques	IC ₅₀ (nM)
DZNep	EZH2 (très faiblement)	-	
EPZ005687	EZH2	Phase Préclinique	54
EPZ6438	EZH2	Phase clinique en cours	54
UC1999	EZH1 et EZH2	Phase Préclinique	10,45
CPI-1205	EZH2	Phase I	2
GSK343	EZH2	Phase Préclinique	4
GSK126	EZH2 et EZH1	Phase I	9,9

2. Inhibiteurs du complexe PRC2

Une autre approche pharmacologique consiste à cibler le complexe PRC2. Cette stratégie alternative pour le ciblage sélectif de l'activité de la méthyltransférase EZH2 consiste à perturber l'interaction de EZH2 et EED par une hélice α synthétique mimant EED. Elle permet l'inhibition de l'activité oncogénique des cellules de leucémie ainsi que la différenciation des macrophages (Kim et al., 2013). En 2017, Qi et ses collègues ont découvert EED226, un

inhibiteur puissant et sélectif de PRC2 qui se lie directement à EED. Il empêche la reconnaissance de la marque H3K27me3 par EED. EED226 induit un changement de conformation de EED et diminue alors l'activité du complexe PRC2 (Qi et al., 2017). A-395, un puissant antagoniste de la liaison H3K27me3 de l'EED, inhibe également la liaison de EED à H3K27me3 et possède une activité antitumorale (He et al., 2017).

Bien que de nombreux types de cancer surexpriment EZH2, les données bibliographiques ci-dessus montrent qu'ils ne sont pas forcément tous tributaires de EZH2 pour croître et la surexpression de EZH2 peut même être une stratégie de défense contre le développement de tumeurs. De plus, EZH2 présente plusieurs modes d'action qui peuvent être mobilisés différemment selon le type de tumeur ou l'état du processus tumoral. Par conséquent, les stratégies de traitement par ciblage de EZH2 doivent prendre en compte toutes ces questions afin d'offrir une chance de succès.

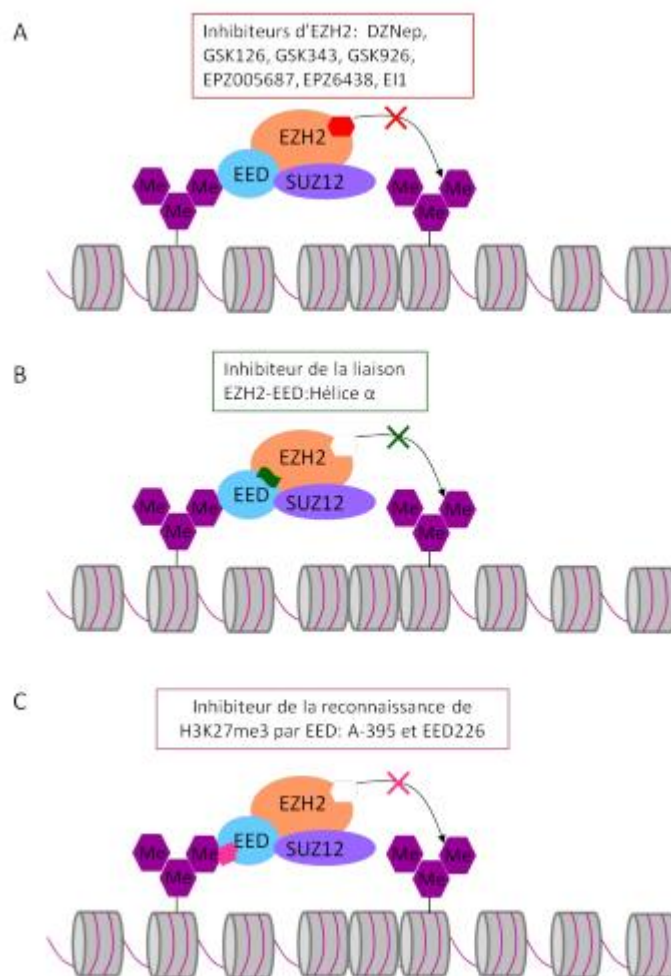


Figure 18 : Inhibition de EZH2.

A) Utilisation de molécules compétitrices de la SAM comme le DZNep, un inhibiteur pour toutes les histones méthyltransférases. Les molécules de la famille GSK et EPZ sont plus spécifiques de EZH2. B) Le complexe PRC2 peut être dissocié par un peptide en hélice α qui inhibe la liaison de EZH2 avec EED. C) L'inhibition de la reconnaissance de H3K27me3 par EED permet de diminuer l'abondance de la marque épigénétique (He et al., 2017).

VI. GSK126 – un inhibiteur de EZH2

1. Structure et mode d'action

GSK126 est un inhibiteur de EZH2 qui comporte un groupement pyridone qui est son principe actif principal car il occupe partiellement le site pour le co-substrat SAM dans la poche de liaison de l'enzyme. Cela explique pourquoi son mécanisme d'action est compétitif vis-à-vis de la SAM. Il se compose d'une région dite « tête » de pyridone, une région « cou » de liaison amide, une région de « corps » et des structures de « bras » et de « queue » (**Figure 19**) (Bratkowski et al., 2018; Fioravanti et al., 2018). Le GSK-126 est connu comme un inhibiteur de l'activité de EZH2 et considéré comme un médicament anti-tumoral potentiel (Wang et al., 2021).

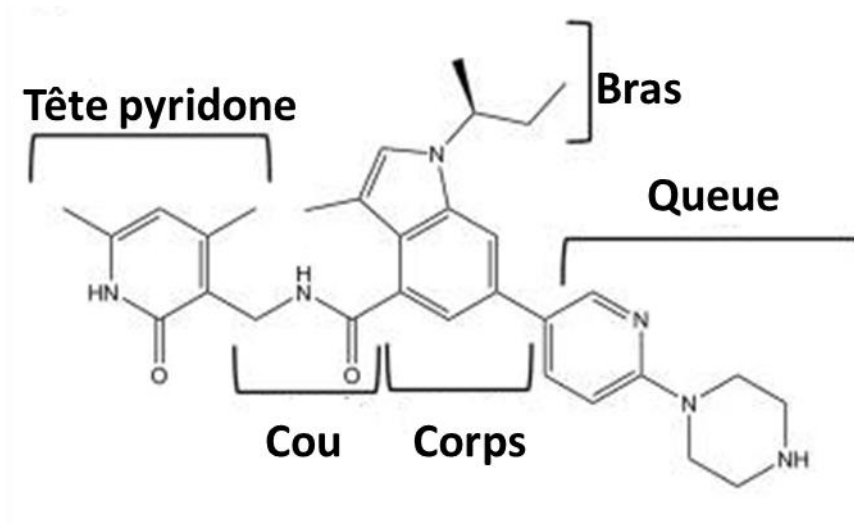


Figure 19 : Structure de GSK126.

Comme EZH2 est surexprimé dans divers types de cancers, l'inhibition de son activité par les inhibiteurs chimiques a été largement utilisée et a montré une efficacité *in vitro* et *in vivo*. GSK126 a été utilisé pour traiter le cancer du myélome multiple MM, où il a révélé son

efficacité en éliminant les cellules du MM, en induisant leur apoptose. Il inhibe totalement l'expression de l'histone H3K27me3 *in vitro*. Son effet anti-tumoral a aussi été prouvé *in vivo* avec un modèle de souris xéno greffe de myélome multiple (Zeng et al., 2016).

Dans le cancer de la prostate, GSK126 a présenté un effet significatif à partir d'une dose de 50 µM sur la diminution de la croissance cellulaire et l'induction de l'apoptose. De plus il a inhibé significativement la migration et l'invasion tumorales et cela était dû à son action sur la transition épithélio-mésenchymateuse (Lin et al., 2016).

Une étude de 2016 menée sur des tumeurs solides (cancer du poumon et cancer gastrique) a montré que GSK126 inhibe la migration cellulaire pour les deux types de cancers *in vitro* et *in vivo*, bloque l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* par la réduction de l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF-A. GSK126 peut donc être un candidat pour traiter les tumeurs solides (Chen et al., 2016).

ARID1A appartient à la famille SWI / SNF possédant des activités hélicase et ATPase et censés réguler la transcription de certains gènes. Dans l'adénocarcinome ovarien à cellules claires avec mutation de ARID1A, GSK126 inhibe la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro* et empêche la formation des tumeurs *in vivo* après injection des cellules d'adénocarcinome ovarien dans la cavité abdominale des souris. Ainsi GSK126 est considéré comme une des molécules les plus actives pour traiter ce cancer (TAKEDA et al., 2016).

Récemment, une étude du carcinome épidermoïde de la langue a aussi montré l'efficacité de GSK126 sur l'inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose (Liu et al., 2020).

Dans le carcinome hépatocellulaire (CHC), l'immunité innée peut jouer un rôle important pour limiter la progression de la tumeur grâce aux cellules tueuses NK (Natural Killer). Le nombre de ligands des NK du groupe 2D (NK2D) est régulé à la baisse dans le CHC. Bulgide et al ; (2018) ont montré que EZH2 est un répresseur de l'expression de ces ligands donc diminue l'éradication des cellules cancéreuses par les NK. Le traitement par des inhibiteurs de EZH2, dont GSK126, a entraîné une augmentation de la cytotoxicité induite par les cellules NK envers les cellules de CHC (Bugide et al., 2018).

Chez les patients atteints de mélanome uvéal, la surexpression de EZH2 est associée à un mauvais pronostic dû à l'induction de métastases hépatiques. Or l'inhibition de EZH2 par GSK126 a été validée comme cible thérapeutique contre la formation de ces métastases et il a été montré que GSK126 a une action inhibitrice sur les cellules tumorales circulantes (CTC) (Jin et al., 2020).

GSK126 est aussi actif dans des processus normaux physiologiques indépendamment d'un contexte de cancer. En effet, EZH2 joue un rôle important dans la formation des os, mais son inhibition qui induit une réduction de la triméthylation peut favoriser une expression des gènes impliqués dans la signalisation osseuse qui étaient bloqués par la triméthylation. La combinaison de GSK126 et BMP2 (protéine morphogénétique osseuse) augmente la différenciation des ostéoblastes et améliore la cicatrisation osseuse intramembraneuse *in vivo*. BMP2 est utilisé en clinique pour des indications orthopédiques, y compris la guérison des fractures tibiales et la fusion, mais cette utilisation est limitée à cause de son coût élevé et des effets secondaires. Or l'association de BMP2 avec GSK126 a permis de réduire le coût et les effets secondaires tout en améliorant la différenciation osseuse (Dudakovic et al., 2020).

De plus, il existe une relation entre l'épigénétique et l'obésité. En effet, l'activité méthyltransférase de EZH2 est importante pour la différenciation des adipocytes blancs et bruns. L'utilisation de GSK126 pour inhiber EZH2 peut être un agent thérapeutique pour réguler l'obésité. D'après une étude réalisée en 2018, le traitement de souris par le GSK126 après un régime riche en graisse a montré une réduction de la graisse corporelle, une augmentation de la lipolyse et une amélioration de la tolérance au glucose et une inhibition la différenciation des adipocytes blancs (Wu et al., 2018).

2. Études cliniques

Dans une étude déjà en cours (NCT02082977), GSK126 est administré 2 fois par semaine par voie intraveineuse dans deux groupes : dans le premier groupe, les patients sont atteints d'un lymphome diffus à grandes cellules B récidivant/réfractaire (DLBCL), d'un lymphome folliculaire transformé, d'autres lymphomes non hodgkiniens (LNH), de tumeurs solides (y compris un cancer de la prostate résistant à la castration) et d'un myélome multiple (MM) ; dans le deuxième groupe, les patients sont atteints de lymphome B diffus à cellules B (EZH2 sauvage) et de lymphome diffus à grandes cellules B et de myélome (EZH2 muté).

La phase I a pour but de déterminer la dose de GSK126 maximale permise, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie. Pour les patients atteints de lymphomes à cellules B et des cancers solides, GSK126 est administré (dose entre 50 et 3000 mg) 2 fois par semaine pendant 3 semaines suivies d'1 semaine de repos (durée de 28 jours). La demi-vie

d'élimination de la drogue était en moyenne d'environ 27 heures. Les résultats du traitement ont montré qu'il n'y a pas de changement dans le taux de H3K27me3, et 34 % des patients ont vu une stabilisation de la maladie, un patient atteint de lymphome a montré une réponse partielle, 41 % ont vu une progression de la maladie et les réponses de 5 patients n'ont pas pu être évaluées. Cette étude a pu montrer qu'une dose de 2400 mg est la dose maximale de GSK126 qui puisse être administrée aux patients mais comme GSK126 a une demi vie courte *in vivo*, cela limite son utilisation de façon efficace et peut expliquer la faible activité anticancéreuse observée (Yap et al., 2019). Face à ces résultats, l'étude a été arrêtée.

VII. Conclusion

La protéine EZH2 joue un rôle dans divers cancers, soit un oncogène, soit un suppresseur de tumeur. Dans le cas du gliome infiltrant du tronc cérébral (DMG), nous avons conduit une analyse du transcriptome de 35 patients atteints de DMG. Cette analyse a mis en évidence une surexpression de la méthyltransférase EZH2 associée à un mauvais pronostic. Cette analyse permet de supposer un rôle de EZH2 dans la pathogénèse des DMG et son inhibition est une cible potentielle pour traiter ce cancer. L'inhibition de EZH2 par l'inhibiteur sélectif GSK126, a montré une régulation à la hausse des protéines liées à la biosynthèse du cholestérol d'après une analyse protéomique que nous effectuée. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'inhibition de EZH2 par GSK126 rend les cellules de gliome DMG dépendantes de la biosynthèse du cholestérol, donnant ainsi la possibilité d'explorer l'utilisation de statines ou d'autres médicaments réducteurs de lipides pour traiter cette pathologie.

Chapitre 3 : Le cholestérol dans l'homéostasie physiologique et dans le cancer

Le rôle du cholestérol dans les maladies cardiovasculaires est établi depuis de nombreuses années et son excès dans le sang constitue un facteur de risque majeur d'accident cardiovasculaire (Jia et al., 2019; Soliman, 2019; Wang et al., 2017). De nos jours, le rôle du cholestérol va au-delà des maladies cardiovasculaires et il est reconnu comme étant un facteur important dans les cancers et les troubles neurodégénératifs.

Le cholestérol (cholest-5-en-3 β -ol) est considéré comme une molécule de type lipidique et l'un des composants structurels les plus importants des membranes cellulaires où son abondance est variable. Il joue plusieurs rôles mécaniques sur la membrane allant de sa structuration à sa fluidité ainsi qu'un rôle métabolique plus complexe. Il est également un précurseur de la synthèse d'hormones stéroïdiennes ainsi que de vitamines (Albuquerque et al., 2018; Róg et al., 2009)

I. Le cholestérol

1. Structure

Le cholestérol est un composé contenant 27 atomes de carbone et 46 atomes d'hydrogène, plus un atome d'oxygène (C₂₇H₄₆O). Il est formé d'un noyau tétracyclique stérol, composé de quatre cycles carbonés notés A, B, C ou D, d'une chaîne iso-octyl en position 17 et d'une fonction alcool. Il est considéré comme un composé hydrophobe de base, mais la présence d'un groupement hydroxyle sur son carbone 3 forme sa tête polaire donc hydrophile et confère alors au cholestérol son caractère amphiphile (Allen et al., 2007; Ohvo-Rekilä et al., 2002) (**Figure 20**).

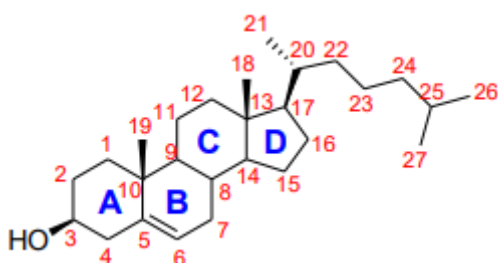


Figure 20 : Structure du cholestérol

2. Sources

La source du cholestérol est soit endogène, soit exogène. L'apport endogène est assuré par le foie qui est l'organe principal où a lieu la biosynthèse du cholestérol alors que l'apport exogène provient de l'alimentation. Chez l'homme, l'apport quotidien par la nourriture serait de 300 à 500 mg alors que la biosynthèse produirait de 600 à 900 mg par jour. Une partie du cholestérol est dégradée en acides biliaires qui sont ensuite secrétés dans la bile, puis excrétés dans l'intestin grêle. Le cholestérol est utilisé pour le renouvellement des membranes cellulaires et la synthèse des hormones stéroïdiennes. Dans des conditions physiologiques normales, l'apport en cholestérol et son utilisation maintiennent en équilibre les niveaux de cholestérol dans le corps (Repa and Mangelsdorf, 2000).

Le cholestérol exogène est capté au niveau de l'intestin, il est distribué aux tissus par les lipoprotéines de faible densité (LDL) depuis le foie. Les LDL se lient à leurs récepteurs situés sur la membrane plasmique (LDLR), et sont enrobés dans des endosomes. Les lipides dans les LDL sont hydrolysés pour donner du cholestérol libre qui est ensuite redistribué dans toute la cellule. Ce cholestérol libre peut aider à former la structure des membranes cellulaires, être estérifié par l'acylCoA Cholestérol Acyl transférase (ACAT) pour un stockage sous forme d'esters, aidant ainsi à la constitution du stock de cholestérol dans les cellules. Le cholestérol est éliminé par les lipoprotéines de haute densité (HDL) qui transportent le cholestérol vers le foie où il servira de précurseur pour la synthèse des acides biliaires (**Figure 21**) (Chang et al., 2006; Rogers et al., 2015).

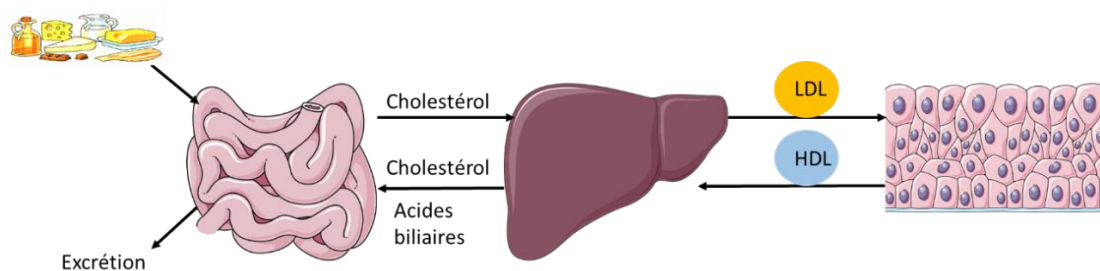


Figure 21 : Circulation du cholestérol dans le corps.

Le cholestérol provenant de l'alimentation est absorbé au niveau de l'intestin et exporté vers le foie qui le redistribue aux tissus périphériques dans les lipoprotéines de faible densité (LDL). Le transport inverse correspond à l'élimination du cholestérol des tissus périphériques vers le foie dans les particules HDL (lipoprotéines de haute densité) puis le foie le convertit en acides biliaires déversés au niveau de l'intestin pour leur excrétion.

3. Biosynthèse

La biosynthèse du cholestérol se déroule dans l'organisme en plusieurs étapes. C'est un processus complexe nécessitant l'intervention d'une grande chaîne d'enzymes. La première étape commence par la synthèse de mévalonate à partir d'acétate. La condensation de deux molécules d'acétyl-CoA pour former l'acétoacétyl-CoA est catalysée par la thiolase. Ensuite, la HMG-CoA synthase catalyse la réaction entre l'acétoacétyl-CoA et une autre molécule d'acétyl-CoA pour former le HMG-CoA. Enfin la synthèse de mévalonate est accomplie par la HMG-CoA réductase qui est l'étape limitante de la synthèse du cholestérol. La prochaine étape implique la conversion du mévalonate en deux isoprènes activés (isopentanyl-5-pyrophosphate et diméthylallyl pyrophosphate). La condensation des isoprènes activés forme le squalène qui est le précurseur biochimique de tous les stéroïdes. À son tour, le squalène subit une série de changements pour être converti en lanostérol qui subit à son tour plusieurs réactions enzymatiques qui aboutissent à la synthèse du cholestérol (Cerqueira et al., 2016) (**Figure 22**).

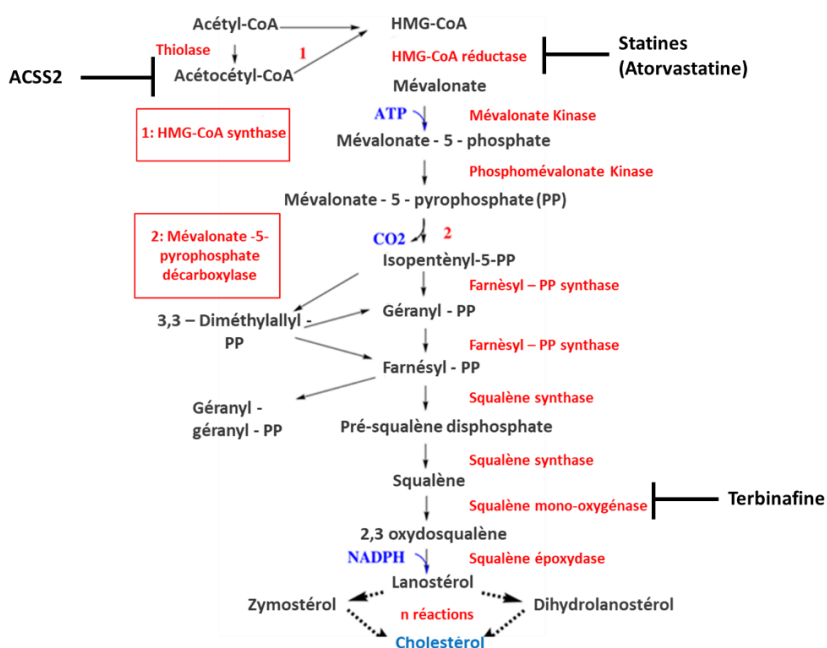


Figure 22 : Étapes de la biosynthèse du cholestérol

La biosynthèse du cholestérol se fait en plusieurs étapes par l'intermédiaire de plusieurs enzymes. Les statines comme l'atorvastatine, l'inhibiteur d'ACSS2 et la terbinafine sont des inhibiteurs utilisés pour inhiber certaines enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol. HMG : 3-Hydroxy-3-Méthyl-Glutaryl, ACSS2 : acetate-dependent acetyl-CoA synthetase 2. Adapté de (<http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/3CoursdeBiochSTRUCT/6HMGcoAreductase/1HMGcoAreductase.htm>)

4. Rôles physiologiques

Le cholestérol joue un rôle vital dans le bon fonctionnement des cellules. Dans les membranes cellulaires, il interagit avec les phospholipides et les sphingolipides pour moduler la rigidité de la bicouche membranaire et diminuer sa perméabilité à l'eau, aux ions et aux gaz. Cependant, les membranes avec une teneur plus élevée en cholestérol auront tendance à être plus rigides et compactées, tandis que celles avec moins de cholestérol seront plus fluides à 37 °C. De plus, le cholestérol est impliqué dans le processus d'endocytose. Au niveau de l'organisme, le cholestérol est considéré comme le précurseur des hormones stéroïdiennes produites par les glandes surrénales (cortisol, corticostérone), des hormones sexuelles, telles que les œstrogènes (œstradiol), les progestagènes (progésterone), les androgènes (testostérone), les acides biliaires et de la vitamine D. Cette vitamine est nécessaire au processus d'ossification pendant et après la croissance et de plus favorise la reproduction (Cerqueira et al., 2016; Cortes et al., 2013, 2014).

Le cholestérol est impliqué dans l'activation de protéines telles que Sonic hedgehog (Shh) dans la voie Patched qui est essentielle au développement, à la prolifération et au maintien des cellules souches (Blassberg and Jacob, 2017).

Enfin, plusieurs études ont montré un rôle protumoral du cholestérol dans différents types de cancer tels que le mélanome ou le cancer de la prostate (Kuzu et al., 2016).

5. Homéostasie

L'homéostasie du cholestérol est essentielle à une fonction cellulaire normale. Ainsi, la perturbation de l'homéostasie du cholestérol est à l'origine de maladies cardiovasculaires mais aussi de maladies neurodégénératives et observée dans certains cancers. La question se pose de savoir comment les cellules mesurent le taux de cholestérol et envoient des signaux pour contrôler son apport.

Plusieurs études ont permis de mieux comprendre la régulation du métabolisme du cholestérol cellulaire qui résulte d'un équilibre entre l'apport extérieur par les LDL, la synthèse *de novo* (voie du mévalonate) et le stockage sous forme d'esters (Luo et al., 2020).

L'homéostasie cellulaire du cholestérol est maintenue grâce à divers contrôles par rétroaction des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels. Ainsi, les protéines de liaison aux éléments de réponse aux stérols (SREBP) sont les contrôleurs majeurs de la transcription de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, tels que

HMGCR (Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase) et *LDLR* (Low Density Lipoprotein Receptor). SREBP se trouve dans le réticulum endoplasmique (RE) sous 2 isoformes : SREBP-1c qui est impliqué dans la synthèse des acides gras et SREBP-2 qui est dédié à la synthèse du cholestérol et à la régulation de *LDLR* (Espenshade and Hughes, 2007). Lorsque la synthèse de cholestérol est nécessaire, SREBP est activée dans l'appareil de Golgi par les protéases S1P et S2P (protéases du site 1 et du site 2). L'activation et le transport de SREBP vers le noyau se fait par la protéine Scap (protéine activant le clivage des SREBP) qui contient un domaine de détection des stérols. En absence de stérols, Scap se lie à SREBP, et favorise son export vers le Golgi en recrutant les protéines du complexe COPII. Lorsque le taux de cholestérol est suffisant, la protéine activée est alors transportée dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles tels que *HMGCR* et *LDLR* (Luo et al., 2020). En revanche, lorsque les niveaux de cholestérol sont élevés, SCAP interagit physiquement avec INSIG1 et INSIG2 (gènes induits par l'insuline 1 et 2), qui sont situés dans le RE.

D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans le contrôle de la transcription, en particulier les récepteurs nucléaires LXR (liver oxysterol receptor) qui régulent à la fois le métabolisme du cholestérol et des acides gras dans plusieurs tissus, y compris le système nerveux (Cermenati et al., 2013a; Courtney and Landreth, 2016a) (Cermenati et al., 2013b; Courtney and Landreth, 2016b; Wang et al., 2008a). Leur déplétion stimule l'expression de *HMGCR* ce qui conduit à une synthèse accrue de cholestérol (Wang et al., 2008b)

L'homéostasie du cholestérol est également régulée par son efflux et son stockage. L'efflux cellulaire est contrôlé par le facteur de transcription LXR qui module, entre autres, le taux des protéines ABCA1 (ATP Binding Cassette A1) et ABCG1 (ATP Binding Cassette G1) qui assurent le transport du cholestérol à travers la membrane plasmique des macrophages. Il est ensuite associé à des lipoprotéines pour être exporté vers le foie sous forme de particules HDL (Gelissen et al., 2006; Venkateswaran et al., 2000).

Une partie du cholestérol importé est transportée vers les lysosomes par l'intermédiaire des protéines de type Niemann Pick 1 et 2 (NPC1 et NPC2) (Pfeffer, 2019). Le stockage sous forme d'esters d'acides gras dans des gouttelettes lipidiques se fait grâce aux deux enzymes ACAT-1 et ACAT-2 (acyl-CoA cholestérol acyltransférase 1 et 2) (Buhman et al., 2000; Chang et al., 2000) (**Figure 23**).

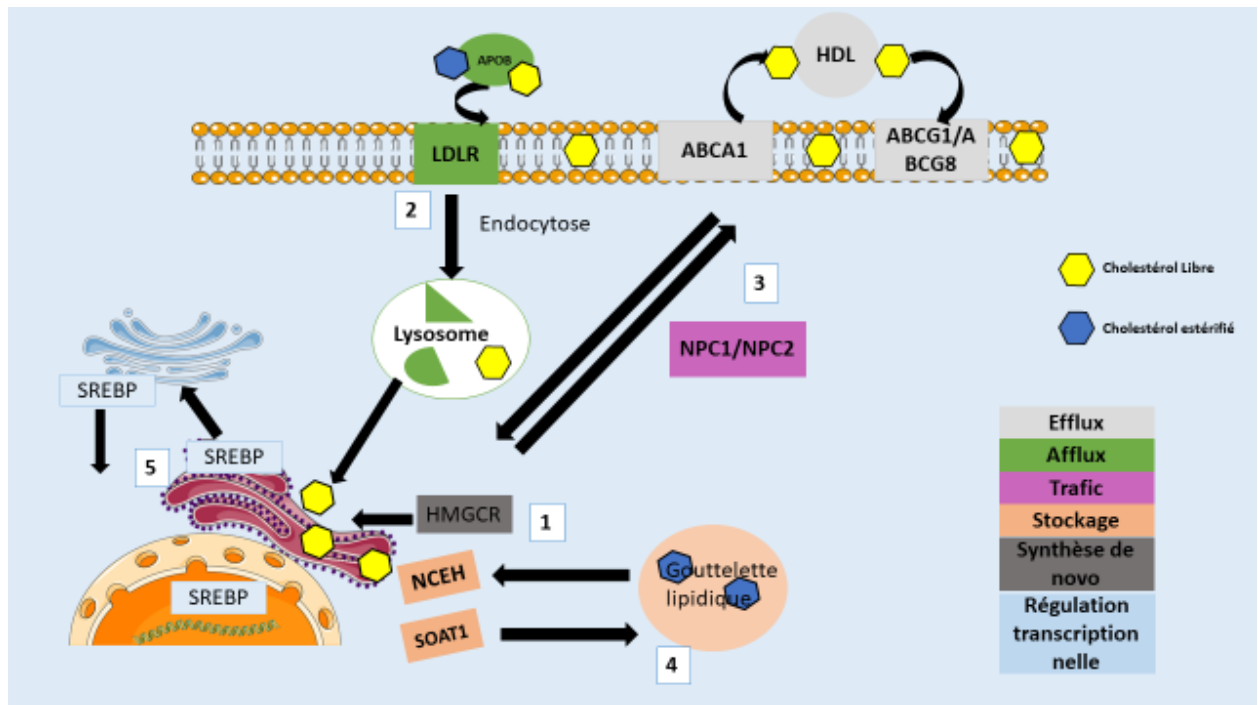


Figure 23 : Homéostasie du cholestérol.

1- La synthèse de novo du cholestérol (en gris) a lieu dans le réticulum endoplasmique et implique l'enzyme HMGCR. 2- Lorsque le niveau de cholestérol est bas, il est apporté de l'extérieur par les lipoprotéines riches en APOB (en vert). Elles se lient aux récepteurs de LDL (LDLR) et les complexes APOB/LDLR sont internalisés par endocytose pour être transportés vers le lysosome où ils subissent une dégradation aboutissant à la libération du cholestérol libre. 3- Comme l'excès de cholestérol est toxique, il est transporté par les protéines NPC1/NPC2 vers la membrane plasmique (en violet) pour être exporté par ABCA1 ou ABCG1, 4- Il peut aussi être converti en ester par SOAT1 (Sterol O-acyltransferase 1) ce qui conduit à la formation de gouttelettes lipidiques. NCEH (Neutral cholesterol ester hydrolase 1) peut convertir le cholestérol estérifié en cholestérol libre (en saumon). 5- En cas de déficit en cholestérol, l'homéostasie est régulée au niveau transcriptionnel (en bleu) : le complexe SREBP synthétisé dans le noyau est transporté vers l'appareil de Golgi et clivé ce qui permet sa translocation vers le noyau pour réguler l'expression des gènes du métabolisme du cholestérol. Adapté de (Merscher et al., 2014).

II. Cholestérol cérébral

Le cerveau est principalement composé de lipides, dont le cholestérol qui est essentiel à son bon fonctionnement ainsi qu'à la communication entre les neurones. Il a des fonctions propres qui sont présentées ci-dessous :

1. Le cholestérol : constituant principal de la myéline

Le cholestérol est un des constituants principaux de la gaine de myéline. Le rapport molaire cholestérol, phospholipides et glycosphingolipides est d'environ 40 %, 40 %, 20 % alors qu'il est de l'ordre de 25 %, 65 %, 10 % dans la plupart des membranes (O'Brien, 1965). La conduction rapide de l'influx nerveux nécessite que les axones soient enveloppés d'une gaine de myéline qui consiste en un empilement de membranes riches en lipides. La myéline est formée d'oligodendrocytes et de cellules de Schwann sous la forme d'une structure multicouche riche en lipides. L'abondance en myéline représente ~ 30 % du poids sec du cerveau humain (Schmitt et al., 2015).

2. Modulation de la fluidité et de la rigidité membranaire par le cholestérol

Les phospholipides, cholestérol et glycolipides représentent 50 à 60 % de la masse des membranes cérébrales dont ils assurent la stabilité, la fluidité et la perméabilité. Le maintien de la fluidité membranaire est nécessaire au bon fonctionnement des protéines membranaires (transporteurs, enzymes, canaux ioniques, récepteurs...) or des variations du taux du cholestérol cérébral en modifiant les propriétés physicochimiques des membranes peuvent induire diverses maladies dont des troubles neurodégénératifs (Swapna et al., 2006; Yip et al., 2001).

3. Régulation des processus neuronaux

Le cholestérol est essentiel pour plusieurs processus cellulaires tels que la croissance des cellules gliales et des neurites (axones ou dendrites), la stabilité des microtubules et la synaptogenèse. Il joue ainsi un rôle très important dans la régénération nerveuse. Cependant, chaque dérégulation anormale du métabolisme du cholestérol, est considérée comme un facteur de risque de troubles cérébraux graves (Hussain et al., 2019).

III. Cholestérol et cancer

Une étude de la relation entre le cholestérol alimentaire (apport exogène) et l'incidence du cancer a conduit à conclure qu'un taux élevé de cholestérol alimentaire augmente le risque de survenue de plusieurs cancers tels que ceux du pancréas, poumon, sein, rein, des lymphomes mais pas des tumeurs cérébrales, tout simplement parce que le cholestérol exogène ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Ahmad et al., 2019; Hu et al., 2012).

Une des caractéristiques communes des cancers est l'accumulation du cholestérol dans les tissus qui joue un rôle essentiel dans la progression du cancer (cancer du sein, de la prostate et colorectal). Des dysfonctionnements dans les voies métaboliques du cholestérol sont donc liés au développement tumoral (Murai, 2015). Etant des cellules à prolifération rapide, et sachant que le cholestérol est essentiel pour la biogenèse membranaire, les cellules cancéreuses ont donc besoin de niveaux élevés en cholestérol pour leur croissance et pour d'autres exigences fonctionnelles.

La biosynthèse du cholestérol est importante au maintien des cellules souches cancéreuses en activant les voies Sonic hedgehog (Shh), Notch et certaines tyrosines kinases. De plus la voie du mévalonate est considérée comme oncogénique dans divers cancers car elle est augmentée ce qui favorise la tumorigenèse. En outre, l'absorption du cholestérol est augmentée dans les cellules cancéreuses par rapport à des cellules normales. Bien que le cholestérol soit une source essentielle à la croissance tumorale, la façon dont les cellules programment sa biosynthèse et son absorption est complexe et mal comprise (Huang et al., 2020).

De plus, diverses études ont révélé l'importance du cholestérol dans les cellules immunitaires où il régule les réponses inflammatoires et l'immunité innée. La relation entre le cholestérol et les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs est bien documentée. A titre d'exemple, dans le cancer de poumon, les lymphocytes T CD8⁺ absorbent l'excès de cholestérol provoquant un stress pour le réticulum endoplasmique (ER) et activant la protéine XBP1 (X-box-binding protein 1) ce qui induit l'épuisement en cellules T CD8⁺ (Xu et al., 2020).

Le cholestérol est également impliqué dans les voies de transduction du signal qui régulent la carcinogénèse, la résistance aux médicaments et les métastases (Sharma and Agnihotri, 2019).

Une autre aberration métabolique cruciale indispensable à la carcinogénèse est la synthèse des acides gras *de novo* en tant que source d'énergie importante *via* la β -oxydation ou la conversion en triglycérides pour le stockage ou en phospholipides pour la production de membranes (Riscal et al., 2019).

IV. Cholestérol dans les gliomes

Comme je l'ai mentionné plus haut, les gliomes diffus restent parmi les tumeurs malignes humaines les plus meurtrières du fait de leur agressivité.

Le cholestérol étant le principal composant de la membrane de myéline, le cholestérol cérébral représente près d'un quart du cholestérol total du corps. Cependant, le cholestérol environnant ne peut pas traverser la BHE et son métabolisme dans le cerveau est complètement différent des autres organes. Par conséquent, la majeure partie du cholestérol dans le cerveau est synthétisée *de novo* par les astrocytes puis délivré aux cellules voisines, y compris les neurones, sous la forme de particules de lipoprotéines du type haute densité (HDL) et contenant de l'apolipoprotéine E (ApoE) (Pirmoradi et al., 2019; Villa et al., 2016a). Les besoins métaboliques des cellules de glioblastome sont principalement satisfaits par le cholestérol exogène car la synthèse endogène y est abolie contrairement aux astrocytes sains. C'est pourquoi les cellules du glioblastome sont moins sensibles que les astrocytes normaux à un traitement par des statines qui sont des inhibiteurs de la synthèse *de novo* du cholestérol (Yamamoto et al., 2018)

Les glioblastomes contiennent des niveaux élevés de lipides qui sont nécessaires à leur survie et activent la voie oncogénique EGFR/PI3K/Akt. Cette voie est impliquée dans la croissance cellulaire, qui à son tour augmente les lipides intracellulaires et l'expression de SREBP afin d'induire l'absorption de lipides. Or, une inhibition de SREBP entraîne la mort des cellules de glioblastome (Guo et al., 2013; Pirmoradi et al., 2019)

De plus, les cellules des gliomes augmentent la synthèse du cholestérol grâce à une amélioration de l'absorption de l'oxygène, de la glycolyse et la voie de synthèse des pentoses phosphate, mais elles dépendent également du cholestérol pour leur survie (Ahmad et al., 2019)

Une étude récente a montré que les cellules de gliome peuvent avoir des niveaux de synthèse du cholestérol inférieurs à ceux de cellules cérébrales normales. Etant donné que la biosynthèse du cholestérol est un processus consommateur d'énergie, les cellules du gliome réduisent sa fabrication à un niveau minimum, et l'énergie « économisée » par cette inhibition est utilisée pour synthétiser les acides nucléiques et les protéines nécessaires à la réplication des cellules cancéreuses (Li et al., 2020).

Dans une autre étude publiée en 2019, après le traitement de cellules de glioblastome avec un inhibiteur de la phosphorylation oxydative mitochondriale, l'analyse des ARNm a montré une corrélation entre le taux élevé de ABCAe et un niveau faible de cholestérol. La combinaison de l'induction mitotique et de l'inhibition du cholestérol pourrait être une meilleure stratégie thérapeutique pour traiter les glioblastomes (Gomez-roman et al., 2019). Les glioblastomes (GBM) hautement mortels dépendent du cholestérol pour leur survie, ce qui rend ces tumeurs sensibles à la mort cellulaire qui dépend du LXR. L'utilisation de LXR-623, un inhibiteur de LXR pouvant traverser la BHE, induit une mort cellulaire substantielle dans les cellules de GBM. Il inhibe l'absorption des LDL et induit un efflux de cholestérol des cellules de GBM, ce qui entraîne une réduction significative de la teneur en cholestérol cellulaire. L'insensibilité des cellules cérébrales normales au LXR-623 peut être due à leur dépendance vis-à-vis de la synthèse endogène de cholestérol et à une rétroaction négative par la synthèse d'oxystérols endogènes (Villa et al., 2016b).

Une seule étude a été faite sur l'influence du cholestérol dans le DMG. Elle a montré une perturbation de l'homéostasie du cholestérol en utilisant un inhibiteur de la ménine MI-2 qui exerce une activité antitumorale en supprimant la synthèse du cholestérol et provoquant la mort cellulaire des cellules de DMG. Les analyses ont montré que la cible moléculaire directe de MI-2 est la lanostérol synthase (Phillips et al., 2019).

V. Les statines : inhibiteurs de la voie du mévalonate

La HMGR catalyse l'étape limitante de la biosynthèse du cholestérol et elle est inhibée par les statines. Elles sont considérées comme des médicaments efficaces pour traiter l'hypercholestérolémie. Outre leur rôle dans la réduction du taux du cholestérol sérique, ils jouent un rôle dans la stimulation de la formation osseuse, le renforcement de la croissance des vaisseaux sanguins par l'oxyde nitrique, induisent des effets anti-inflammatoires et réduisent la protéine C-réactive (Istvan and Deisenhofer, 2001).

Les statines constituent un groupe de médicaments très diversifiés (simvastatine, atorvastatine, pitavastatine...) groupés selon leur degré relatif de lipophilie. Ils partagent tous une partie hydrophobe qui se lie sur le groupement HMG (Faubion et al., 2019a; Istvan and Deisenhofer, 2001).

1. Mode d'action des statines

Les statines agissent sur la synthèse du mévalonate catalysée par HMGCR, ce qui a pour conséquence une diminution de la teneur en cholestérol et, par conséquence, une expression importante des LDL récepteurs dans le foie qui captent cholestérol circulant dans le sang (Sirtori, 2014).

2. Usages des statines

Plusieurs études ont montré l'efficacité des statines dans le traitement des maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose (Adhyaru and Jacobson, 2018). De plus, on a pu montrer l'efficacité des statines dans les maladies neuronales comme la maladie d'Alzheimer, dont elles ralentissent ou empêchent le développement en réduisant la production de l'amyloïde- β associé à la progression de cette maladie. Dans le cas de démence, des études ont prouvé que l'utilisation des statines réduit le risque de démence tandis que d'autres études n'ont pas montré de changement. Cela peut être dû à des différences d'origine ethnique ou des facteurs culturels qui influencent le développement et la progression de la démence (Faubion et al., 2019b).

De plus, en bloquant la synthèse du cholestérol par les cellules, dont on a déjà montré l'importance pour la croissance tumorale, les statines peuvent influencer la prolifération et la migration des cellules tumorales par leur action sur la réduction de la disponibilité du cholestérol. Les statines jouent alors un rôle dans le traitement des cancers en inhibant les protéines impliquées dans le cycle cellulaire comme les cyclines, qui provoquent l'apoptose et déstabilisent la membrane cellulaire (Matuszewicz et al., 2015; Nielsen et al., 2012). Dans le cancer du sein par exemple, l'usage des statines réduit le risque de récurrence de ce cancer mais n'a aucun effet sur l'augmentation du risque d'apparition de ce cancer (Beckwitt et al., 2018). De même, chez les patients atteints de cancer de l'ovaire, l'utilisation des statines

réduit le risque d'incidence de cancer et augmente la survie des patients (Mohammadian-Hafshejani et al., 2020).

3. Statines et glioblastome

Depuis quelques années, l'utilisation des statines comme médicaments auxiliaires potentiels est envisagée pour traiter les glioblastomes du fait de leur efficacité à inhiber la croissance cellulaire tumorale, la migration, l'inflammation, l'angiogenèse et parce qu'elles favorisent l'apoptose, comme plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont pu le montrer. Malgré cela, les études cliniques n'ont pas mis en évidence qu'un traitement par les statines puisse aider à améliorer le taux de survie chez les patients (Afshari et al., 2020) (**Figure 24**).

Une étude menée sur une cohorte de 1562 patients suggère que l'utilisation de statines avant le diagnostic de glioblastome pourrait améliorer la survie des patients (Gaist et al., 2014a). Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence l'importance de la combinaison des statines avec d'autres drogues pour le traitement du glioblastome. A titre d'exemple, la combinaison des statines avec les thiazolidinediones (une classe de médicaments qui peuvent augmenter la sensibilité à l'insuline dans les tissus) montre un effet cytotoxique envers les cellules du glioblastome (Tapia-Pérez et al., 2011). De plus, la combinaison statines/pioglitazone (médicament antidiabétique, agoniste du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes) réduit la tumeur mais sans aucun impact sur la survie (Tapia-Pérez et al., 2016a).

Dans les glioblastomes à taux élevé de TGF- β , les statines sont de puissants agents contre le GBM et la combinaison des statines avec des inhibiteurs de TGF- β pourrait être encore plus efficace pour traiter ce cancer (Xiao et al., 2019a).

La combinaison des statines avec les anti-inflammatoires non stéroïdiens a réussi à inhiber la croissance tumorale des gliomes mais elle n'influence pas sur la survie surtout pour les gliomes de haut grade (Seliger et al., 2018a).

Une autre combinaison étudiée en 2020, statines et témozolomide (TMZ, un médicament utilisé couramment pour traiter le GMB) a augmenté la mort par apoptose des cellules cancéreuses (Dastghaib et al., 2020).

Dans une étude très récente, une thérapie utilisant la triple combinaison statines, quétiapine (antagoniste des récepteurs de la dopamine) et radiothérapie s'est avérée

efficace *in vitro* et *in vivo* pour améliorer la survie des souris, et comme ces médicaments sont régulièrement prescrits, cette triple combinaison doit entrer en phase d'essai clinique (Bhat et al., 2021a).

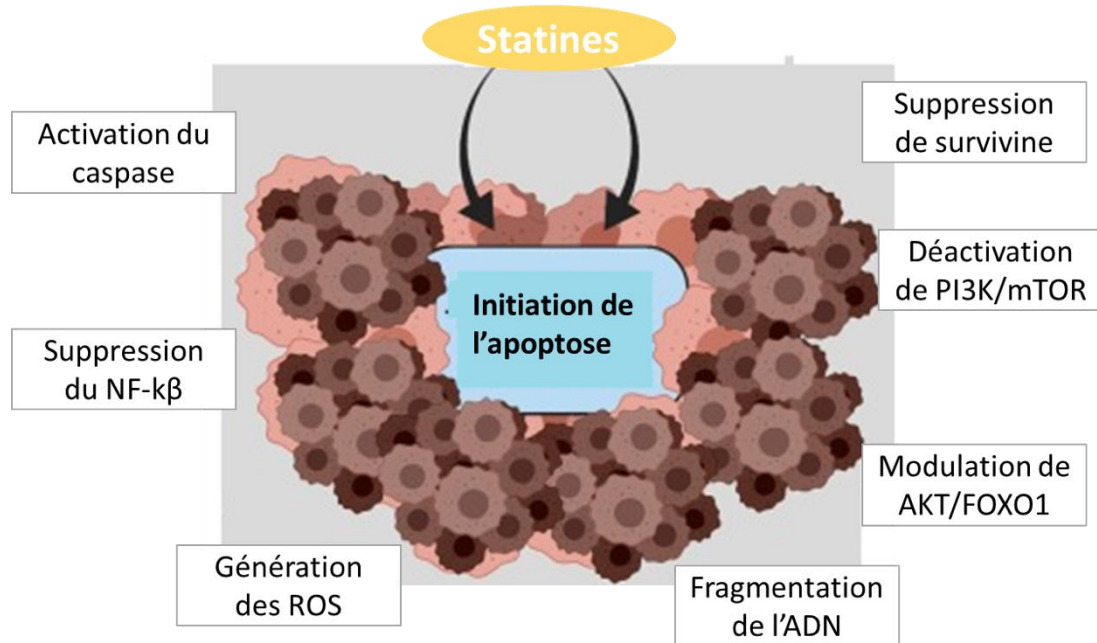


Figure 24 : Effets potentiels induisant l'apoptose des statines dans le cancer.

Adapté de (Afshari et al., 2020).

Chapitre 4 : Ciblage thérapeutique

I. Le système de vectorisation

Les progrès dans la thérapie anticancéreuse pédiatrique ont aidé à augmenter l'espérance de vie des enfants. Mais, en même temps, ces traitements et surtout la chimiothérapie ont des effets toxiques et conduisent à l'apparition de séquelles secondaires telles que des dysfonctionnement métaboliques, cardio-vasculaires, gastro-intestinaux, musculo-squelettiques... (Ederhy et al., 2011; Hölttä et al., 2005). C'est pour cela qu'une seconde partie de mes travaux a été consacrée à l'étude d'une thérapie innovante pour la rendre moins toxique pour traiter les cancers pédiatriques. Ces expériences ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Sébastien Papot (UMR-CNRS 7285, Équipe 5 : Systèmes Moléculaires Programmés, Université de Poitiers), un des grands spécialistes du ciblage thérapeutique par vectorisation de drogues.

La vectorisation est une technique qui vise à la délivrance d'une substance médicamenteuse à un endroit précis de l'organisme au moyen d'un système transporteur appelé vecteur. L'intérêt de ce procédé réside également dans l'augmentation de l'activité thérapeutique au niveau de la tumeur par rapport aux tissus voisins. La localisation du produit actif juste au niveau des tumeurs limiterait les effets secondaires induits par une chimiothérapie classique. De plus, la vectorisation permet l'augmentation de la spécificité d'action par concentration sélective et efficace à l'endroit à traiter et diminue la toxicité pour certains organes par la modification de la distribution des substances actives (**Figure 25**).

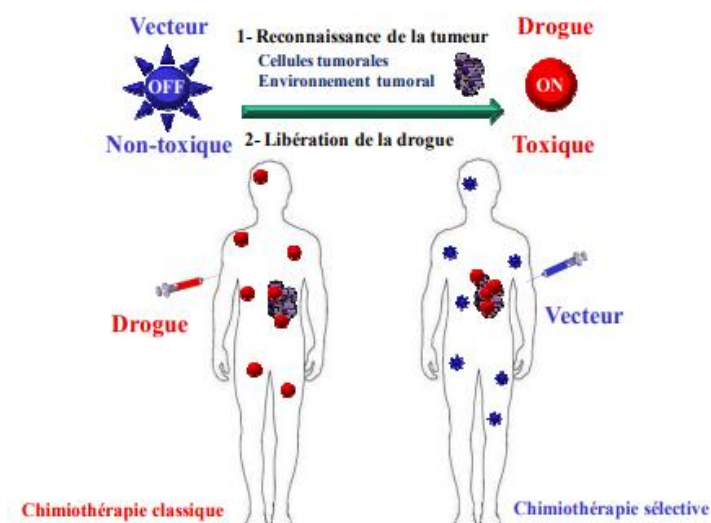


Figure 25 : Principe de la vectorisation d'une drogue comparée à la chimiothérapie classique

La drogue anti-cancéreuse délivrée lors de la chimiothérapie diffuse dans tout l'organisme ainsi que dans les cellules tumorales, induisant des effets secondaires pour les cellules saines de l'organisme. Le système de vectorisation vise à introduire la drogue dans un vecteur non toxique qui la protège et qui ne la rendra active qu'une fois que le vecteur aura rencontré les cellules tumorales (cibles de la drogue) libérant ainsi la substance active qui sera alors sélective des cellules tumorales.

II. Étapes de la vectorisation

1. Ciblage du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est caractérisé par son acidité, son hypoxie (très faibles concentrations d'oxygène), son augmentation en lactate, et par le recrutement de cellules immunitaires. Le microenvironnement tumoral est marqué par son hétérogénéité, avec des zones de pH neutre et d'autres de pH très acide (Boedtkjer and Pedersen, 2020). Ces caractéristiques pourraient être utiles pour l'action des vecteurs au sein de la tumeur.

L'activation du promédicament dans le microenvironnement tumoral se fait par l'action d'enzymes présentes et surexprimées dans la tumeur, telles par exemple l'oxydase d'aldéhyde, la réductase du cytochrome P450, la β -phosphatase, la β -glucuronidase. Pour avoir l'effet désiré, le choix d'un substrat spécifique pour chaque enzyme est indispensable pour permettre la libération du médicament sélectivement dans la zone tumorale (Rooseboom et al., 2004).

Les deux stratégies de vectorisation les plus répandues sont 1) la PMT (Prodrug MonoTherapy) qui vise à cibler les enzymes surexprimées dans le microenvironnement tumoral ; 2) la DEPT (Directed Enzyme Prodrug Therapy) composée de 2 étapes. Dans un premier temps, une enzyme est sélectionnée puis vectorisée pour augmenter sa concentration dans le microenvironnement tumoral. Dans un second temps, la drogue est fournie sous forme de prodrogue inoffensive qui sera convertie en un médicament efficace spécifiquement par l'enzyme choisie et donc uniquement dans les zones tumorales (Schellmann et al., 2010).

2. Le processus de libération de la drogue

Pour limiter les effets secondaires des traitements classiques anti-cancéreux, la reconnaissance de la tumeur est très importante pour libérer le médicament actif juste dans les zones tumorales. Cette reconnaissance se fait par une activation chimique ou enzymatique du vecteur.

a. Stratégies d'activation chimique

Les tumeurs possèdent un pH plus acide que les cellules saines avec une différence allant de 0,5 à 1 unité. Cet élément peut être exploité pour activer les vecteurs chimiquement mais ils doivent cependant rester stables dans les tissus jusqu'à ce qu'ils aient atteint le tissu tumoral où ils seront activés (Tannock and Rotin, 1989). Le pH acide du milieu tumoral permet la libération des molécules actives du vecteur par hydrolyse (Lee et al., 2006).

Comme les tissus tumoraux sont dans des conditions d'hypoxie contrairement aux tissus sains, des prodrogues ont été conçues pour être sélectivement activées dans des conditions réductrices par des réductases sensibles à l'oxygène et donc associées à plusieurs types de composés chimiques tels que les quinones, les composés nitro-aromatiques et les N-oxydes aliphatique (Denny, 2005).

b. Stratégies d'activation enzymatique

L'activation enzymatique consiste à utiliser des enzymes qui sont généralement présentes à des concentrations élevées dans le microenvironnement tumoral, où cette enzyme permet l'activation de la prodrogue, ou avec des enzymes liées à un support macromoléculaire qui reconnaît les cellules tumorales porteuses d'un antigène donné. Pour obtenir une libération rapide et efficace du médicament, après l'activation enzymatique, il est évident qu'il faut ajouter un lien (linker) qui éloigne la drogue du substrat pour qu'il soit toujours reconnu par l'enzyme (Papot et al., 2002).

3. Les vecteurs glucuronylés

La β -glucuronidase est une enzyme appartenant à la famille des glycosidases et elle est surexprimée dans plusieurs tumeurs solides telles que le cancer du sein, des poumons, des ovaires, les mélanomes. Elle est sécrétée par les cellules inflammatoires au niveau des zones de nécrose alors qu'elle est piégée dans les lysosomes dans les cellules normales. Le ciblage

de cette enzyme par des promédicaments sensibles à la β -glucuronidase constitue une importante option de monothérapie ciblée (Tranoy-Opalinski et al., 2014).

A ce jour, de nombreux vecteurs ciblant la β -glucuronidase ont été synthétisés, comme les vecteurs glucuronylés qui sont moins toxiques et offrent ainsi une diminution de la toxicité avec une élévation de l'activité anti-tumorale.

A titre d'exemple, des vecteurs glucuronylés ont été synthétisés à base d'auristatine monométhyle E. L'auristatine E (AE) est un produit utilisé pour traiter les cancers car il inhibe la polymérisation de la tubuline, et perturbe la vascularisation en endommageant les vaisseaux sanguins des tumeurs. L'AE est cytotoxique pour diverses lignées cellulaires cancéreuses. Mais son activité n'était pas sélective, car il agit sur les cellules tumorales aussi bien que sur les cellules saines. Elle a donc été modifiée en un analogue appelé la monométhylauristatine E (MMAE) conjuguée à un anticorps ciblant la tumeur via un linker pour que l'AE ne soit délivrée qu'au niveau des cellules tumorales. Après son absorption par la tumeur, le médicament est libéré donc activé par une hydrolyse au niveau du linker catalysée par une protéase lysosomale. Plusieurs études ont pu montrer que la MMAE est un puissant traitement anti-cancéreux qui présente une toxicité plus faible comparée à l'AE seule (Bajjuri et al., 2011).

Après la vectorisation basée sur des conjugués d'anticorps-médicament, une nouvelle technique a été développée qui utilise l'albumine modifiée de diverses façons comme un vecteur polyvalent pour l'administration des médicaments contre le cancer (Châtre et al., 2020). C'est une nouvelle génération de prodrogues sensibles à la β -glucuronidase et qui permet la synthèse *in vivo* de conjugués d'albumine à triple charge. Elle repose sur l'ajout au vecteur de maléimide qui est connu pour sa rapidité à se lier à l'albumine présente dans la circulation sanguine. Ce conjugué (albumine-vecteur avec le dérivé maléimide) s'accumule dans les tissus tumoraux, où il est ensuite activé par la β -glucuronidase extracellulaire présente à haute concentration dans le microenvironnement tumoral. Cette activation permet la libération du MMAE spécifiquement dans les cellules tumorales pour les détruire. Cette approche s'est avérée efficace pour traiter le cancer du sein, du colon et des poumons chez la souris (**Figure 26**) (Châtre et al., 2020).

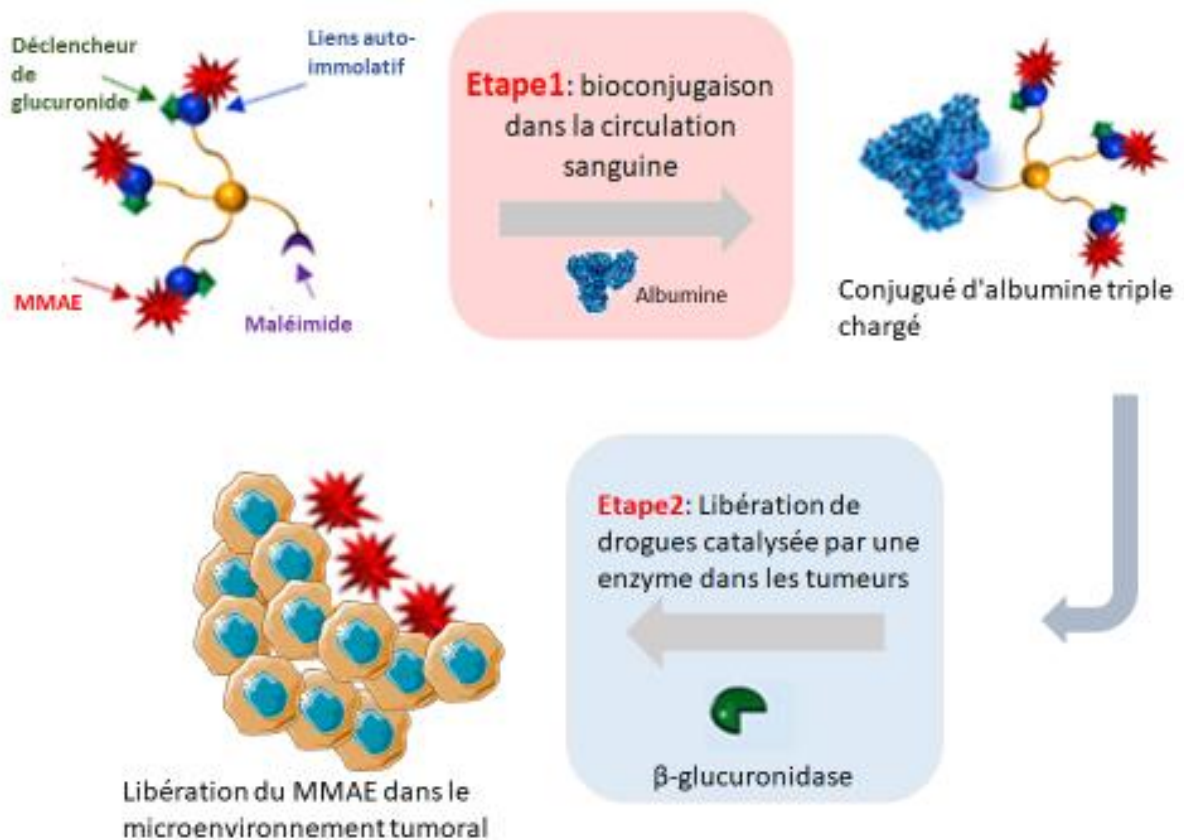


Figure 26 : Mode d'action du système de vectorisation avec la MMAE.

La prodrogue inactive (MMAE), le déclencheur de la glucuronidase, la maléimide sont conjugués puis administrés dans la circulation sanguine où le conjugué se lie spontanément de façon covalente à l'albumine présente dans le sang, formant ainsi une albumine à « triple charge ». Cette albumine s'accumule dans le microenvironnement tumoral où il y a une suractivation de la β -glucuronidase, qui les glucuronides et déclenche la libération de la MMAE dans l'espace extracellulaire de la tumeur qui pénètre ensuite à l'intérieur des cellules cancéreuses environnantes pour exercer sa cytotoxicité. Adapté de (Châtre et al., 2020).

Objectifs

Le gliome infiltrant du tronc cérébral (DMG) est l'une des tumeurs pédiatriques cérébrales les plus agressives et mortelles avec une espérance de vie très faible et ayant le plus mauvais pronostic. À ce jour, il n'y a aucun traitement efficace de cette tumeur. En effet, la chimiothérapie et la radiothérapie ne sont pas des thérapies curatives et les enfants qui survivent à ces traitements risquent de développer au cours de leur vie un autre cancer tel qu'une leucémie. Plusieurs essais cliniques ont été réalisés mais aucun n'a pu montrer une efficacité durable. Ainsi, il est urgent de trouver des nouvelles cibles thérapeutiques pour améliorer le pronostic de ces enfants. Nous savons que le complexe protéique PRC2 est impliqué dans la régulation de la transcription des gènes. Parmi les sous-unités de PRC2, on peut citer la protéine EZH2 qui, par son activité méthyltransférase, régule l'expression des gènes en catalysant le transfert d'un groupe méthyle à partir d'un donneur de méthyle universel sur la lysine 27 de l'Histone H3 (H3K27) associée à une chromatine plus condensée. Cela conduit à la répression transcriptionnelle des gènes. Diverses études ont montré que EZH2 est surexprimé dans plusieurs types de cancers (dont des tumeurs solides et des leucémies), entraîne des complications graves chez les patients atteints de ces cancers. De même, il a été montré par analyse transcriptomique que dans le DMG, EZH2 est également surexprimé. Nous pouvons donc supposer que la méthyltransférase d'histone EZH2 pourrait jouer un rôle dans le gliome infiltrant du tronc cérébral et serait par conséquent une cible potentielle pour traiter cette maladie. De ce fait, le but principal de ce projet était d'évaluer la validité de l'inhibition de EZH2 par différentes approches : pharmaceutique (chimique) et génétique. L'approche chimique consiste à traiter les cellules DMG par des inhibiteurs de EZH2, notamment EPZ6438 (Tazémétostat), qui est en phase d'essai clinique, GSK343 et GSK126. GSK126 est un inhibiteur de l'activité méthyltransférase de EZH2.

Le premier objectif de ma thèse a été de valider l'approche pharmaceutique en testant l'efficacité de ces 3 inhibiteurs après traitements de cellules DMG pendant 72h *in vitro*. Ensuite, j'ai souhaité confirmer l'effet de l'inhibition de EZH2 par approche génétique en regardant l'effet d'ARN interférents ciblant EZH2 sur les lignées cellulaires DMG. En parallèle, un KO du gène EZH2 dans deux lignées cellulaires DMG a été réalisé grâce au système CRISPR/Cas9. Puis, j'ai validé l'approche chimique en utilisant le GSK126 ce qui a résulté en une diminution de la croissance tumorale et une induction de l'apoptose. Nous avons alors souhaité caractériser les protéines dérégulées après 48 heures de traitement

par ce composé. Enfin, l'analyse protéomique de lignées DMG traitées ou non par le GSK126 et réalisée au début de ma thèse, a mis en évidence une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans la voie de synthèse du cholestérol.

Le second objectif de ma thèse a été de déterminer la relation entre le traitement des cellules par GSK126 et l'élévation du taux de cholestérol et le rôle de celui-ci dans la tumorigenèse des cellules DMG. Ces travaux ont nécessité des analyses cellulaires *in vitro* afin d'étudier la prolifération et la migration cellulaire tumorale suite au traitement des cellules soit par des inhibiteurs des enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol – tels que les statines (atorvastatine), la terbinafine et l'inhibiteur d'ACSS2 - soit par le GSK126 seul et enfin par la combinaison des deux traitements.

Après la validation de l'efficacité d'un traitement combinant un inhibiteur de la voie de synthèse du cholestérol et le GSK126 *in vitro*, le troisième objectif de ma thèse a été d'étudier leur action sur un modèle de culture cellulaire en 3 dimensions c'est-à-dire des sphéroïdes de cellules DMG. La culture cellulaire en 3 dimensions (culture 3D) permet de recréer les conditions du microenvironnement rencontrées dans l'organisme. Le but de la culture 3D est de fournir aux cellules un environnement leur permettant de former des structures appelés sphéroïdes dans lesquels les cellules peuvent interagir entre elles mimant ainsi l'état physiologique au sein des patients.

Dans un dernier temps, pour valider les résultats *in vitro*, le quatrième objectif a été de vérifier l'efficacité du traitement combiné sur un nouveau modèle préclinique du DMG (déjà établi au laboratoire) à l'aide de la membrane chorioallantoïde d'embryon de poulet (CAM) pour étudier le développement tumoral. La CAM est une membrane fortement vascularisée qui entoure l'embryon de poulet et qui assure les échanges gazeux entre l'embryon et le milieu extérieur. Elle est non innervée, ce qui en fait un substrat idéal pour l'étude de l'angiogenèse et de la croissance tumorale. Ce modèle présente l'avantage d'être peu coûteux, plus facile à mettre en place et d'avoir une durée d'expérimentation courte en comparaison du modèle souris. Ce modèle CAM est fortement reproductible, rentable et ne demande pas d'approbation par les comités d'éthique, comme c'est le cas pour de nombreux autres modèles animaux *in vivo*. Génétiquement assez proche de l'homme (60 % de gènes voisins), le modèle CAM permet donc de reproduire le microenvironnement tumoral que nécessite la tumeur pour se développer.

Un schéma explicatif du modèle d'implantation de la CAM est représenté dans la **Figure 27**. L'implantation de la tumeur est suivie par stéréomicroscopie pendant 7 jours afin de confirmer la croissance tumorale ainsi que la vascularisation de la tumeur. Ce modèle est utilisé en cancérologie pour l'étude de la vascularisation, de l'invasion, de la croissance tumorale et de l'efficacité ou la toxicité des traitements (Balke et al., 2010; Hagedorn et al., 2005; Quemener et al., 2016; Saidi et al., 2009; Vargas et al., 2007) .

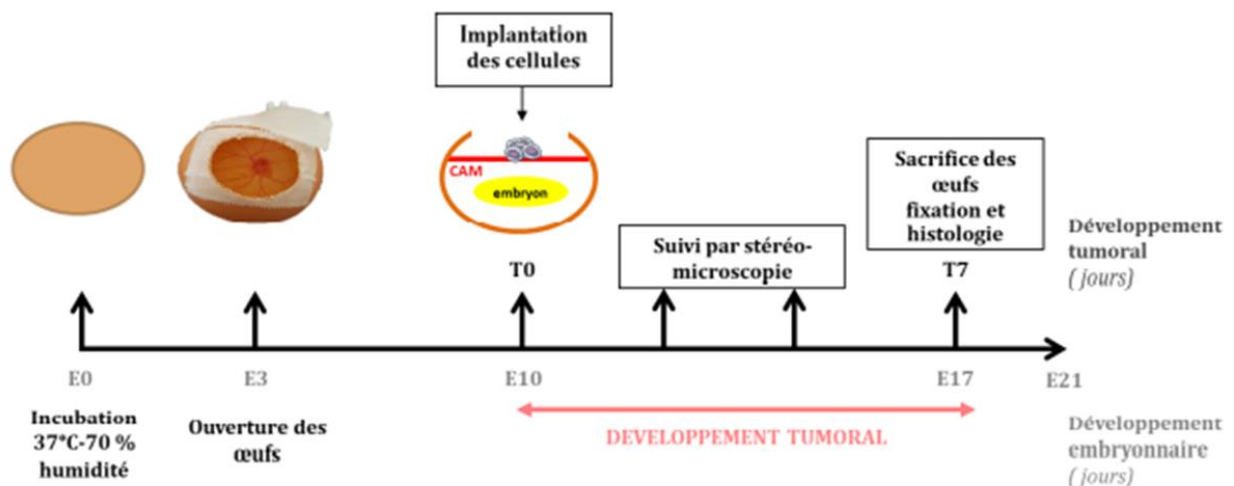


Figure 27 : Chronologie du modèle de l'embryon de poulet et principales étapes des expérimentations.

La découverte et la validation de nouveaux traitements des tumeurs du tronc cérébral permettront de faire un pas important pour soigner les enfants souffrant de ce cancer.

Le cinquième objectif de ma thèse a été de valider l'efficacité des traitements envisagés dans un modèle orthotopique (injection tumorale directe dans le tronc cérébral) ainsi que sur un autre modèle de souris sous cutané. En effet, pour aller plus loin dans nos études et être le plus proche possible de l'état des patients atteints de DMG, il est également nécessaire d'utiliser un modèle orthotopique chez des souriceaux (âgés de deux jours) afin de pouvoir modéliser la croissance des tumeurs dans un cerveau en développement. Cette technique présente l'avantage d'une mise en œuvre aisée ne nécessitant pas d'acte chirurgical et d'un suivi longitudinal simple (mesure de la croissance au pied à coulisse) qui évite des manipulations engendrant douleur ou stress importants de l'animal. Elle permet de répondre aux questions scientifiques posées, qu'il s'agisse de l'évaluation de drogues ou

d'approches de génétique inverse. À partir de ce modèle, le cinquième objectif de ma thèse a été de valider l'efficacité des traitements envisagés dans un modèle orthotopique (injection tumorale directe dans le tronc cérébral) ainsi que sur un autre modèle de souris sous cutané.

Résultats

Targeting EZH2 protein sensitizes pediatric brainstem glioma to cholesterol metabolism inhibitors

Farah Rahal, Ph.D^{1,2}, Caroline Capdevielle, Ph.D^{1,2}, Benoit Rousseau, Ph.D^{1,3}, Julien Yzotte, MSc^{1,3}, Jean-William Dupuy, MSc⁴, David Cappellen, MD^{1,2}, Guillaume Chotard, MD⁵, Mélissa Ménard, MSc^{1,2}, Justine Charpentier MSc^{1,2}, Vincent Jecko, MD⁵, Charline Caumont, MD⁶, Edouard Gimbert, MD⁵, Christophe F. Grosset, Ph.D^{1,2} and Martin Hagedorn*, MD, Ph.D^{1,2}

¹Univ Bordeaux, Campus de Carreire/Victoire, Sciences de la santé/Sciences de l'Homme, 146 rue Léo Saignat CS 61292, 33 076 Bordeaux CEDEX, France

²Inserm U1035, Bâtiment TP Zone Sud, 146 Rue Léo Saignat 4ème étage, 33000 Bordeaux, France

³Animalerie A2, Univ. Bordeaux, 146 rue Leo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

⁴Univ. Bordeaux, Plateforme Protéome, 33000, Bordeaux, France

⁵Department of Neurosurgery, Hôpital Pellegrin, Bordeaux University Hospital, place Amélie Raba Léon, 33076 Bordeaux CEDEX, France.

⁶Department of Pathology, Hôpital Pellegrin, Bordeaux University Hospital, place Amélie Raba Léon, 33076 Bordeaux CEDEX, France.

*corresponding author: Martin Hagedorn, MD, PhD, Inserm U1035, Bâtiment TP Zone Sud, 146 Rue Léo Saignat 4ème étage, 33000 Bordeaux, France. Phone: +33-670228545, E-mail: martin.hagedorn@u-bordeaux.fr, ORCID ID: 0000-0002-0960-5116

Abbreviations: EZH2: Enhancer Of Zeste Homolog 2, DMG: Diffuse Midline Glioma, H3K27M-mutant

Abstract

Background

Diffuse Midline Glioma, H3K27M-mutant (DMG, formerly DIPG) is a rare, highly aggressive pediatric tumor affecting the brainstem, and is one of the deadliest cancers. Currently available treatment options such as chemotherapy and radiotherapy do only modestly prolong survival. In this pathology, H3K27 mutations deregulate Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), including enzymatic activity of EZH2, which is therefore under investigation as a therapeutic target.

Methods

We used a chemical EZH2 inhibitor, GSK126, small interfering RNAs and a CRISPR/Cas9 knockout approach in a series of DMG tumor cell lines to investigate metabolic treatment responses by proteomic analysis. A combination strategy was elaborated and studied in primary and established DMG cells, spheroid 3D cultures and *in vivo* in a chick chorio-allantoic membrane DMG assay and an orthotopic intracranial DMG mouse model.

Results

GSK126 shows significant ($p < 0.05-0.001$) inhibitory effects in *in vitro* cell proliferation assays and induces apoptosis. Chemical targeting of EZH2 induced expression of proteins implicated in cholesterol metabolism. Low-dose GSK126 treatment together with statins revealed strong growth inhibition in combinatorial treatments, but not in single treatments, both in DMG cells *in vitro*, in DMG spheroid cultures and in chick and mouse *in vivo* models ($p < 0.05$). All statistical tests were two-sided.

Conclusion

Our results reveal an unexpected GSK126-inducible sensitivity to cholesterol biosynthesis inhibitors in highly aggressive pediatric glioma that warrants further evaluation as treatment strategy. This combinatorial therapy should have few side effects because of the low doses used to achieve significant anti-tumor activity.

Identifying novel treatment concepts for incurable cancers remains a major challenge in medicine. Cancer-type specific drugs or so called 'precision medicine' are very costly and are available only for some adult cancers. Research for therapies tailored for specific pediatric tumors is still rare [1], therefore therapy options are often limited to chemotherapy and radiotherapy with severe side effects.

Drugs targeting proteins regulating epigenetic processes (epi-drugs) have gained increasing attention as treatment for hematological and solid malignancies, including DMG [2-4].

One key element in organization of the genome are histones and several histone mutations have been discovered which deeply influence transcriptional activity [5]. For example, reduction of histone methylation by Lysine to Methionine mutations at specific histones (K-to-M at H3K36, H3F3A or HIST1H3B) has profound effects on cell growth through transcriptional modifications, a phenomenon conserved in all living systems, from plants [6] to eukaryotic cell, including cancer cells [7]. Histone mutations alter functioning of effector protein complexes such as PRC2, which includes the methyltransferase EZH2.

Analyzing reaction to treatment on a cellular level using high throughput approaches such as microarrays and proteomics combined with diverse artificial intelligence techniques has widely broadened our general understanding of drug mechanisms of action [8] and can give information on novel potential targets of existing drugs [9].

Cholesterol biosynthesis related proteins are significantly upregulated in DMG cells by GSK126 treatment. We therefore hypothesized that EZH2 inhibition by GSK126 renders DMG glioma cells dependent on cholesterol biosynthesis, thus giving the possibility to explore statins or other lipid reducing drugs as treatment option in this pathology. Drug

repurposing has already provided novel perspectives for various diseases, including cancer [10, 11].

In this paper, we provide evidence that simultaneous use of low micromolar doses of GSK126 together with statins, especially Atorvastatin, has significant anti-tumor effects in highly malignant glioma *in vitro* and *in vivo*, thereby opening a novel treatment perspective for this disease with dismal prognosis.

Methods

Microarray analysis

The GSE50021 expression profile (35 DMG samples, 10 normal brain samples), was extracted from the Gene Expression Omnibus database. Raw reads were quantile normalized and log2 transformed. Expression values identified by ILMN_1652913 probe for EZH2 were extracted and analyzed using GraphPad Prism.

DMG cell lines and primary BXdmg1 cells

DMG cell lines used in this study were NEM157i, NEM157i-VEGF, NEM163i, SU-DIPG-IVi, SU-DIPG-IVi-Luc and primary cells BXdmg1. Origin and lentiviral modification procedures (including immortalization) as well as culture conditions have been described elsewhere [4] and in **Supplementary data**.

Chemical inhibitors

EZH2 inhibitor GSK126, Atorvastatin, ACSS2 inhibitor and Terbinafine have been used (Selleckchemicals, Houston, USA).

Western blots

Blots were performed using standard techniques. Details are in the **Supplementary Methods** section.

Histone Extraction

Histone extraction was performed according to manufacturer's instructions (Histone Extraction Kit - ab113476, Abcam, Paris, France).

Proliferation assays

Cell growth was measured with the In vitro Toxicology Assay kit (Sulforhodamine B, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) according to manufacturer's instructions. Cells were plated at a density of 2000 cells per well in 96-well plates in triplicates. Absorbance was measured at 565 nm using the CLARIOstar multiplate reader (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France) at indicated time points.

Apoptosis assays

After exposure to drugs at indicated concentrations and times, cells were labeled with Annexin V-PE (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and 7-AminoActinomycin D (7-AAD) (BD Bioscience) and analyzed using Flow Cytometry as described [4].

siRNA and CRISPR/Cas9-mediated EZH2 targeting

Small interfering RNAs (siRNAs) targeting EZH2 were purchased from Eurofins (Ebersberg, Germany). Transfection protocol is detailed in **Supplementary Methods**.

For CRISPR/Cas9 mediated EZH2 KO, details are described in the **Supplementary Methods**.

Label-free quantitative proteomics

Three independent biological replicates of NEM157i, NEM163i and SU-DIPG-IVi cell lines were performed to compare the following conditions: biological effects of GSK126 versus

control and siRNA-EZH2 versus siRNA control. The steps of sample preparation and protein digestion by trypsin were performed as previously described [4] and in the **Supplementary data** section.

Migration assays

2×10^4 cells/well were placed in a 96-well and incubated for 24h. An IncuCyte WoundMaker (96-pin woundmaking tool) was used to make scratches (**Supplementary Methods**).

DMG spheroid cultures

Standard culture methods for spheroid cultures were used. Details are in the **Supplementary Methods section**.

DMG *in vivo* models

Animal procedures were carried out in agreement with the European (directive 2010/63/UE) and French (decree 2013-118) guidelines. Mouse experiments have been authorized by local ethic commission and validated by the French Minister of Higher Education, Research and Innovation (APAFIS #13466-2019032112211281, authorization number B33063916).

The DMG NEM157i/NEM157i-VEGF CAM model has been described before [4].

A murine orthotopic model (SU-DIPG-IVi-Luc in NOD/LtSz-scid IL2R gamma mice) was developed based on the work of Mohammed et al. [3]. Additional details are in the **Supplementary methods**.

Statistical analysis

Statistical analyses were standard procedures and are detailed in **Supplementary data**.

All tests were two-sided.

Results

EZH2 gene and protein expression in DMG samples and cell lines

Transcripts of EZH2 are significantly over expressed in DMG samples compared to normal brain (**Figure 1A**; [12]). Similar results have been found in other solid malignancies ranging from prostate, lung, hepatocellular, colorectal, breast to pancreatic cancer (for review see [13]). Mean EZH2 over expression was not very elevated compared to controls due to high expression variability between the two groups, but a core set of samples regrouped around the median EZH2 expression and differences are still significant (**Figure 1A, left plot, boxed frame**). Cell lines used in this study show all expression of EZH2 protein as revealed by Western Blot (**Figure 1B**).

Significant growth inhibition of GSK126 was observed at doses above 6 μ M and was total at higher doses above 25 μ M (**Figure 1C**). Growth inhibition was accompanied by an increase in tumor cell apoptosis, at similar doses when cell proliferation was strongly reduced (**Figure 1D**).

Inhibition of EZH2 expression by siRNA and CRISPR/Cas9 and growth consequences in DMG cell lines

To get a more complete understanding of EZH2 role in DMG cell growth we reasoned that knock down or genetic deletion of EZH2 could produce similar results. However, use of a very efficient siRNA which reduced EZH2 protein levels almost to nothing in two DMG cell lines (**Figure 2A**), produced no effects on DMG cell growth 3 or 4 days after transfection

(**Figure 2B**). Cell lines devoid of EZH2 (**Figure 2C**) continued to proliferated normally (**Figure 2D**), thereby confirming that EZH2 is not required for DMG cell proliferation.

Growth inhibition of GSK126 was observed after 24h or 48h in EZH2 KO cells, with IC50s comparable to normal cells controls (under 10 μ M, **Supplementary Figure 1A-C**). Growth promoting or inhibiting roles of EZH2 have already been a debate in other type of cancers and may be due to compensation effects of EZH1 [14].

Proteomic analysis of EZH2 impairment by GSK126 or siRNA

Volcano plot expression comparison of the two EZH2 inhibition approaches already revealed profound differences (**Supplementary Figure 2**). Whereas chemical inhibition up regulated 55 proteins in at least two out of three cell lines (**Figure 3A, left panel**), only one protein was up regulated in the same cells after EZH2 knock down (**Figure 3A, right panel**). These data point to profound biological differences caused by these two methods which cannot be explained by simple EZH2 function interference.

We submitted 55 up regulated proteins to gene ontology tools (PANTHER) to identify biological processes enriched in GSK126 treated cells. Importantly, a very significant enrichment (up to >100 times) of genes involved in the cholesterol biosynthesis pathway was evidenced (**Supplementary Table 1**). In fact, 11 out of the 55 proteins up regulated by the treatment play key roles in lipid metabolic processes (**Figure 3B**). These results suggest that profound metabolic changes have occurred in GSK126-treated DMG cells.

Effects of ACS2 inhibitor, Atorvastatin and Terbinafine on DMG cells alone or in combination with GSK126

In order to interpret these changes, we hypothesized that several key enzymes involved in the biosynthesis of cholesterol became important to GSK126-treated DMG cells. These enzymes are known for a long time to be implicated in diseases related to lipid metabolisms [15]. For each cholesterol biosynthesis inhibitor tested, no effects have been observed on two different tumor cell lines alone (**Supplementary Figure 3**).

However, when co-treated with low doses of GSK126 (4 μ M) which do not affect DMG cell growth (**Figure 1C, Figure 5D**), significant growth inhibition occurs for all three inhibitors at doses from 1 to 5 μ M (**Figure 4, A-C**).

Validation of DMG cell line data on freshly isolated DMG cells

Cell lines which are immortalized or cultured for a certain time can behave differently as the original cells. We therefore isolated cells from a DMG biopsy for functional analysis. Bright field (BF) microscopy shows a homogenous, spindle-formed cell population (**Figure 5A, and insert**). H&E staining of BXdmg1 cells revealed atypical eosinophilic cells with irregular anisocaryotic cell nuclei with very high mitotic activity, almost all tumor cells express the Ki-67 antigen (**Figure 5 A**). Tumor cells were also strongly positive for the H3K27M mutation and negative for H3K27me3 trimethylation ([3], **Figure 5 A**). Cellular, molecular and genetic characterization of the biopsy where BXdmg1 cells originated from are summarized in **Supplementary Table 2**, notably confirming the c83A>T; pK28M mutation in histone H3F3A, leading to the driver oncogenic event, which is conserved in BXdmg1 cells.

GSK126 treatment reduced H3K27me3 trimethylation in a dose-dependent manner as revealed by Western blots of histone-purified protein extracts (**Figure 5A, lower right panel**). BXdmg1 cells are sensible to growth inhibition by GSK126 (**Figure 5B**) with an IC50

around 10 μ M (**Figure 5C**), comparable to the other DMG lines. BXdmg1 cell growth is not affected by three cholesterol biosynthesis inhibitors, up to 10 μ M (**Figure 5D**). Combining GSK126 and Atorvastatin showed significant growth inhibition at low doses of 3 and 5 μ M for each inhibitor, this effect was masked, as expected, at higher doses because of already established cytotoxicity of GSK126 alone (**Figure 5E**).

Effects of Atorvastatin, GSK126 and combination on cell migration

We also investigated the influence of the drugs on DMG cell migration using an automated cell scratcher with Incucyte. Cell movement was measured from 24h to 48h after confluence and initiation of wound. Initial denuded area is very clean and marked by a frame of the same size for illustration in all conditions (**Figure 6A-C**). Percent of denuded area covered by migrating DMG cells NEM157i, NEM163i and primary BXdmg1 cells after 24h was reported by the Incucyte software and is displayed per condition in the right graphs (**Figure 6A-C**). For all cells tested, a significant inhibition of migration activity (approximately 2-times) was observed for the combo treatment ($p < 0.001$) compared to single treatments or solvent control. In NEM163i and BXdmg1 cells, migration was also slowed by Atorvastatin compared to DMSO ($p < 0.05$ and $p < 0.001$), but cells exposed to combo treatment still had fewer area covered by migrating cells compared to Atorvastatin alone ($p < 0.001$). This anti-migratory effect of Atorvastatin is in line with previous results obtained in adult glioma cells [16].

Inhibition of tumor cell spheroid formation by Atorvastatin/GSK126 combination

In an attempt to further investigate cell movements and adhesion phenomena in our cells, we used a protocol which allows spheroid formation of DMG cells and analyzed cell

movements and aggregation with an InCellis imaging system. Tumor spheroids are considered as a more realistic culture system than classical 2D models, adding 3D complexity closer to *in vivo* growth conditions [17]. Using three different DMG cell lines, including our primary BXdmg1 cells, we could reliably generate tumor neurospheres with all lines (**Figure 7A, B, D**). Round-shaped spheres formed rapidly within 24h, albeit with slightly different sizes and sometimes differences in border shape (clear delimited vs. irregular).

However, cells exposed to combo-treatment almost never formed spheroids compared to single GSK126 treatment ($p < 0.001$, for all cells, **Figure 7C, E, Supplementary Figure 6**). In some GSK126-treated cultures, spheroid formation was affected, especially in the primary cells (**Figure 7D, E**).

GSK126 effects on orthotopic SU-DIPG-IVi-Luc implanted tumor cells in NOD/LtSz-scid IL2R gamma (NSG) mice

We developed an orthotopic brainstem glioma model in newborn immunocompromised mice based on the work of Grasso et al. [18]. SU-DIPG-IVi-Luc cells were generated using lentiviral transfection procedures, as described ([4] and **Supplementary Methods**). In a first experiment, we tested efficacy of GSK126 treatment in this model and found significant growth reduction at an i.p. dose of 10mg/kg evidenced by bioluminescence ($p = 0.009$) in treated mice ($n = 23$) compared to solvent controls ($n = 18$, **Figure 8A**).

For the Atorvastatin/GSK126 combo treatment experiment, we reduced GSK126 dose to 6mg/kg to avoid growth inhibition. After four treatments, a significantly greater tumor growth inhibition of the combo occurred ($n = 13$) compared to Atorvastatin ($n = 13$), GSK126 ($n = 17$) ($p < 0.05$) as well as to DMSO controls ($p < 0.01$, $n = 13$, **Figure 8B**). No significant

differences have been found between controls or single treatments. All bioluminescence images of animals used in this study are shown (**Figure 8A, B**).

Atorvastatin/GSK126 combo treatment also exhibits better anti-tumor effects in a chick CAM DMG model we recently developed [4]. In this short-term model, based on a previously established adult glioma CAM model [19], drugs can be directly applied on the tumor and growth monitored by biomicroscopy. Phenotypic characterization of drug action can be made by classifying the degree of tumor vascularization into high or low/moderate (**Figure 8C, right panel**). Degree of vascularization should be interpreted as capacity of tumor cells to interact with the host tissue, an indirect indicator of tumor cell aggressiveness. Combo treated experimental tumors showed reduced vascularization compared to Atorvastatin ($p=0.036$), GSK126 ($p=0.0248$) and DMSO controls ($p=0.03$, **Figure 8C, left graph**).

Discussion

EZH2 is under investigation as a potential target in cancer [20]. However, EZH2 implication in DMG pathogenesis is still controversial. Mohammed et al. have shown EZH2 dependency of DMG cells *in vitro* and *in vivo* [3], whereas Wiese et al. could not evidence growth inhibition of DMG cells using two chemical EZH2 inhibitors [21].

Our results suggest that EZH2 protein is not required for DMG cell growth. Neither a very efficient siRNA against EZH2 nor CRISPR/Cas9-mediated EZH2 KO in DMG cells (NEM157i and SU-DIPG-IVi) shows different proliferation patterns compared to empty control vectors (**Figure 2**). Intriguingly, both knock-down and KO cells still remained highly sensitive to the EZH2 inhibitor GSK126, with an IC50 comparable to wild-type DMG cells (**Supplementary Figure 1**). These results strongly suggest that GSK126 affects a yet unknown growth promoting target (or targets) in DMG cells.

In an attempt to shed light on the molecular changes occurring in DMG cells treated with GSK126, we undertook a systemic proteomic approach using three different cell lines. 55 proteins were induced by GSK126 treatment with a significant enrichment of lipid and cholesterol synthesis proteins (**Figure 3, Supplementary Table 1**).

Enzymes implicated in cholesterol synthesis have been described as potential targets in adult glioma [22] and especially Atorvastatin has been shown to be cytotoxic in A172 human glioma cells [16]. Recently, lanosterol synthase has been identified as a target of the menin inhibitor MI-2. Blocking this enzyme impaired biosynthesis of cholesterol in DMG, leading to glioma cell death [23].

Atorvastatin also has anti-angiogenic and anti-invasive activity [24, 25] which is in line with our CAM experiment where Atorvastatin/GSK126-treated tumors appear less vascularized and our migration and spheroid experiments which reveal significant reduction

of cell motility (**Figure 6, 7 and Supplementary Figure 6**). These biological effects have also been shown for GSK126 in other solid tumors [26].

We did not observe any growth inhibition of Atorvastatin alone, up to 10 mM, whereas in combination with 4 mM GSK126 (which has no inhibitory effect at that dose) significant inhibition was achieved between 1-5 mM. Similar results have been obtained with ACSS2 inhibitor and Terbinafine (**Figure 4, Supplementary Table 2**).

Combinatorial therapies are generally more effective than single treatments in complex malignant disease such as adult or pediatric high-grade glioma [2, 4, 27-29].

In adult glioma, combined treatment with a dopamine receptor antagonist, quetiapine, and radiotherapy, also induces genes in the cholesterol biosynthesis pathway thereby rendering glioma cells vulnerable to atorvastatin [27].

The combination of a statin and GSK126 seems to be a promising approach, affecting biological processes critical for tumor progression [30] at micromolar doses at which either drug alone does not alter cell growth.

Even though significant tumor growth inhibition by GSK126 alone, and importantly, at lower doses in combination with Atorvastatin, could be evidenced in our mouse model, a more complex situation may be present in human patients. EZH2 inhibitors are prone to be excluded from penetration to the brain through specific transport efflux mechanisms implicating glycoprotein (P-gp/ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) [31], but these inhibitors can achieve therapeutic concentrations in the brainstem when CED (Convection-enhanced delivery) is applied [32]. Atorvastatin crosses the Blood-brain barrier (BBB), even though at lower levels compared to other statins such as simvastatin [33]. Given our results with ACSS2 inhibitor and Terbinafine (**Figure 4**) which have not been tested *in*

vivo, it is likely that brain-penetrating cholesterol biosynthesis inhibitors can be identified which can achieve therapeutic brainstem levels together with GSK126 applied by CED.

Our results did not answer all questions regarding the unexpected efficacy of the combinatory therapy, notably on cell migration and adhesion. Both processes affect cytoskeleton modifications, for example Atorvastatin has been shown to negatively regulate cell adhesion in patients with myocardial injury [34] and other statins have anti-migratory and anti-adhesive effects *in vitro* in melanoma cells through suppression of Rho/ROCK signaling [35].

Epi-drugs work best in combination with other inhibitors, including chemotherapy, underlining their potential to sensitize cells to combo therapies [36]. Atorvastatin (Lipitor®) is well tolerated in children from 6 years on [37] and EZH2 inhibitors are currently being evaluated in clinical trials, including pediatric malignancies. Given the consistent and encouraging results presented in this paper for experimental DMG treatment, further investigation using this combination therapy should be performed, hopefully leading to clinical trials to eventually ameliorate prognosis of this dismal disease.

Figure legends

Figure 1

A) EZH2 transcripts are significantly overexpressed in a series of DMG biopsies (N=35) compared to normal brain (N=10), microarray data retrieved from GSE50021 [12]. Dashed square delimits samples regrouped around median expression. B) Patient-derived cell lines express EZH2 protein detected by Western Blot. C) GSK126 strongly inhibits proliferation of NEM157i and SU-DIPG-IVi DMG cells and induces tumor cell death (D). E) H3k27me3 trimethylation is reduced in GSK126 treated cell lines in a dose-dependent manner. ** = $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 2

A) Knock down of EZH2 using siRNA (siRNA EZH2-1) completely blocks EZH2 protein expression, siRNA siEZH2-2 showed no effect. B) NEM157i and SU-DIPG-IVi cell growth over 72h to 96h did not differ between control siRNA and EZH2-1 siRNA. C) Lentiviral CRISPR-Cas9 mediated knockout of EZH2 validated by Western Blot. D) Indicated DMG cell lines without EZH2 did not proliferate differently compared to empty vector control cells (Supplementary Figure 1).

Figure 3

A) Proteomic analysis of GSK126 and EZH2 siRNA effects on three different DMG cell lines. Diagrams indicating number of upregulated proteins by EZH2 chemical inhibition or genetic reduction of protein in three DMG cell lines, numbers in circles indicate significantly upregulated proteins and intersections indicate number of identical proteins upregulated in

at least two or three out of three cell lines (B). Bioinformatics analysis of shared upregulated genes in indicated cell lines which belong to cholesterol biosynthesis metabolic processes significantly over represented in GSK126 treated cells (indicated by grey circles, **Supplementary Table 1**).

Figure 4

A-C) Cell growth assays of NEM157i and SU-DIPG-IVi cells exposed to GSK126 which has no growth inhibitory effects at this dose (open circles) and increasing doses of ACS2 inhibitor, Atorvastatin and Terbinafine. Combo treatment shows significant proliferation inhibition starting at low micro molar doses of statins which show no effects alone (**Supplementary Figure 3**).

Figure 5

A) BXdmg1 primary cell characterization. Upper left panel: bright field microscopy (BF) showing cell morphology of early passage BXdmg1 primary cells. Bar = 200 μ m. Upper middle panel: H&E staining of CytoBlock preparation of cells revealing nuclear irregularities. Upper right panel: Proliferation status using Ki-67 staining. Lower left panel: Demonstration of presence of H3K27M mutation in BXdmg1 cells. Lower middle panel: Status of H3K27me trimethylation in BXdmg1 cells. Lower right panel: Western blot on histone protein isolation demonstrating typical reduction of H3K27me after exposure to GSK126. B, C) BXdmg1 proliferation is inhibited by GSK126, with an IC₅₀ of 10.36 μ M, comparable sensitivity to the other DMG cells. D) BXdmg1 cells are not sensitive to exposure to cholesterol biosynthesis inhibitors. E) Combo treatment of GSK126 and Atorvastatin (Ator) shows stronger growth inhibition as GSK126 alone. Combo effect is visible at low doses and is lost at higher doses of

GSK126 because of its toxicity alone at these concentrations. Further information about molecular features of BXdmg1 biopsy are presented in **Supplementary Table 2**.

Figure 6

A-C) Cell migration impairment in the combo treatment revealed by a wound scratch assay in the NEM157i and NEM163i cell lines and the BXdmg1 primary cells.

Figure 7

A, B, D) Phase contrast micrographs of representative spheroids derived from DMG glioma cell lines after exposure to indicated inhibitors. C, E) Statistical analysis of treatment effects on spheroid formation. Phenotypic criteria were spheroid formed or not formed (dispersed cells). Fisher' Exact test was used to compare relevant treatments and the combination (combo). GSK126 dose was 20 μ M for NEM157i and 15 μ M for the others. Time-lapse videos of inhibitor effects are demonstrated in **Supplementary Figure 6**.

Figure 8

A) Orthotopic tumor growth inhibition of SU-DIPG-IVI-Luc cells implanted in the brainstem of NOD/LtSz-scid IL2R gamma (NSG) mice after GSK126 i.p. treatments. Tumor growth inhibition is demonstrated for all mice by bioluminescence live imaging and statistical analysis after the four treatments. Color bar indicates level of expression, blue values equal low and red values high expression. B) The same approach is performed at a lower dose of GSK126 in combination with Atorvastatin at a non-toxic dose. The combination shows significant growth inhibitory effects, whereas single treatments are not effective. Bars indicate median plus range. C) Similar tumor growth inhibitory results were obtained using a

chick CAM DMG model where a less angiogenic phenotype of implanted tumors was observed in the combo treatment.

References

1. Forrest SJ, Georger B, Janeway KA. Precision medicine in pediatric oncology. *Curr Opin Pediatr* 2018;30(1):17-24.
2. Zhang Y, Dong W, Zhu J, *et al.* Combination of EZH2 inhibitor and BET inhibitor for treatment of diffuse intrinsic pontine glioma. *Cell Biosci* 2017;7:56.
3. Mohammad F, Weissmann S, Leblanc B, *et al.* EZH2 is a potential therapeutic target for H3K27M-mutant pediatric gliomas. *Nat Med* 2017;23(4):483-492.
4. Capdevielle C, Desplat A, Charpentier J, *et al.* HDAC inhibition induces expression of scaffolding proteins critical for tumor progression in pediatric glioma: focus on EBP50 and IRSp53. *Neuro Oncol* 2019; 10.1093/neuonc/noz215.
5. Maze I, Noh KM, Soshnev AA, *et al.* Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nat Rev Genet* 2014;15(4):259-71.
6. Sanders D, Qian S, Fieweger R, *et al.* Histone Lysine-to-Methionine Mutations Reduce Histone Methylation and Cause Developmental Pleiotropy. *Plant Physiol* 2017;173(4):2243-2252.
7. Lowe BR, Maxham LA, Hamey JJ, *et al.* Histone H3 Mutations: An Updated View of Their Role in Chromatin Deregulation and Cancer. *Cancers (Basel)* 2019;11(5).
8. Frejno M, Meng C, Ruprecht B, *et al.* Proteome activity landscapes of tumor cell lines determine drug responses. *Nat Commun* 2020;11(1):3639.
9. Nicora G, Vitali F, Dagliati A, *et al.* Integrated Multi-Omics Analyses in Oncology: A Review of Machine Learning Methods and Tools. *Front Oncol* 2020;10:1030.
10. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov* 2019;18(1):41-58.
11. Sleire L, Førde HE, Netland IA, *et al.* Drug repurposing in cancer. *Pharmacol Res* 2017;124:74-91.
12. 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(5):451-6.
13. Gan L, Yang Y, Li Q, *et al.* Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential. *Biomark Res* 2018;6:10.
14. Hock H. A complex Polycomb issue: the two faces of EZH2 in cancer. *Genes Dev* 2012;26(8):751-5.
15. Cerqueira NM, Oliveira EF, Gesto DS, *et al.* Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry* 2016;55(39):5483-5506.
16. Oliveira KA, Dal-Cim T, Lopes FG, *et al.* Atorvastatin Promotes Cytotoxicity and Reduces Migration and Proliferation of Human A172 Glioma Cells. *Mol Neurobiol* 2018;55(2):1509-1523.
17. Santini MT, Rainaldi G. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology* 1999;67(3):148-57.
18. Grasso CS, Tang Y, Truffaux N, *et al.* Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Med* 2015;21(6):555-9.
19. Hagedorn M, Javerzat S, Gilges D, *et al.* Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(5):1643-8.
20. Kim KH, Roberts CW. Targeting EZH2 in cancer. *Nat Med* 2016;22(2):128-34.

21. Wiese M, Schill F, Sturm D, *et al.* No Significant Cytotoxic Effect of the EZH2 Inhibitor Tazemetostat (EPZ-6438) on Pediatric Glioma Cells with Wildtype Histone 3 or Mutated Histone 3.3. *Klin Padiatr* 2016;228(3):113-7.
22. Ahmad F, Sun Q, Patel D, *et al.* Cholesterol Metabolism: A Potential Therapeutic Target in Glioblastoma. *Cancers (Basel)* 2019;11(2).
23. Phillips RE, Yang Y, Smith RC, *et al.* Target identification reveals lanosterol synthase as a vulnerability in glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116(16):7957-7962.
24. Yongjun Y, Shuyun H, Lei C, *et al.* Atorvastatin suppresses glioma invasion and migration by reducing microglial MT1-MMP expression. *J Neuroimmunol* 2013;260(1-2):1-8.
25. Bayat N, Izadpanah R, Ebrahimi-Barough S, *et al.* The Anti-Angiogenic Effect of Atorvastatin in Glioblastoma Spheroids Tumor Cultured in Fibrin Gel: in 3D in Vitro Model. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018;19(9):2553-2560.
26. Chen YT, Zhu F, Lin WR, *et al.* The novel EZH2 inhibitor, GSK126, suppresses cell migration and angiogenesis via down-regulating VEGF-A. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016;77(4):757-65.
27. Bhat K, Saki M, Cheng F, *et al.* Dopamine Receptor Antagonists, Radiation, and Cholesterol Biosynthesis in Mouse Models of Glioblastoma. *J Natl Cancer Inst* 2021; 10.1093/jnci/djab018.
28. Tapia-Pérez JH, Preininger R, Kirches E, *et al.* Simultaneous Administration of Statins and Pioglitazone Limits Tumor Growth in a Rat Model of Malignant Glioma. *Anticancer Res* 2016;36(12):6357-6365.
29. Peng P, Wei W, Long C, *et al.* Atorvastatin augments temozolomide's efficacy in glioblastoma via prenylation-dependent inhibition of Ras signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;489(3):293-298.
30. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
31. Zhang P, de Gooijer MC, Buil LC, *et al.* ABCB1 and ABCG2 restrict the brain penetration of a panel of novel EZH2-Inhibitors. *Int J Cancer* 2015;137(8):2007-18.
32. Sasaki T, Katagi H, Goldman S, *et al.* Convection-Enhanced Delivery of Enhancer of Zeste Homolog-2 (EZH2) Inhibitor for the Treatment of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Neurosurgery* 2020;87(6):E680-8.
33. Sierra S, Ramos MC, Molina P, *et al.* Statins as neuroprotectants: a comparative in vitro study of lipophilicity, blood-brain-barrier penetration, lowering of brain cholesterol, and decrease of neuron cell death. *J Alzheimers Dis* 2011;23(2):307-18.
34. Patti G, Chello M, Pasceri V, *et al.* Protection from procedural myocardial injury by atorvastatin is associated with lower levels of adhesion molecules after percutaneous coronary intervention: results from the ARMYDA-CAMs (Atorvastatin for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty-Cell Adhesion Molecules) substudy. *J Am Coll Cardiol* 2006;48(8):1560-6.
35. Kidera Y, Tsubaki M, Yamazoe Y, *et al.* Reduction of lung metastasis, cell invasion, and adhesion in mouse melanoma by statin-induced blockade of the Rho/Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase pathway. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29(1):127.
36. Morel D, Jeffery D, Aspeslagh S, *et al.* Combining epigenetic drugs with other therapies for solid tumours - past lessons and future promise. *Nat Rev Clin Oncol* 2020;17(2):91-107.
37. Langslet G, Breazna A, Drogari E. A 3-year study of atorvastatin in children and adolescents with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol* 2016;10(5):1153-1162.e3.

Notes

Funding

FR was financed by the Ministry of Interior and Municipalities, Lebanon and by the Eva pour la Vie foundation (EPLV, <https://www.evapourlavie.com>). Groupama Foundation (<https://www.groupama.com/en/our-commitment/patronage/groupama-foundation/>) and EPLV financed CC and JC. Additional support came from the University of Bordeaux (MM), La Ligue Contre le Cancer (GCF and MH, National contract), INSERM and Univ Bordeaux (general funding) and following private foundations: EPLV, Aidons Marina (<http://aidonsmarina.com>), Cassandra Contre la Leucémie (<https://www.associationcassandra.org>), ESCAPE, Spheres (<http://asso-spheres.com>) and Ami de Marius.

Author contributions

FR, CC, MM and JC performed in vitro and in vivo experiments and analyzed data. BR and JY performed and supervised in vivo experiments. JWD performed, supervised and analyzed proteomic experiments. DC supervised clinical biopsy sample processing and genetic analysis. VJ, EG, GC and ChC provided biopsy material and access to clinical data. CFG provided funding, access to laboratory infrastructures and cell culture techniques (spheroids). MH provided funding, conceived the study, supervised students or engineers (FR, CC, MM, JC), analyzed data and wrote the paper. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Dr. Kasia Hooks for precious help with data processing from the GSE source and helpful discussions. We also thank Malak Alannan for help with CAM experiments.

Data Availability

BXdmg1 cells are available from the corresponding author depending on reasonable requests. Proteomic data are available at <http://www.proteomexchange.org>, ID PXD017525.

Figure 1

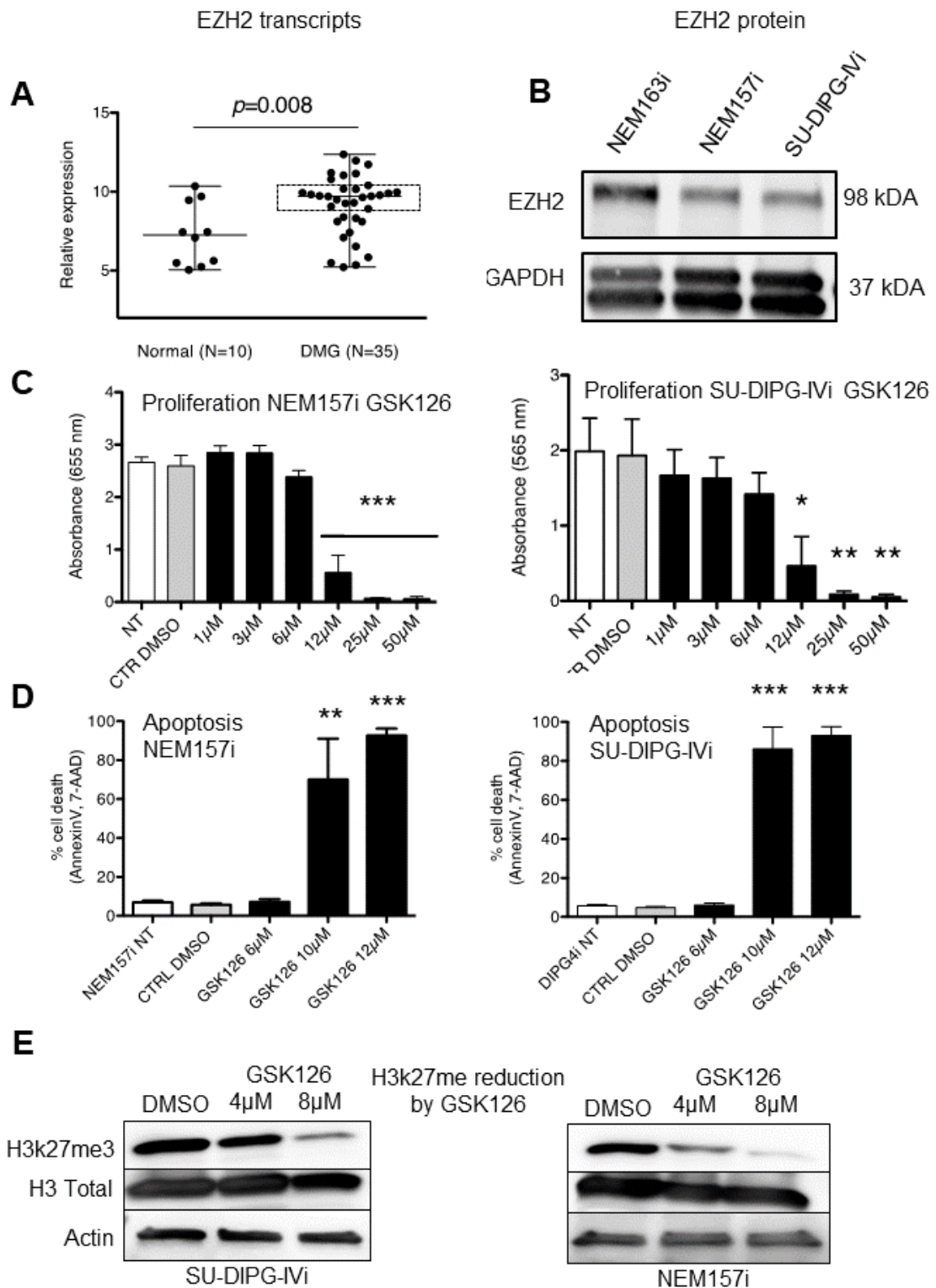
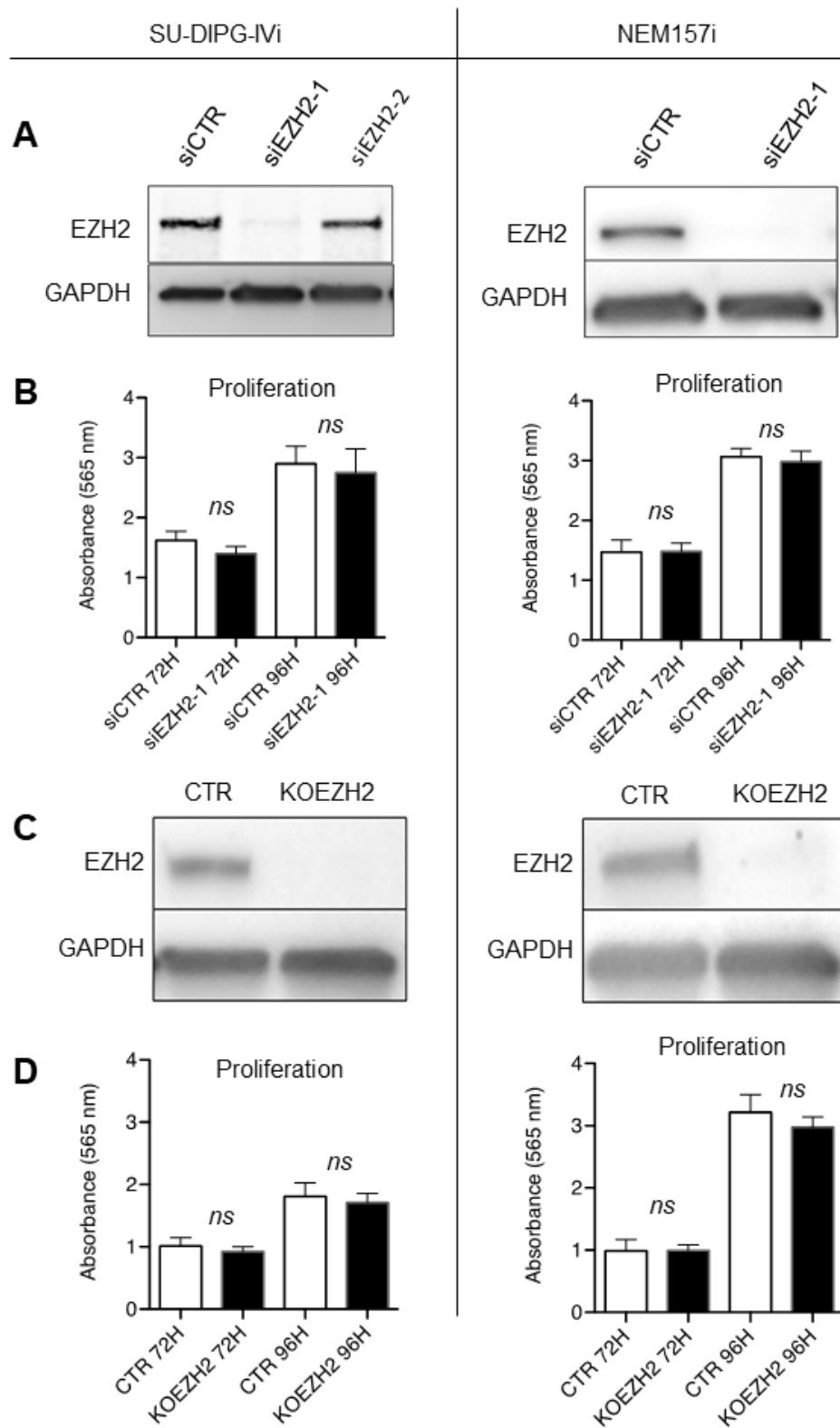
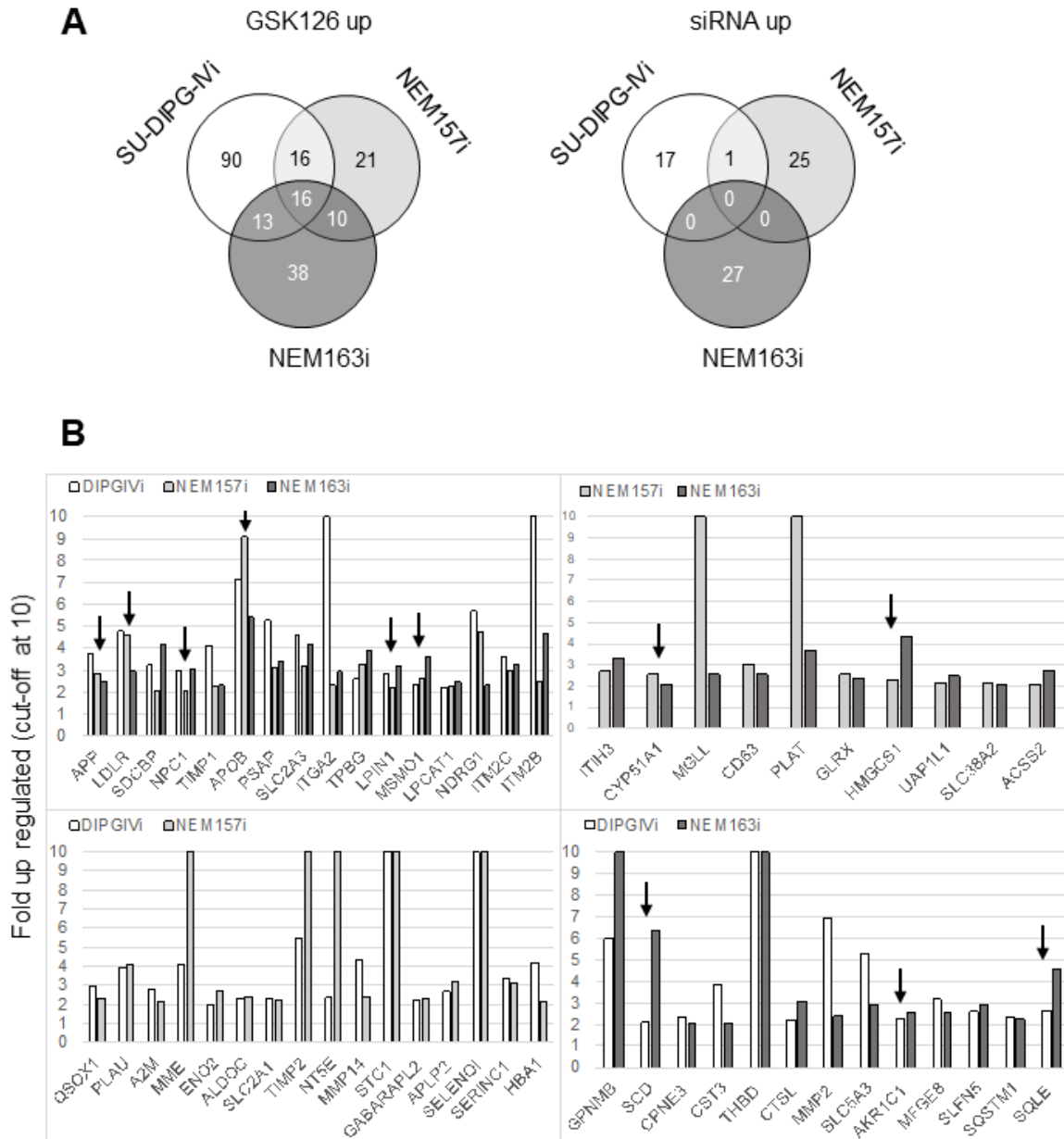


Figure 2



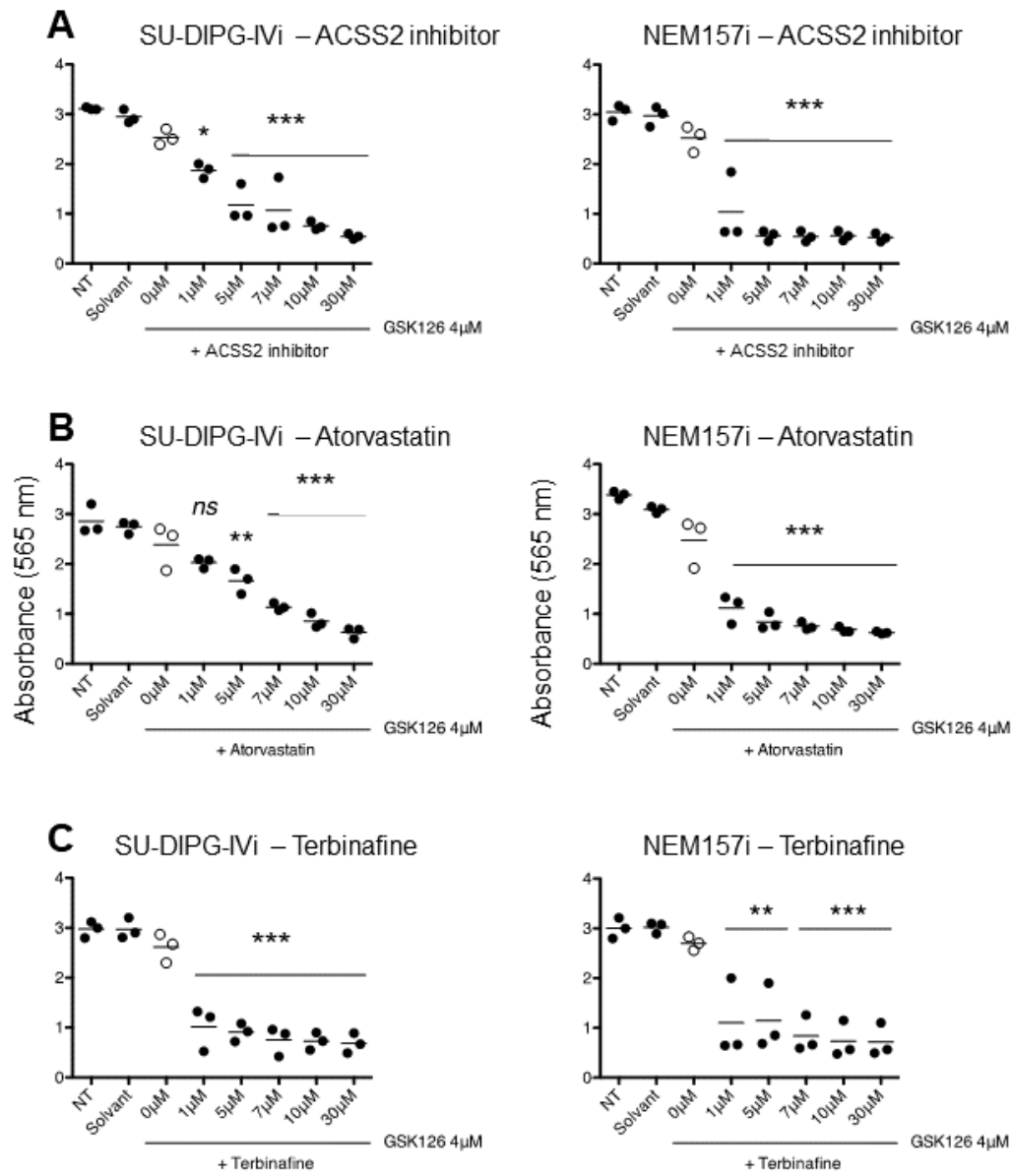
Discussed with Supplementary Figure 1

Figure 3



Discussed with Supplementary Figure 2 and Supplementary Table 1

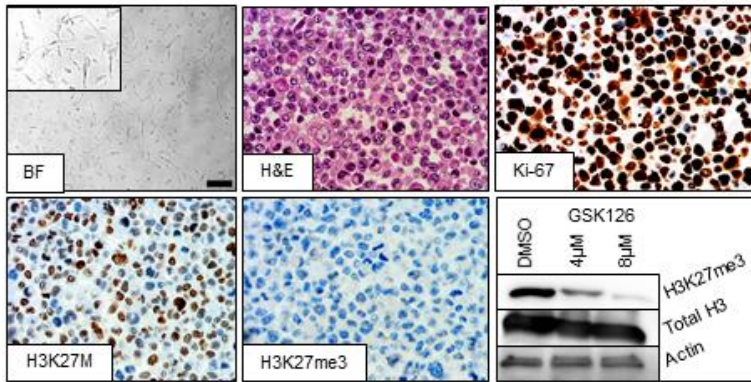
Figure 4



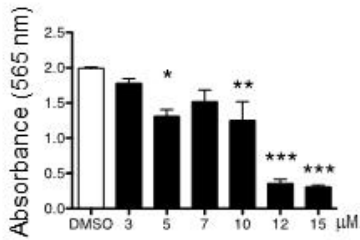
Discussed with Supplementary Figure 3

Figure 5

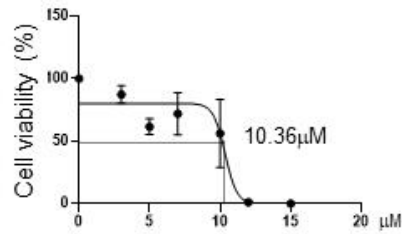
A BXdmg1 cell line characterization



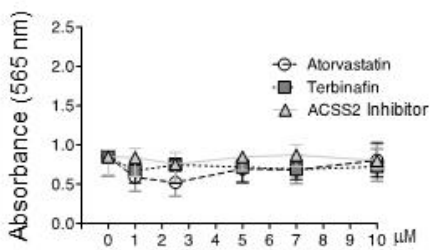
B Proliferation – GSK126



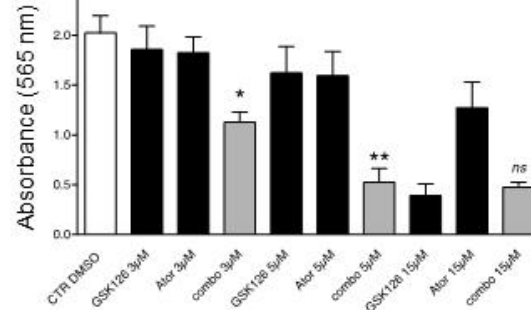
C IC50 – GSK126



D Proliferation



E Combo – GSK126/Atorvastatin



Discussed with Supplementary Table 2

Figure 6

DMG cell migration in a wound healing scratch assay

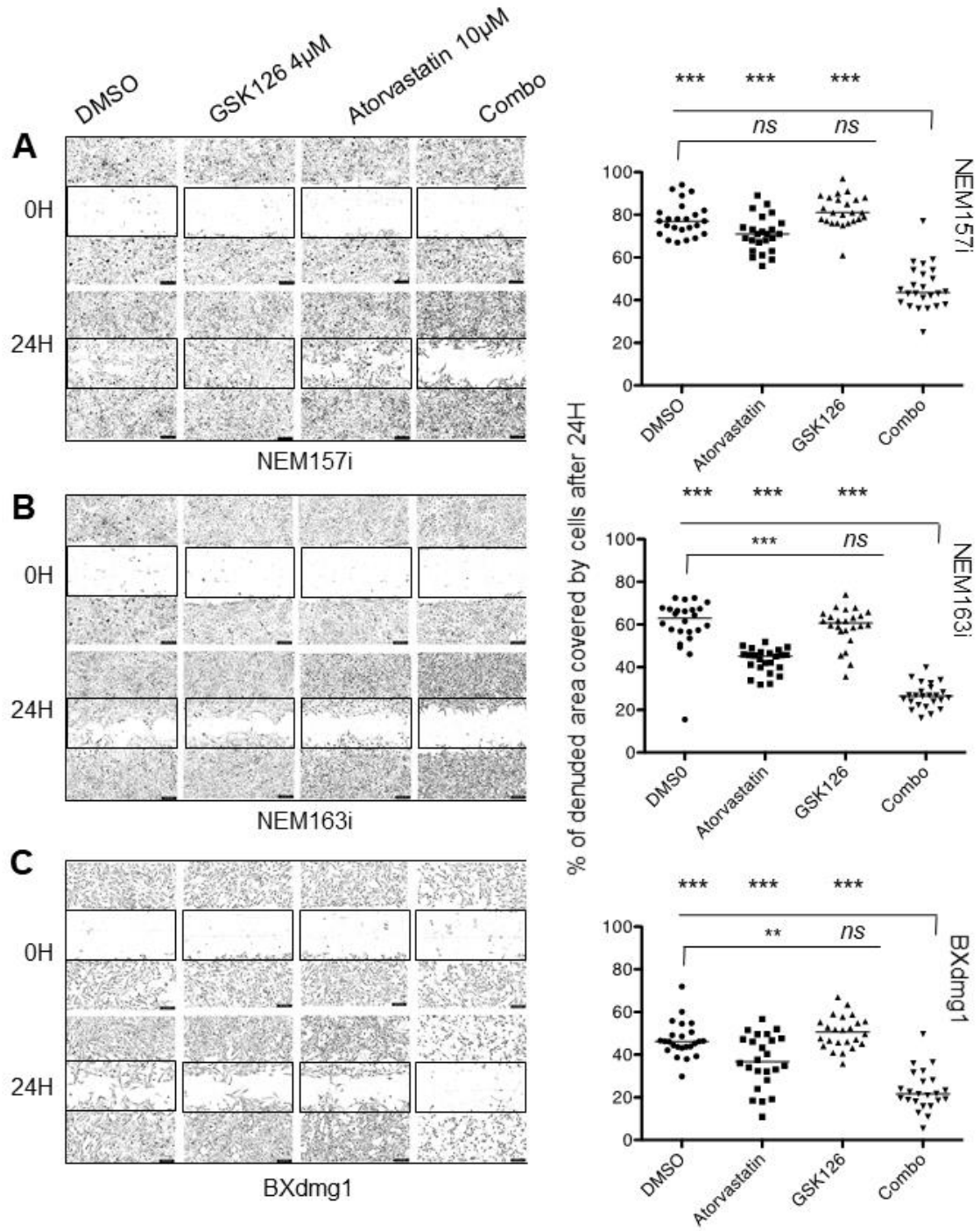
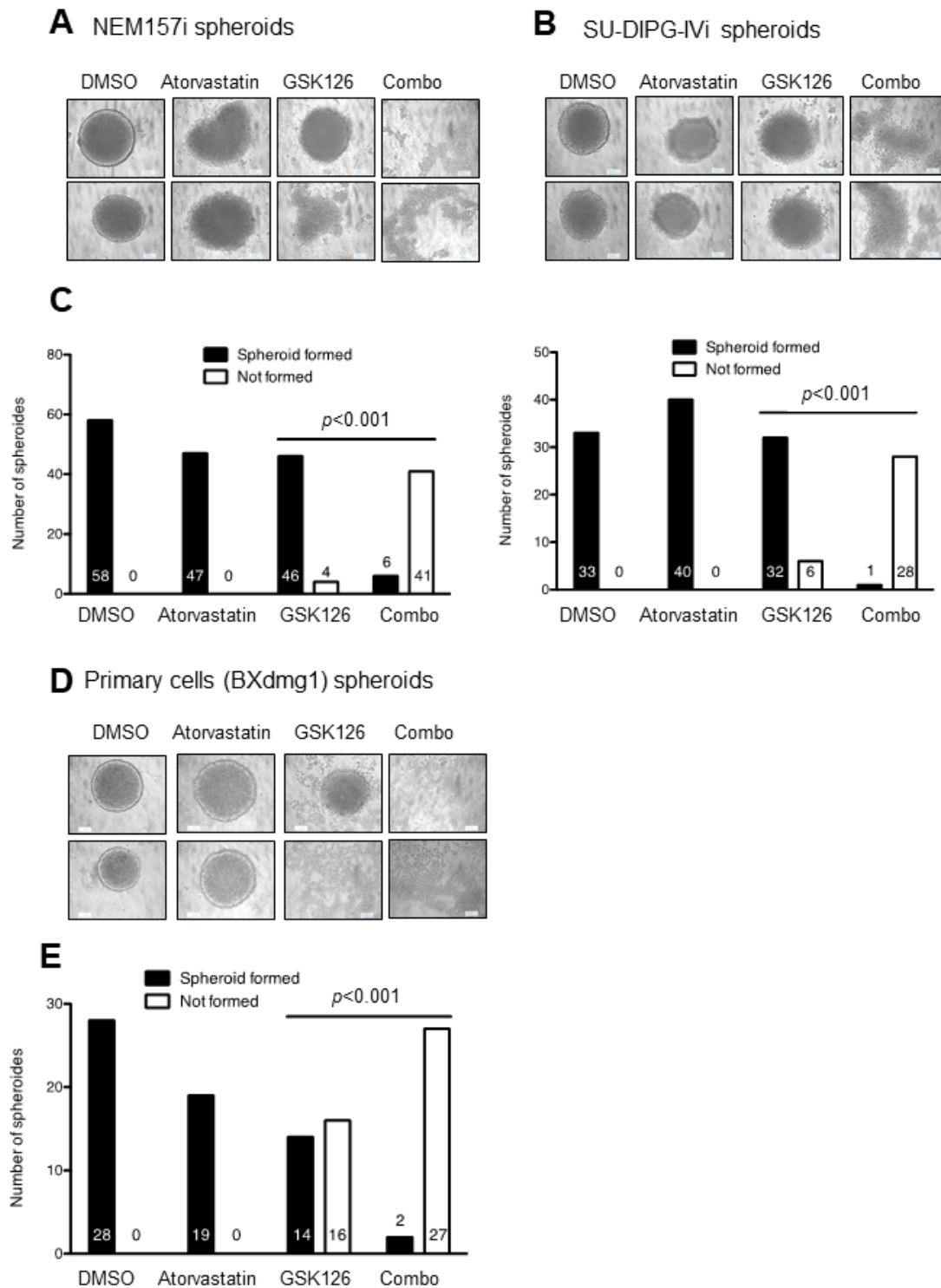


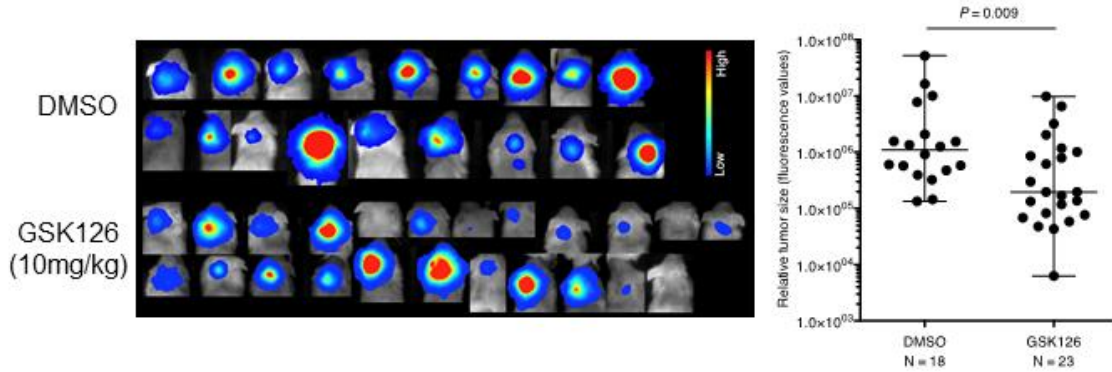
Figure 7



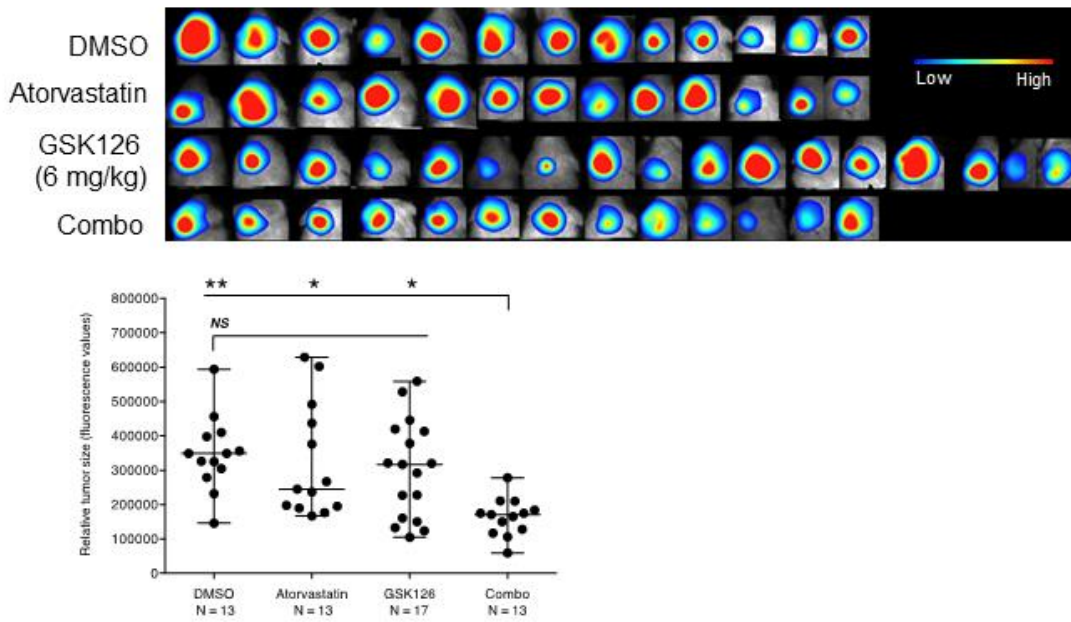
Discussed with Supplementary figure 4

Figure 8

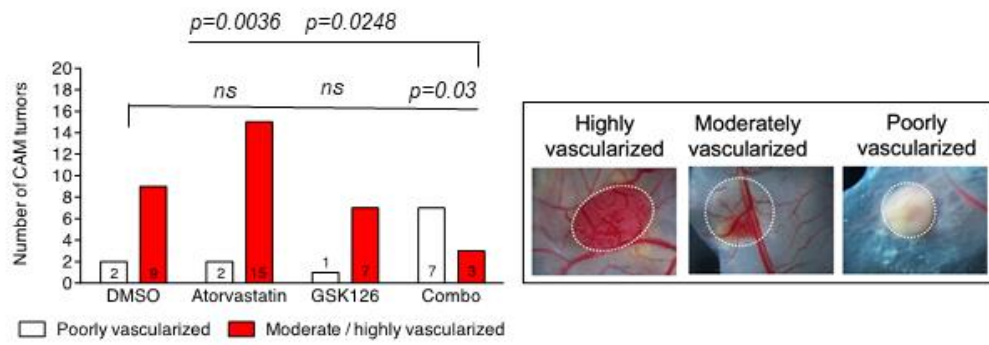
A SU-DIPG-IVI-Luc murine DMG tumor model



B SU-DIPG-IVI-Luc murine DMG tumor model



C NEM157i/NEM157i-VEGF CAM DMG tumor model



Supplementary Data

Supplementary Figure 1

A) GSK126 treatment effects in NEM157i non-transformed cells. As expected, growth inhibition occurred with an IC₅₀ of 7.9 μ M. All curves represent two independent experiments. B) Growth of lentiviral transfected NEM157i cells with empty vector also was affected by GSK treatment with an IC₅₀ of 8.2 μ M. C). Unexpectedly, proliferation of EZH2 KO cells also was blocked in a similar manner as controls (IC₅₀ =7.5 μ M).

Supplementary Figure 2

Volcano plots of raw fold-change expression data of indicated comparisons. For each plot, on the left field, in green, protein expression is reduced, on the right in red, overexpressed proteins. Chemical GSK126 inhibition and genetic EZH2 blockade are compared (left vs. right graphs) and reveal profound differences in general expression data.

Supplementary Figure 3

Three different chemical inhibitors of different enzymes implicated in the cholesterol biosynthesis pathway and induced by GSK126 (Atorvastatin: HMGSC1, Terbinafine: SQLE, ACSS2 inhibitor: AcetylCoA) have no effect on DMG cell proliferation up to 30 μ M, suggesting insensibility of the cells to these inhibitors in the absence of GSK126.

Supplementary Figure 4

Detection of H3F3A gene mutation, c.83A>T , p.K28M at codon K28 (AAG>ATG; Lys28Met), in patient tumor biopsy and derived cell line BXdmg1.

Supplementary Figure 5

Lack of 1p36 and 19q13 deletions in patient tumour biopsy and derived BXdmg1 primary cells.

Supplementary Figure 6

Incucyte videos over 24h illustrating combo effects of indicated cells disposed in 96-well.

Supplementary Table 1

55 proteins common to at least two out of three cell lines were converted to gene symbols and submitted to Panther overrepresentation test. Only significantly enriched pathways with more than 10-fold enrichment are shown. Highlighted rows indicate enriched pathways implicated in cholesterol biosynthesis.

Supplementary Table 2

Molecular, cellular and genetic characterization of the initial biopsy confirming a classical DMG diagnosis.

Supplementary methods

Chemical inhibitors

GSK126 is a highly selective EZH2 methyltransferase inhibitor with an IC₅₀ of 9.9 nM, (>1000-fold selective for EZH2 over 20 other human methyltransferases). GSK126 (SelleckChem) was dissolved with DMSO (Dimethyl sulfoxide) and stored at -20°C. Three inhibitors of the cholesterol synthesis pathway have been used: Atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, ACSS2 inhibitor which targets acetate-dependent acetyl-CoA synthetase 2 (ACSS2) and Terbinafine (squalene epoxidase inhibitor). All inhibitors were purchased at Selleckchemicals (Houston, USA). All inhibitors were aliquoted in DMSO and stored at -20°C.

Primary cell isolation, culture and characterization

All cell lines were tested regularly for the presence of mycoplasma and have been successfully STR profiled for authentication in April 2021 (LGC, Molsheim, France). Patients (or their guardians) enrolled for therapy at the University Hospital in Bordeaux gave written consent that biological probes can be used for research purposes in an anonymized manner, according to French national guidelines.

A DMG biopsy was received in the laboratory and dissociated using GentleMACs cell separator (Miltenyi Biotech, Paris, France) within 24h using MACSBrain Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotech, Paris, France) and the standard GentleMACs brain tissue separation program. Cells yielded were cultivated in Amniomax C100SUP plus Amniomax C100 basal medium (Gibco, ThermoFisher, Illkirch Cedex, France). Molecular and cellular analysis of the biopsy are detailed in Supplementary Figure 6.

For characterization of biopsy-derived cells (BXdmg1) immunohistochemistry was used. Cells were harvested and included in CytoBlocks prior to sectioning and staining (Figure 5A). Automated staining was performed on an Omnis Dako® stainer after heat antigen retrieval in citrate buffer, Flex amplification treatment and incubation with following

antibodies: Ki-67 (Dako, clone MIB1, 1/100), H3-K27M (Diagomics, clone RM192, 1/5000) and H3-K27me3 (ABcam, clone 8290, 1/100). Revelation was done using diaminobenzidine (Dako). The cells were regularly passaged and displayed a homogeneous morphological phenotype, they have been termed BXdmg1.

Western Blots

Cell lysates were prepared by scraping cells using RIPA buffer (Sigma Aldrich) plus proteinase inhibitors (Sigma Aldrich) and centrifuged at 13000g for 15 min at 4°C. Protein concentrations were measured using Pierce™ BCATM Protein Assays (ThermoFisher) and equal amounts of cell extracts were loaded for western blot analysis in 4-15 % precasted polyacrylamide gel (Bio-Rad). Proteins were blotted on a nitrocellulose membrane (Transblot® Turbo midi-size, Bio Rad), blocked with the Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences, ScienceTec, Les Ulis, France) or with BSA diluted in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) and probed with primary antibodies overnight at 4°C. Primary antibodies used were: rabbit polyclonal anti-EZH2 (1:1000 dilution, #5246S, Ozyme/Cells signaling, Saint Cyr l'Ecole, France), rabbit anti-GAPDH (1:15000, BLE649203, Ozyme/Cells signaling), rabbit monoclonal H3K27me3 (1:1000, 9733S, Ozyme/Cells signaling), mouse monoclonal histone H3 (1:500, sc-517576, Santa-Cruz, Heidelberg, Germany), mouse monoclonal actin (C-2) (1:500, sc-8432, Santa-Cruz), diluted in blocking buffer or 5% BSA. After washing with TBST, the membranes were incubated with corresponding goat anti mouse IgG (H+L)-HRP conjugate (1:3000, 170-6516, Biorad, Marnes-la-Coquette, France) or anti-rabbit IgG-HRP (1:3000, A0545, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). After washing with TBST (twice for 10 minutes), membranes were revealed with Fusion FX (Vilber Lourmat). Quantification was performed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

siRNA transfections

siRNAs were 5'-GAGGGAAAGUGUAUGAUAA[dTdT]-3' (siEZH2-1) and 5'-UUCAUGCAACACCCAACACU [dTdT]-3' (siEZH2-2) and were diluted in the 1x siMAX dilution buffer (30mM HEPES, 100mM KCl, 1mM MgCl₂, pH=7.3 (Eurofins, Ebersberg, Germany). DMG cell lines were transfected independently with each EZH2 siRNA or control siRNA (AllStars Negative Control siRNA, Qiagen, Courtaboeuf, France). Briefly, 10nM of siRNA was transfected with RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions for reverse and forward transfections. Prior to transfection, Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFischer) was diluted 1 / 100th in transfection medium (OptiMEM, Gibco, ThermoFisher, Illkirch Cedex, France).

CRISPR/Cas9 system to create a EZH2 KO

EZH2 RNA guide sequence (sgRNA) was cloned into the lentiviral vector LentiCRISPR-Cas9 521. The guide sequence was selected using the Chopchop website (<https://chopchop.cbu.uib.no>). Following sense (5' 'CACCG ACCCCACCAAAACGTCCAGG 3') and antisense (3'CTGGGGTGGTTTTGCAGGTCC CAAA 5') sequences were used.

Oligo-nucleotide sequences were phosphorylated and hybridized then inserted into the linearized vector 521, by ligation using T4 ligase (NEB) at room temperature and transferred into electro-competent bacteria STBL2 (Invitrogen, ThermoFisher) by electroporation then, were spread on a Petri dish containing the culture medium: LB (lysogenic broth) - agar + Ampicillin (100mg / mL). After an overnight incubation at 37°C, two clones were cultured in LB-Ampicillin and the recombinant plasmid DNA was extracted by Miniprep (Kit Plasmid DNA purification - Nucleospin plasmid [No lid], Macherey-Nagel).

The extracted DNA was digested with the restriction enzymes KpnI (NEB) and EcoRI (NEB) and deposited on 1% agarose gel in order to confirm the integrity of the restriction profile of the vector. Sequencing was then carried out to validate the insertion of the entire EZH2 guide RNA sequence into the vector 521 (Mix2Seq kit, Eurofins). The sequencing was done using the U6 primer GACTATCATATGCTTACCGT (Eurogentec). The recombinant DNA obtained by Miniprep was transformed into the XL10 gold bacteria by electroporation to amplify the recombinant DNA. After spreading the bacteria on a Petri dish, a colony was transplanted into the culture medium (LB + Ampicillin). The amplified DNA was extracted and purified by Midiprep (Kit Plasmid DNA purification - NucleoBond Xtra Midi, Macherey-Nagel).

After the production of the lentiviral vectors by transient transfection was done by the vectorology platform (Vect'UB, INSERM U1035) cell lines NEM157i and SU-DIPG-IVi were transduced with lentiviruses with different MOIs (Multiplicity of Infection). An MOI of 5 was chosen to verify the effect of the EZH2 gene deletion. The cells were then sorted by FACS in order to keep only the fluorescent cells which have integrated the recombinant vector (Cytometry platform, UB'Facility).

Label-free quantitative proteomics

10µg of proteins were loaded on a 10% acrylamide SDS-PAGE gel and proteins were visualized by Colloidal Blue staining. Migration was stopped when samples had just entered the resolving gel and the unresolved region of the gel was cut into only one segment. NanoLC-MS/MS analysis were performed using an Ultimate 3000 RSLC Nano-UPHLC system (Thermo Scientific, USA) coupled to a nanospray Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, California, USA). Each peptide extracts were loaded on a 300µm ID x 5 mm PepMap C₁₈ precolumn (Thermo Scientific,

USA) at a flow rate of 10 μ L/min. After a 3 min desalting step, peptides were separated on a 50 cm EasySpray column (75 μ m ID, 2 μ m C18 beads, 100 Å pore size, ES803, Thermo Fisher Scientific) with a 4-40% linear gradient of solvent B (0.1% formic acid in 80% ACN) in 48 min. The separation flow rate was set at 300 nL/min.

The mass spectrometer operated in positive ion mode at a 2.0 kV needle voltage. Data was acquired using Xcalibur 4.1 software in a data-dependent mode. MS scans (m/z 375-1500) were recorded at a resolution of $R = 120000$ (@ m/z 200) and an AGC target of 4×10^5 ions collected within 50 ms, followed by a top speed duty cycle of up to 3 seconds for MS/MS acquisition. Precursor ions (2 to 7 charge states) were isolated in the quadrupole with a mass window of 1.6 Th and fragmented with HCD@30% normalized collision energy. MS/MS data was acquired in the ion trap with rapid scan mode, AGC target of 3×10^3 ions and a maximum injection time of 300 ms. Selected precursors were excluded for 60 seconds.

Protein identification and Label-Free Quantification (LFQ) were done in Proteome Discoverer 2.3. MS Amanda 2.0, Sequest HT and Mascot 2.4 algorithms were used for protein identification in batch mode by searching against a Uniprot *Homo sapiens* database (74 489 entries, release May 16, 2019). Two missed enzyme cleavages were allowed for the trypsin. Mass tolerances in MS and MS/MS were set to 10 ppm and 0.6 Da. Oxidation (M), acetylation (K) and deamidation (N, Q) were searched as dynamic modifications and carbamidomethylation (C) as static modification. Peptide validation was performed using Percolator algorithm [1] and only “high confidence” peptides were retained corresponding to a 1% false discovery rate at peptide level. Minora feature detector node (LFQ) was used along with the feature mapper and precursor ions quantifier. The normalization parameters were selected as follows: (1) Unique peptides (2) Precursor abundance based on intensity (3) Normalization mode: total peptide amount (4) Protein abundance calculation : summed abundances (5) Protein ratio calculation : pairwise ratio based and (6) Hypothesis test : t-test

(background based). Quantitative data were considered for master proteins, quantified by a minimum of 2 unique peptides, a fold changes above 2 and a statistical p-value lower than 0.05. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [2] partner repository with the dataset identifier PXD017525.

1. Käll L, Canterbury JD, Weston J, *et al.* Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat Methods* 2007;4(11):923-5.
2. Perez-Riverol Y, Csordas A, Bai J, *et al.* The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1):D442-d450.

Cell migration assays and spheroid cultures

Migration was monitored by IncuCyte S3 live-cell analysis system (Essen BioScience, Ltd, Royston Hertfordshire, United Kingdom). The original unmodified Incucyte images were used for statistical analysis but for demonstration of the effects images have been transformed using Adobe Photoshop CS4 (San Jose, USA). Following functions have been used to optimize visibility of the cells: greyscale mode, bichrome mode, negative, contrast/luminosity, exposition/gamma, negative.

For spheroid formation assays, 10^4 cells were used per well in a 96-well plate. Volume of methylcellulose/medium/cells and inhibitors (10, 15 or 20 μ M) mixture per well was 100 μ L with a final concentration of methylcellulose at 0.5%. After rapid and gentle homogenization, the mixture was placed on a round-bottom cell culture microplate (U-shaped) treated to limit cell adhesion. After, spheroids were incubated in an incubator at 37°C and 5% CO₂ for 24 hours. Photos and films of spheroids were taken by an InCellis cell

imager (Bertin instruments, Montigny-le-Bretonneux, France). Since no dose-dependent effect was observed at the doses tested, all doses were pooled for statistical analysis.

DMG chick and mouse models

For the chick CAM assay DMG model, 1×10^6 NEM157i/NEM157i-VEGF (50:50) cells were mixed with Matrigel including inhibitors at indicated concentrations and 40 μ l were put directly on the CAM. Tumor growth was monitored using a stereomicroscope (DS-Fi2, Nikon/SMZ745T) every two or three days. Tumors were fixed with PFA 4% and proceeded for photo documentation.

For the mouse model, the immortalized SU-DIPG-IV line was used. SU-DIPG-IVi is transduced by a luciferase vector (Luc) with a MOI of 10. Two days after birth, 10^5 SU-DIPG-IVi-Luc cells in 2 μ l were injected directly into the brainstem through the neck to a depth of 3 mm using a 2 μ l NeuroSyringe (Hamilton Neuros, Dutscher, Bruxelles, Belgium) under anesthesia with 2% isoflurane and 50% oxygen enrichment. Treatment begun after 8 days, 3-times a week with solvent control (DMSO) or GSK126 (6 or 10 mg/kg), Atorvastatin (10mg/kg) or combo (statin and GSK126 together). Tumor growth was evaluated non-invasively with anesthetized mice on a Biospace imager (Biospace Lab, Nesles la Vallée, France) 1-2 days after each treatment.

Prior to treatments, mice are micro-tattooed (Aramis kit, BiosebLab, France). Animals are weighed and then receive an i.p. injection in the lower right quadrant following IACUC recommendations. A 1 ml tuberculin syringe and a 26 gauge needle were used with an injection volume of 200 μ l for a 30g mouse (3 mg / ml), adjusted to actual weight each week. Treatment was done 3 times a week, starting at day 8. Tumor growth is evaluated non-invasively on a Biospace imager (Biospace Lab, Nesles la Vallée, France). The entire procedure is carried out on a heating mat at 37°C. The animals are shaved and anesthetized in

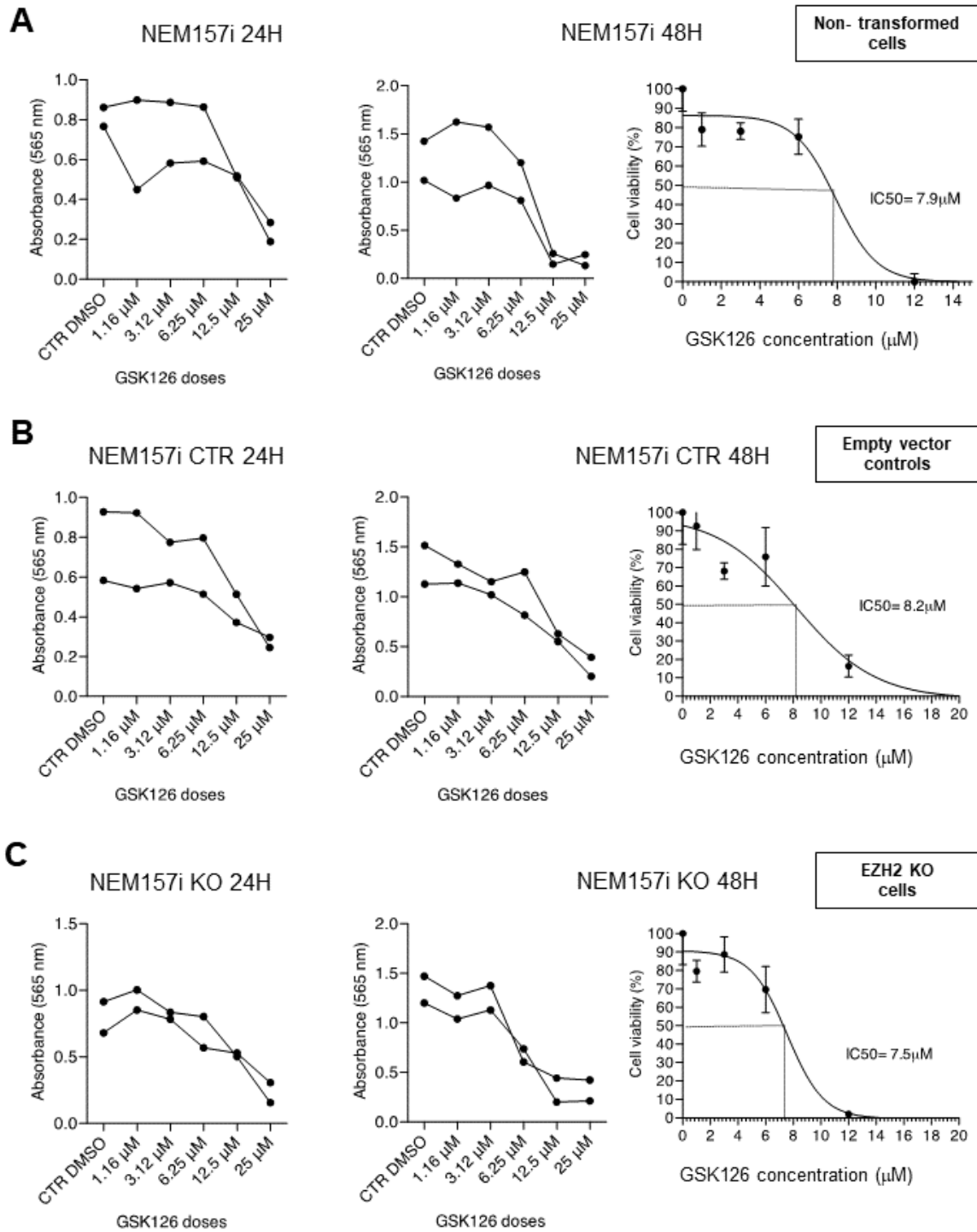
sterile condition (under PSM-2) in boxes dedicated to imaging. Prior to imaging, animals receive an i.p. injection of 150mg/kg of D-Luc (Promega, E264X) diluted in PBS (50 to 100µl), depending on the weight of the animal. The box is then placed on a heating mat at 37°C in the photo imager in which 2% isoflurane with 50% oxygen is maintained. Imaging is done twice a week. Anesthesia time was around 15 minutes since only immobility is desired and awakening of the animals is almost instantaneous. At day 21, animals were killed by cervical dislocation.

Statistical methods

Statistical analyzes were performed with GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, Inc. San Diego, USA). For quantitative comparisons of more than two samples, One-way ANOVA test was used followed by Bonferroni post-test. If data distribution was not normal, Kruskal-Wallis test was used following Dunn's post-test of selected relevant conditions. For the comparisons of two small independent samples, unpaired t-test was used. For experiments analyzed by phenotypic evaluation using a semi-quantitative approach, Fisher's Exact test was used. All experiments (except *in vivo* experiments) were carried out, independently, at least 3 times, n=independent experiments. A *p*-value of <0.05 was considered to be statistically significant. For all data in figures, *: *p*< 0.05, **: *p*< 0.01, ***: *p* < 0.001 or exact *p*-values where indicated.

Supplementary Figure 1

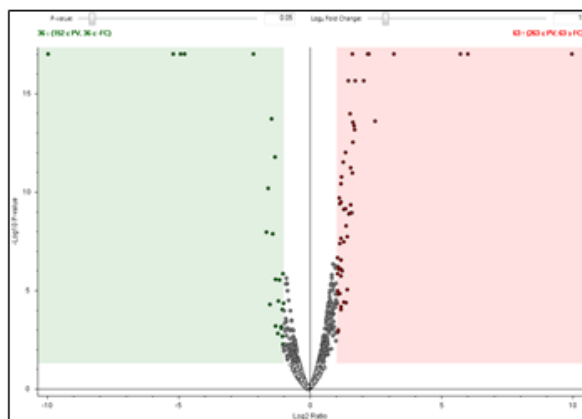
GSK126 effects on DMG cells in the absence of EZH2 protein (CRISPR-Cas9 mediated KO)



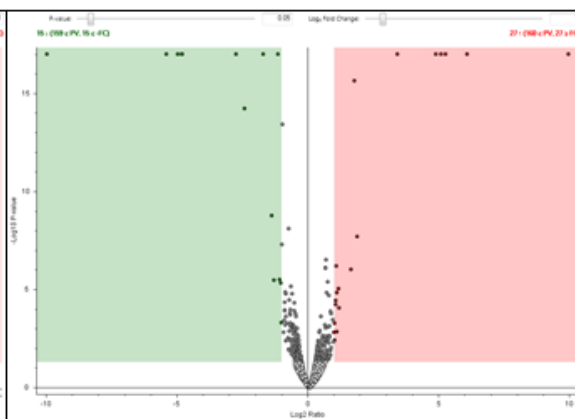
Supplementary Figure 2

Volcano plots of protein fold-changes

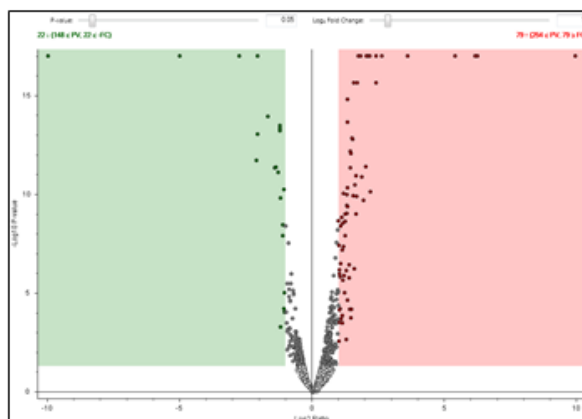
NEM157i - DMSO vs GSK126



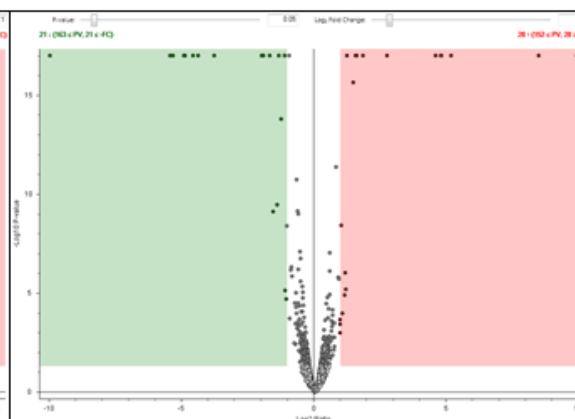
NEM157i - siControl vs siEZH2



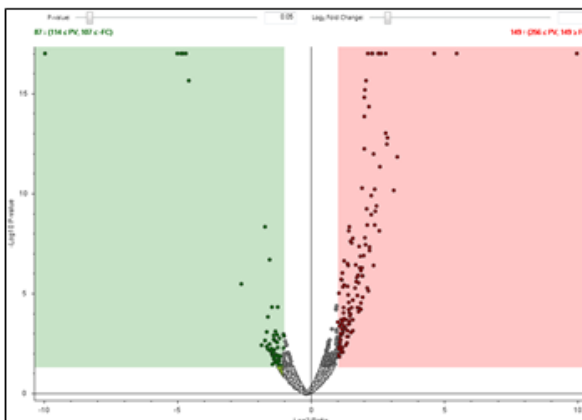
NEM163i - DMSO vs GSK126



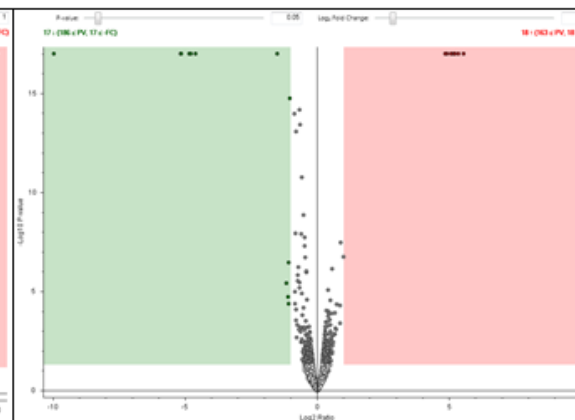
NEM163i - siControl vs siEZH2



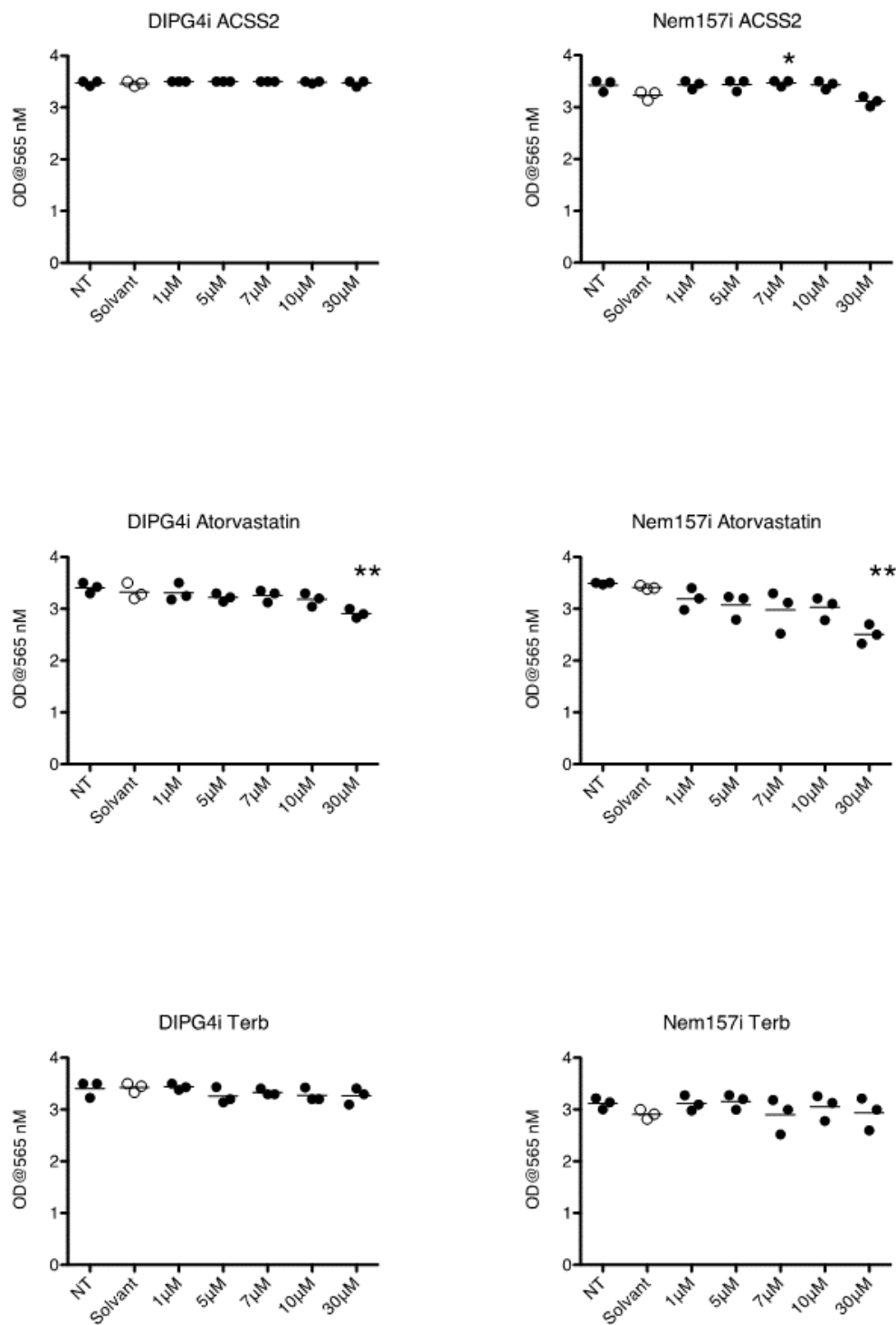
SU-DIPG-IVi - DMSO vs GSK126



SU-DIPG-IVi - siControl vs siEZH2

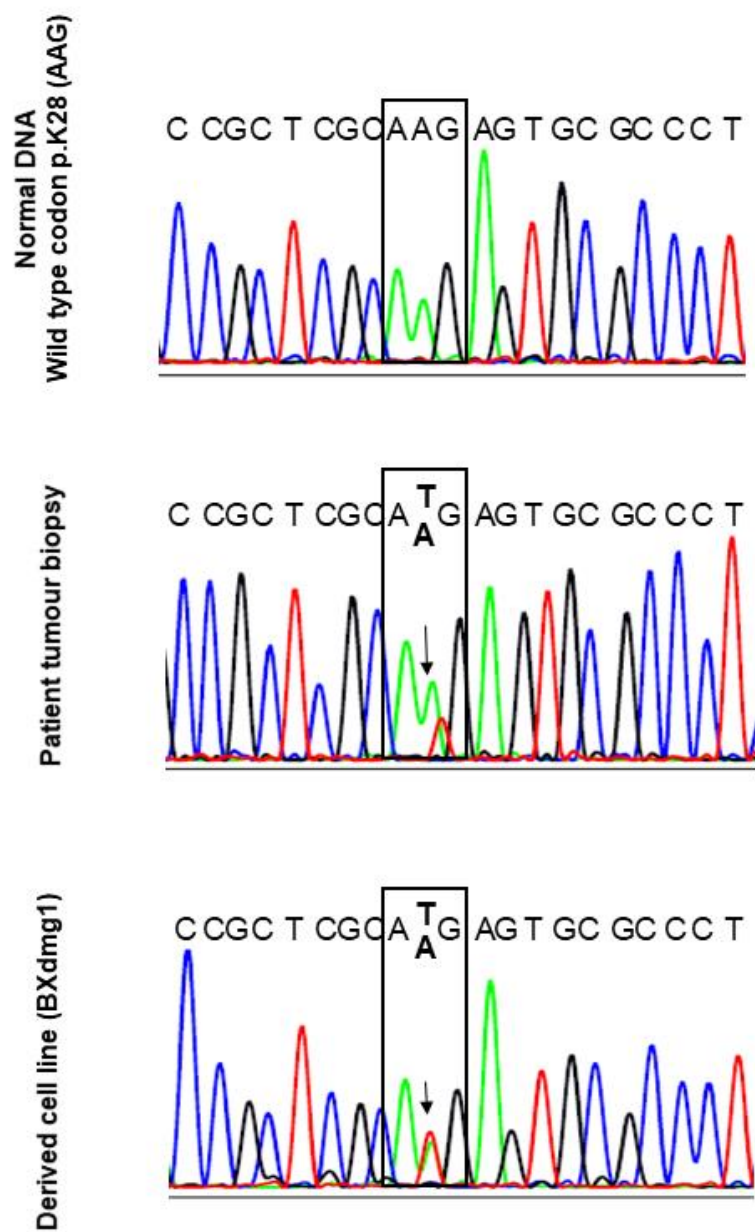


Supplementary Figure 3



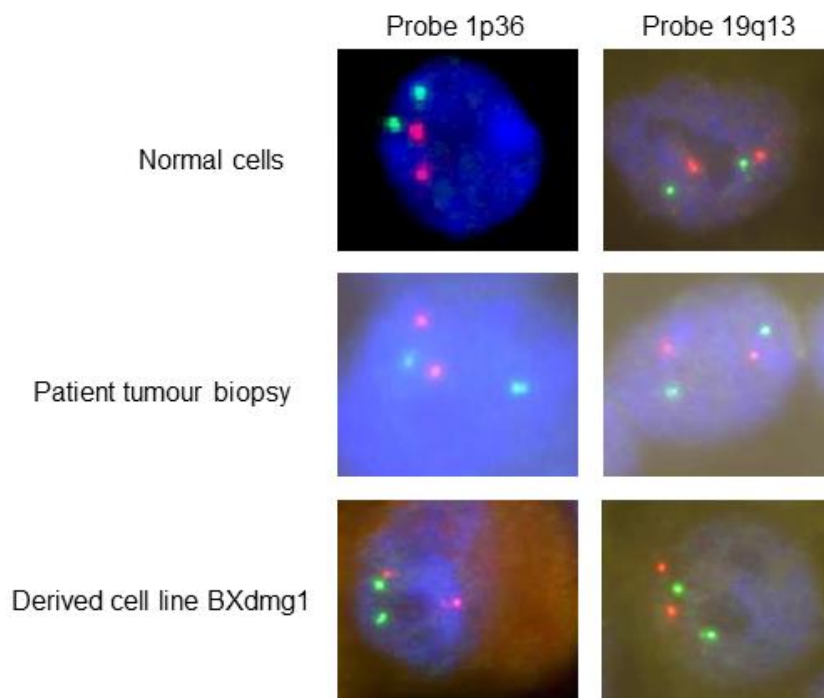
Supplementary Figure 4

H3F3A (Histone H3.3A) gene mutation analysis:
Partial H3F3A exon 2 sequence encompassing codon p.K28



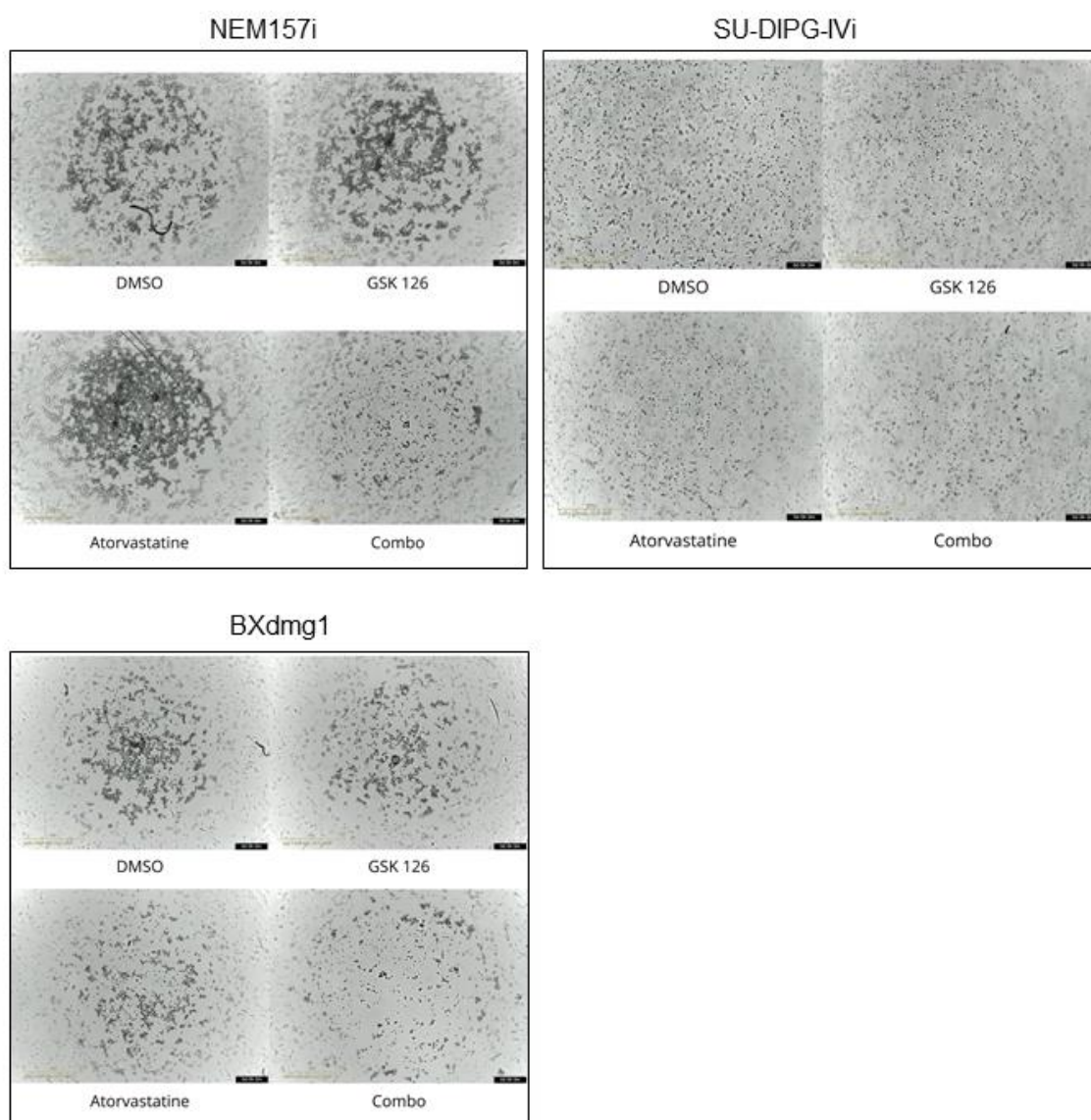
Supplementary Figure 5

Analysis of 1p36 and 19q13 deletions by FISH



Supplementary Figure 6

Live video sequences of indicated cells and treatments over 24h



Supplementary Table 1

Overrepresented metabolic pathways in GSK126 treated DMG cells (>10-fold)

Analysis Type:		PANTHER Overrepresentation Test (Released 20190711)				
Annotation Version and Release Date:		GO Ontology database Released 2019-12-09				
Analyzed List:		Client Text Box Input (Homo sapiens)				
Reference List:		Homo sapiens (all genes in database)				
Test Type:		FISHER				
Correction:		FDR				
GO biological process complete	Homo sapiens - REFUS T	GSK126 induced (48)	No of expected proteins	Pathway (fold Enrichment)	Raw P-value	FDR
triglyceride mobilization (GO:0006642)	4	2	0.01	> 100	7.60E-05	1.44E-02
negative regulation of amyloid precursor protein biosynthetic process (GO:0042985)	7	2	0.02	> 100	1.82E-04	2.78E-02
negative regulation of metalloproteinase activity (GO:1905049)	7	2	0.02	> 100	1.82E-04	2.75E-02
negative regulation of membrane protein ectodomain proteolysis (GO:0051045)	8	2	0.02	> 100	2.27E-04	3.28E-02
smooth muscle cell migration (GO:0014909)	10	2	0.02	87	3.31E-04	4.36E-02
negative regulation of glycoprotein metabolic process (GO:1903019)	16	3	0.04	82	1.05E-05	3.16E-03
plasminogen activation (GO:0031639)	11	2	0.03	80	3.91E-04	4.94E-02
L-ascorbic acid metabolic process (GO:0019852)	11	2	0.03	80	3.91E-04	4.90E-02
glucose transmembrane transport (GO:1904659)	32	3	0.07	41	6.92E-05	1.40E-02
regulation of cholesterol biosynthetic process (GO:0045540)	43	4	0.1	41	3.95E-06	1.46E-03
regulation of sterol biosynthetic process (GO:0106118)	43	4	0.1	41	3.95E-06	1.43E-03
extracellular matrix disassembly (GO:0022617)	66	6	0.15	40	1.42E-08	2.06E-05
hexose transmembrane transport (GO:0008645)	36	3	0.08	36	9.61E-05	1.74E-02
monosaccharide transmembrane transport (GO:0015749)	38	3	0.09	35	1.12E-04	1.95E-02
carbohydrate transmembrane transport (GO:0034219)	40	3	0.09	33	1.29E-04	2.21E-02
cholesterol biosynthetic process (GO:000695)	41	3	0.09	32	1.38E-04	2.31E-02
regulation of cholesterol metabolic process (GO:0090181)	56	4	0.13	31	1.06E-05	3.12E-03
zymogen activation (GO:0031638)	42	3	0.1	31	1.48E-04	2.45E-02
collagen catabolic process (GO:0030574)	43	3	0.1	31	1.58E-04	2.59E-02
secondary alcohol biosynthetic process (GO:1902653)	45	3	0.1	29	1.79E-04	2.83E-02
NAD metabolic process (GO:0019674)	45	3	0.1	29	1.79E-04	2.80E-02
regulation of glycoprotein metabolic process (GO:1903018)	46	3	0.11	29	1.91E-04	2.84E-02
sterol biosynthetic process (GO:0016126)	50	3	0.11	26	2.41E-04	3.42E-02
negative regulation of blood coagulation (GO:0030195)	50	3	0.11	26	2.41E-04	3.39E-02
negative regulation of hemostasis (GO:1900047)	51	3	0.12	26	2.55E-04	3.56E-02
negative regulation of coagulation (GO:0050819)	54	3	0.12	24	2.99E-04	4.07E-02
cholesterol transport (GO:0030301)	55	3	0.13	24	3.15E-04	4.18E-02
regulation of alcohol biosynthetic process (GO:1902930)	76	4	0.17	23	3.32E-05	7.66E-03
regulation of steroid biosynthetic process (GO:0050810)	88	4	0.2	20	5.74E-05	1.19E-02
cholesterol metabolic process (GO:0008203)	121	5	0.28	18	9.90E-06	3.09E-03
platelet degranulation (GO:0002576)	128	5	0.29	17	1.29E-05	3.66E-03
secondary alcohol metabolic process (GO:1902652)	134	5	0.31	16	1.59E-05	4.45E-03
negative regulation of protein catabolic process (GO:0042177)	135	5	0.31	16	1.65E-05	4.53E-03
sterol metabolic process (GO:0016125)	137	5	0.31	16	1.77E-05	4.77E-03
regulation of steroid metabolic process (GO:0019218)	118	4	0.27	15	1.72E-04	2.76E-02
female pregnancy (GO:0007565)	187	6	0.43	14	4.90E-06	1.66E-03
organic hydroxy compound transport (GO:0015850)	143	4	0.33	12	3.50E-04	4.50E-02
multi-multicellular organism process (GO:0044706)	219	6	0.5	12	1.18E-05	3.41E-03
negative regulation of cellular catabolic process (GO:0031330)	258	7	0.59	12	2.20E-06	8.75E-04
regulation of lipid biosynthetic process (GO:0046890)	191	5	0.44	11	8.24E-05	1.53E-02
alcohol metabolic process (GO:0006066)	320	8	0.73	11	7.02E-07	3.99E-04
phospholipid biosynthetic process (GO:0008654)	246	6	0.56	11	2.24E-05	5.94E-03
extracellular matrix organization (GO:0030198)	342	8	0.78	10	1.14E-06	5.68E-04
response to hypoxia (GO:0001666)	343	8	0.78	10	1.17E-06	5.63E-04
extracellular structure organization (GO:0043062)	343	8	0.78	10	1.17E-06	5.46E-04
steroid metabolic process (GO:0008202)	260	6	0.59	10	3.03E-05	7.10E-03
cellular component disassembly (GO:0022411)	394	9	0.9	10	2.75E-07	1.90E-04
neutrophil degranulation (GO:0043312)	482	11	1.1	10	1.08E-08	2.45E-05

Supplementary Table 2

Molecular and immunohistochemical analysis of the original BXdmg1 biopsy

High Resolution Melt (HRM)	
No mutations	Codons OK
IDH1 (exon 4, NM_005986.2)	R132
IDH2 (exon 4, NM_002168.2)	R140 + R172
Sanger sequencing	
Exon 2 H3F3A (NM_002107.4): c83A>t; pK28M	
Exon 1 HIST1H3B (NM_003537.3): Normal	K28 normal
Fish probe 1p36/1q25 and 19q13/19p13	
1p36	
95% negative nuclei	
5% positive nuclei	
19q13	
95% negative nuclei	
5% positive nuclei	
Immunohistochemistry	
GFAP: 50-60%	
Olig2: 80%	
IDH1-R132H: 0%	
ATRX: 70%	
P53: >50%	
PS100: 0%	
Synaptophysine: 0%	
PLAP: 0%	
SALL4: 0%	
Proliferatin index (Mib1): 70%	
EGFR not amplified	

Autres résultats et discussion

I. Effet de l'inhibition de EZH2 sur la croissance des cellules de DMG

Les études transcriptomiques réalisées par (Buczkwicz et al., 2014) ont montré une surexpression du transcrit EZH2 dans les cellules du DMG par rapport aux cellules cérébrales non tumorales, ce qui est potentiellement une conséquence de la mutation H3K27M. Nous pouvons supposer qu'un mécanisme de compensation peut être mis en place par les cellules afin de contrer l'hypométhylation des histones et limiter l'expression de certains gènes. Ainsi EZH2 possède un rôle oncogénique dans le gliome infiltrant du tronc cérébral et l'inhibition de EZH2 peut être considérée comme une approche thérapeutique.

Pour cela, dans un premier temps, notre but était d'inhiber l'action de EZH2 par une approche pharmacologique en utilisant différents inhibiteurs de l'activité méthyltransférase de EZH2. Nous avons testé 3 inhibiteurs, EPZ6438, GSK343 et GSK126, sur les 3 lignées de DMG utilisées au laboratoire, SU-DMG-IVi, NEM157i et NEM163i. On a pu observer que ces 3 inhibiteurs se comportent différemment. EPZ6438 n'a pas d'effet anti-prolifératif sur ces lignées (**Figure 28**) ce qui est en accord avec les études de Wiese et al. (2016) mais en contradiction avec celles de Mohammad et al. (2017) qui ont observé que EPZ6438 est efficace sur des lignées DMG autres que celles que nous utilisons (Mohammad et al., 2017). Nous avons pu montrer que GSK343 n'est actif qu'à des concentrations élevées (50 μ M) (**Figure 28**) tandis que GSK126 est anti-prolifératif et pro-apoptotique sur nos lignées DMG (résultats présentés dans l'article Figure 1C et D, page 118).

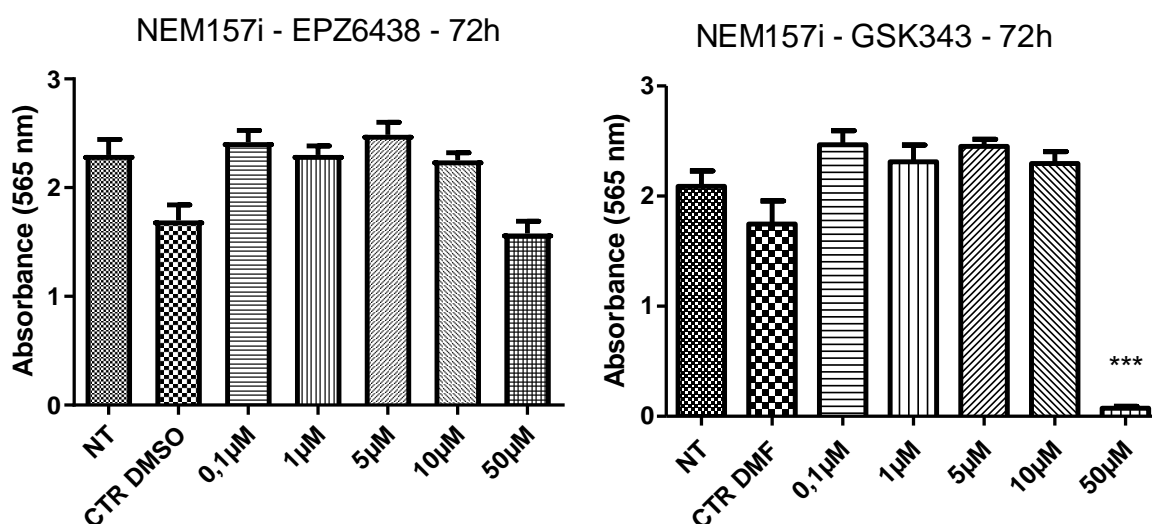


Figure 28 : Effet de l'inhibition de EZH2 sur la prolifération cellulaire.

*Les cellules NEM157i ont été traitées avec différentes concentrations d'inhibiteurs de EZH2 ou par le solvant correspondant. La prolifération cellulaire a été observée après 72 h de traitement et évaluée par la Sulforhodamine B. L'absorbance de la Sulforhodamine B est mesurée à 565 nm. Les résultats sont représentés sous forme d'histogramme (moyenne \pm écart-type). DMSO : solvant de EPZ6438, DMF : solvant de GSK343. Ces données ont été soumises au test ANOVA à 1 facteur ($n=3$, ou $n=5$). NT : Non – traité, CTR : Contrôle, *** : $P<0.00$*

L'inhibition chimique par le GSK126 diminue la prolifération tumorale, mais cette inhibition n'est pas un blocage total de la protéine, car si l'activité enzymatique est inhibée, la protéine EZH2 est toujours présente. Pour mieux comprendre le rôle de EZH2 dans le DMG, nous nous sommes orientés vers une approche génétique pour obtenir une inhibition plus stable. Des ARN interférants contre EZH2 (siEZH2) ont permis d'inhiber l'expression de EZH2 après 48 et 72 heures, mais cela n'a pas eu d'influence sur la prolifération tumorale des deux lignées SU-DIPG-IVi et NEM157i, même pour des temps plus longs (jusqu'à 6 jours). Pour corroborer ces résultats, nous avons créé des cellules KO pour EZH2 par le système CRISPR/Cas9. Bien que les cellules KO EZH2 ne produisent plus de EZH2, elles continuent à croître normalement, ce qui confirmerait que EZH2 ne joue aucun rôle dans la prolifération tumorale des cellules de DMG. Mais d'autres hypothèses peuvent être envisagées. Ainsi, l'inactivation d'un gène induit parfois des systèmes de compensation ou l'activation d'autres voies de régulation physiologiques qui rendront la mutation inefficace. Une dernière hypothèse est la redondance de gènes. À titre d'exemple, on peut citer la famille des pannexines les (Panz1, Panx2, Panx3), protéines membranaires qui jouent un rôle dans le développement et la perception sensorielle du système nerveux central. Suite à l'invalidation de Panx1 par KO, afin d'étudier son rôle dans les systèmes sensoriels, les chercheurs ont montré que la perte de Panx1 est corrélée à une régulation positive de l'expression de Panx3. Ces résultats ont conduit à l'hypothèse d'une compensation de la perte de Panx1 par Panx3 qui permet de conserver une activité pannexine dans la cellule (Whyte-Fagundes et al., 2018). Il pourrait en être de même pour les gènes Iroquois homeobox (Irx) qui sont des régulateurs transcriptionnels impliqués dans le développement. L'inhibition d'un des gènes de cette famille, par exemple Irx2, n'a aucun effet sur le

phénotype des souris KO *Irx2*, ce qui pourrait être expliqué par le système de compensation fonctionnelle par les autres gènes *Irx* (Lebel et al., 2003).

En ce qui concerne notre protéine d'intérêt, EZH2, il existe un homologue, EZH1 (voir page 47 de ce manuscrit). Les deux protéines sont présentes dans des complexes PRC2 et catalysent la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (Konze et al., 2013). EZH1 et EZH2 travaillent en association ou en complémentarité au cours du développement et de la maintenance des cellules souches embryonnaires et la régulation du programme de différenciation cellulaire. Un très grand nombre d'études ont révélé la relation entre EZH2 et le cancer mais peu concernent le lien entre EZH1 et cancer. Une étude portant sur les lymphomes myélodysplasiques/myéloprolifératifs a montré que EZH1 est essentiel pour la progression tumorale dans un contexte d'inactivation de EZH2. Les deux protéines jouent donc un rôle dans l'agressivité de ce cancer, où l'inhibition simultanée de EZH2 et de EZH1 est plus efficace pour diminuer la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* par rapport à l'inhibition de EZH2 seul (Honma et al., 2017). Les résultats que nous avons obtenus pourraient être expliqués par le fait que EZH1 a pris le relais en absence de EZH2 pour maintenir une activité de méthyltransférase dans les cellules DMG.

Nous avons donc traité les cellules KO EZH2 par GSK126 et obtenu une inhibition de la prolifération tumorale des cellules DMG avec des IC50 similaires aux cellules non-KO. Ces résultats suggèrent que GSK126 affecte d'autres cibles dans le cas du DMG. Une étude récente publiée en mai 2021 a montré que GSK126 est un inhibiteur de l'histone méthyltransférase ainsi que des histones déméthylases telles que KDM1A (Histone Lysine-specific Demethylase 1A ou LSD1) (Pasyukova et al., 2021). GSK126 pourrait peut-être interagir avec LSD1 en absence de EZH2. Des inhibiteurs de LSD1 ont été utilisés dans le DMG dans une étude en 2020 qui a montré que l'inhibition catalytique de LSD1 induit une diminution de la progression tumorale *in vitro* et *in vivo* et favorise la perfusion des cellules Natural Killers (NK). Ces résultats permettent de proposer LSD1 comme cible thérapeutique pour traiter les DMG (Bailey et al., 2020). L'utilisation des inhibiteurs spécifiques de LSD1 sur nos lignées cellulaires de DMG KO EZH2 nous permettra éventuellement de découvrir une nouvelle cible de EZH2.

II. Analyses de l'étude protéomique

Afin de comprendre la différence entre les deux approches pharmacologique et génétique, nous avons entrepris une étude protéomique par spectrométrie de masse pour tenter de faire la lumière sur les changements moléculaires qui se produisent au sein des cellules de DMG soit traitées par GSK126, soit transfectées par les siEZH2.

À partir de cette analyse, nous avons identifié 55 protéines communes entre les trois lignées traitées avec GSK126 (SU-DIPG-IVi, NEM157i et NEM163i) dont l'expression était dérégulée (surexprimée) par rapport aux cellules non traitées. Ces 55 protéines étaient pour la plupart en relation avec le métabolisme de synthèse des lipides, dont le cholestérol. Au contraire, pour les cellules transfectées avec le siEZH2, nous n'avons observé aucun changement dans la dérégulation des protéines. Ces données confirment nos résultats *in vitro* et indiquent des différences biologiques profondes causées par ces deux méthodes, qui ne peuvent pas être expliquées par une simple interférence de la fonction de EZH2.

Parmi les 55 protéines dérégulées, 11 étaient enrichies 100 fois et jouent un rôle dans la biosynthèse de cholestérol. Nous avons alors suggéré qu'en présence de GSK126, les cellules développent un mécanisme de résistance en surexprimant des enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol. Ces enzymes sont étudiées dans diverses maladies impliquant des dérégulations du métabolisme des lipides. Nous avons émis l'hypothèse qu'inhiber ces enzymes dans les cellules DMG pourrait ralentir le développement tumoral. Nous avons choisi des inhibiteurs de la synthèse du cholestérol, tels que des statines qui ciblent la HMG-CoA réductase, la terbinafine, un inhibiteur de la squalène monooxygénase, et un inhibiteur de l'acétoacétyl-CoA synthase ou ACSS2. Le traitement des cellules DMG par ces 3 inhibiteurs seuls n'a pas montré d'effet sur la prolifération tumorale après 72 heures. Or certaines statines sont déjà connues pour inhiber la croissance cellulaire des gliomes ainsi que d'autres cancers comme les leucémies (Gaist et al., 2014; Zhang et al., 2019). L'atorvastatine, une statine synthétique a montré son importance dans le traitement des divers cancers du cerveau (Afshari et al., 2021). Elle a un effet cytotoxique sur les cellules A172 du gliome adulte, diminue leur viabilité cellulaire et induit leur apoptose (Oliveira et al., 2018). Cependant l'utilisation des statines chez les patients atteints de GMB est controversée, certaines études mettant en évidence une efficacité pour traiter les glioblastomes et d'autres ne montrant aucun effet (Bhavsar et al., 2016; Gaist et al., 2014b;

Seliger et al., 2018b). Une analyse récente n'a pas confirmé un bénéfice des statines dans le traitement du glioblastome (Happold et al., 2018).

Pour notre étude, nous avons envisagé une bithérapie en combinant le GSK126 avec un des 3 inhibiteurs de la biosynthèse de cholestérol. Les résultats ont souligné un effet additif de ces deux types de drogues à de très faibles doses (4 μ M de GSK126 avec 1-5 μ M d'atorvastatine, de terbinafine ou d'inhibiteur d'ACSS2). La combinaison des traitements comme les statines avec d'autres drogues anti-cancéreuses apporte généralement plus d'efficacité qu'un traitement unique et cela a été observé dans le cas des gliomes adultes et pédiatriques dans plusieurs études (Bhat et al., 2021b; Seliger et al., 2018b; Tapia-Pérez et al., 2016b; Xiao et al., 2019b; Zhang et al., 2017). Dans notre étude sur le DMG, la combinaison d'une statine avec le GSK126 a révélé une efficacité puissante *in vitro*, tant au niveau de la suppression de la prolifération tumorale que de l'altération de la formation des sphéroïdes ou que du blocage de la migration tumorale. Ces résultats confirment l'hypothèse d'un rôle du cholestérol dans le développement du gliome et permettent d'identifier potentiellement de nouvelles cibles dans cette voie.

Pour préserver le cerveau de l'arrivée de toxines ou d'agents pathogènes, l'homéostasie du système nerveux central est contrôlée précisément par la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette barrière de vaisseaux sanguins permet de réguler d'une façon précise les échanges d'ions, de molécules et de médicaments entre le sang et le cerveau (Daneman and Prat, 2015). Elle présente un défi pour l'administration de drogues dans le système nerveux central. Plusieurs médicaments efficaces *in vitro* ont perdu leur efficacité *in vivo* ou en clinique car incapables de traverser la BHE pour atteindre leur cible, le cerveau, et exercer leur action (Begley, 2004).

Les substrats lipophiles pénètrent facilement dans le système nerveux central sans être perturbés par la BHE mais il existe d'autres molécules qui ne peuvent pas pénétrer et sont éliminées du cerveau par des transporteurs d'efflux actifs tels que les transporteurs ATP-binding cassette (ABC). À titre d'exemple, dans notre étude, les inhibiteurs de EZH2 ne peuvent pénétrer dans le cerveau à cause de leur grande affinité pour les transporteurs ABC, Or GSK126 possède une très mauvaise perméabilité membranaire et une importante interaction avec les ABC, ce qui le rend incapable de traverser la BHE (Zhang et al., 2015). Au contraire, les statines peuvent franchir la BHE mais avec des niveaux différents. La simvastatine est plus efficace que l'atorvastatine pour passer la BHE (Sierra et al., 2011).

Pour contourner ce problème, diverses techniques ont été élaborées pour améliorer la délivrance des traitements, comme par exemple l'injection du médicament directement dans le cerveau par voie intraventriculaire ou dans le liquide céphalo-rachidien par voie intrathécale. Une autre stratégie est l'administration des médicaments à des concentrations élevées directement dans le cerveau par l'implantation stéréotaxique d'un cathéter au niveau de la tumeur, pour s'assurer que la drogue atteint sa cible. Cette technique est appelée la délivrance par convection améliorée ou CED en anglais (Convection Enhanced Delivery) et est actuellement utilisée dans le traitement de diverses maladies telles que la maladie de Parkinson, Alzheimer et les gliomes. Dans le cas du DMG, le CED est une méthode attrayante, surtout quand on pense au tronc cérébral. Actuellement, des essais cliniques au niveau du tronc cérébral sont en cours (Begley, 2004; Mehta et al., 2017; Zhou et al., 2017). Dans une étude récente de 2020, l'application de la technique du CED a montré son efficacité pour faire pénétrer un inhibiteur de EZH2 (EPZ-6438) dans le tronc cérébral où il a été actif contre le DMG (Sasaki et al., 2020).

De nos jours, plusieurs études visent à augmenter la perméabilité de la BHE par des composés comme la morphine ou la méthamphétamine, ou par des ultrasons (Kluiver et al., 2020).

Nous n'avons pas testé *in vivo* l'inhibiteur de ACSS2 et la terbinafine mais il est probable que nous utiliserons la CED pour faire pénétrer dans le cerveau les inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol en combinaison avec GSK126 pour qu'ils puissent atteindre des niveaux thérapeutiques dans le tronc cérébral.

Nos résultats n'ont pas répondu à toutes les questions concernant l'efficacité inattendue de la thérapie combinatoire, notamment la migration cellulaire et l'adhésion. Ces deux processus affectent le cytosquelette et il a été démontré que l'atorvastatine régule négativement l'adhésion cellulaire chez les patients présentant une lésion myocardique. D'autres statines ont des effets anti-migratoires et anti-adhésifs *in vitro* dans les cellules de mélanome par suppression de la signalisation Rho/ROCK (Kidera et al., 2010; Patti et al., 2006).

III. Etudes *in vivo*

Bien que le modèle CAM nous ait permis de valider l'effet des traitements dans un contexte *ex vivo*, il est tout de même important de valider l'effet de ce traitement sur un modèle mammifère. Nous avons utilisé un modèle murin déjà mis en place dans le laboratoire en utilisant la lignée SU-DIPG-IVi qui a été la seule capable de développer une masse tumorale après 3 semaines dans le flanc des souris.

Comme nous avons montré l'efficacité de GSK126 *in vitro*, nous avons voulu évaluer son action dans des modèles précliniques *in vivo* chez la souris afin de valider de nouvelles stratégies de traitement. Nous avons utilisé deux modèles de souris : implantation sous cutanée de la tumeur ou implantation orthotopique de cellules tumorales dans le cerveau des souris, modèle de la maladie Le bénéfice attendu est de pouvoir offrir aux enfants malades un traitement plus efficace et moins toxique.

La xénogreffe sous cutanée été faite sur des souris adultes de 2 mois et plus. A cet âge la taille de la souris facilite la manipulation expérimentale et l'inoculation des cellules. L'injection sous cutanée des cellules SU-DIPG-IVi Luc (1 million par souris) chez les souris adultes NOD-SCID a été réalisé dans 4 groupes de 8 souris traitées par soit le solvant (DMSO), soit l'atorvastatine, soit le GSK126, soit la combinaison. La croissance tumorale été évaluée en mesurant la longueur et la largeur des tumeurs. Quand les tumeurs ont atteint 200 mm³, le traitement a commencé par une injection intrapéritonéale des différents inhibiteurs 3 fois par semaine et la croissance tumorale été évaluée en mesurant la longueur et la largeur des tumeurs après traitement. La dose de GSK126 utilisée était 6 mg/kg et celle de l'atorvastatine 10 mg/kg. Les résultats jour par jour ont montré une croissance très rapide des tumeurs sans aucune différence entre les conditions, pas d'effet des traitements sur la diminution de la croissance tumorale (**Figure 29**). Cela peut être dû au fait que la tumeur de DMG n'a pas été implantée dans son site naturel et elle était donc faiblement représentative de la maladie humaine. IL se peut aussi que les doses utilisées aient été trop faibles et qu'elles doivent être optimisées afin de permettre un bon traitement des souris et induire la réduction tumorale sans avoir de toxicité. Une étude menée sur le DMG en utilisant un modèle sous-cutané et en traitant les souris par une combinaison des deux drogues, le ZSTK474 qui est un inhibiteur de PI3K, et le trametinib, qui est un inhibiteur de MEK, n'a pas montré de différence entre les traitements (R et al., 2019). Cependant, dans le cas de glioblastome adulte, le profil n'est pas toujours le

même et des études ont montré l'efficacité de ce modèle dans des essais de traitement. Ainsi, l'association du 131I-PARP (un inhibiteur de l'enzyme de réparation de l'ADN poly (ADN-ribose) polymérase 1 (PARP-1)) et la radiothérapie a été efficace pour augmenter la survie des souris traitées par rapport aux souris contrôle recevant le solvant ainsi que pour réduire la croissance tumorale (Jannetti et al., 2018). Les cellules du glioblastome GBM inhibent également l'activité des cellules tueuses naturelles NK, qui peuvent être modifiées génétiquement pour exprimer des récepteurs d'antigènes chimériques (CAR) qui reconnaissent les antigènes de surface associés aux tumeurs et lyser les cellules tumorales. De plus, la protéine ErbB2 est surexprimée dans le GMB et cette surexpression est corrélée à une diminution de la survie des patients. L'utilisation de CAR NK spécifiques de ErbB2, appelés NK-92/5.28.z a entraîné *in vivo* une régression complète de la tumeur en tuant les cellules de GMB (Zhang et al., 2016).

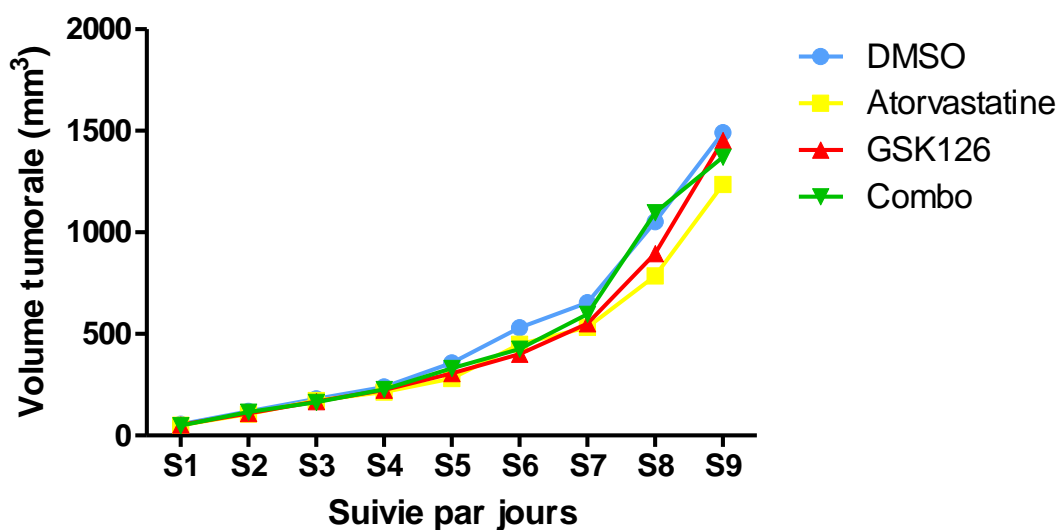


Figure 29 : Évaluation de l'effet des traitements sur les tumeurs SU-DIPG-IV dans un modèle sous-cutané de souris NOD-SCID.

Un million de cellules (SU-DIPG-IV-i,) ont été implantées dans le flanc de souris NOD-SCID. n=15 pour chaque condition. Les différentes tumeurs ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse. Les souris ont été traitées par injection intrapéritonéale de GSK126 à une concentration de 3 mg/kg (rouge, n=15), de l'atorvastatine à une concentration de 10mg/kg (jaune, n=15), du Combo (vert, n=15), ou du solvant, DMSO (bleu, n=15). Combo : Combinaison GSK126 + atorvastatine

Les tumeurs cérébrales sont des tumeurs malignes, et difficiles à traiter à cause de leurs résistances à des nombreux traitements, et la recherche de nouvelles cibles potentielles thérapeutiques nécessite l'application des modèles animaux appropriés à cette recherche. Le modèle de souris orthotopique vise à injecter les cellules tumorales humaine dérivées des patients directement dans l'organe murin correspondant atteint du cancer. Dans le cas du DMG, il s'agit du pons. Ce type de modèle reproduit fidèlement l'histologie de l'infiltration diffuse du DMG.

Comme cela est décrit dans l'article joint à ce manuscrit, nous avons utilisé un modèle orthotopique de souris pour traiter des souriceaux âgés de 2 jours dans 4 conditions : DMSO, GSK126, atorvastatine et la combinaison de GSK126 et d'atorvastatine. Nous avons pu observer après 21 jours de traitement une efficacité de la combinaison GSK126 et atorvastatine par rapport au GSK126 seul. Une hypothèse est que GSK126 sensibilise les cellules à l'atorvastatine et l'utilisation de la combinaison des deux drogues devrait donc être évaluée en tant que nouvelle stratégie de traitement de ce cancer. Cette combinaison devrait avoir peu d'effets secondaires en raison des faibles doses utilisées pour obtenir une activité antitumorale significative.

De façon similaire, Mount et al. en 2018 ont utilisé pour leurs études du DMG le modèle orthotopique. Ils ont ainsi évalué l'effet de lymphocytes T exprimant le récepteur de l'antigène chimérique (CAR) dirigé contre disialoganglioside GD2. Ils ont observé qu'ils agissaient sur l'évolution de ces tumeurs cérébrales et ont ainsi montré leur rôle actif dans le DMG. Un groupe de glycosphingolipides normalement présents sur la surface membranaire des neurones est très abondant dans les DMG : les disialoganglioside GD2. Des lymphocytes chimériques T CAR anti-GD2 sécrétant des cytokines pouvant détruire les cellules DMG *in vitro* et *in vivo*, ont été injectés dans des souriceaux nouveaux nés dans lesquels des cellules DMG avaient été introduites au niveau du pons. Leur efficacité a été démontrée par l'observation d'une clairance tumorale complète par imagerie bioluminescence (Mount et al., 2018). Une étude récente en 2020 a également utilisé le modèle orthotopique *in vivo*, pour un essai d'administration d'une combinaison d'inhibiteurs de la déméthylase d'histone LSD1 et de cellules NK. Cela s'est avéré efficace contre les gliomes DMG avec des effets antitumoraux prometteurs pour lesquels l'action des NK est renforcée par l'inhibition de LSD1 (Bailey et al., 2020).

IV. Vectorisation des drogues

L'efficacité du GSK126 a été montrée pour le traitement de divers cancers tels que le cancer de la prostate, des poumons et le myélome (Huang et al., 2019 ; Sato et al., 2013; Wu et al., 2015 ; J. Zhou et al., 2018) ainsi que pour les cellules DMG. Il reste cependant un médicament qui peut avoir des effets toxiques et secondaires indésirables. C'est pour cela que la technique de la vectorisation des drogues doit être envisagée pour élaborer une nouvelle thérapie contre le cancer. Pour minimiser les effets toxiques des traitements pharmaceutiques classiques (chimiothérapies), nous envisageons de vectoriser les médicaments actuellement en étude clinique car ils risquent d'être très toxiques pour un organisme en développement comme c'est le cas chez les enfants. Ce concept prometteur pourrait donc améliorer l'efficacité du traitement et réduire significativement sa toxicité.

Les expériences réalisées dans le cadre du programme financé par la Ligue contre le Cancer ont validé ce concept *in vitro* dans deux lignées de tumeurs cérébrales chez l'enfant. Le premier médicament choisi était la monométhyl auristatine E (MMAE) qui est un agent antinéoplasique synthétique comme je l'ai déjà décrit. En raison de sa toxicité, il ne peut pas être utilisé directement comme médicament et doit plutôt être lié à un anticorps monoclonal (MAB) qui le dirige vers les cellules cancéreuses. C'est un médicament très puissant utilisé dans le traitement de divers cancers. C'est un agent antimétabolique qui inhibe la division cellulaire en bloquant la polymérisation de la tubuline. MMAE a été choisie pour la mise au point avec nos cellules de DMG car déjà validé par notre collaborateur Sébastien Papot à Poitiers sur d'autres cancers solides très agressifs. Les médicaments couplés avec la MMAE (pro-drogue) devraient avoir des cytotoxicités très limitées sur nos lignées cellulaires. Nous ne prévoyons également aucun effet sur la croissance cellulaire des fractions chimiques dépourvue de MMAE. L'ajout de bêta-glucuronidase au milieu de culture devrait libérer la MMAE et restaurer sa cytotoxicité sur les lignées DMG. Nous avons traité les 2 lignées de tumeur du tronc cérébral SU-DIPG-IVi et NEM157i soit par la MMAE seule, soit par la MMAE vectorisée (pro-drogue), soit par la pro-drogue accompagnée de la bêta-glucuronidase sur une gamme de concentrations, pendant 72 h. Les résultats ont montré une inhibition de la prolifération cellulaire avec la MMAE seule (voir **Figure 30**, courbes rouges). La MMAE vectorisée ne montre pas de toxicité entre 1 et 100 nM pour la lignée SU-DMG-IVi et entre 10 et 100 nM pour la lignée NEM157i (**Figure 30**, courbes bleues). En

ajoutant la bêta-glucuronidase au milieu de culture cellulaire, on retrouve le même profil qu'avec la MMAE seule (**Figure 30**, courbes vertes), ce qui valide l'efficacité et la faisabilité du système dans les lignées cellulaires des gliomes du tronc cérébral. À partir de ces résultats encourageants, la création d'un système de vectorisation pour le GSK126 sera aussi importante pour un meilleur traitement des enfants atteints du DMG.

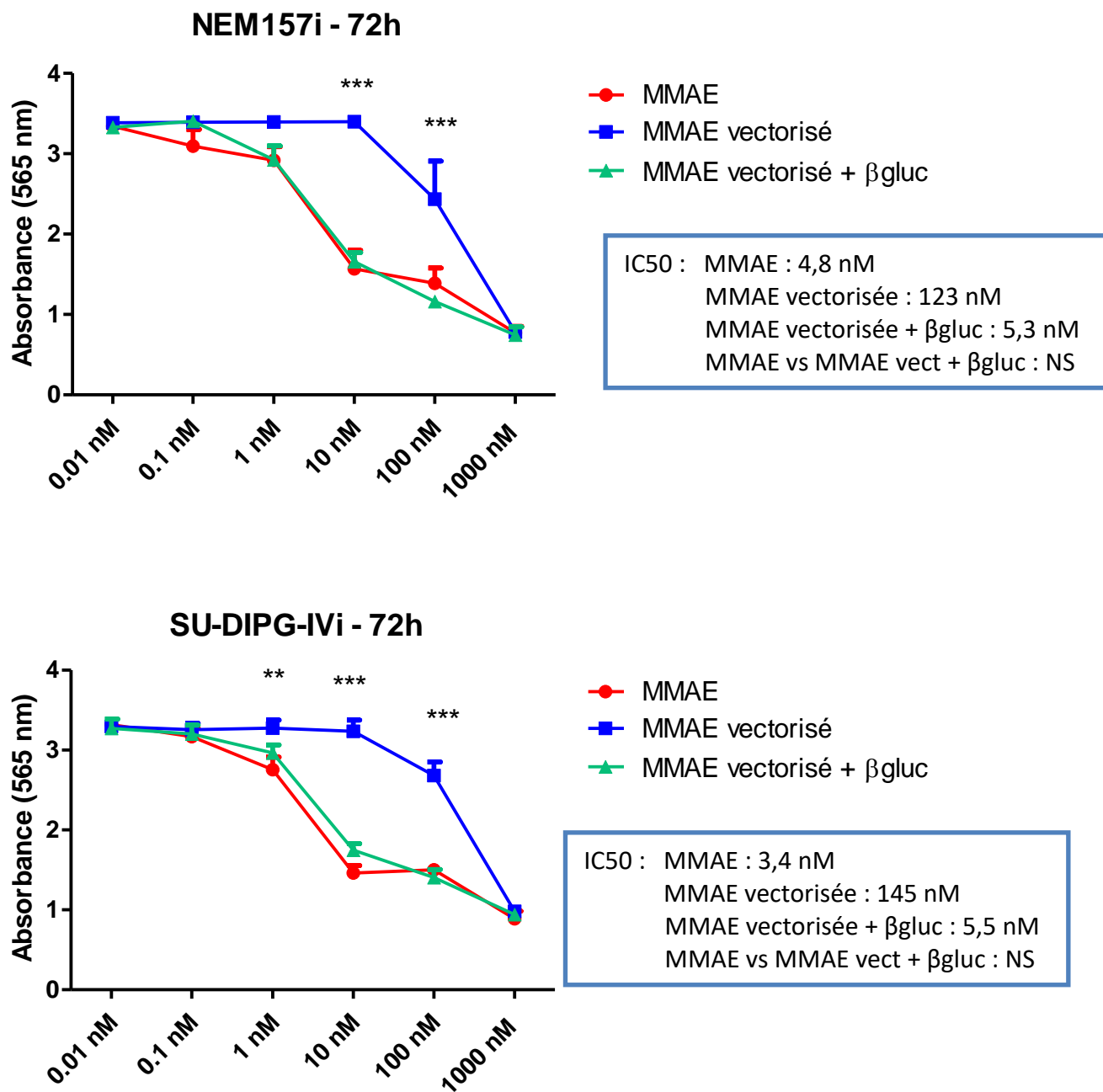


Figure 30 : Application du système de vectorisation du MMAE sur les 2 lignées de DMG.

Les cellules NEM157i et SU-DIPG-IV ont été traitées avec différentes concentrations en MMAE, MMAE vectorisée seule et MMAE vectorisée avec la β-glucuronidase. La prolifération cellulaire a été observée après 72h de traitement et évaluée par le test de la sulforhodamine B. L'absorbance de la sulforhodamine B est mesurée à 565 nm. Les résultats sont représentés sous forme d'histogramme (moyenne ± écart-type). MMAE : monométhyl auristatine E. Ces données ont été soumises au test ANOVA à un facteur (n=3) *** : P<0.001. NS : non significatif.

Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence une sensibilité inductible par le GSK126 aux inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol dans le gliome pédiatrique du tronc cérébral qui justifie une évaluation plus approfondie comme stratégie de traitement. La combinaison des traitements a été beaucoup étudiée et utilisée pour traiter divers types de cancers, où elle a pu montrer une efficacité plus puissante qu'un traitement unique. L'efficacité de la combinaison de GSK126 (un agent anti-cancéreux) avec une statine a été évaluée dans ce travail pour traiter les DMG. Les statines sont des médicaments existant sur le marché depuis longtemps pour traiter l'hypercholestérolémie, et leur utilisation est admise pour les enfants. Il sera alors utile de tester la combinaison de GSK126 avec d'autres statines.

Il est devenu clair que des facteurs génétiques et épigénétiques interviennent dans le développement du cancer, en impliquant plusieurs changements significatifs dans divers réseaux moléculaires. Cela rend plus complexe le traitement du cancer et cela nécessite l'interaction entre facteurs épigénétiques et non épigénétiques pour cibler ainsi plusieurs systèmes. Cela a conduit à l'émergence d'une nouvelle approche thérapeutique appelée « epi-drugs » qui est basée sur l'utilisation d'inhibiteurs épigénétiques tels que les inhibiteurs de HDAC, de l'ADN méthyltransférase (DNMTI), etc., seuls ou en combinaison avec d'autres drogues pour produire des effets synergiques (Ghasemi, 2020; Tomaselli et al., 2020). L'approche thérapeutique que nous avons développée dans nos travaux a conduit à des résultats inattendus et très encourageants grâce à la combinaison d'inhibiteurs épigénétiques avec des statines.

Références

- Adhyaru, B.B., and Jacobson, T.A. (2018). Safety and efficacy of statin therapy. *Nat. Rev. Cardiol.* *15*, 757–769.
- Afshari, A.R., Mollazadeh, H., Henney, N.C., Jamialahmad, T., and Sahebkar, A. (2020). Effects of statins on brain tumors: a review. *Semin. Cancer Biol.*
- Afshari, A.R., Mollazadeh, H., Henney, N.C., Jamialahmad, T., and Sahebkar, A. (2021). Effects of statins on brain tumors: a review. *Semin. Cancer Biol.* *73*, 116–133.
- Ahmad, F., Sun, Q., Patel, D., and Stommel, J.M. (2019). Cholesterol Metabolism: A Potential Therapeutic Target in Glioblastoma. *Cancers* *11*.
- Ahronian, L.G., and Lewis, B.C. (2014). Using the RCAS-TVA system to model human cancer in mice. *Cold Spring Harb. Protoc.* *2014*, 1128–1135.
- Albuquerque, H.M.T., Santos, C.M.M., and Silva, A.M.S. (2018). Cholesterol-Based Compounds: Recent Advances in Synthesis and Applications. *Molecules* *24*.
- Allen, J.A., Halverson-Tamboli, R.A., and Rasenick, M.M. (2007). Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 128–140.
- Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B., and Aggarwal, B.B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm. Res.* *25*, 2097–2116.
- Anastas, J.N., Zee, B.M., Kalin, J.H., Kim, M., Guo, R., Alexandrescu, S., Blanco, M.A., Giera, S., Gillespie, S.M., Das, J., et al. (2019). Re-programing Chromatin with a Bifunctional LSD1/HDAC Inhibitor Induces Therapeutic Differentiation in DIPG. *Cancer Cell* *36*, 528-544.e10.
- Angeles Fernández-Gil, M., Palacios-Bote, R., Leo-Barahona, M., and Mora-Encinas, J.P. (2010). Anatomy of the brainstem: a gaze into the stem of life. *Semin. Ultrasound. CT MR* *31*, 196–219.
- Antonyamy, S., Condon, B., Druzina, Z., Bonanno, J.B., Gheyi, T., Zhang, F., MacEwan, I., Zhang, A., Ashok, S., Rodgers, L., et al. (2013). Structural Context of Disease-Associated Mutations and Putative Mechanism of Autoinhibition Revealed by X-Ray Crystallographic Analysis of the EZH2-SET Domain. *PLoS ONE* *8*.
- Aoki, Y., Hashizume, R., Ozawa, T., Banerjee, A., Prados, M., James, C.D., and Gupta, N. (2012). An experimental xenograft mouse model of diffuse pontine glioma designed for therapeutic testing. *J. Neurooncol.* *108*.
- Baeza, J., Smallegan, M.J., and Denu, J.M. (2016). Mechanisms and Dynamics of Protein Acetylation in Mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* *41*, 231–244.
- Bailey, C.P., Figueroa, M., Gangadharan, A., Yang, Y., Romero, M.M., Kennis, B.A., Yadavilli, S., Henry, V., Collier, T., Monje, M., et al. (2020). Pharmacologic inhibition of lysine specific demethylase-1 (LSD1) as a therapeutic and immune-sensitization strategy in pediatric high grade glioma (pHGG). *Neuro-Oncol.*

- Bajjuri, K.M., Liu, Y., Liu, C., and Sinha, S.C. (2011). The Legumain Protease-Activated Auristatin Prodrugs Suppress Tumor Growth and Metastasis without Toxicity. *ChemMedChem* 6, 54–59.
- Balke, M., Neumann, A., Kersting, C., Agelopoulos, K., Gebert, C., Gosheger, G., Buerger, H., and Hagedorn, M. (2010). Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane. *BMC Res. Notes* 3, 58.
- Banerjee, R., Russo, N., Liu, M., Van Tubergen, E., and D’Silva, N.J. (2012). Rap1 and its regulatory proteins. *Small GTPases* 3, 192–197.
- Barton, K.L., Misuraca, K., Cordero, F., Dobrikova, E., Min, H.D., Gromeier, M., Kirsch, D.G., and Becher, O.J. (2013). PD-0332991, a CDK4/6 Inhibitor, Significantly Prolongs Survival in a Genetically Engineered Mouse Model of Brainstem Glioma. *PLoS ONE* 8.
- Beckwitt, C.H., Brufsky, A., Oltvai, Z.N., and Wells, A. (2018). Statin drugs to reduce breast cancer recurrence and mortality. *Breast Cancer Res. BCR* 20.
- Begley, D.J. (2004). Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol. Ther.* 104, 29–45.
- Bhakta, N., Force, L.M., Allemani, C., Atun, R., Bray, F., Coleman, M.P., Steliarova-Foucher, E., Frazier, A.L., Robison, L.L., Rodriguez-Galindo, C., et al. (2019). Childhood cancer burden: a review of global estimates. *Lancet Oncol.* 20, e42–e53.
- Bhat, K., Saki, M., Cheng, F., He, L., Zhang, L., Ioannidis, A., Nathanson, D., Tsang, J., Bensinger, S.J., Nghiemphu, P.L., et al. (2021a). Dopamine Receptor Antagonists, Radiation, and Cholesterol Biosynthesis in Mouse Models of Glioblastoma. *J. Natl. Cancer Inst.*
- Bhat, K., Saki, M., Cheng, F., He, L., Zhang, L., Ioannidis, A., Nathanson, D., Tsang, J., Bensinger, S.J., Nghiemphu, P.L., et al. (2021b). Dopamine Receptor Antagonists, Radiation, and Cholesterol Biosynthesis in Mouse Models of Glioblastoma. *J. Natl. Cancer Inst.* djab018.
- Bhavsar, S., Hagan, K., Arunkumar, R., Potylchansky, Y., Grasu, R., Dang, A., Carlson, R., Cowels, C., Arnold, B., Rahlfs, T.F., et al. (2016). Preoperative statin use is not associated with improvement in survival after glioblastoma surgery. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 31, 176–180.
- Blackledge, N.P., Farcas, A.M., Kondo, T., King, H.W., McGouran, J.F., Hanssen, L.L.P., Ito, S., Cooper, S., Kondo, K., Koseki, Y., et al. (2014). Variant PRC1 Complex-Dependent H2A Ubiquitylation Drives PRC2 Recruitment and Polycomb Domain Formation. *Cell* 157, 1445–1459.
- Blackledge, N.P., Fursova, N.A., Kelley, J.R., Huseyin, M.K., Feldmann, A., and Klose, R.J. (2020). PRC1 Catalytic Activity Is Central to Polycomb System Function. *Mol. Cell* 77, 857–874.e9.
- Blassberg, R., and Jacob, J. (2017). Lipid metabolism fattens up hedgehog signaling. *BMC Biol.* 15.

Blüml, S., Panigrahy, A., Laskov, M., Dhall, G., Krieger, M.D., Nelson, M.D., Finlay, J.L., and Gilles, F.H. (2011). Elevated citrate in pediatric astrocytomas with malignant progression. *Neuro-Oncol.* *13*, 1107–1117.

Boedtkjer, E., and Pedersen, S.F. (2020). The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* *82*, 103–126.

Bratkowski, M., Yang, X., and Liu, X. (2018). An Evolutionarily Conserved Structural Platform for PRC2 Inhibition by a Class of Ezh2 Inhibitors. *Sci. Rep.* *8*.

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

Buczkwicz, P., Hoeman, C., Rakopoulos, P., Pajovic, S., Letourneau, L., Dzamba, M., Morrison, A., Lewis, P., Bouffet, E., Bartels, U., et al. (2014). Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nat. Genet.* *46*, 451–456.

Bugide, S., Green, M.R., and Wajapeyee, N. (2018). Inhibition of Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) induces natural killer cell-mediated eradication of hepatocellular carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E3509–E3518.

Buhman, K.F., Accad, M., and Farese, R.V. (2000). Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1529*, 142–154.

Cage, T.A., Samagh, S.P., Mueller, S., Nicolaidis, T., Haas-Kogan, D., Prados, M., Banerjee, A., Auguste, K.I., and Gupta, N. (2013). Feasibility, safety, and indications for surgical biopsy of intrinsic brainstem tumors in children. *Childs Nerv. Syst.* *29*, 1313–1319.

Cao, R., and Zhang, Y. (2004). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *14*, 155–164.

Cao, R., Tsukada, Y., and Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A Ubiquitylation and Hox Gene Silencing. *Mol. Cell* *20*, 845–854.

Capdevielle, C., Desplat, A., Charpentier, J., Sagliocco, F., Thiebaud, P., Thézé, N., Fédou, S., Hooks, K.B., Silvestri, R., Guyonnet-Duperat, V., et al. (2020). HDAC inhibition induces expression of scaffolding proteins critical for tumor progression in pediatric glioma: focus on EBP50 and IRSp53. *Neuro-Oncol.* *22*, 550–562.

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

Castel, D., Philippe, C., Kergrohen, T., Sill, M., Merlevede, J., Barret, E., Puget, S., Sainte-Rose, C., Kramm, C.M., Jones, C., et al. (2018). Transcriptomic and epigenetic profiling of “diffuse midline gliomas, H3 K27M-mutant” discriminate two subgroups based on the type of histone

H3 mutated and not supratentorial or infratentorial location. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 117.

Castillo-Aguilera, O., Depreux, P., Halby, L., Arimondo, P.B., and Goossens, L. (2017). DNA Methylation Targeting: The DNMT/HMT Crosstalk Challenge. *Biomolecules* 7.

Cermenati, G., Brioschi, E., Abbiati, F., Melcangi, R.C., Caruso, D., and Mitro, N. (2013a). Liver X receptors, nervous system, and lipid metabolism. *J. Endocrinol. Invest.* 36, 435–443.

Cermenati, G., Brioschi, E., Abbiati, F., Melcangi, R.C., Caruso, D., and Mitro, N. (2013b). Liver X receptors, nervous system, and lipid metabolism. *J. Endocrinol. Invest.* 36, 435–443.

Cerqueira, N.M.F.S.A., Oliveira, E.F., Gesto, D.S., Santos-Martins, D., Moreira, C., Moorthy, H.N., Ramos, M.J., and Fernandes, P.A. (2016). Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry* 55, 5483–5506.

Cha, T.-L., Zhou, B.P., Xia, W., Wu, Y., Yang, C.-C., Chen, C.-T., Ping, B., Otte, A.P., and Hung, M.-C. (2005). Akt-Mediated Phosphorylation of EZH2 Suppresses Methylation of Lysine 27 in Histone H3. *Science* 310, 306–310.

Chammas, P., Mocavini, I., and Croce, L.D. (2020). Engaging chromatin: PRC2 structure meets function. *Br. J. Cancer* 122, 315–328.

Chang, C.C.Y., Sakashita, N., Ornvold, K., Lee, O., Chang, E.T., Dong, R., Lin, S., Lee, C.-Y.G., Strom, S.C., Kashyap, R., et al. (2000). Immunological Quantitation and Localization of ACAT-1 and ACAT-2 in Human Liver and Small Intestine*. *J. Biol. Chem.* 275, 28083–28092.

Chang, C.-J., Yang, J.-Y., Xia, W., Chen, C.-T., Xie, X., Chao, C.-H., Woodward, W.A., Hsu, J.-M., Hortobagyi, G.N., and Hung, M.-C. (2011). EZH2 promotes expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1- β -catenin signaling. *Cancer Cell* 19, 86–100.

Chang, T.-Y., Chang, C.C.Y., Ohgami, N., and Yamauchi, Y. (2006). Cholesterol Sensing, Trafficking, and Esterification. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 129–157.

Chanvivattana, Y., Bishopp, A., Schubert, D., Stock, C., Moon, Y.-H., Sung, Z.R., and Goodrich, J. (2004). Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in Arabidopsis. *Development* 131, 5263–5276.

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

Châtre, R., Lange, J., Péraudeau, E., Poinot, P., Lerondel, S., Le Pape, A., Clarhaut, J., Renoux, B., and Papot, S. (2020). In vivo synthesis of triple-loaded albumin conjugate for efficient targeted cancer chemotherapy. *J. Controlled Release* 327, 19–25.

Chen, Y.-T., Zhu, F., Lin, W.-R., Ying, R.-B., Yang, Y.-P., and Zeng, L.-H. (2016). The novel EZH2 inhibitor, GSK126, suppresses cell migration and angiogenesis via down-regulating VEGF-A. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 77, 757–765.

Chheda, Z.S., Kohanbash, G., Okada, K., Jahan, N., Sidney, J., Pecoraro, M., Yang, X., Carrera, D.A., Downey, K.M., Shrivastav, S., et al. (2018). Novel and shared neoantigen derived from histone 3 variant H3.3K27M mutation for glioma T cell therapy. *J. Exp. Med.* *215*, 141–157.

Chien, Y.-C., Liu, L.-C., Ye, H.-Y., Wu, J.-Y., and Yu, Y.-L. (2018). EZH2 promotes migration and invasion of triple-negative breast cancer cells via regulating TIMP2-MMP-2/-9 pathway. *Am. J. Cancer Res.* *8*, 422–434.

Chou, R.-H., Chiu, L., Yu, Y.-L., and Shyu, W.-C. (2015). The Potential Roles of EZH2 in Regenerative Medicine. *Cell Transplant.* *24*, 313–317.

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

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

Comet, I., and Helin, K. (2014). Revolution in the Polycomb hierarchy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 573–575.

Comet, I., Riising, E.M., Leblanc, B., and Helin, K. (2016). Maintaining cell identity: PRC2-mediated regulation of transcription and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 803–810.

Cooper, S., Dienstbier, M., Hassan, R., Schermelleh, L., Sharif, J., Blackledge, N.P., De Marco, V., Elderkin, S., Koseki, H., Klose, R., et al. (2014). Targeting polycomb to pericentric heterochromatin in embryonic stem cells reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. *Cell Rep.* *7*, 1456–1470.

Copeland, R.A., Solomon, M.E., and Richon, V.M. (2009). Protein methyltransferases as a target class for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* *8*, 724–732.

Cordero, F.J., Huang, Z., Grenier, C., He, X., Hu, G., McLendon, R., Murphy, S.K., Hashizume, R., and Becher, O. (2017). Histone H3.3K27M represses p16 to accelerate gliomagenesis in a murine model of DIPG. *Mol. Cancer Res. MCR* *15*, 1243–1254.

Cortes, V.A., Busso, D., Mardones, P., Maiz, A., Arteaga, A., Nervi, F., and Rigotti, A. (2013). Retracted: Advances in the physiological and pathological implications of cholesterol. *Biol. Rev.* *88*, 825–843.

Cortes, V.A., Busso, D., Maiz, A., Arteaga, A., Nervi, F., and Rigotti, A. (2014). Physiological and pathological implications of cholesterol. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *19*, 416–428.

Courtney, R., and Landreth, G.E. (2016a). LXR regulation of brain cholesterol: from development to disease. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *27*, 404–414.

Courtney, R., and Landreth, G.E. (2016b). LXR Regulation of Brain Cholesterol: From Development to Disease. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *27*, 404–414.

- Coutel, Y. (1959). [Infiltrating glioblastoma of the brain stem in an 8-year-old child; normalization of the pneumoencephalogram after radiotherapy]. *Rev. Otoneuroophthalmol.* *31*, 119–123.
- Creasy, C.L. (2017). Untangling the role of mutant histone H3 in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Med.* *23*, 413–414.
- Dagdemiir, A., Judes, G., Lebert, A., Echegut, M., Karsli-Ceppioglu, S., Rifai, K., Daures, M., Ngollo, M., Dubois, L., Penault-Llorca, F., et al. (2016). Epigenetic Modifications with DZNep, NaBu and SAHA in Luminal and Mesenchymal-like Breast Cancer Subtype Cells. *Cancer Genomics Proteomics* *13*, 291–303.
- Daneman, R., and Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*, a020412.
- Daskalaki, M.G., Tsatsanis, C., and Kampranis, S.C. (2018). Histone methylation and acetylation in macrophages as a mechanism for regulation of inflammatory responses. *J. Cell. Physiol.* *233*, 6495–6507.
- Dastghaib, S., Shojaei, S., Mostafavi-Pour, Z., Sharma, P., Patterson, J.B., Samali, A., Mokarram, P., and Ghavami, S. (2020). Simvastatin Induces Unfolded Protein Response and Enhances Temozolomide-Induced Cell Death in Glioblastoma Cells. *Cells* *9*.
- Deb, G., Thakur, V.S., and Gupta, S. (2013). Multifaceted role of EZH2 in breast and prostate tumorigenesis. *Epigenetics* *8*, 464–476.
- Deb, G., Singh, A.K., and Gupta, S. (2014). EZH2: Not EZHY (Easy) to Deal. *Mol. Cancer Res. MCR* *12*, 639–653.
- Denny, W.A. (2005). Hypoxia-activated anticancer drugs. *Expert Opin. Ther. Pat.* *15*, 635–646.
- Desandes, E., Faure, L., Guissou, S., Goujon, S., Berger, C., Minard-Colin, V., Petit, A., Schleiermacher, G., Poulalhon, C., Lacour, B., et al. (2020). Infant cancers in France: Incidence and survival (2000–2014). *Cancer Epidemiol.* *65*, 101697.
- Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T., and Ozato, K. (2003). The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8758–8763.
- Di Cerbo, V., and Schneider, R. (2013). Cancers with wrong HATs: the impact of acetylation. *Brief. Funct. Genomics* *12*, 231–243.
- Diaz, E., Machutta, C.A., Chen, S., Jiang, Y., Nixon, C., Hofmann, G., Key, D., Sweitzer, S., Patel, M., Wu, Z., et al. (2012). Development and validation of reagents and assays for EZH2 peptide and nucleosome high-throughput screens. *J. Biomol. Screen.* *17*, 1279–1292.
- Duchatel, R.J., Jackson, E.R., Alvaro, F., Nixon, B., Hondermarck, H., and Dun, M.D. (2019). Signal Transduction in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Proteomics* *19*, e1800479.

- Dudakovic, A., Samsonraj, R.M., Paradise, C.R., Galeano-Garces, C., Mol, M.O., Galeano-Garces, D., Zan, P., Galvan, M.L., Hevesi, M., Pichurin, O., et al. (2020). Inhibition of the epigenetic suppressor EZH2 primes osteogenic differentiation mediated by BMP2. *J. Biol. Chem.* *295*, 7877–7893.
- Ederhy, S., Duclos, B., Mahammedi, H., and Doublet, J.-D. (2011). [Management of side-effects of targeted therapies in renal cancer: cardiovascular side-effects]. *Bull. Cancer (Paris)* *98*, S19-34.
- Ellsworth, D.L., Blackburn, H.L., Shriver, C.D., Rabizadeh, S., Soon-Shiong, P., and Ellsworth, R.E. (2017). Single-cell sequencing and tumorigenesis: improved understanding of tumor evolution and metastasis. *Clin. Transl. Med.* *6*.
- Ernst, T., Chase, A.J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C.E., Bryant, C., Jones, A.V., Waghorn, K., Zoi, K., Ross, F.M., Reiter, A., et al. (2010). Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat. Genet.* *42*, 722–726.
- Espenshade, P.J., and Hughes, A.L. (2007). Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* *41*, 401–427.
- Fang, D., Gan, H., Cheng, L., Lee, J.-H., Zhou, H., Sarkaria, J.N., Daniels, D.J., and Zhang, Z. H3.3K27M mutant proteins reprogram epigenome by sequestering the PRC2 complex to poised enhancers. *ELife* *7*.
- Faubion, S.S., Kapoor, E., Moyer, A.M., Hodis, H.N., and Miller, V.M. (2019a). Statin therapy: does sex matter? *Menopause N. Y. N* *26*, 1425–1435.
- Faubion, S.S., Kapoor, E., Moyer, A.M., Hodis, H.N., and Miller, V.M. (2019b). Statin Therapy: Does Sex Matter? *Menopause N. Y. N* *26*, 1425–1435.
- Filippakopoulos, P., and Knapp, S. (2014). Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat. Rev. Drug Discov.* *13*, 337–356.
- Fioravanti, R., Stazi, G., Zwergel, C., Valente, S., and Mai, A. (2018). Six Years (2012-2018) of Researches on Catalytic EZH2 Inhibitors: The Boom of the 2-Pyridone Compounds. *Chem. Rec. N. Y. N* *18*, 1818–1832.
- Flannery, P.C., DeSisto, J.A., Amani, V., Venkataraman, S., Lemma, R.T., Prince, E.W., Donson, A., Moroze, E.E., Hoffman, L., Levy, J.M.M., et al. (2018). Preclinical analysis of MTOR complex 1/2 inhibition in diffuse intrinsic pontine glioma. *Oncol. Rep.* *39*, 455–464.
- Fontebasso, A.M., Papillon-Cavanagh, S., Schwartzenruber, J., Nikbakht, H., Gerges, N., Fiset, P.-O., Bechet, D., Faury, D., De Jay, N., Ramkissoon, L., et al. (2014). Recurrent somatic mutations in ACVR1 in pediatric midline high-grade astrocytoma. *Nat. Genet.* *46*, 462–466.
- Gaist, D., Hallas, J., Friis, S., Hansen, S., and Sørensen, H.T. (2014a). Statin use and survival following glioblastoma multiforme. *Cancer Epidemiol.* *38*, 722–727.
- Gaist, D., Hallas, J., Friis, S., Hansen, S., and Sørensen, H.T. (2014b). Statin use and survival following glioblastoma multiforme. *Cancer Epidemiol.* *38*, 722–727.

- Gelissen, I.C., Harris, M., Rye, K.-A., Quinn, C., Brown, A.J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L., and Jessup, W. (2006). ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *26*, 534–540.
- Ghasemi, S. (2020). Cancer's epigenetic drugs: where are they in the cancer medicines? *Pharmacogenomics J.* *20*, 367–379.
- Gil, J., and O'Loughlen, A. (2014). PRC1 complex diversity: where is it taking us? *Trends Cell Biol.* *24*, 632–641.
- Gomez-roman, N., Jackson, M., and Chalmers, A.J. (2019). Cholesterol protects glioblastoma cells against premature mitosis. *Neuro-Oncol.* *21*, iv7–iv7.
- Gong, F., and Miller, K.M. (2019). Histone Methylation and the DNA Damage Response. *Mutat. Res.* *780*, 37–47.
- Gonzalez, M.E., DuPrie, M.L., Krueger, H., Merajver, S.D., Ventura, A.C., Toy, K.A., and Kleer, C.G. (2011). Histone Methyltransferase EZH2 Induces Akt-Dependent Genomic Instability and BRCA1 Inhibition in Breast Cancer. *Cancer Res.* *71*, 2360–2370.
- Gonzalez, M.E., Moore, H.M., Li, X., Toy, K.A., Huang, W., Sabel, M.S., Kidwell, K.M., and Kleer, C.G. (2014). EZH2 expands breast stem cells through activation of NOTCH1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 3098–3103.
- Goodwin, C.R., Xu, R., Iyer, R., Sankey, E.W., Liu, A., Abu-Bonsrah, N., Sarabia-Estrada, R., Frazier, J.L., Sciubba, D.M., and Jallo, G.I. (2016). Local delivery methods of therapeutic agents in the treatment of diffuse intrinsic brainstem gliomas. *Clin. Neurol. Neurosurg.* *142*, 120–127.
- Grasso, C.S., Tang, Y., Truffaux, N., Berlow, N.E., Liu, L., Debily, M.-A., Quist, M.J., Davis, L.E., Huang, E.C., Woo, P.J., et al. (2015). Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Med.* *21*, 555–559.
- Green, A.L., and Kieran, M.W. (2015). Pediatric Brainstem Gliomas: New Understanding Leads to Potential New Treatments for Two Very Different Tumors. *Curr. Oncol. Rep.* *17*, 12.
- Grill, J., Puget, S., Andreiuolo, F., Philippe, C., MacConaill, L., and Kieran, M.W. (2012). Critical oncogenic mutations in newly diagnosed pediatric diffuse intrinsic pontine glioma. *Pediatr. Blood Cancer* *58*, 489–491.
- Grimm, S.A., and Chamberlain, M.C. (2013). Brainstem Glioma: A Review. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *13*, 346.
- Gulati, N., Beguelin, W., and Giulino-Roth, L. (2018). EMERGING DRUG PROFILE. *Leuk. Lymphoma* *59*, 1574–1585.
- Guo, D., Bell, E.H., and Chakravarti, A. (2013). Lipid metabolism emerges as a promising target for malignant glioma therapy. *CNS Oncol.* *2*, 289–299.

Gupta, N., Goumnerova, L.C., Manley, P., Chi, S.N., Neuberg, D., Puligandla, M., Fangusaro, J., Goldman, S., Tomita, T., Alden, T., et al. (2018). Prospective feasibility and safety assessment of surgical biopsy for patients with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro-Oncol.* *20*, 1547–1555.

Gwak, H.-S., and Park, H.J. (2017). Developing chemotherapy for diffuse pontine intrinsic gliomas (DIPG). *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *120*, 111–119.

Haery, L., Thompson, R.C., and Gilmore, T.D. (2015). Histone acetyltransferases and histone deacetylases in B- and T-cell development, physiology and malignancy. *Genes Cancer* *6*, 184–213.

Hagedorn, M., Zilberberg, L., Wilting, J., Canron, X., Carrabba, G., Giussani, C., Pluderi, M., Bello, L., and Bikfalvi, A. (2002). Domain Swapping in a COOH-terminal Fragment of Platelet Factor 4 Generates Potent Angiogenesis Inhibitors. *Cancer Res.* *62*, 6884–6890.

Hagedorn, M., Javerzat, S., Gilges, D., Meyre, A., Lafarge, B. de, Eichmann, A., and Bikfalvi, A. (2005). Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 1643–1648.

Hall, M.D., Odia, Y., Allen, J.E., Tarapore, R., Khatib, Z., Niazi, T.N., Daghistani, D., Schalop, L., Chi, A.S., Oster, W., et al. (2019). First clinical experience with DRD2/3 antagonist ONC201 in H3 K27M-mutant pediatric diffuse intrinsic pontine glioma: a case report. *J. Neurosurg. Pediatr.* 1–7.

Halvorson, K.G., Barton, K.L., Schroeder, K., Misuraca, K.L., Hoeman, C., Chung, A., Crabtree, D.M., Cordero, F.J., Singh, R., Spasojevic, I., et al. (2015). A High-Throughput In Vitro Drug Screen in a Genetically Engineered Mouse Model of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Identifies BMS-754807 as a Promising Therapeutic Agent. *PLoS ONE* *10*.

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

Han, Z., Xing, X., Hu, M., Zhang, Y., Liu, P., and Chai, J. (2007). Structural Basis of EZH2 Recognition by EED. *Structure* *15*, 1306–1315.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.

Happold, C., Gorlia, T., Nabors, L.B., Erridge, S.C., Reardon, D.A., Hicking, C., Picard, M., Stupp, R., Weller, M., and For the EORTC Brain Tumor Group and on behalf of the CENTRIC and CORE Clinical Trial Groups (2018). Do statins, ACE inhibitors or sartans improve outcome in primary glioblastoma? *J. Neurooncol.* *138*, 163–171.

Harutyunyan, A.S., Krug, B., Chen, H., Papillon-Cavanagh, S., Zeinieh, M., De Jay, N., Deshmukh, S., Chen, C.C.L., Belle, J., Mikael, L.G., 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., Smirnov, I., Liu, S., Phillips, J.J., Hyer, J., McKnight, T.R., Wendland, M., Prados, M., Banerjee, A., Nicolaidis, T., et al. (2012). Characterization of a diffuse intrinsic pontine glioma cell line: implications for future investigations and treatment. *J. Neurooncol.* *110*, 305–313.

He, Y., Selvaraju, S., Curtin, M.L., Jakob, C.G., Zhu, H., Comess, K.M., Shaw, B., The, J., Lima-Fernandes, E., Szewczyk, M.M., et al. (2017). The EED protein-protein interaction inhibitor A-395 inactivates the PRC2 complex. *Nat. Chem. Biol.* *13*, 389–395.

Hervioui, L., Cavalli, G., Cartron, G., Klein, B., and Moreaux, J. (2015). EZH2 in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Oncotarget* *7*, 2284–2296.

Hoeman, C., Shen, C., and Becher, O.J. (2018). r et al., 2014). *Front. Oncol.* *8*.

Holoch, D., and Margueron, R. (2017). Mechanisms Regulating PRC2 Recruitment and Enzymatic Activity. *Trends Biochem. Sci.* *42*, 531–542.

Höltkä, P., Hovi, L., Saarinen-Pihkala, U.M., Peltola, J., and Alaluusua, S. (2005). Disturbed root development of permanent teeth after pediatric stem cell transplantation. Dental root development after SCT. *Cancer* *103*, 1484–1493.

Honma, D., Kanno, O., Watanabe, J., Kinoshita, J., Hirasawa, M., Nosaka, E., Shiroishi, M., Takizawa, T., Yasumatsu, I., Horiuchi, T., et al. (2017). Novel orally bioavailable EZH1/2 dual inhibitors with greater antitumor efficacy than an EZH2 selective inhibitor. *Cancer Sci.* *108*, 2069–2078.

Howie, H., Rijal, C.M., and Ressler, K.J. (2019). A review of epigenetic contributions ^[1]to post-traumatic stress disorder. *Dialogues Clin. Neurosci.* *21*, 417–428.

Hu, J., La Vecchia, C., de Groh, M., Negri, E., Morrison, H., Mery, L., and Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group (2012). Dietary cholesterol intake and cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *23*, 491–500.

Huang, B., Song, B., and Xu, C. (2020). Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat. Metab.* *2*, 132–141.

Huang, S., Wang, Z., Zhou, J., Huang, J., Zhou, L., Luo, J., Wan, Y.Y., Long, H., and Zhu, B. (2019). EZH2 Inhibitor GSK126 Suppresses Antitumor Immunity by Driving Production of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* *79*, 2009–2020.

Hurley, R.A., Flashman, L.A., Chow, T.W., and Taber, K.H. (2010). The Brainstem: Anatomy, Assessment, and Clinical Syndromes. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* *22*, iv–7.

Hussain, G., Wang, J., Rasul, A., Anwar, H., Imran, A., Qasim, M., Zafar, S., Kamran, S.K.S., Razzaq, A., Aziz, N., et al. (2019). Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. *Lipids Health Dis.* *18*, 26.

Hyun, K., Jeon, J., Park, K., and Kim, J. (2017). Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp. Mol. Med.* *49*, e324.

- Istvan, E.S., and Deisenhofer, J. (2001). Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science* 292, 1160–1164.
- Iwama, A. (2017). Polycomb repressive complexes in hematological malignancies. *Blood* 130, 23–29.
- Jannetti, S.A., Carlucci, G., Carney, B., Kossatz, S., Shenker, L., Carter, L.M., Salinas, B., Brand, C., Sadique, A., Donabedian, P.L., et al. (2018). PARP-1–Targeted Radiotherapy in Mouse Models of Glioblastoma. *J. Nucl. Med.* 59, 1225–1233.
- Janssens, G.O., Jansen, M.H., Lauwers, S.J., Nowak, P.J., Oldenburger, F.R., Bouffet, E., Saran, F., Ulzen, K.K., Lindert, E.J. van, Schieving, J.H., et al. (2013). Hypofractionation vs Conventional Radiation Therapy for Newly Diagnosed Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: A Matched-Cohort Analysis. *Int. J. Radiat. Oncol. • Biol. • Phys.* 85, 315–320.
- Jia, X., Lorenz, P., and Ballantyne, C.M. (2019). Poststatin Lipid Therapeutics: A Review. *Methodist DeBakey Cardiovasc. J.* 15, 32–38.
- Jin, B., Zhang, P., Zou, H., Ye, H., Wang, Y., Zhang, J., Yang, H., and Pan, J. (2020). Verification of EZH2 as a druggable target in metastatic uveal melanoma. *Mol. Cancer* 19.
- Johung, T.B., and Monje, M. (2017). Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: New Pathophysiological Insights and Emerging Therapeutic Targets. *Curr. Neuropharmacol.* 15, 88–97.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2007). The Epigenomics of Cancer. *Cell* 128, 683–692.
- Jubierre, L., Jiménez, C., Rovira, E., Soriano, A., Sábado, C., Gros, L., Llort, A., Hladun, R., Roma, J., Toledo, J.S. de, et al. (2018). Targeting of epigenetic regulators in neuroblastoma. *Exp. Mol. Med.* 50.
- Jung, H.-Y., Jun, S., Lee, M., Kim, H.-C., Wang, X., Ji, H., McCrea, P.D., and Park, J.-I. (2013). PAF and EZH2 Induce Wnt/ β -Catenin Signaling Hyperactivation. *Mol. Cell* 52, 193–205.
- Kambhampati, M., Perez, J.P., Yadavilli, S., Saratsis, A.M., Hill, A.D., Ho, C.-Y., Panditharatna, E., Markel, M., Packer, R.J., and Nazarian, J. (2015). A standardized autopsy procurement allows for the comprehensive study of DIPG biology. *Oncotarget* 6, 12740–12747.
- Ketel, C.S., Andersen, E.F., Vargas, M.L., Suh, J., Strome, S., and Simon, J.A. (2005). Subunit Contributions to Histone Methyltransferase Activities of Fly and Worm Polycomb Group Complexes. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6857–6868.
- Khatua, S., Sadighi, Z.S., Pearlman, M.L., Bochare, S., and Vats, T.S. (2012). Brain Tumors in Children- Current Therapies and Newer Directions. *Indian J. Pediatr.* 79, 922–927.
- Khuong-Quang, D.-A., Buczkowicz, P., Rakopoulos, P., Liu, X.-Y., Fontebasso, A.M., Bouffet, E., Bartels, U., Albrecht, S., Schwartzentruber, J., Letourneau, L., et al. (2012). K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 439–447.

- Kidera, Y., Tsubaki, M., Yamazoe, Y., Shoji, K., Nakamura, H., Ogaki, M., Satou, T., Itoh, T., Isozaki, M., Kaneko, J., et al. (2010). Reduction of lung metastasis, cell invasion, and adhesion in mouse melanoma by statin-induced blockade of the Rho/Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *CR 29*, 127.
- Kim, E., Kim, M., Woo, D.-H., Shin, Y., Shin, J., Chang, N., Oh, Y.T., Kim, H., Rheey, J., Nakano, I., et al. (2013). Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell* *23*, 839–852.
- Kim, E., Ilagan, J.O., Liang, Y., Daubner, G.M., Lee, S.C.-W., Ramakrishnan, A., Li, Y., Chung, Y.R., Micol, J.-B., Murphy, M., et al. (2015). SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia Through Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell* *27*, 617–630.
- Kluiver, T.A., Alieva, M., van Vuurden, D.G., Wehrens, E.J., and Rios, A.C. (2020). Invaders Exposed: Understanding and Targeting Tumor Cell Invasion in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front. Oncol.* *10*.
- Knutson, S.K., Wigle, T.J., Warholic, N.M., Sneeringer, C.J., Allain, C.J., Klaus, C.R., Sacks, J.D., Raimondi, A., Majer, C.R., Song, J., et al. (2012). A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat. Chem. Biol.* *8*, 890–896.
- Knutson, S.K., Warholic, N.M., Wigle, T.J., Klaus, C.R., Allain, C.J., Raimondi, A., Porter Scott, M., Chesworth, R., Moyer, M.P., Copeland, R.A., et al. (2013). Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 7922–7927.
- Konze, K.D., Ma, A., Li, F., Barsyte-Lovejoy, D., Parton, T., Macnevin, C.J., Liu, F., Gao, C., Huang, X.-P., Kuznetsova, E., et al. (2013). An orally bioavailable chemical probe of the Lysine Methyltransferases EZH2 and EZH1. *ACS Chem. Biol.* *8*, 1324–1334.
- Koubi, M., Chabannon, C., and Duprez, E. (2017). Au cœur d'une complexité biologique - EZH2, une protéine du groupe Polycomb. *médecine/sciences* *33*, 499–505.
- Kumar, R., Liu, A.P.Y., Orr, B.A., Northcott, P.A., and Robinson, G.W. (2018). Advances in the classification of pediatric brain tumors through DNA methylation profiling: From research tool to frontline diagnostic. *Cancer* *124*, 4168–4180.
- Kundu, S., Ji, F., Sunwoo, H., Jain, G., Lee, J.T., Sadreyev, R.I., Dekker, J., and Kingston, R.E. (2017). Polycomb Repressive Complex 1 generates discrete compacted domains that change during differentiation. *Mol. Cell* *65*, 432-446.e5.
- Kuzu, O.F., Noory, M.A., and Robertson, G.P. (2016). The role of cholesterol in cancer. *Cancer Res.* *76*, 2063–2070.
- Lapin, D.H., Tsoli, M., and Ziegler, D.S. (2017). Genomic Insights into Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front. Oncol.* *7*, 57.

Larson, J.D., Kasper, L.H., Paugh, B.S., Jin, H., Wu, G., Kwon, C.-H., Fan, Y., Shaw, T.I., Silveira, A.B., Qu, C., et al. (2019). Histone H3.3 K27M Accelerates Spontaneous Brainstem Glioma and Drives Restricted Changes in Bivalent Gene Expression. *Cancer Cell* 35, 140-155.e7.

Leatham-Jensen, M., Uyehara, C.M., Strahl, B.D., Matera, A.G., Duronio, R.J., and McKay, D.J. (2019). Lysine 27 of replication-independent histone H3.3 is required for Polycomb target gene silencing but not for gene activation. *PLoS Genet.* 15.

Lebel, M., Agarwal, P., Cheng, C.W., Kabir, M.G., Chan, T.Y., Thanabalasingham, V., Zhang, X., Cohen, D.R., Husain, M., Cheng, S.H., et al. (2003). The Iroquois homeobox gene *Irx2* is not essential for normal development of the heart and midbrain-hindbrain boundary in mice. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8216–8225.

Lee, C.C., Gillies, E.R., Fox, M.E., Guillaudeu, S.J., Fréchet, J.M.J., Dy, E.E., and Szoka, F.C. (2006). A single dose of doxorubicin-functionalized bow-tie dendrimer cures mice bearing C-26 colon carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 16649–16654.

Lee, C.-H., Yu, J.-R., Granat, J., Saldaña-Meyer, R., Andrade, J., LeRoy, G., Jin, Y., Lund, P., Stafford, J.M., Garcia, B.A., et al. (2019). Automethylation of PRC2 promotes H3K27 methylation and is impaired in H3K27M pediatric glioma. *Genes Dev.* 33, 1428–1440.

Lee, J.M., Lee, J.S., Kim, H., Kim, K., Park, H., Kim, J.-Y., Lee, S.H., Kim, I.S., Kim, J., Lee, M., et al. (2012). EZH2 Generates a Methyl Degron that Is Recognized by the DCAF1/DDB1/CUL4 E3 Ubiquitin Ligase Complex. *Mol. Cell* 48, 572–586.

Lee, S.T., Li, Z., Wu, Z., Aau, M., Guan, P., Karuturi, R.K.M., Liou, Y.C., and Yu, Q. (2011). Context-Specific Regulation of NF- κ B Target Gene Expression by EZH2 in Breast Cancers. *Mol. Cell* 43, 798–810.

Lewis, P.W., Müller, M.M., Koletsky, M.S., Cordero, F., Lin, S., Banaszynski, L.A., Garcia, B.A., Muir, T.W., Becher, O.J., and Allis, C.D. (2013). Inhibition of PRC2 Activity by a Gain-of-Function H3 Mutation Found in Pediatric Glioblastoma. *Science* 340, 857–861.

Li, D., Li, S., Xue, A.Z., Smith Callahan, L.A., and Liu, Y. (2020). Expression of SREBP2 and cholesterol metabolism related genes in TCGA glioma cohorts. *Medicine (Baltimore)* 99.

Li, H., Chang, C., Shang, Y., Qiang, L., Zhang, B., Bu, B., Ren, G., Song, L., Shang, M., and Yu, J. (2017). A missense variant in EZH2 is associated with colorectal cancer risk in a Chinese population. *Oncotarget* 8, 94738–94742.

Lieberman, N.A.P., DeGolier, K., Kovar, H.M., Davis, A., Høglund, V., Stevens, J., Winter, C., Deutsch, G., Furlan, S.N., Vitanza, N.A., et al. (2019). Characterization of the immune microenvironment of diffuse intrinsic pontine glioma: implications for development of immunotherapy. *Neuro-Oncol.* 21, 83–94.

Lin, G.L., and Monje, M. (2017). A Protocol for Rapid Post-mortem Cell Culture of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG). *J. Vis. Exp. JoVE.*

- Lin, G.L., Nagaraja, S., Filbin, M.G., Suvà, M.L., Vogel, H., and Monje, M. (2018). Non-inflammatory tumor microenvironment of diffuse intrinsic pontine glioma. *Acta Neuropathol. Commun.* *6*, 51.
- Lin, W., Chen, Y., Zeng, L., Ying, R., and Zhu, F. (2016). [Effect of a novel EZH2 inhibitor GSK126 on prostate cancer cells]. *Zhejiang Xue Xue Bao Yi Xue Ban J. Zhejiang Univ. Med. Sci.* *45*, 356–363.
- Liu, J.-N., Ma, Z.-L., Su, R.-J., and Huang, K.-Q. (2020). [Effect of enhancer of zeste homolog 2 inhibitor GSK126 on the proliferation and apoptosis of tongue squamous cell carcinoma]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi West China J. Stomatol.* *38*, 495–501.
- Long, W., Yi, Y., Chen, S., Cao, Q., Zhao, W., and Liu, Q. (2017). Potential New Therapies for Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front. Pharmacol.* *8*.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *131*, 803–820.
- Lowe, B.R., Maxham, L.A., Hamey, J.J., Wilkins, M.R., and Partridge, J.F. (2019). Histone H3 Mutations: An Updated View of Their Role in Chromatin Deregulation and Cancer. *Cancers* *11*.
- Lu, C., Han, H.D., Mangala, L.S., Ali-Fehmi, R., Newton, C.S., Ozbun, L., Armaiz-Pena, G.N., Hu, W., Stone, R.L., Munkarah, A., et al. (2010). Regulation of Tumor Angiogenesis by EZH2. *Cancer Cell* *18*, 185–197.
- Lu, V.M., Alvi, M.A., McDonald, K.L., and Daniels, D.J. (2018). Impact of the H3K27M mutation on survival in pediatric high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis. *J. Neurosurg. Pediatr.* *23*, 308–316.
- Lue, J.K., and Amengual, J.E. (2018). Emerging EZH2 Inhibitors and Their Application in Lymphoma. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* *13*, 369–382.
- Lulla, R.R., Saratsis, A.M., and Hashizume, R. (2016). Mutations in chromatin machinery and pediatric high-grade glioma. *Sci. Adv.* *2*, e1501354.
- Luo, J., Yang, H., and Song, B.-L. (2020). Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *21*, 225–245.
- Mackay, A., Burford, A., Carvalho, D., Izquierdo, E., Fazal-Salom, J., Taylor, K.R., Bjerke, L., Clarke, M., Vinci, M., Nandhabalan, M., et al. (2017). Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* *32*, 520-537.e5.
- Mallen-St. Clair, J., Soydaner-Azeloglu, R., Lee, K.E., Taylor, L., Livanos, A., Pylayeva-Gupta, Y., Miller, G., Margueron, R., Reinberg, D., and Bar-Sagi, D. (2012). EZH2 couples pancreatic regeneration to neoplastic progression. *Genes Dev.* *26*, 439–444.

- Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb Complex PRC2 and its Mark in Life. *Nature* 469, 343–349.
- Margueron, R., Li, G., Sarma, K., Blais, A., Zavadil, J., Woodcock, C.L., Dynlacht, B.D., and Reinberg, D. (2008). Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol. Cell* 32, 503–518.
- Margueron, R., Justin, N., Ohno, K., Sharpe, M.L., Son, J., Drury, W.J., Voigt, P., Martin, S., Taylor, W.R., De Marco, V., et al. (2009). Role of the polycomb protein Eed in the propagation of repressive histone marks. *Nature* 461, 762–767.
- Marigil, M., Martinez-Velez, N., Domínguez, P.D., Idoate, M.A., Xipell, E., Patiño-García, A., Gonzalez-Huarriz, M., García-Moure, M., Junier, M.-P., Chneiweiss, H., et al. (2017). Development of a DIPG Orthotopic Model in Mice Using an Implantable Guide-Screw System. *PLoS ONE* 12.
- Masui, K., Mischel, P.S., and Reifenberger, G. (2016). Molecular classification of gliomas. In *Handbook of Clinical Neurology*, (Elsevier), pp. 97–120.
- Mathew, R.K., and Rutka, J.T. (2018). Diffuse Intrinsic Pontine Glioma : Clinical Features, Molecular Genetics, and Novel Targeted Therapeutics. *J. Korean Neurosurg. Soc.* 61, 343–351.
- Matuszewicz, L., Meissner, J., Toporkiewicz, M., and Sikorski, A.F. (2015). The effect of statins on cancer cells--review. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 36, 4889–4904.
- McCabe, M.T., Graves, A.P., Ganji, G., Diaz, E., Halsey, W.S., Jiang, Y., Smitheman, K.N., Ott, H.M., Pappalardi, M.B., Allen, K.E., et al. (2012a). Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2989–2994.
- McCabe, M.T., Ott, H.M., Ganji, G., Korenchuk, S., Thompson, C., Aller, G.S.V., Liu, Y., Graves, A.P., Iij, A.D.P., Diaz, E., et al. (2012b). EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 492, 108–112.
- Meel, M.H., Kaspers, G.J.L., and Hulleman, E. (2019). Preclinical therapeutic targets in diffuse midline glioma. *Drug Resist. Updat.* 44, 15–25.
- Mehta, A.M., Sonabend, A.M., and Bruce, J.N. (2017). Convection-Enhanced Delivery. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 14, 358–371.
- Mendiratta, S., Gatto, A., and Almouzni, G. (2019). Histone supply: Multitiered regulation ensures chromatin dynamics throughout the cell cycle. *J. Cell Biol.* 218, 39–54.
- Merscher, S., Pedigo, C.E., and Mendez, A.J. (2014). Metabolism, Energetics, and Lipid Biology in the Podocyte – Cellular Cholesterol-Mediated Glomerular Injury. *Front. Endocrinol.* 5.

- Mierlo, G. van, Veenstra, G.J.C., Vermeulen, M., and Marks, H. (2019). The Complexity of PRC2 Subcomplexes. *Trends Cell Biol.* *29*, 660–671.
- Min, J., Zaslavsky, A., Fedele, G., McLaughlin, S.K., Reczek, E.E., De Raedt, T., Guney, I., Strochlic, D.E., Laura, E., Beroukhi, R., et al. (2010). An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and NF- κ B. *Nat. Med.* *16*, 286–294.
- Miranda, T.B., Cortez, C.C., Yoo, C.B., Liang, G., Abe, M., Kelly, T.K., Marquez, V.E., and Jones, P.A. (2009). DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol. Cancer Ther.* *8*, 1579–1588.
- Misuraca, K.L., Cordero, F.J., and Becher, O.J. (2015). Pre-Clinical Models of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front. Oncol.* *5*.
- Mohammad, F., Weissmann, S., Leblanc, B., Pandey, D.P., Højfeldt, J.W., Comet, I., Zheng, C., Johansen, J.V., Rapin, N., Porse, B.T., et al. (2017). EZH2 is a potential therapeutic target for H3K27M-mutant pediatric gliomas. *Nat. Med.* *23*, 483–492.
- Mohammadian-Hafshejani, A., Sherwin, C.M.T., and Heidari-Soureshjani, S. (2020). Do statins play any role in reducing the incidence and mortality of ovarian cancer? A systematic review and meta-analysis. *J. Prev. Med. Hyg.* *61*, E331–E339.
- Monje, M., Mitra, S.S., Freret, M.E., Raveh, T.B., Kim, J., Masek, M., Attema, J.L., Li, G., Haddix, T., Edwards, M.S.B., et al. (2011). Hedgehog-responsive candidate cell of origin for diffuse intrinsic pontine glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4453–4458.
- Morgan, M.A., and Shilatifard, A. (2013). (Poly)Combing the Pediatric Cancer Genome for Answers. *Science* *340*, 823–824.
- Morin, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Mungall, A.J., An, J., Goya, R., Paul, J.E., Boyle, M., Woolcock, B.W., Kuchenbauer, F., et al. (2010). Somatic mutation of EZH2 (Y641) in Follicular and Diffuse Large B-cell Lymphomas of Germinal Center Origin. *Nat. Genet.* *42*, 181–185.
- Moritz, L.E., and Trievel, R.C. (2018). Structure, mechanism, and regulation of polycomb-repressive complex 2. *J. Biol. Chem.* *293*, 13805–13814.
- Mosaab, A., El-Ayadi, M., Khorshed, E.N., Amer, N., Refaat, A., El-Beltagy, M., Hassan, Z., Soror, S.H., Zaghoul, M.S., and El-Naggar, S. (2020). Histone H3K27M Mutation Overrides Histological Grading in Pediatric Gliomas. *Sci. Rep.* *10*.
- Mount, C.W., Majzner, R.G., Sundaresh, S., Arnold, E.P., Kadapakkam, M., Haile, S., Labanieh, L., Hulleman, E., Woo, P.J., Rietberg, S.P., et al. (2018). Potent antitumor efficacy of anti-GD2 CAR T-cells in H3K27M+ diffuse midline gliomas. *Nat. Med.* *24*, 572–579.
- Murai, T. (2015). Cholesterol lowering: role in cancer prevention and treatment. *Biol. Chem.* *396*, 1–11.

- Nagaraja, S., Vitanza, N.A., Woo, P.J., Taylor, K.R., Liu, F., Zhang, L., Li, M., Meng, W., Ponnuswami, A., Sun, W., et al. (2017). Transcriptional Dependencies in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* 31, 635-652.e6.
- Nagaraja, S., Quezada, M.A., Gillespie, S.M., Arzt, M., Lennon, J.J., Woo, P.J., Hovestadt, V., Kambhampati, M., Filbin, M.G., Suva, M.L., et al. (2019). Histone Variant and Cell Context Determine H3K27M Reprogramming of the Enhancer Landscape and Oncogenic State. *Mol. Cell* 76, 965-980.e12.
- Nichol, J.N., Dupéré-Richer, D., Ezponda, T., Licht, J.D., and Miller, W.H. (2016). H3K27 Methylation: A Focal Point of Epigenetic Dereglulation in Cancer. *Adv. Cancer Res.* 131, 59–95.
- Nielsen, S.F., Nordestgaard, B.G., and Bojesen, S.E. (2012). Statin Use and Reduced Cancer-Related Mortality. *N. Engl. J. Med.* 367, 1792–1802.
- Nikoloski, G., Langemeijer, S.M.C., Kuiper, R.P., Knops, R., Massop, M., Tönnissen, E.R.L.T.M., Heijden, A. van der, Scheele, T.N., Vandenbergh, P., Witte, T. de, et al. (2010). Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* 42, 665–667.
- O’Brien, J.S. (1965). STABILITY OF THE MYELIN MEMBRANE. *Science* 147, 1099–1107.
- Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., and Slotte, J.P. (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.* 41, 66–97.
- Oliveira, K.A., Dal-Cim, T., Lopes, F.G., Ludka, F.K., Nedel, C.B., and Tasca, C.I. (2018). Atorvastatin Promotes Cytotoxicity and Reduces Migration and Proliferation of Human A172 Glioma Cells. *Mol. Neurobiol.* 55, 1509–1523.
- Packer, R.J., Boyett, J.M., Zimmerman, R.A., Albright, A.L., Kaplan, A.M., Rorke, L.B., Selch, M.T., Cherlow, J.M., Finlay, J.L., and Wara, W.M. (1994). Outcome of children with brain stem gliomas after treatment with 7800 cGy of hyperfractionated radiotherapy. A childrens cancer group phase 1/11 trial. *Cancer* 74, 1827–1834.
- Pal, S., Kozono, D., Yang, X., Fendler, W., Fitts, W., Ni, J., Alberta, J.A., Zhao, J., Liu, K.X., Bian, J., et al. (2018). Dual HDAC and PI3K Inhibition Abrogates NFκB- and FOXM1-Mediated DNA Damage Response to Radiosensitize Pediatric High-Grade Gliomas. *Cancer Res.* 78, 4007–4021.
- Panditharatna, E., Yaeger, K., Kilburn, L.B., Packer, R.J., and Nazarian, J. (2015). Clinicopathology of diffuse intrinsic pontine glioma and its redefined genomic and epigenomic landscape. *Cancer Genet.* 208, 367–373.
- Papot, S., Tranoy, I., Tillequin, F., Florent, J.-C., and Gesson, J.-P. (2002). Design of selectively activated anticancer prodrugs: elimination and cyclization strategies. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* 2, 155–185.

Pasini, D., Malatesta, M., Jung, H.R., Walfridsson, J., Willer, A., Olsson, L., Skotte, J., Wutz, A., Porse, B., Jensen, O.N., et al. (2010). Characterization of an antagonistic switch between histone H3 lysine 27 methylation and acetylation in the transcriptional regulation of Polycomb group target genes. *Nucleic Acids Res.* *38*, 4958–4969.

Pasyukova, E.G., Symonenko, A.V., Rybina, O.Y., and Vaiserman, A.M. (2021). Epigenetic enzymes: A role in aging and prospects for pharmacological targeting. *Ageing Res. Rev.* *67*, 101312.

Pathania, M., De Jay, N., Maestro, N., Harutyunyan, A.S., Nitarska, J., Pahlavan, P., Henderson, S., Mikael, L.G., Richard-Londt, A., Zhang, Y., et al. (2017). H3.3K27M Cooperates with Trp53 Loss and PDGFRA Gain in Mouse Embryonic Neural Progenitor Cells to Induce Invasive High-Grade Gliomas. *Cancer Cell* *32*, 684-700.e9.

Patti, G., Chello, M., Pasceri, V., Colonna, D., Nusca, A., Miglionico, M., D'Ambrosio, A., Covino, E., and Di Sciascio, G. (2006). Protection from procedural myocardial injury by atorvastatin is associated with lower levels of adhesion molecules after percutaneous coronary intervention: results from the ARMYDA-CAMs (Atorvastatin for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty-Cell Adhesion Molecules) substudy. *J. Am. Coll. Cardiol.* *48*, 1560–1566.

Paugh, B.S., Zhu, X., Qu, C., Endersby, R., Diaz, A.K., Zhang, J., Bax, D.A., Carvalho, D., Reis, R.M., Onar-Thomas, A., et al. (2013). Novel Oncogenic PDGFRA Mutations in Pediatric High-Grade Gliomas. *Cancer Res.* *73*, 6219–6229.

Perry, A., and Wesseling, P. (2016). Histologic classification of gliomas. In *Handbook of Clinical Neurology*, (Elsevier), pp. 71–95.

Pfeffer, S.R. (2019). NPC intracellular cholesterol transporter 1 (NPC1)-mediated cholesterol export from lysosomes. *J. Biol. Chem.* *294*, 1706–1709.

Phillips, R.E., Yang, Y., Smith, R.C., Thompson, B.M., Yamasaki, T., Soto-Feliciano, Y.M., Funato, K., Liang, Y., Garcia-Bermudez, J., Wang, X., et al. (2019). Target identification reveals lanosterol synthase as a vulnerability in glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *116*, 7957–7962.

Pirmoradi, L., Seyfizadeh, N., Ghavami, S., Zeki, A.A., and Shojaei, S. (2019). Targeting cholesterol metabolism in glioblastoma: a new therapeutic approach in cancer therapy. *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* *67*, 715–719.

Piunti, A., Hashizume, R., Morgan, M.A., Bartom, E.T., Horbinski, C.M., Marshall, S.A., Rendleman, E.J., Ma, Q., Takahashi, Y., Woodfin, A.R., et al. (2017). Therapeutic targeting of polycomb and BET bromodomain proteins in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Nat. Med.* *23*, 493–500.

Plessier, A., Le Dret, L., Varlet, P., Beccaria, K., Lacombe, J., Mériaux, S., Geffroy, F., Fiette, L., Flamant, P., Chrétien, F., et al. (2017). New in vivo avatars of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) from stereotactic biopsies performed at diagnosis. *Oncotarget* *8*, 52543–52559.

Pollack, I.F., Jakacki, R.I., Butterfield, L.H., Hamilton, R.L., Panigrahy, A., Potter, D.M., Connelly, A.K., Dibridge, S.A., Whiteside, T.L., and Okada, H. (2014). Antigen-Specific Immune Responses and Clinical Outcome After Vaccination With Glioma-Associated Antigen Peptides and Polyinosinic-Polycytidylic Acid Stabilized by Lysine and Carboxymethylcellulose in Children With Newly Diagnosed Malignant Brainstem and Nonbrainstem Gliomas. *J. Clin. Oncol.* *32*, 2050–2058.

Pollack, I.F., Agnihotri, S., and Broniscer, A. (2019). Childhood brain tumors: current management, biological insights, and future directions. *J. Neurosurg. Pediatr.* *23*, 261–273.

Puget, S., Blauwblomme, T., and Grill, J. (2012). Is Biopsy Safe in Children with Newly Diagnosed Diffuse Intrinsic Pontine Glioma? *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 629–633.

Puget, S., Beccaria, K., Blauwblomme, T., Roujeau, T., James, S., Grill, J., Zerah, M., Varlet, P., and Sainte-Rose, C. (2015). Biopsy in a series of 130 pediatric diffuse intrinsic Pontine gliomas. *Childs Nerv. Syst.* *31*, 1773–1780.

Qi, W., Zhao, K., Gu, J., Huang, Y., Wang, Y., Zhang, H., Zhang, M., Zhang, J., Yu, Z., Li, L., et al. (2017). An allosteric PRC2 inhibitor targeting the H3K27me3 binding pocket of EED. *Nat. Chem. Biol.* *13*, 381–388.

Qiu, S., Huang, D., Yin, D., Li, F., Li, X., Kung, H., and Peng, Y. (2013). Suppression of tumorigenicity by MicroRNA-138 through inhibition of EZH2-CDK4/6-pRb-E2F1 signal loop in glioblastoma multiforme. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1832*, 1697–1707.

Qu, Y., Lu, D., Jiang, H., Chi, X., and Zhang, H. (2016). EZH2 is required for mouse oocyte meiotic maturation by interacting with and stabilizing spindle assembly checkpoint protein BubRI. *Nucleic Acids Res.* *44*, 7659–7672.

Quemener, C., Baud, J., Boyé, K., Dubrac, A., Billottet, C., Soulet, F., Darlot, F., Dumartin, L., Sire, M., Grepin, R., et al. (2016). Dual Roles for CXCL4 Chemokines and CXCR3 in Angiogenesis and Invasion of Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* *76*, 6507–6519.

R, C., U, T., J, V., O, A., Ly, W., Me, S., Dj, P., Oj, B., Mm, S., and Ub, M. (2019). Combined targeting of PI3K and MEK effector pathways via CED for DIPG therapy. *Neuro-Oncol. Adv.* *1*.

Rashed, W.M., Maher, E., Adel, M., Saber, O., and Zaghloul, M.S. (2019). Pediatric diffuse intrinsic pontine glioma: where do we stand? *Cancer Metastasis Rev.* *38*, 759–770.

Recinos, P.F., Sciubba, D.M., and Jallo, G.I. (2007). Brainstem Tumors: Where Are We Today? *Pediatr. Neurosurg.* *43*, 192–201.

Reith, W., Bodea, S., and Mühl-Benninghaus, R. (2017). Kindliche Hirntumoren. *Radiol.* *57*, 728–739.

Repa, J.J., and Mangelsdorf, D.J. (2000). The Role of Orphan Nuclear Receptors in the Regulation of Cholesterol Homeostasis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *16*, 459–481.

Ribatti, D. (2016). The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech. Dev.* *141*, 70–77.

Riscal, R., Skuli, N., and Simon, M.C. (2019). Even cancer cells watch their cholesterol! *Mol. Cell* 76, 220–231.

Rizq, O., Mimura, N., Oshima, M., Saraya, A., Koide, S., Kato, Y., Aoyama, K., Nakajima-Takagi, Y., Wang, C., Chiba, T., et al. (2017). Dual Inhibition of EZH2 and EZH1 Sensitizes PRC2-Dependent Tumors to Proteasome Inhibition. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23, 4817–4830.

Róg, T., Pasenkiewicz-Gierula, M., Vattulainen, I., and Karttunen, M. (2009). Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1788, 97–121.

Rogers, M.A., Liu, J., Song, B.-L., Li, B.-L., Chang, C.C.Y., and Chang, T.-Y. (2015). Acyl-CoA:cholesterol acyltransferases (ACATs/SOATs): enzymes with multiple sterols as substrates and as activators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 151, 102–107.

Rojanasakul, Y. (2013). Linking JNK-STAT3-Akt signaling axis to EZH2 phosphorylation. *Cell Cycle* 12, 202.

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

Rooseboom, M., Commandeur, J.N.M., and Vermeulen, N.P.E. (2004). Enzyme-Catalyzed Activation of Anticancer Prodrugs. *Pharmacol. Rev.* 56, 53–102.

Rose, N.R., King, H.W., Blackledge, N.P., Fursova, N.A., Ember, K.J., Fischer, R., Kessler, B.M., and Klose, R.J. RYBP stimulates PRC1 to shape chromatin-based communication between Polycomb repressive complexes. *ELife* 5.

Saidi, A., Hagedorn, M., Allain, N., Verpelli, C., Sala, C., Bello, L., Bikfalvi, A., and Javerzat, S. (2009). Combined targeting of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor potently inhibits glioma growth and invasiveness. *Int. J. Cancer* 125, 1054–1064.

Sasaki, T., Katagi, H., Goldman, S., Becher, O.J., and Hashizume, R. (2020). Convection-Enhanced Delivery of Enhancer of Zeste Homolog-2 (EZH2) Inhibitor for the Treatment of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Neurosurgery* 87, E680–E688.

Sato, T., Kaneda, A., Tsuji, S., Isagawa, T., Yamamoto, S., Fujita, T., Yamanaka, R., Tanaka, Y., Nukiwa, T., Marquez, V.E., et al. (2013). PRC2 overexpression and PRC2-target gene repression relating to poorer prognosis in small cell lung cancer. *Sci. Rep.* 3.

Schellmann, N., Deckert, P.M., Bachran, D., Fuchs, H., and Bachran, C. (2010). Targeted enzyme prodrug therapies. *Mini Rev. Med. Chem.* 10, 887–904.

Schmitt, S., Cantuti Castelvetri, L., and Simons, M. (2015). Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1851, 999–1005.

Schroeder, K.M., Hoeman, C.M., and Becher, O.J. (2014). Children are not just little adults: recent advances in understanding of diffuse intrinsic pontine glioma biology. *Pediatr. Res.* 75, 205–209.

- Schuelke, M.R., Wongthida, P., Thompson, J., Kottke, T., Driscoll, C.B., Huff, A.L., Shim, K.G., Coffey, M., Pulido, J., Evgin, L., et al. (2019). Diverse immunotherapies can effectively treat syngeneic brainstem tumors in the absence of overt toxicity. *J. Immunother. Cancer* 7, 188.
- Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.-Y., Jones, D.T.W., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A.M., Quang, D.-A.K., Tönjes, M., et al. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 482, 226–231.
- Scutti, J.A.B. (2018). Importance of immune monitoring approaches and the use of immune checkpoints for the treatment of diffuse intrinsic pontine glioma: From bench to clinic and vice versa (Review). *Int. J. Oncol.* 52, 1041–1056.
- Sedlacik, J., Winchell, A., Kocak, M., Loeffler, R.B., Broniscer, A., and Hillenbrand, C.M. (2013). MRI-Assessment of Tumor Perfusion and 3D Segmented Volume at Baseline, During Treatment, and at Tumor Progression in Children with Newly Diagnosed Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 34, 1450–1455.
- Seliger, C., Schaertl, J., Gerken, M., Lubner, C., Proescholdt, M., Riemenschneider, M.J., Leitzmann, M.F., Hau, P., and Klinkhammer-Schalke, M. (2018a). Use of statins or NSAIDs and survival of patients with high-grade glioma. *PLoS ONE* 13.
- Seliger, C., Schaertl, J., Gerken, M., Lubner, C., Proescholdt, M., Riemenschneider, M.J., Leitzmann, M.F., Hau, P., and Klinkhammer-Schalke, M. (2018b). Use of statins or NSAIDs and survival of patients with high-grade glioma. *PloS One* 13, e0207858.
- Seymour, Z.A., Panigrahy, A., Finlay, J.L., Nelson, M.D., and Blüml, S. (2008). Citrate in Pediatric CNS Tumors? *Am. J. Neuroradiol.* 29, 1006–1011.
- Sha, M., Mao, G., Wang, G., Chen, Y., Wu, X., and Wang, Z. (2015). DZNep inhibits the proliferation of colon cancer HCT116 cells by inducing senescence and apoptosis. *Acta Pharm. Sin. B* 5, 188–193.
- Sharma, B., and Agnihotri, N. (2019). Role of cholesterol homeostasis and its efflux pathways in cancer progression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 191, 105377.
- Sharma, S., Kelly, T.K., and Jones, P.A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27–36.
- Shi, B., Liang, J., Yang, X., Wang, Y., Zhao, Y., Wu, H., Sun, L., Zhang, Y., Chen, Y., Li, R., et al. (2007). Integration of Estrogen and Wnt Signaling Circuits by the Polycomb Group Protein EZH2 in Breast Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5105–5119.
- Shin, Y.J., and Kim, J.-H. (2012). The Role of EZH2 in the Regulation of the Activity of Matrix Metalloproteinases in Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE* 7.
- Shirahata-Adachi, M., Iriyama, C., Tomita, A., Suzuki, Y., Shimada, K., and Kiyoi, H. (2017). Altered EZH2 splicing and expression is associated with impaired histone H3 lysine 27 tri-Methylation in myelodysplastic syndrome. *Leuk. Res.* 63, 90–97.

- Sierra, S., Ramos, M.C., Molina, P., Esteo, C., Vázquez, J.A., and Burgos, J.S. (2011). Statins as Neuroprotectants: A Comparative In Vitro Study of Lipophilicity, Blood-Brain-Barrier Penetration, Lowering of Brain Cholesterol, and Decrease of Neuron Cell Death. *J. Alzheimers Dis.* *23*, 307–318.
- Simon, C., Chagraoui, J., Krosi, J., Gendron, P., Wilhelm, B., Lemieux, S., Boucher, G., Chagnon, P., Drouin, S., Lambert, R., et al. (2012). A key role for EZH2 and associated genes in mouse and human adult T-cell acute leukemia. *Genes Dev.* *26*, 651–656.
- Sirtori, C.R. (2014). The pharmacology of statins. *Pharmacol. Res.* *88*, 3–11.
- Smith, J.S., Tachibana, I., Passe, S.M., Huntley, B.K., Borell, T.J., Iturria, N., O’Fallon, J.R., Schaefer, P.L., Scheithauer, B.W., James, C.D., et al. (2001). PTEN Mutation, EGFR Amplification, and Outcome in Patients With Anaplastic Astrocytoma and Glioblastoma Multiforme. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *93*, 1246–1256.
- Sneeringer, C.J., Scott, M.P., Kuntz, K.W., Knutson, S.K., Pollock, R.M., Richon, V.M., and Copeland, R.A. (2010). Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 20980–20985.
- Soliman, G.A. (2019). Dietary Fiber, Atherosclerosis, and Cardiovascular Disease. *Nutrients* *11*.
- Stafford, J.M., Lee, C.-H., Voigt, P., Descostes, N., Saldaña-Meyer, R., Yu, J.-R., Leroy, G., Oksuz, O., Chapman, J.R., Suarez, F., et al. (2018). Multiple modes of PRC2 inhibition elicit global chromatin alterations in H3K27M pediatric glioma. *Sci. Adv.* *4*.
- Sternglanz, R., and Schindelin, H. (1999). Structure and mechanism of action of the histone acetyltransferase Gcn5 and similarity to other N-acetyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 8807–8808.
- Sturm, D., Witt, H., Hovestadt, V., Khuong-Quang, D.-A., Jones, D.T.W., Konermann, C., Pfaff, E., Tönjes, M., Sill, M., Bender, S., et al. (2012). Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma. *Cancer Cell* *22*, 425–437.
- Swapna, I., SathyaSaiKumar, K.V., Murthy, C.R.K., Dutta-Gupta, A., and Senthilkumaran, B. (2006). Changes in cerebral membrane lipid composition and fluidity during thioacetamide-induced hepatic encephalopathy. *J. Neurochem.* *98*, 1899–1907.
- Tabbal, H. (2018). Mécanismes moléculaires régulés par la méthyltransférase EZH2 dans les corticosurrénales. Theses. Université Clermont Auvergne.
- Tabbal, H., Septier, A., Mathieu, M., Drelon, C., Rodriguez, S., Djari, C., Batisse-Lignier, M., Tauveron, I., Pointud, J.-C., Sahut-Barnola, I., et al. (2019). EZH2 cooperates with E2F1 to stimulate expression of genes involved in adrenocortical carcinoma aggressiveness. *Br. J. Cancer* *121*, 384–394.

TAKEDA, T., BANNO, K., OKAWA, R., YANOKURA, M., IJIMA, M., IRIE-KUNITOMI, H., NAKAMURA, K., IIDA, M., ADACHI, M., UMENE, K., et al. (2016). ARID1A gene mutation in ovarian and endometrial cancers (Review). *Oncol. Rep.* *35*, 607–613.

Tan, J., Yang, X., Zhuang, L., Jiang, X., Chen, W., Lee, P.L., Karuturi, R.K.M., Tan, P.B.O., Liu, E.T., and Yu, Q. (2007). Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev.* *21*, 1050–1063.

Tan, J., Yan, Y., Wang, X., Jiang, Y., and Xu, H.E. (2014). EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* *35*, 161–174.

Tanaka, S., Miyagi, S., Sashida, G., Chiba, T., Yuan, J., Mochizuki-Kashio, M., Suzuki, Y., Sugano, S., Nakaseko, C., Yokote, K., et al. (2012). Ezh2 augments leukemogenicity by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia. *Blood* *120*, 1107–1117.

Tannock, I.F., and Rotin, D. (1989). Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res.* *49*, 4373–4384.

Tapia-Pérez, J.H., Kirches, E., Mawrin, C., Firsching, R., and Schneider, T. (2011). Cytotoxic effect of different statins and thiazolidinediones on malignant glioma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *67*, 1193–1201.

Tapia-Pérez, J.H., Preininger, R., Kirches, E., Reinhold, A., Butzmann, J., Prilloff, S., Mawrin, C., and Schneider, T. (2016a). Simultaneous Administration of Statins and Pioglitazone Limits Tumor Growth in a Rat Model of Malignant Glioma. *Anticancer Res.* *36*, 6357–6365.

Tapia-Pérez, J.H., Preininger, R., Kirches, E., Reinhold, A., Butzmann, J., Prilloff, S., Mawrin, C., and Schneider, T. (2016b). Simultaneous Administration of Statins and Pioglitazone Limits Tumor Growth in a Rat Model of Malignant Glioma. *Anticancer Res.* *36*, 6357–6365.

Tatavosian, R., Duc, H.N., Huynh, T.N., Fang, D., Schmitt, B., Shi, X., Deng, Y., Phiel, C., Yao, T., Zhang, Z., et al. (2018). Live-cell single-molecule dynamics of PcG proteins imposed by the DIPG H3.3K27M mutation. *Nat. Commun.* *9*.

Taylor, I.C., Hütt-Cabezas, M., Brandt, W.D., Kambhampati, M., Nazarian, J., Chang, H.T., Warren, K.E., Eberhart, C.G., and Raabe, E.H. (2015). Disrupting NOTCH Slows Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Growth, Enhances Radiation Sensitivity, and Shows Combinatorial Efficacy With Bromodomain Inhibition. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *74*, 778–790.

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

Testa, U., Castelli, G., and Pelosi, E. (2018). Genetic Abnormalities, Clonal Evolution, and Cancer Stem Cells of Brain Tumors. *Med. Sci.* *6*.

- Thirant, C., Bessette, B., Varlet, P., Puget, S., Cadusseau, J., Tavares, S.D.R., Studler, J.-M., Silvestre, D.C., Susini, A., Villa, C., et al. (2011). Clinical Relevance of Tumor Cells with Stem-Like Properties in Pediatric Brain Tumors. *PLOS ONE* *6*, e16375.
- Tinkle, C.L., Duncan, E.C., Doubrovin, M., Han, Y., Li, Y., Kim, H., Broniscer, A., Snyder, S.E., Merchant, T.E., and Shulkin, B.L. (2019). Evaluation of ¹¹C-Methionine PET and Anatomic MRI Associations in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *J. Nucl. Med.* *60*, 312–319.
- Tisnado, J., Young, R., Peck, K.K., and Haque, S. (2016). Conventional and Advanced Imaging of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *J. Child Neurol.* *31*, 1386–1393.
- Tomaselli, D., Lucidi, A., Rotili, D., and Mai, A. (2020). Epigenetic Polypharmacology: A New Frontier for Epi-Drug Discovery. *Med. Res. Rev.* *40*, 190–244.
- Tranoy-Opalinski, I., Legigan, T., Barat, R., Clarhaut, J., Thomas, M., Renoux, B., and Papot, S. (2014). β -Glucuronidase-responsive prodrugs for selective cancer chemotherapy: an update. *Eur. J. Med. Chem.* *74*, 302–313.
- Truffaux, N., Philippe, C., Paulsson, J., Andreiuolo, F., Guerrini-Rousseau, L., Cornilleau, G., Le Dret, L., Richon, C., Lacroix, L., Puget, S., et al. (2015). Preclinical evaluation of dasatinib alone and in combination with cabozantinib for the treatment of diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro-Oncol.* *17*, 953–964.
- Tsangaris, G.T., and Anagnostopoulos, A.K. (2018). Pediatric brain tumors: Update of proteome-based studies. *J. Proteomics* *188*, 41–45.
- Udaka, Y.T., and Packer, R.J. (2018). Pediatric Brain Tumors. *Neurol. Clin.* *36*, 533–556.
- Valer, J.A., Sánchez-de-Diego, C., Pimenta-Lopes, C., Rosa, J.L., and Ventura, F. (2019). ACVR1 Function in Health and Disease. *Cells* *8*.
- Van der Meulen, J., Speleman, F., and Van Vlierberghe, P. (2014). The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease. *Epigenetics* *9*, 658–668.
- Vanan, M.I., and Eisenstat, D.D. (2015). DIPG in Children – What Can We Learn from the Past? *Front. Oncol.* *5*.
- Vargas, A., Zeisser-Labouèbe, M., Lange, N., Gurny, R., and Delie, F. (2007). The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *59*, 1162–1176.
- Veldhuijzen van Zanten, S.E.M., Baugh, J., Chaney, B., De Jongh, D., Sanchez Aliaga, E., Barkhof, F., Noltes, J., De Wolf, R., Van Dijk, J., Cannarozzo, A., et al. (2017). Development of the SIOPE DIPG network, registry and imaging repository: a collaborative effort to optimize research into a rare and lethal disease. *J. Neurooncol.* *132*, 255–266.
- Venkateswaran, A., Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Mak, P.A., Wilpitz, D.C., Edwards, P.A., and Tontonoz, P. (2000). Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 12097–12102.

- Villa, G.R., Hulce, J.J., Zanca, C., Bi, J., Ikegami, S., Cahill, G.L., Gu, Y., Lum, K.M., Masui, K., Yang, H., et al. (2016a). An LXR-Cholesterol Axis Creates a Metabolic Co-Dependency for Brain Cancers. *Cancer Cell* 30, 683–693.
- Villa, G.R., Hulce, J.J., Zanca, C., Bi, J., Ikegami, S., Cahill, G.L., Gu, Y., Lum, K.M., Masui, K., Yang, H., et al. (2016b). An LXR-Cholesterol Axis Creates a Metabolic Co-Dependency for Brain Cancers. *Cancer Cell* 30, 683–693.
- Völkel, P., Dupret, B., Le Bourhis, X., and Angrand, P.-O. (2015). Diverse involvement of EZH2 in cancer epigenetics. *Am. J. Transl. Res.* 7, 175–193.
- Wan, J., Zhan, J., Li, S., Ma, J., Xu, W., Liu, C., Xue, X., Xie, Y., Fang, W., Chin, Y.E., et al. (2015). PCAF-primed EZH2 acetylation regulates its stability and promotes lung adenocarcinoma progression. *Nucleic Acids Res.* 43, 3591–3604.
- Wang, H.H., Garruti, G., Liu, M., Portincasa, P., and Wang, D.Q.-H. (2017). Cholesterol and Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis: Recent Advances In reverse Cholesterol Transport. *Ann. Hepatol.* 16, s27–s42.
- Wang, Y., Rogers, P.M., Su, C., Varga, G., Stayrook, K.R., and Burris, T.P. (2008a). Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRA. *J. Biol. Chem.* 283, 26332–26339.
- Wang, Y., Rogers, P.M., Su, C., Varga, G., Stayrook, K.R., and Burris, T.P. (2008b). Regulation of Cholesterologenesis by the Oxysterol Receptor, LXR α . *J. Biol. Chem.* 283, 26332–26339.
- Wang, Z., Su, Y., Zhuang, D., and Lan, T. (2021). The Role of EZH2 Inhibitor, GSK-126, in Seizure Susceptibility. *J. Mol. Neurosci.* MN 71, 556–564.
- Wassef, M., and Margueron, R. (2017). The Multiple Facets of PRC2 Alterations in Cancers. *J. Mol. Biol.* 429, 1978–1993.
- Wassef, M., Rodilla, V., Teissandier, A., Zeitouni, B., Gruel, N., Sadacca, B., Irondelle, M., Charruel, M., Ducos, B., Michaud, A., et al. (2015). Impaired PRC2 activity promotes transcriptional instability and favors breast tumorigenesis. *Genes Dev.* 29, 2547–2562.
- Weinberg, R.A. (2014). *The biology of cancer* (New York: Garland Science, Taylor & Francis Group).
- Wells, E.M., and Packer, R.J. (2015). Pediatric brain tumors. *Contin. Minneap. Minn* 21, 373–396.
- Werbrouck, C., Evangelista, C.C.S., Lobón-Iglesias, M.-J., Barret, E., Teuff, G.L., Merlevede, J., Brusini, R., Kergrohen, T., Mondini, M., Bolle, S., et al. (2019). TP53 Pathway Alterations Drive Radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG). *Clin. Cancer Res.* 25, 6788–6800.
- Wesseling, P., and Capper, D. (2018). WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 44, 139–150.

- Whyte-Fagundes, P., Kurtenbach, S., Zoidl, C., Shestopalov, V.I., Carlen, P.L., and Zoidl, G. (2018). A Potential Compensatory Role of Panx3 in the VNO of a Panx1 Knock Out Mouse Model. *Front. Mol. Neurosci.* *11*, 135.
- Wolff, J.E.A., Classen, C.F., Wagner, S., Kortmann, R.-D., Palla, S.L., Pietsch, T., Kühl, J., Gnekow, A., and Kramm, C.M. (2008). Subpopulations of malignant gliomas in pediatric patients: analysis of the HIT-GBM database. *J. Neurooncol.* *87*, 155–164.
- Wu, C., Jin, X., Yang, J., Yang, Y., He, Y., Ding, L., Pan, Y., Chen, S., Jiang, J., and Huang, H. (2015). Inhibition of EZH2 by chemo- and radiotherapy agents and small molecule inhibitors induces cell death in castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget* *7*, 3440–3452.
- Wu, H., Zeng, H., Dong, A., Li, F., He, H., Senisterra, G., Seitova, A., Duan, S., Brown, P.J., Vedadi, M., et al. (2013). Structure of the Catalytic Domain of EZH2 Reveals Conformational Plasticity in Cofactor and Substrate Binding Sites and Explains Oncogenic Mutations. *PLoS ONE* *8*.
- Wu, X., Wang, Y., Wang, Y., Wang, X., Li, J., Chang, K., Sun, C., Jia, Z., Gao, S., Wei, J., et al. (2018). GSK126 alleviates the obesity phenotype by promoting the differentiation of thermogenic beige adipocytes in diet-induced obese mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *501*, 9–15.
- Xiao, A., Brenneman, B., Floyd, D., Comeau, L., Spurio, K., Olmez, I., Lee, J., Nakano, I., Godlewski, J., Bronisz, A., et al. (2019a). Statins affect human glioblastoma and other cancers through TGF- β inhibition. *Oncotarget* *10*, 1716–1728.
- Xiao, A., Brenneman, B., Floyd, D., Comeau, L., Spurio, K., Olmez, I., Lee, J., Nakano, I., Godlewski, J., Bronisz, A., et al. (2019b). Statins affect human glioblastoma and other cancers through TGF- β inhibition. *Oncotarget* *10*, 1716–1728.
- Xu, H., Xu, K., He, H.H., Zang, C., Chen, C.-H., Chen, Y., Qin, Q., Wang, S., Wang, C., Hu, S., et al. (2016). Integrative Analysis Reveals the Transcriptional Collaboration between EZH2 and E2F1 in the Regulation of Cancer-Related Gene Expression. *Mol. Cancer Res.* *14*, 163–172.
- Xu, H., Zhou, S., Tang, Q., Xia, H., and Bi, F. (2020). Cholesterol metabolism: New functions and therapeutic approaches in cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* *1874*, 188394.
- Xu, K., Wu, Z.J., Groner, A.C., He, H.H., Cai, C., Lis, R.T., Wu, X., Stack, E.C., Loda, M., Liu, T., et al. (2012). EZH2 Oncogenic Activity in Castration Resistant Prostate Cancer Cells is Polycomb-Independent. *Science* *338*, 1465–1469.
- Yamagishi, M., and Uchamaru, K. (2017). Targeting EZH2 in cancer therapy. *Curr. Opin. Oncol.* *29*, 375–381.
- Yamamoto, K., Sonoda, M., Inokuchi, J., Shirasawa, S., and Sasazuki, T. (2004). Polycomb Group Suppressor of Zeste 12 Links Heterochromatin Protein 1 α and Enhancer of Zeste 2. *J. Biol. Chem.* *279*, 401–406.

- Yamamoto, Y., Sasaki, N., Kumagai, K., Takeuchi, S., Toyooka, T., Otani, N., Wada, K., Narita, Y., Ichimura, K., Namba, H., et al. (2018). Involvement of Intracellular Cholesterol in Temozolomide-Induced Glioblastoma Cell Death. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 58, 296–302.
- Yan, J., Ng, S.-B., Tay, J.L.-S., Lin, B., Koh, T.L., Tan, J., Selvarajan, V., Liu, S.-C., Bi, C., Wang, S., et al. (2013). EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *Blood* 121, 4512–4520.
- Yan, J., Li, B., Lin, B., Lee, P.T., Chung, T.-H., Tan, J., Bi, C., Lee, X.T., Selvarajan, V., Ng, S.-B., et al. (2016). EZH2 phosphorylation by JAK3 mediates a switch to noncanonical function in natural killer/T-cell lymphoma. *Blood* 128, 948–958.
- Yan, J., Dutta, B., Hee, Y.T., and Chng, W.-J. (2019). Towards understanding of PRC2 binding to RNA. *RNA Biol.* 16, 176–184.
- Yao, H.-W., and Li, J. (2015). Epigenetic Modifications in Fibrotic Diseases: Implications for Pathogenesis and Pharmacological Targets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 352, 2–13.
- Yap, T.A., Winter, J.N., Giulino-Roth, L., Longley, J., Lopez, J., Michot, J.-M., Leonard, J.P., Ribrag, V., McCabe, M.T., Creasy, C.L., et al. (2019). Phase I Study of the Novel Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) Inhibitor GSK2816126 in Patients with Advanced Hematologic and Solid Tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 25, 7331–7339.
- Yip, C.M., Elton, E.A., Darabie, A.A., Morrison, M.R., and McLaurin, J. (2001). Cholesterol, a modulator of membrane-associated Abeta-fibrillogenesis and neurotoxicity. *J. Mol. Biol.* 311, 723–734.
- Zarghooni, M., Bartels, U., Lee, E., Buczkowicz, P., Morrison, A., Huang, A., Bouffet, E., and Hawkins, C. (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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 1337–1344.
- Zarifi, M., and Tzika, A.A. (2016). Proton MRS imaging in pediatric brain tumors. *Pediatr. Radiol.* 46, 952–962.
- Zeng, D., Liu, M., and Pan, J. (2016). Blocking EZH2 methylation transferase activity by GSK126 decreases stem cell-like myeloma cells. *Oncotarget* 8, 3396–3411.
- Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15, 2343–2360.
- Zhang, C., Burger, M.C., Jennewein, L., Genßler, S., Schönfeld, K., Zeiner, P., Hattingen, E., Harter, P.N., Mittelbronn, M., Tonn, T., et al. (2016). ErbB2/HER2-Specific NK Cells for Targeted Therapy of Glioblastoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 108.
- Zhang, L., Chen, T., Dou, Y., Zhang, S., Liu, H., Khishignyam, T., Li, X., Zuo, D., Zhang, Z., Jin, M., et al. (2019). Atorvastatin Exerts Antileukemia Activity via Inhibiting Mevalonate-YAP Axis in K562 and HL60 Cells. *Front. Oncol.* 9, 1032.

Zhang, P., de Gooijer, M.C., Buil, L.C.M., Beijnen, J.H., Li, G., and van Tellingen, O. (2015). ABCB1 and ABCG2 restrict the brain penetration of a panel of novel EZH2-Inhibitors. *Int. J. Cancer* *137*, 2007–2018.

Zhang, Y., Dong, W., Zhu, J., Wang, L., Wu, X., and Shan, H. (2017). Combination of EZH2 inhibitor and BET inhibitor for treatment of diffuse intrinsic pontine glioma. *Cell Biosci.* *7*, 56.

Zhou, J., Nie, D., Li, J., Du, X., Lu, Y., Li, Y., Liu, C., Dai, W., Wang, Y., Jin, Y., et al. (2018). PTEN Is Fundamental for Elimination of Leukemia Stem Cells Mediated by GSK126 Targeting EZH2 in Chronic Myelogenous Leukemia. *Clin. Cancer Res.* *24*, 145–157.

Zhou, Z., Singh, R., and Souweidane, M.M. (2017). Convection-Enhanced Delivery for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Treatment. *Curr. Neuropharmacol.* *15*, 116–128.

Revue générale des cancers pédiatriques - Pédiatrie.

Résumé

Caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques contre les gliomes invasifs pédiatriques

Le gliome médian diffus (en anglais DMG pour « Diffuse Midline Glioma ») est un des cancers cérébraux pédiatriques les plus mortels. Les seuls traitements disponibles sont la chimiothérapie et la radiothérapie mais ils sont peu efficaces. C'est pourquoi, il est urgent de trouver des traitements ciblés permettant d'améliorer la prise en charge de ces enfants. Des études génomiques et épigénomiques ont permis d'identifier une mutation importante qui touche l'histone H3. Le résultat de la mutation est une substitution de la Lysine 27 en Méthionine (H3K27M) qui est à l'origine de 80% du DMG, et dérégule le complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2), y compris l'activité enzymatique d'EZH2, qui est donc à l'étude en tant que cible thérapeutique. L'inhibition chimique de EZH2 in vitro par GSK126 induit une diminution de la croissance tumorale des lignées DMG et la mort cellulaire par apoptose. Pour étudier la réponse des cellules DMG au traitement GSK126, une analyse protéomique montre l'induction des protéines impliquées dans la synthèse du cholestérol. Sur la base de ces résultats, une stratégie combinée a été élaborée et étudiée in vitro, cultures 3D (sphéroïdes) et in vivo dans une membrane chorio-allantoïque de l'embryon de poulet et sur un modèle de souris orthotopique. Le traitement GSK126 à faible dose associé à des inhibiteurs des enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol ont révélé une forte inhibition de la croissance dans les traitements combinés, mais pas dans les traitements uniques, à la fois dans des cellules DMG in vitro et dans des cultures de sphéroïdes DMG. Cette efficacité est validée in vivo, sur le modèle préclinique d'embryon de poulet et le modèle souris DMG intracrânien orthotopique. Nos résultats révèlent une sensibilité inattendue inductible par le GSK126 aux inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol dans le gliome pédiatrique hautement agressif et justifie une évaluation plus approfondie comme une nouvelle stratégie de traitement. Cette thérapie combinée devrait avoir peu d'effets secondaires en raison de la faible dose utilisées pour atteindre une activité antitumorale significative.

Abstract

Characterisation of new therapeutic targets for invasive paediatric gliomas

Diffuse midline glioma (DMG in English) is one of the most fatal pediatric brain cancers. The only treatments available are chemotherapy and radiotherapy, but they are not very effective. This is why it is urgent to find targeted treatments to improve the care of these children. Genomic and epigenomic studies have identified an important mutation that affects histone H3. The result of the mutation is a substitution of Lysine 27 for Methionine (H3K27M) which is the source of 80% of DMG, and deregulates the PRC2 complex (Polycomb Repressive Complex 2), including the enzymatic activity of EZH2, which is therefore being studied as a therapeutic target. Chemical inhibition of EZH2 in vitro by GSK126 induces a decrease in tumor growth of DMG lines and cell death by apoptosis. To study the response of DMG cells to GSK126 treatment, proteomic analysis shows the induction of proteins involved in cholesterol synthesis. Based on these results, a combined strategy was developed and studied in vitro, 3D cultures (spheroids) and in vivo in a chorioallantoic membrane of the chick embryo and in an orthotopic mouse model. Low dose GSK126 treatment in combination with inhibitors of enzymes involved in cholesterol synthesis showed strong growth inhibition in combination treatments, but not in single treatments, both in DMG cells in vitro and in DMG spheroid cultures. This efficacy has been validated in vivo, on the preclinical chicken embryo model and the orthotopic intracranial DMG mouse model. Our results reveal an unexpected sensitivity inducible by GSK126 to inhibitors of cholesterol biosynthesis in highly aggressive pediatric glioma and warrants further evaluation as a new treatment strategy. This combination therapy is expected to have few side effects due to the low dose used to achieve significant anti-tumor activity