



HAL
open science

Interactions des mutations oncogéniques secondaires avec la mutation initiatrice H3K27M dans les gliomes diffus de la ligne médiane : description d'un nouveau sous-type tumoral

Lucie Auffret

► To cite this version:

Lucie Auffret. Interactions des mutations oncogéniques secondaires avec la mutation initiatrice H3K27M dans les gliomes diffus de la ligne médiane : description d'un nouveau sous-type tumoral. Cancer. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL065 . tel-04368928

HAL Id: tel-04368928

<https://theses.hal.science/tel-04368928>

Submitted on 2 Jan 2024

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.

Interactions des mutations oncogéniques
secondaires avec la mutation initiatrice H3K27M
dans les gliomes diffus de la ligne médiane :
description d'un nouveau sous-type tumoral

*Interactions of secondary oncogenic mutations with H3K27M driver
mutation in diffuse midline gliomas: description of a new tumor subtype*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n° 582, Cancérologie : Biologie, Médecine, Santé (CBMS)

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie

Graduate School : Life sciences and health

Référent : Faculté de médecine

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Prédicteurs moléculaires et nouvelles cibles en oncologie (Université Paris-Saclay, INSERM)**, sous la direction de **Jacques GRILL**, Médecin – chercheur, Gustave Roussy et la direction de **David CASTEL**, Chargé de recherche (CR), INSERM

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 3 juillet 2023, par

Lucie AUFFRET

Composition du Jury

Pascal CHASTAGNER

Professeur des universités, praticien hospitalier
(PU PH), Lorraine

Président

Hélène CASTEL

Directrice de recherche (DR2), INSERM

Rapportrice & Examinatrice

Dominique VIDAUD

Maître de conférences des universités, praticienne
hospitalière (MCU PH), Paris-Cité

Rapportrice & Examinatrice

Pascale VARLET

Professeure des universités (PU), Paris-Cité

Examinatrice

Isabelle LE ROUX

Chercheuse (CRCN), CNRS Paris-Cité

Examinatrice

REMERCIEMENTS

Avant tout, je tiens à sincèrement remercier l'ensemble des membres du jury, Dominique Vidaud, Hélène Castel, Pascale Varlet, Isabelle Le Roux et Pascal Chastagner pour avoir consacré du temps à l'évaluation de ce projet. Plus particulièrement, un grand merci à Hélène Castel et Dominique Vidaud pour avoir accepté le rôle de rapportrices.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers l'association « L'Etoile de Martin, espérer & grandir sans cancer » pour avoir rendu possible la réalisation de ce projet en finançant mes trois années et demie de thèse.

Avant de continuer, je souhaite apporter un peu de contexte à ces remerciements car je les écris avec une grande émotion. J'ai rejoint cette équipe de recherche en avril 2018 pour un stage de Master 1, il y a maintenant cinq années. Depuis lors, j'ai appris plus que je ne l'aurais jamais imaginé, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je suis profondément reconnaissante envers chacun des membres passés et présents de l'équipe pour leur soutien et leur inspiration tout au long de ce parcours. Vous êtes tous uniques.

Je souhaite sincèrement remercier avec un grand « R » Marco Bruschi qui a été la première personne à m'encadrer, en stage de Master 1, et je peux vous assurer que je n'étais pas un cadeau. Je n'avais jamais touché à une pipette et j'avais un milliard de questions. Merci Marco d'avoir été la petite souris derrière mon oreille pour m'encourager ou me secouer jusque maintenant. Je t'en suis très sincèrement reconnaissante. Merci aussi pour tes blagues du quotidien qui ont participé à faire de ce bureau, le meilleur des bureaux !

Tout d'abord, c'est en tant qu'étudiante de l'Université d'Évry que je souhaite remercier Marie-Anne Debily pour son introduction à la génomique, sa pédagogie et l'envie qu'elle a suscitée en moi pour l'oncologie au travers de ses cours. Ensuite, c'est en tant que membre de l'équipe que je remercie Marie-Anne pour son précieux regard sur l'avancée de ce projet au fil des années.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers mes deux directeurs de thèse, Jacques Grill et David Castel, pour leur soutien constant et leur infinie patience tout au long de mon parcours de recherche. Je vous suis très reconnaissante pour m'avoir accordé votre confiance en me proposant ce projet ambitieux, ainsi que pour m'avoir transmis votre passion et votre curiosité pour la science, qui ont été une source

d'inspiration pour moi. Je vous suis également reconnaissante pour m'avoir poussée hors de ma zone de confort en me proposant de participer à différentes conférences et congrès. Mille mercis pour tout.

Je remercie sincèrement l'ensemble des collaborateurs pour leurs contributions au projet : Pascale Varlet, Arnault Tauziède-Espariat, Mehdi Touat, Volodia Dangouloff-Ros, Chloé Puisseux, Laurent Riffaud.

Un grand merci à Marie Baylac, stagiaire sur le projet, pour ses 2 mois qui ont été une bouffée d'oxygène. Tu m'as rappelé à quel point la science était enrichissante et ses longues journées de travail étaient plus courtes à deux, entrecoupées de rires et de discussions. Merci pour ton investissement et tous ces moments. Plein de courage pour la fin de tes études.

Je vais tâcher d'être succincte mais c'est un exercice périlleux. Merci à Coralie Werbrouck de m'avoir prise sous ton aile au départ. Merci à Kenji Fujimoto, Marjorie Sabourin, Khawla Achoch, Bilal El-Ouahabi, Saïma Zili, Lilia Midjek, Maxime Durand pour le partage et la joie en salle de culture, autour d'un plat ou d'un verre. Merci à Clémentine Barry et Mélissa Diop d'avoir été mes petites mains lorsque le temps me manquait mais aussi pour tous les moments passés ensemble à discuter ou à rire. Merci à Melis Cardon pour toutes nos discussions durant les pauses sur tous les sujets inimaginables et pour m'avoir motivée à courir plusieurs fois au cours de ces conversations. Un grand merci à Émilie Barret pour ton oreille, tes conseils et tous les fous rires quand tu venais rendre visite à la « team » du bureau 273. Merci à Maxime Genovese pour ta bonne humeur, tes blagues drôles ou pas drôles (je rigole) et pour toutes ces riches discussions scientifiques.

Manon Lancien, Chloé Subecz, Virginie Menez et Hoa Nguyen, vous avez été mes piliers durant ses 5 années. Un grand merci d'avoir été chacune présente à votre manière. Virginie et Chloé, merci d'avoir joué les rôles de grandes sœurs et pour tous les fous rires. Merci beaucoup pour votre soutien dans les moments difficiles. Thanks to Hoa, my thesis twin, we traveled together through the different stages of our theses and our respective personal lives. Manon, merci pour ton énergie, ta bonne humeur et ton franc-parler. Nos débriefings vont me manquer. Merci aussi pour le développement des modèles *in-vivo*. Je vous souhaite à toutes plein de bonheur pour la suite.

Thomas Kergrohen, je te remercie d'avoir toujours été présent *for everything*. Premièrement, merci pour ton aide précieuse sur la partie génétique du projet. Ensuite merci pour toutes nos discussions que ce soit sur la cuisine, le sport ou la vie, au laboratoire, à la cantine ou autour d'un verre durant ces 5 années.

Ludivine Le Dret, par où commencer ? Peut-être par le début. Je suis arrivée il y a 5 ans et tu m'as toujours impressionnée par ta clairvoyance que ce soit sur la vie ou la biologie. J'ai appris à te connaître au fil des années et j'ai été de découvertes en découvertes et de rires en rires. Heureusement que nos horaires de travail étaient décalés sans quoi ma thèse n'aurait pas autant avancé. Tu as été une maman et une amie à chaque seconde de cette thèse et je t'en remercie du fond du cœur. J'ai eu un immense plaisir à partager ce bureau avec Marco et toi, vous me manquez déjà. Et pour terminer, merci pour le développement des modèles *in-vivo* et pour ta relecture du manuscrit.

Mille mercis à Yassine Ajilil pour le travail important sur le projet concernant les analyses de méthylation de l'ADN et pour m'avoir transmis les bases de la bio-informatique transcriptomique. Tu as été pédagogue et patient (vraiment très patient), merci encore. Outre cela Yassine, merci pour tout ce que tu m'as apporté durant ces années : ta gentillesse, ton optimisme, tes blagues, tes encouragements et ton écoute lorsque ça n'allait pas. Tu as illuminé bien des journées.

Thank you very much, Josie Hirsch, for being there for me during these last few years. I appreciate all the outings and the laughter we shared together, which brightened up many weekends. Plein de gratitude envers mes amis d'enfances Morgan Houdart, Manon Vergne, Amandine Dubois, Clarisse Durot et Sarah Miccoli. Merci pour vos infaillibles encouragements et pour votre compréhension quand je n'ai pas été présente parce que j'avais trop de travail. Malgré la distance, vous resterez toujours des grands rayons de soleils dans ma vie.

Sincerely, I thank my American/English family for all the encouragements and love they have given me during these four years. Thank you for always inquiring if everything was alright. Je tiens à sincèrement remercier pour leur soutien toute ma grande famille, de tous les horizons. Particulièrement, Yvonne Lungaretti, Margot Le Tallec, mes grands-parents, mes beaux-parents, mes parents et mon petit frère. Je vous en serai à jamais reconnaissante. Sans votre amour inconditionnel, vos conseils et votre aide au quotidien, je ne serais pas ici aujourd'hui. Merci du fond du cœur.

Les larmes coulent à flots. Je n'ai pas assez de mots pour te dire à quel point je te suis reconnaissante d'avoir emménagé en France pour partager ensemble cette aventure de vie. Cette thèse, je n'aurais pas pu la réussir sans toi. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir soutenue quand ça n'allait pas. Merci pour ta patience, ton optimisme sans faille et ta combativité qui ont été des moteurs pour moi. Merci à Phil Hoffert, mon partenaire de bonheur, mon époux.

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
TABLES DES MATIERES	7
LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION GENERALE	14
1. Les gliomes diffus de la ligne médiane H3K27-altérés (DMG)	14
1.1. Généralités.....	14
1.2. Portrait moléculaire hétérogène des DMG	17
1.3. Portrait clinique hétérogène des patients avec DMG	37
1.4. Classification des DMG en sous-groupes.....	42
1.5. Modèles <i>in-vitro</i> & <i>in-vivo</i> de DMG	46
2. Les oncogènes BRAF et FGFR1	50
2.1. La voie MAPK	50
2.2. L'oncogène <i>BRAF</i>	55
2.3. L'oncogène <i>FGFR1</i>	63
2.4. La sénescence induite par un oncogène.....	71
3. Concepts de l'oncogenèse	83
3.1. Cellule d'origine et modèles de l'oncogenèse.....	83
3.2. Interactions oncogéniques	90
3.3. Application aux DMG H3K27M	95
OBJECTIFS INITIAUX DU PROJET DOCTORAL	104
RESULTATS	106
1. Caractérisation phénotypique clinique et moléculaire des DMG_K27-MAPKa	107
2. Développement de modèles d'études <i>in-vitro</i> et <i>in-vivo</i>	139
2.1. Modèles <i>in-vitro</i> et <i>in-vivo</i> dérivés de DMG K27-MAPKa.....	140
2.2. Modulation du programme oncogénique H3.3K27M.....	159
DISCUSSIONS & PERSPECTIVES	177
MATERIEL & METHODES	200
PRESENTATIONS ORALES /PUBLICATIONS	205
BIBLIOGRAPHIE	207

LISTE DES ABREVIATIONS

AC-like	Cellules à marquage astrocytaire positif
ACP	Analyse en composante principale
ACVR1	Récepteur de l'activine A de type 1
ARNm	ARN messenger
ATM	Ataxie télangiectasie mutée
ATRX	Alpha-Thalassemia/mental retardation, X-linked
β-gal	β-galactosidase
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BRAF	B-Raf proto-oncogène
CDK	Kinases dépendantes des cyclines
CDOX	Xénogreffes orthotopiques dérivées de cellules
CNV	Variation de nombre de copie
COSMIC	Catalogue des mutations somatiques dans le cancer
CpG	Cytosine phosphate guanine
CSC	Cellule souche cancéreuse
DEG	Gène différentiellement exprimé
DIPG	Gliome infiltrant du tronc cérébral
DMG	Gliome diffus de ligne médiane
DMG K27	DMG H3K27-altéré
DMG K27-MAPKa	DMG H3K27-MAPK-altéré
DNMT	Méthyltransférases à ADN
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épithélial
EZH2	Enhancer of Zeste homolog 2
EZH1P	Enhancer of zeste homolog Inhibitory protein
FGFR1	Récepteur 1 du facteur de croissance des fibroblastes
FGFR1-TKD	FGFR1-duplication domaine tyrosine kinase
GDP	Guanosine Diphosphate
GSC	Cellules souches de gliome
GTP	Guanosine triphosphate
(s)GSEA	Analyse d'enrichissement en groupes de gènes (échantillon unique)
H+numéro	Histone + numéro
HAT	Histone acétyle-transférase
HDAC	Histone désacétylase
HGG	Gliome de haut grade
IDH1	Isocitrate déshydrogénase 1
IF	Immunofluorescence
iPC	Cellule progénitrice intermédiaire
iPSC	Cellules souches pluripotentes induites
IHC	Immunohistochimie
LGG	Gliome de bas grade
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MPT	Modifications post-traductionnelles
MUT	Muté
NEC	Cellules neuroépithéliales
NSC	Cellule souche neurale
OC-like	Cellule à marquage oligodendrocyte positif
OIS	Sénescence induite par un oncogène
OMS	Organisation mondiale de la santé

OPC	Cellule progénitrice oligodendrogliale
OPC-like	Cellule à marquage progénitrice oligodendrogliale positif
oRG	Glie radiale fille
PDGFRA	Récepteur aux facteurs de croissance dérivés des plaquettes alpha
PDOX	Xénogreffes orthotopiques dérivées de biopsies de patient
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PRC1 /2	Complexe polycomb répresseur 1 /2
RNAseq	Séquençage de l'ARN
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SAHF	Foyer d'hétérochromatine associé à la sénescence
SASP	Phénotype sécrétoire associé à la sénescence
SD	Déviations standard
SNC	Système nerveux central
SOS	Son of Sevenless
TCGA	Atlas du génome du cancer
TPM	Transcrits par million
tSNE	t-distributed stochastic neighbor embedding
vRG	Glie radiale ventriculaire
WES	Séquençage de l'exome entier
WT	Sauvage

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre. »

Marie Curie (1867-1934)

INTRODUCTION GENERALE

Cette introduction a pour but de donner les clés pour la compréhension de ce projet de thèse. Pour cela, ce chapitre sera divisé en trois parties. La première correspondra à une description moléculaire et clinique intégrée des gliomes de la ligne médiane H3K27-altérés. La seconde partie s'intéressera plus particulièrement à deux oncogènes *BRAF* et *FGFR1* que l'on retrouve parfois muté au sein de cette entité. La dernière partie s'adonnera à présenter quelques notions et modèles du vaste champs de l'oncogenèse nécessaires à la discussion du projet.

1. Les gliomes diffus de la ligne médiane H3K27-altérés (DMG)

1.1. Généralités

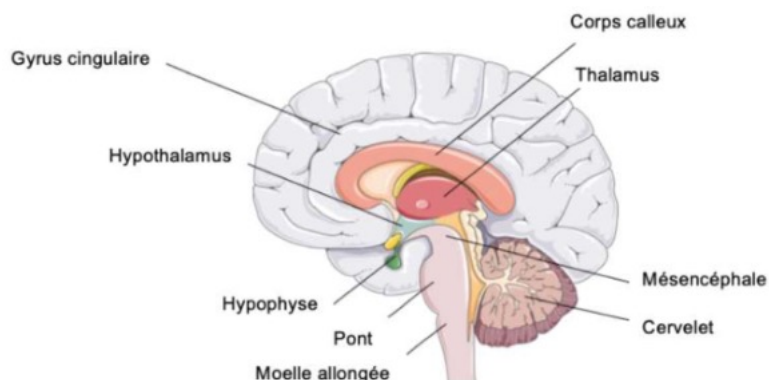
Les tumeurs du SNC

Les tumeurs du SNC regroupent plus d'une centaine d'entités et représentent la première cause de mortalité par cancer chez l'enfant, l'adolescent et le jeune adulte (Ostrom *et al.*, 2018; Miller *et al.*, 2021). Les incidences, les taux de mortalité et les types tumoraux diffèrent selon l'âge, avec des différences assez marquées entre les enfants et les adolescents d'une part, et adultes d'autre part (Braunstein *et al.*, 2017; Rasmussen *et al.*, 2017; Ostrom *et al.*, 2018; Roux *et al.*, 2020). Soixante-dix pour cent des tumeurs cérébrales pédiatriques sont bénignes d'après la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Les gliomes représentent les tumeurs les plus fréquentes parmi les tumeurs du SNC (Miller *et al.*, 2021). Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux gliomes de hauts grades (HGG pour High Grade Gliomas) (c'est-à-dire les gliomes malins), les tumeurs les plus fréquentes sont les glioblastomes hémisphériques chez l'adulte alors que ce sont les gliomes diffus de la ligne médiane (DMG pour Diffuse Midline Gliomas) dans la population pédiatrique (Louis *et al.*, 2016; Miller *et al.*, 2021). Les gliomes infiltrants du tronc cérébral (DIPG pour Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas) font partie des gliomes diffus de la ligne médiane depuis la révision 2016 de la classification de l'OMS.

1.1.A Les DMG

Comme indiqué dans l'intitulé de l'entité, les DMG présentent un caractère diffus (ne forment pas de masse mais infiltrent le parenchyme cérébral) et se développent dans la ligne médiane qui comprend embryologiquement le thalamus, le tronc, le cervelet et la moelle épinière (Fig. 1A) (Moore, 2015; Louis *et al.*, 2016; Frank and Sela-Donenfeld, 2019).

A



B

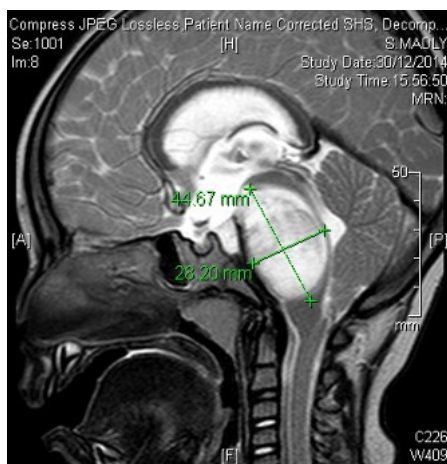


Figure 1 : Localisation et diagnostic des gliomes diffus de la ligne médiane

(A) Schéma anatomique d'une coupe sagittale de cerveau mettant en évidence la ligne médiane. (B) Coupe T2-FLAIR sagittale d'une IRM d'un patient de Gustave Roussy avec une délimitation de la tumeur en vert.

En France, chaque année, environ 50 enfants sont diagnostiqués avec un DIPG. Si on compte les DMG tous âges confondus, on peut estimer qu'une centaine de patients par an est concernée par cette pathologie. Il faut noter que la majorité des études scientifiques qui seront citées au cours de ce projet concernent principalement les DMG pédiatriques. L'âge au diagnostic peut varier de 1 à 82 ans et l'âge médian au diagnostic est variable selon le sous-type et la localisation tumorale (*Solomon et al., 2016; Mackay et al., 2017; Vuong et al., 2021*). Nous verrons l'ensemble des caractéristiques cliniques dans la suite de l'introduction.

Généralement, le diagnostic est réalisé dans les 3 mois suivants l'apparition des premiers symptômes chez le patient (*Cohen, Jabado and Grill, 2017*). Les symptômes peuvent diverger en fonction de la localisation tumorale, interne ou externe au tronc. Un DMG peut occuper plus de 50% du tronc et en

conséquence comprimer les voies longues et le cervelet, responsables de l'équilibre et de la coordination du corps dans l'espace (Fig. 1B). Les symptômes les plus fréquents sont donc des maux de têtes, des déficits moteurs et/ou sensitifs, une ataxie et une paralysie des nerfs crâniens en particuliers les nerfs oculomoteurs (Dono et al., 2020).

La localisation tumorale peut aussi jouer un rôle sur la prise en charge du patient. Par exemple, un patient qui a une tumeur dans le tronc est malheureusement inopérable dû à la nature infiltrante de la tumeur et sa localisation dans une zone cérébrale régulatrice des fonctions physiologiques. À l'inverse, un patient avec un gliome dans le thalamus, malgré la diffusion, peut être éligible à une exérèse chirurgicale partielle afin de réduire le volume tumoral. La suite de la prise en charge des DMG est indépendante de la localisation tumorale et consiste en la radiothérapie, traitement standard depuis plus de 60 ans (Coutel, 1959). Le traitement consiste en 30 à 33 séances de radiothérapies focales quotidiennes de 1,8 Gy (Cohen, Jabado and Grill, 2017). Malheureusement, malgré une amélioration clinique post-radiothérapie pour certains patients, la réponse au traitement est seulement transitoire et l'évolution de la maladie mène inévitablement au décès (Werbrouck et al., 2019). La médiane de survie est inférieure à une année (Mackay et al., 2017). Jusqu'à ce jour, et malgré plus de 200 essais cliniques, aucune chimiothérapie ou traitement ciblé en agent unique ou par combinaison n'a permis d'augmenter la survie ou le temps de survie sans progression des patients atteints de DMG. Des études récentes ont montré la grande résistance des DIPG aux chimiothérapies et aux thérapies ciblées habituelles (Grasso et al., 2015). La localisation du cerveau protégé par la barrière hémato-encéphalique (BHE) complique aussi l'équation. En effet, il est nécessaire de trouver une/des drogue(s) (molécules de très petites tailles et hydrosolubles) dont la BHE est perméable, ou alors de développer de nouveaux procédés pour augmenter la perméabilité de la BHE à des drogues de plus grandes tailles (Beccaria et al., 2020). En effet, trouver une opportunité thérapeutique pour les patients atteints de DMG est un challenge et une urgence dans le monde de l'oncologie.

L'absence d'avancées thérapeutiques au cours de ces dernières décennies a aussi été compromise par l'absence de matériels biologiques et la confusion entre DMG pédiatriques et gliomes malins de l'adulte. La connaissance des mécanismes cellulaires et oncogéniques est pourtant indispensable dans l'identification d'une cible thérapeutique. Dans ce but, les neurochirurgiens de l'Hôpital Necker-Enfants malades à Paris ont remis en place, dès 2002, la biopsie stéréotaxique des DIPG au diagnostic pour informer des essais de thérapies ciblées et ont observé que le risque lié à la chirurgie dans le tronc n'est pas augmenté par rapport aux autres zones du cerveau (Roujeau et al., 2007; Puget et al., 2015). La biopsie est ainsi devenue un élément clé dans le diagnostic de ce sous-type tumoral lorsque des analyses

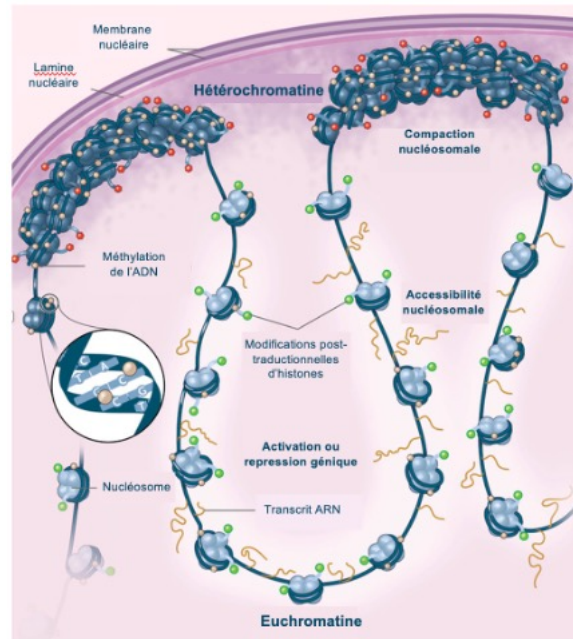
de biologie moléculaire sont devenues possibles car au préalable l'histologie et le grade n'avaient jamais montré de rôle pronostique dans cette pathologie. Pour récapituler, le diagnostic de DMG se réalise donc en trois temps : présence d'un état clinique caractéristique qui impose une imagerie par résonance magnétique (IRM) et ensuite la biopsie est réalisée dans le but de valider le diagnostic par immunohistochimie et/ou analyse moléculaire montrant soit la mutation d'histone H3K27M, soit un profil de méthylation caractéristique de ces tumeurs. L'obtention de matériel biologique a permis de séparer les DMG des gliomes diffus de l'adulte à l'aide d'analyses génomiques. En effet, le profil d'altération génomique et le profil transcriptomique sur, respectivement puces à ADN et ARN, sont divergents entre les gliomes pédiatriques et adultes (Paugh *et al.*, 2010). Cela n'implique pas que les DMG apparaissent uniquement chez les enfants car il y a des cas adultes. Cela signifie que la plus grosse partie des gliomes adultes, appelés communément glioblastomes, sont moléculairement différents des DMG pédiatriques et que seulement une petite partie des gliomes adultes correspondent à des DMG proches de ceux pédiatriques. En conséquence, la prise en charge des glioblastomes des adultes est maintenant différente de celle des DMG chez les enfants.

1.2. Portrait moléculaire hétérogène des DMG

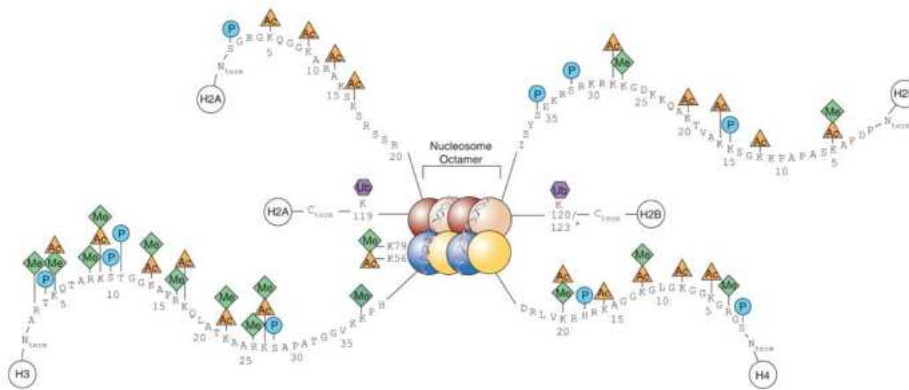
1.2.A Généralités sur l'épigénétique

L'épigénétique consiste en l'acquisition de traits phénotypiques héréditaires et stables qui ne sont pas inscrits dans la séquence d'ADN (Dupont, Armant and Brenner, 2009). Un exemple connu est celui de la chenille qui se métamorphose en papillon. À ces deux stades, le génome est identique mais pas l'épigénome, et c'est cet épigénome qui est à l'origine de cette différence phénotypique par l'expression différenciée des gènes. Ainsi, l'identité d'une cellule est le résultat de la stabilisation de programmes d'expressions géniques par mécanismes épigénétiques. Les mécanismes épigénétiques sont très variés et présents à différents niveaux comme la méthylation de l'ADN, la modification post-traductionnelle de queues d'histones, la régulation génique par les acides ribonucléiques (ARN) non-codants ou encore le remodelage de la chromatine (Fig. 2A).

A



B



C

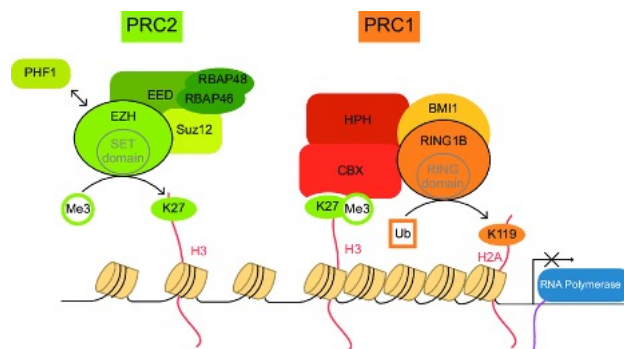


Figure 2 : Mécanismes épigénétiques principaux au sein d'une cellule normale

(A) Schéma de la chromatine compactée (hétérochromatine) ou relâchée (euchromatine) composée de nucléosomes entourés d'ADN. Représentation des deux mécanismes épigénétiques principaux : méthylation de l'ADN et modifications post-traductionnelles des queues d'histones. Adaptée de (Feinberg, 2018). (B) Représentation d'un nucléosome composé d'un octamère d'histones avec leurs queues N- et C-terminales. Certains acides aminés peuvent subir des modifications post-traductionnelles : phosphorylation (P), méthylation (me) et acétylation (ac). (Kepler and Archer, 2008).

(C) Crosstalk entre marques épigénétiques pour la répression transcriptionnelle (*Visser, van Lohuizen and Citterio, 2012*).

La méthylation de l'ADN

Une cytosine (C) proche d'une guanine (G) reliée par une liaison phosphodiester dans une région de plus de 200 paires de bases et dont le pourcentage de G/C combiné est supérieur à 50 correspond à un îlot CpG dans l'ADN (*Gardiner-Garden and Frommer, 1987*). La cytosine de ce dinucléotide peut subir ce qu'on appelle « une méthylation de l'ADN » par un ajout d'un groupement méthyle au niveau de son cinquième carbone (*Holliday and Pugh, 1975*). Cette modification chimique stable, souvent référencée comme la « cinquième base », est réalisée par des enzymes de la famille des méthyltransférases à ADN (DNMT) et se situe en général au niveau du promoteur en amont du gène dans le but de le réprimer (*Razin and Riggs, 1980*). Plus spécifiquement, DNMT1 est responsable du maintien de la méthylation d'une division à l'autre, en méthylant les cytosines hémi-méthylées après réplication. Pour la méthylation *de novo*, c'est DNMT3 la responsable. Il faut savoir qu'environ 70% des îlots CpG du génome sont méthylés en condition physiologique (*Strichman-Almashanu et al., 2002*). Par exemple, la répression génique par méthylation de l'ADN est impliquée dans la régulation de l'expression génique tissu-spécifique, l'inactivation du chromosome X et la répression à long terme des éléments répétés et transposables (*Jones, 2001*).

Les histones

La chromatine, située dans le noyau cellulaire, est une structure complexe composée d'ADN enroulé autour de nucléosomes (*Fig. 2A*). Plus précisément, un nucléosome correspond à l'enroulement de 146 paires de bases autour d'un octamère basique d'histones dont chacun des 4 histones est en double exemplaire : histones 2A (H2A), histones 2B (H2B), histones 3 (H3) et histones 4 (H4) (*Fig. 2B*). Ce sont ces protéines qui sont, en partie, responsables de la compaction de la chromatine (*Kornberg, 1974*). Afin de participer dynamiquement à la régulation de la chromatine, les histones peuvent subir des modifications post-traductionnelles (MPT) réversibles sur différents acides aminés situés aux extrémités N- et C-terminales (*Fig. 2B*). Ces MPT (marques épigénétiques) forment le code histone et sont diverses : acétylation, méthylation, phosphorylations, ubiquitinations et ribosylations. C'est l'histone H3 qui a le plus de possibilités de modifications. Les acteurs du code histone sont les « writers » qui apposent les marques, les « readers » qui les lisent et les « erasers » qui les effacent.

L'acétylation, ou désacétylation, correspond à l'ajout ou à l'élimination d'un groupement acétyle au niveau d'acides aminés (i.e. lysine) des queues d'histones. Ces actions sont respectivement réalisées par des histones acétyltransférases (HAT) et désacétylases (HDAC). Plus généralement, l'acétylation

d'histones, ou « hyper-acétylation », induit un changement conformationnel du nucléosome en neutralisant la charge positive des queues d'histones et réduisant ainsi l'affinité avec l'ADN (*Hong et al., 1993*). Cela permet une ouverture de la chromatine permettant une activation de la transcription. Au contraire, l'absence d'acétylation, ou « hypo-acétylation », correspond à une chromatine fermée et transcriptionnellement inactive. De manière générale, le niveau global d'acétylation des histones est plutôt élevé avec une moyenne de 13-30 résidus /octamère. L'exemple le plus connu est l'acétylation au niveau de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27ac).

Divers résidus de queues d'histones peuvent subir l'ajout ou l'élimination d'un, deux ou trois groupements méthyles (méthylation, me ; diméthylation, me² ou triméthylation, me³). Il n'existe pas d'histone méthyltransférase ou déméthylase universelle, cela varie en fonction de la sous-unité d'histone ou du résidu impliqué. À titre d'illustration, le complexe polycomb répresseur 2 (PRC2) avec sa sous-unité catalytique enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) est responsable de l'apposition de di- ou triméthylation sur la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me_{2/3}) (*Fig. 2C*) (*Wang et al., 2008*). Alors que pour la triméthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me₃), c'est l'histone méthyltransférase SETD2 (aussi appelé KMT3A) qui en est l'auteur (*Sun et al., 2005*). De même, l'impact de la méthylation d'un résidu d'histone est dépendant du résidu en question. Par exemple, la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 (H3K9me₃) ou sur la lysine 27 induit une répression génique alors que la triméthylation de la lysine 36 induit une activation transcriptionnelle.

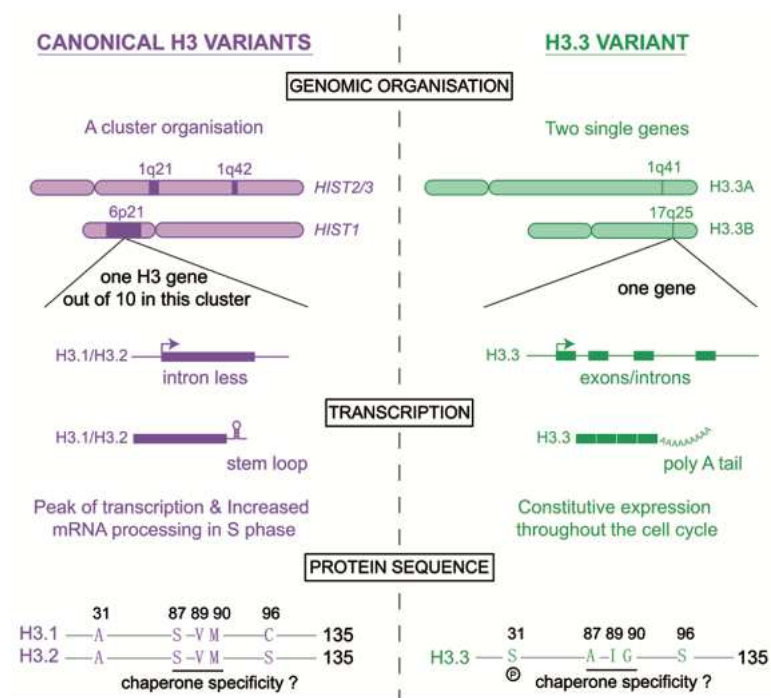
Ce code histone peut parfois être contexte-dépendant, une même marque dans un contexte spécifique peut avoir une autre signification dans un autre. Par exemple, c'est le cas de la marque H3K4me, résultat de l'ajout d'un groupement méthyle sur la lysine 4 de l'histone H3, qui corrèle majoritairement à une activation transcriptionnelle. Mais cette même marque lorsqu'elle est associée à H3K27me₃ (appelée région « bivalente ») dans une cellule pluripotente, les gènes en regards sont éteints (*Azuara et al., 2006*). Ces régions bivalentes sont enrichies lors de différenciations cellulaires où le dynamisme est nécessaire. Certaines MPT comportent un rôle à elles seules et d'autres agissent en concert. On appelle une MPT qui influence une autre, un « crosstalk ». En effet, *Cho et al. 2007* ont montré l'existence d'une coordination des modifications d'histones avec l'élimination de la di-/triméthylation en H3K27 au profit de la méthylation en H3K4 par le complexe méthyltransférase MLL3/4 Set1-H3K4 dans le but d'exprimer les gènes en regards (*Cho et al., 2007*). Un second exemple de crosstalk est la répression par le complexe polycomb répresseur 1 canonique (PRC1) recruté par la marque épigénétique H3K27me₃ déposée par PRC2 (*Fig. 2C*) (*Blackledge et al., 2020*). En effet, PRC1 est recruté au niveau des queues d'histones H3K27 triméthylées. Le complexe catalyse ensuite la mono-ubiquitination de H2A en position K119 et induit la

répression génique par réorganisation de la chromatine. À noter, la répression génique par PRC1 et PRC2 est maintenue au cours des divisions cellulaires, « mémoire épigénétique », mais reste très dynamique (Angel et al., 2011; Berry and Dean, 2015).

Les variants d'histones H3

Il existe des histones canoniques et non canoniques dont les caractéristiques structurales, et en conséquence fonctionnelles, diffèrent (Fig. 3). En effet selon le variant d'histone, l'ADN peut être plus ou moins enroulé ou la stabilité du nucléosome peut être modulé. Une des singularités des variants canoniques est la régulation au cours de la phase de réplication du cycle cellulaire alors que les variants non canoniques sont exprimés en dehors de cette phase (Grove and Zweidler, 1984) (Fig. 3A).

A



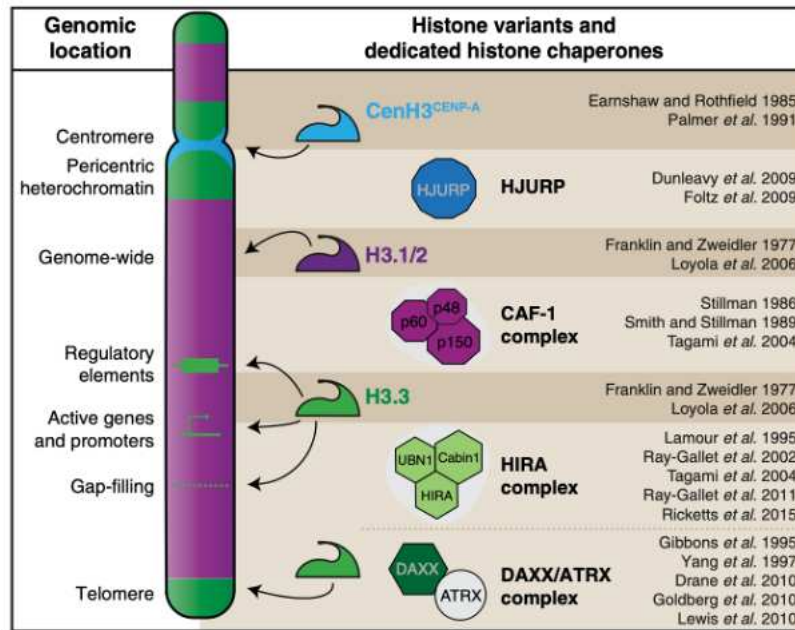
B

Figure 3 : Les différences entre variants canoniques et non canoniques de H3

(A) H3.1 et H3.2 sont les histones canoniques et H3.3 est le seul non canonique de H3. L'organisation génomique, la transcription et la séquence diffèrent entre les H3 canoniques et non canoniques. (Szenker, Ray-Gallet and Almouzni, 2011). (B) Incorporation des variants H3 dans la chromatine en fonction du variant canonique ou non, de la localisation génomique et des protéines chaperonnes. (Sitbon et al., 2017).

Par exemple, il existe trois variants de l'histone H3, deux sont canoniques H3.1 et H3.2 et le troisième H3.3 est non canonique (Fig. 3A) (Szenker, Ray-Gallet and Almouzni, 2011). Malgré une faible différence de 5 acides aminés sur un total de 135 entre H3.1 et H3.3, plusieurs caractéristiques diffèrent entre variants canoniques et non canoniques (Ahmad and Henikoff, 2002).

Premièrement, l'organisation génomique des gènes codant les variants d'histones H3 est différenciée. Les gènes codant pour les histones canoniques n'ont pas d'introns et sont organisés en clusters multicopies (Fig. 3A). Plus précisément, H3.1 est codé par le gène *HIST1H3B* et *H3F3A* code pour H3.3. De plus, l'ARN messenger (ARNm) exprimé à partir des gènes codant les histones canoniques n'est pas polyadénylé mais contient à la place une structure trois dimensions de tige-boucle indispensable pour la stabilité et la traduction de l'ARN (Pandey et al., 1990; Dominski and Marzluff, 2007).

Deuxièmement, la transcription des variants canoniques atteint un pic d'expression au moment de la réplication (phase S) dans le but de fournir assez d'histones pour la duplication du génome (Osley, 1991). En effet, l'organisation génomique et la transcription sont optimisées pour la production d'histones en

énorme quantité pour la compaction de la néo-chromatine pendant la phase S. Ce n'est pas le cas pour le variant non canonique qui est exprimé tout au long du cycle cellulaire.

Troisièmement, l'incorporation des variants d'histones dans la chromatine diffère en fonction du variant en question (Fig. 3B). Le variant H3.1 est principalement incorporé dans tout le génome au cours de la réplication ou de dommages à l'ADN par le complexe de facteurs d'assemblages de la chromatine 1 (CAF-1 pour Chromatin assembly factor 1) (Fig. 3B). Le variant H3.3 peut être incorporé à la fois dans l'hétérochromatine et l'euchromatine selon deux complexes chaperons différents (Fig. 3B). Le complexe DAXX/ATRX – DAXX (death domain-associated protein), protéine chaperonne, ATRX (ATR Chromatin Remodeler), protéine de remodelage de la chromatine -- incorpore H3.3 au niveau de régions télomériques, riches en séquences répétées ou dans l'hétérochromatine péricentrique. Dans l'euchromatine au niveau des promoteurs ou des gènes transcriptionnellement actifs, c'est le complexe HIRA qui incorpore le variant H3.3 dans la chromatine.

1.2.B Perte globale de triméthylation en position 27 de l'histone H3 (H3K27me3)

Mécanisme de perte de H3K27me3 induit par H3K27M

Les avancées technologiques en génomique de ces dernières décennies ont permis l'identification d'une mutation somatique hétérozygote récurrente qui induit la substitution de la lysine par une méthionine en position 27 de l'histone H3 (Schwartzentruber et al., 2012; Wu et al., 2012). L'histone mutée en K27 est appelée « oncohistone » pour sa propriété initiatrice, mais non transformante (insuffisante pour l'initiation tumorale), de l'oncogenèse des DMG (Nacev et al., 2019). Plus de 90% des DMG présentent la mutation d'histone K27M et plus particulièrement 73% sont H3.3K27M et 19% H3.1K27M (Castel et al., 2015; Mackay et al., 2017; Kergrohen et al., 2021). Une autre oncohistone existe dans les HGG pédiatriques : les gliomes hémisphériques H3.3 avec substitution de la guanine par l'arginine ou la valine en position 34 (H3.3G34R/V) (Mackay et al., 2017).

La mutation H3K27M induit par un effet dominant négatif l'inhibition transitoire de PRC2 et de sa sous-unité catalytique EZH2 conduisant à une perte globale de la marque répressive de di- et triméthylation en H3K27 entraînant un remodelage du paysage épigénétique et transcriptionnel principalement mais pas uniquement sur les gènes cibles habituels de PRC2 (Fig. 4A,B,C) (Bender et al., 2013; Lewis et al., 2013; Stafford et al., 2018).

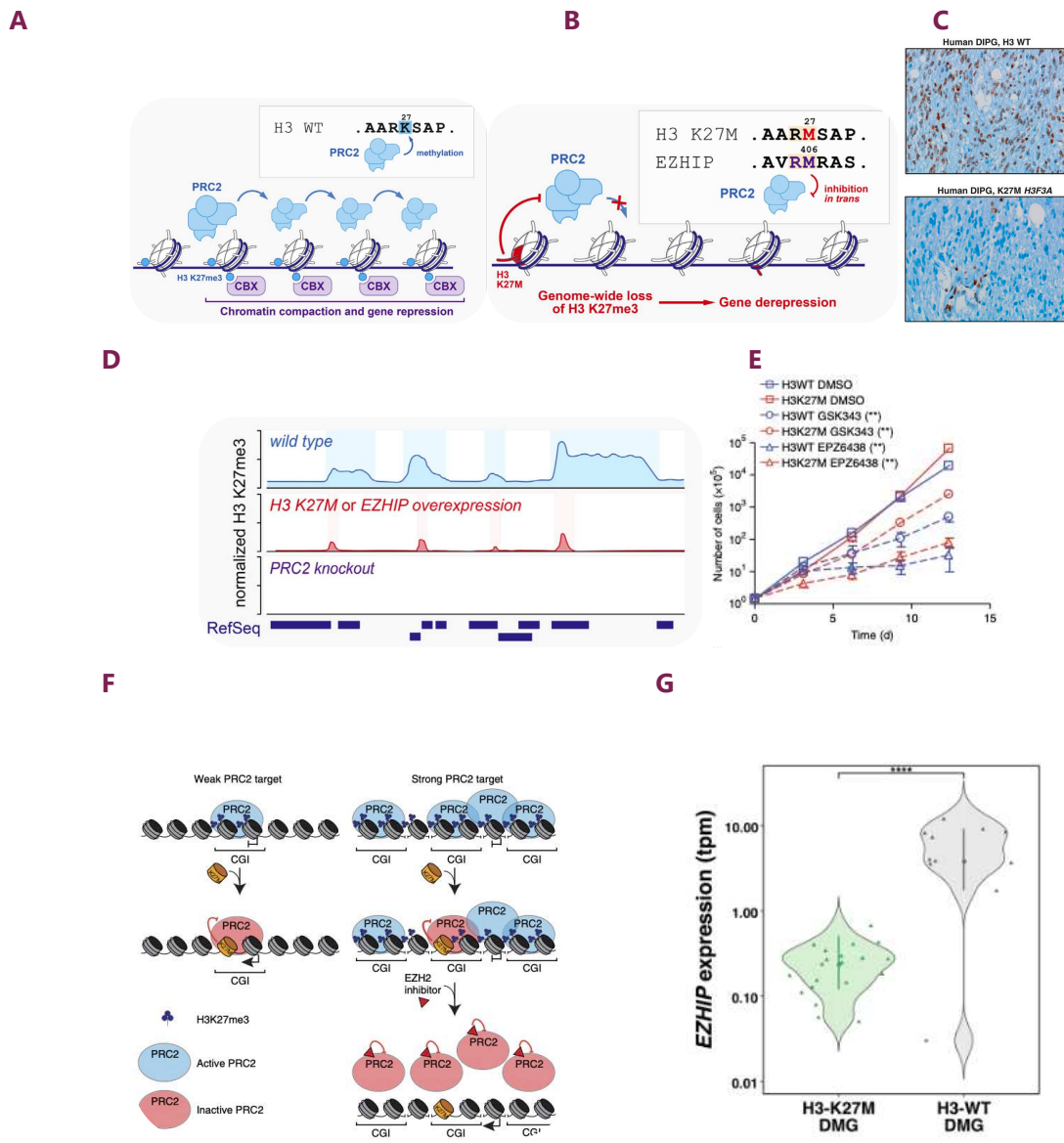


Figure 4 : Mécanisme de perte globale de H3K27me3 induit par la mutation H3K27M ou la surexpression de EZHIP au sein de DMG

(A) Fonctionnement physiologique de PRC2 lors de l'apposition de marques de di-/triméthylations sur H3K27, ce qui induit une compaction de la chromatine et, par conséquent, une répression génique. (Phillips, Soshnev and Allis, 2020) (B) En présence de la mutation H3K27M, PRC2 est inhibé ce qui induit une perte globale de triméthylation en H3K27 à l'échelle du génome et induit une dérégulation génique. (Lewis et al., 2013) (C) Marquage anti- H3K27me3 sur coupe de DMG H3K27M ou H3WT par IHC. (Lewis et al., 2013). (D) Schéma stéréotypé de la quantité de H3K27me3 en condition physiologique, en présence de la mutation H3K27M ou en présence d'une répression génique de PRC2 en fonction l'expression génique. (Phillips, Soshnev and Allis, 2020). (E) Essai de prolifération de modèles *in-vitro* de NSC H3WT ou H3K27M, traités ou non avec l'un des deux inhibiteurs de EZHIP à une concentration de 3µM. (Mohammad et al., 2017). (F) Modèle de perte globale de H3K27me3 avec quelques gains focaux. Le modèle reposerait sur (i) une incorporation homogène et en faible quantité de H3K27M dans la chromatine et (ii) des rapports d'enrichissement PRC2/H3K27me3 différenciés. Les sites cibles de PRC2 dit « faibles » ont un nombre plus limité de PRC2 donc l'incorporation de quelques histones mutées suffiraient à l'inhibition de PRC2. Au contraire, les sites cibles de PRC2 dit « forts » ont un nombre plus important de PRC2 et le faible niveau d'incorporation de H3K27M dans la chromatine ne serait pas suffisant à inhiber totalement PRC2. L'activité résiduelle non inhibée serait responsable de quelques

gains focaux de H3K27me3. (Mohammad *et al.*, 2017). (G) Diagramme en violon de l'expression normalisée de *EZH1P* (TPM pour transcrit par million) dans les gliomes H3K27M ou H3WT avec une perte de triméthylation en H3K27 par IHC. (Castel *et al.*, 2020).

Plus précisément dans un premier temps, la mutation H3K27M augmente son affinité avec PRC2, qui va être recruté au niveau d'une oncohistone (Fig. 4A,B) (Stafford *et al.*, 2018). Cette interaction transitoire oncohistone-PRC2 induirait un changement conformationnel allostérique réduisant l'activité catalytique de PRC2 qui ne lui permettrait plus de remplir son rôle physiologique d'apposition de méthylations en H3K27 et ce changement conformationnel serait maintenu après séparation du complexe oncohistone-PRC2 (Stafford *et al.*, 2018).

De manière surprenante, la perte de H3K27me3 sur le génome n'est pas totale et il existe une centaine de gains focaux de H3K27me3 (Fig. 4D) (Chan *et al.*, 2013; Mohammad *et al.*, 2017). Ces gains focaux sont souvent localisés aux niveaux de gènes suppresseurs de tumeurs comme *CDKN2A* codant pour la protéine p16 dont l'expression est donc constitutionnellement inhibée par la mutation H3K27M. Par conséquent, contrairement à beaucoup d'autres gliomes malins, il n'y a pas dans ces tumeurs de perte de *CDKN2A*. Cette protéine p16 est un inhibiteur du cycle cellulaire impliquée dans l'induction de la senescence (Alcorta *et al.*, 1996). La répression est donc essentielle à la survie et prolifération cellulaire. En 2017, Mohammad *et ses collègues* ont étudié l'impact de ces quelques pics de H3K27me3 dans l'oncogenèse des DMG (Mohammad *et al.*, 2017). Pour cela, ils ont inhibé pharmacologiquement et génétiquement l'activité résiduelle catalytique de EZH2, sous-unité de PRC2, au sein de modèles *in-vitro* dérivés de DIPG H3K27M et *in-vivo* de DIPG générés génétiquement. Ils ont observé une diminution significative de la prolifération sous inhibition de EZH2 dans les modèles H3K27M *versus* non traités (Fig. 4E). Ce résultat souligne que l'activité résiduelle catalytique de PRC2 est nécessaire à la survie des cellules tumorales. De plus, leurs analyses génomiques ont montré que les gènes réprimés avec des gains focaux de H3K27me3 se superposent majoritairement entre les modèles murins de DIPG formés génétiquement (non dérivés de tumeurs humaines) et les lignées cellulaires dérivées de DIPG dont notamment le gain focal retrouvé sur le locus *CDKN2A*. La répression de *CDKN2A* semble être un évènement clé dans le processus oncogénique car il est sélectionné au cours de l'oncogenèse à la fois dans les DMG chez les patients et dans les modèles murins génétiques de DMG. Les autres gènes réprimés par les gains focaux de H3K27me3 sont impliqués dans la différenciation neuronale (Bender *et al.*, 2013).

Pour résumer, l'apparition de la mutation H3K27M induit, par un effet dominant négatif, une perte globale de H3K27me3 à l'exception de quelques gains focaux, mais à ce jour, cela n'explique pas le gain

focal récurrent retrouvé sur *CDKN2A* (Fig.4D). L'hypothèse la plus plausible est la sélection clonale d'une cellule avec un gain stochastique de H3K27me3 sur *CDKN2A*.

Mécanisme de perte de H3K27me3 induit par une surexpression de EZHIP

Les épendymomes de la fausse postérieure de type A, tumeurs cérébrales préférentiellement pédiatriques, sont aussi caractérisés par une perte de triméthylation en H3K27 à des niveaux similaires aux DMG H3K27M mais sans la mutation d'histone. Cependant, ces tumeurs présentent une augmentation significative de l'expression de Enhancer of Zeste Homologs Inhibitory Protein (EZHIP) (Pajtler *et al.*, 2018). Il s'avère que EZHIP est un inhibiteur direct de l'enzyme catalytique EZH2 du complexe PRC2 ce qui explique la perte globale de H3K27me3 (Hübner *et al.*, 2019; Jain *et al.*, 2019). La protéine EZHIP mime l'oncohistone, appelée « oncohistone mimicry » dans la littérature en anglais (Nacev *et al.*, 2019). De manière intéressante, la répression de *CDKN2A* est aussi retrouvée dans les épendymomes ce qui souligne encore l'importance de cet évènement pour ce type d'oncogenèse (Hübner *et al.*, 2019).

Un peu moins de 10% des DMG ne sont pas mutés H3K27M mais sont caractérisés aussi par une perte globale de H3K27me3. Notre équipe a montré que ces gliomes diffus de la ligne médiane H3WT présentent aussi une surexpression de *EZHIP*, ce qui explique la perte de H3K27me3 (Fig. 4G) (Castel *et al.*, 2020).

Conséquences épigénétiques et transcriptomiques de la perte globale de H3K27me3

La perte globale de H3K27me3 induit un remodelage épigénétique et transcriptionnel (Bender *et al.*, 2013; Lewis *et al.*, 2013; Stafford *et al.*, 2018). Ce remodelage épigénétique diffère selon le variant d'histone muté : H3.1- ou H3.3K27M. En effet, l'équipe a récemment montré qu'il est possible de discriminer les gliomes H3.1- *versus* H3.3-K27M selon la distribution de la marque H3K27me3 entre les deux conditions par analyse en composante principale (ACP) (Fig. 5A) (Castel *et al.*, 2018). En conséquence, on retrouve aussi cette séparation H3.1- *versus* H3.3-K27M selon le transcriptome (Fig. 5B). La perte globale de triméthylation en H3K27me3 (marque épigénétique inhibitrice), cette fois-ci indépendamment de la mutation d'histone, induit en conséquence une augmentation générale de l'expression des gènes en regards (Bender *et al.*, 2013).

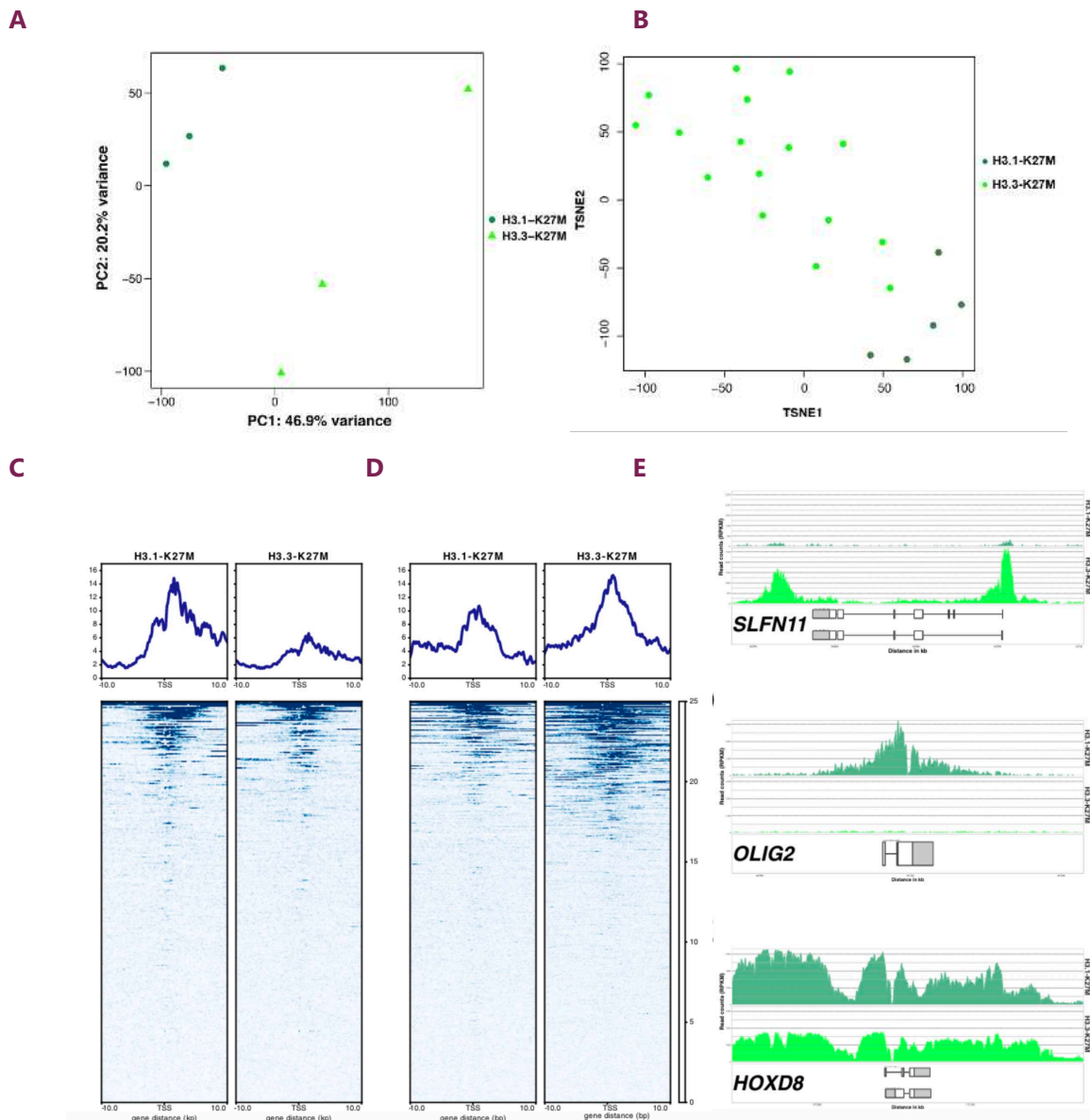


Figure 5 : Paysage épigénétique et transcriptionnel des DMG H3K27M

(A) ACP de modèles *in-vitro* de DMG H3.1 ou H3.3K27M dérivés de biopsies selon le profil de H3K27me3 ($n = 16\,977$ intervalles génomiques) (Castel *et al.*, 2018). (B) Analyse tSNE des transcriptomes de biopsies de DMG H3.1 ou H3.3K27M basée sur le profil des 250 gènes les plus variants. (Castel *et al.*, 2018). Signal de H3K27me3 issu de ChipSeq au niveau des régions promotrices centrées sur le site d'initiation à la transcription (TSS en anglais pour transcription start site) des gènes surexprimés (C) ou sous-exprimés (D) entre modèles *in-vitro* de DMG H3.1- versus H3.3K27M dérivés de biopsies. (E) Niveau et répartition de la marque H3K27me3 au niveau de différents gènes : *SLFN11*, *OLIG2* et *HOXD8* en lectures par million de kilobases (RPKM en anglais pour Reads Per Kilobase Million) dans les modèles *in-vitro* de DMG H3.1- versus H3.3K27M dérivés de biopsies (Castel *et al.*, 2018).

Il faut noter que les niveaux d'expression génique ne sont pas toujours expliqués par le niveau et la distribution de la marque H3K27me3, ce qui souligne la présence d'autres niveaux de régulations (Fig. 5C,D,E). Plusieurs études indépendantes ont montré d'autres altérations du paysage épigénétique des DMG H3K27M. La perte globale de H3K27me3 induit une augmentation des marques épigénétiques

activatrices. En effet, l'inhibition de PRC2 induit aussi une hypométhylation de l'ADN (*Reddington et al., 2013*). De même, le niveau d'acétylation en H3K27 est aussi augmenté (*Lewis et al., 2013; Piunti et al., 2017*). En effet, *Harpaz et ses collègues* ont observé des disparités épigénétiques avec l'identification de cellules avec des profils épigénétiques différents selon le niveau d'expression de l'oncohistone H3.3K27M. La population avec la plus forte expression de H3.3K27M présente une augmentation des marques épigénétiques activatrices : acétylation en H3K27 et en H4K16 ; et méthylation /triméthylation en H3K4 (*Harpaz et al., 2022*).

Les différentes études de certaines marques épigénétiques des DMG montrent un profond remodelage épigénétique et transcriptomique induit par la mutation d'histones. Au sein du laboratoire, une étude plus approfondie avec un nombre plus élevé de marques activatrices et répressives sur un nombre de modèles *in-vitro* dérivés de DMG plus important a été réalisée et est en cours d'analyse pour avoir une plus grande compréhension des remodelages épigénétiques et transcriptomiques.

1.2.C Autres altérations moléculaires présentes dans les DMG

Les multiples études sur le paysage mutationnel des DMG H3K27M ou H3WT rapportent, de manière consensuelle, une hétérogénéité moléculaire avec des associations préférentielles de mutations (*Taylor et al., 2014; Mackay et al., 2017; Kergrohen et al., 2021*). En 2014, notre équipe a montré que la charge mutationnelle au diagnostic n'est pas très élevée avec en moyenne 0,76 mutation *versus* 1,2 mutations par mégabase à l'autopsie (*Taylor et al., 2014*). Cette faible charge souligne le rôle majeur des quelques mutations présentes et leurs associations dans l'oncogenèse des DMG.

Une analyse d'enrichissement en gènes fréquemment altérés dans les DMG a été réalisée à partir des variants (SNV pour single nucleotide variant) et des altérations géniques (CNA pour copy number alteration) par les bioinformaticiens de l'équipe (*Fig. 6*). Les gènes altérés se retrouvent impliqués dans des processus biologiques clés : intégrité du génome via la signalisation p53, la signalisation du TGFB, la voie PI3K-AKT-MTOR et les régulateurs de la chromatine (*Kergrohen et al., 2021*). Pour recontextualiser, la voie du TGF (The transforming growth factor β) est impliquée dans multiples processus biologiques comme la prolifération et différenciation cellulaire, l'immunité et le développement embryonnaire et semble être très contexte-dépendant (*Massagué, 2008*). La voie PI3K-AKT-MTOR, qui est en réalité deux voies de signalisations (i) PI3K-AKT (phosphatidylinositol-3-kinase) et (ii) MTOR (mammalian target of rapamycin), sont si interconnectées qu'elles sont souvent regroupées en une seule voie. La survie et la prolifération cellulaire sont en partie contrôlées par cette voie (Yu and

Cui, 2016). En effet, indépendamment du variant d'histone muté, 92% des DMG ont une altération de la voie PI3K-AKT-MTOR avec une perte d'expression de PTEN en IHC associée habituellement à une activation des effecteurs en aval de la voie : pS6 and pAKT (Kergrohen et al., 2021).

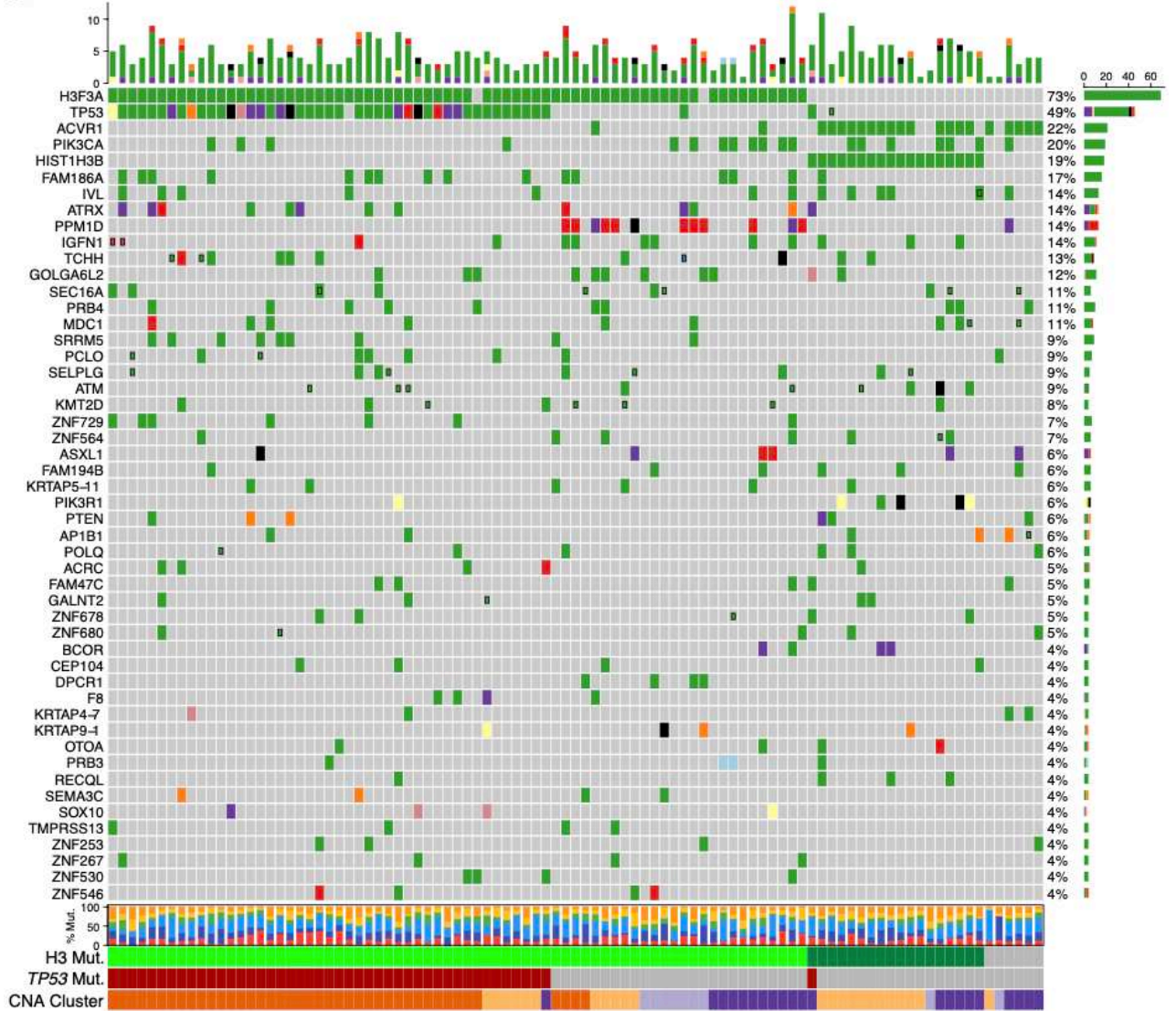
À ce jour, il n'existe pas de données concernant le profil mutationnel des DMG H3K27M adultes sur des cohortes importantes.

Altérations récurrentes associées à H3.1K27M ou une surexpression de EZHIP

Dans la population pédiatrique, la mutation H3.1K27M est dans 78% des cas associée à une mutation du récepteur de l'activine A de type 1 (ACVR1) (Fig. 6A) (Taylor et al., 2014; Kergrohen et al., 2021). ACVR1 est un membre de la voie de signalisation du TGF β et est impliqué dans de multiples processus biologiques dont la régulation du SNC (Valer et al., 2019). ACVR1 est très fréquemment muté dans les DMG H3WT avec une surexpression de EZHIP (14/19) (Fig. 6A) (Castel et al., 2020; Kergrohen et al., 2021).

Parmi la voie PI3K-AKT-MTOR, comme décrit précédemment, la mutation de *PIK3R1* ou *PIK3CA* apparaît très souvent aussi avec la combinaison de mutations H3.1K27M et de *ACVR1* au sein des DMG. Il est possible aussi d'observer une association H3.1K27M-*ACVR1* et mutation de *ATM* au sein des DMG. La protéine ATM, codée par le gène *ATM* (ataxia telangiectasia mutated), est impliquée dans la réparation de l'ADN après coupure double brin en activant p53 (Choi and Cho, 2016).

A



Variant Classif.

- Frame_Shift_Ins
- In_Frame_Ins
- In_Frame_Del
- Missense_Mutation
- Multi_Hit
- Stop_Gain
- Stop_Lost
- Splice_Site
- Germline_Missense
- Germline_Stop_Gain
- Germline_Frameshift

Histone Mut.

- H3.1-K27M
- H3.3-K27M
- WT

TP53 Mut.

- YES
- NO

CNA Cluster

- 1
- 2
- 3
- 4

SNV Class

- C>T
- C>G
- C>A
- T>A
- T>C
- T>G

B

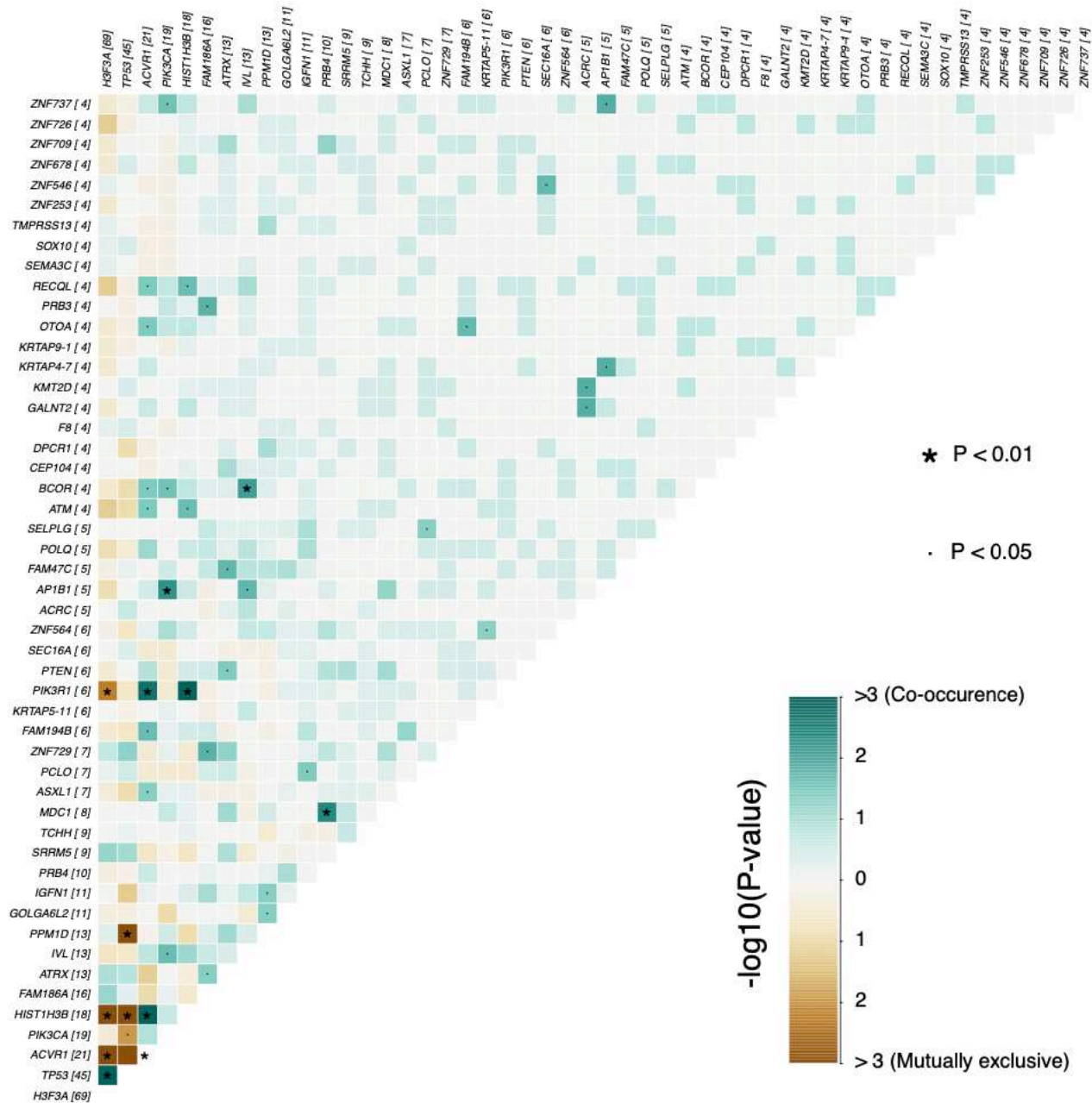


Figure 6 : Profil mutationnel des DIPG pédiatriques

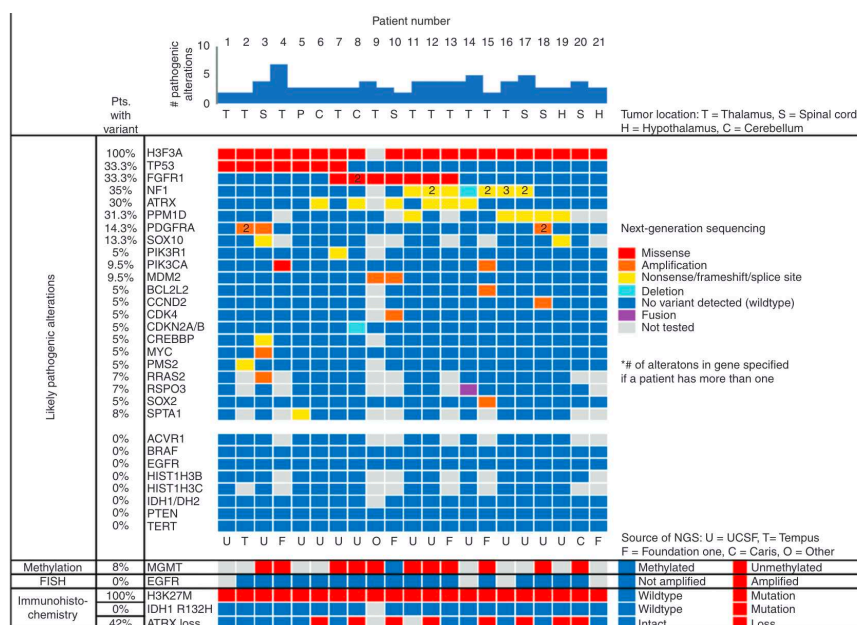
(A) Oncoplot des 50 gènes retrouvés le plus fréquemment mutés dans les DIPG pédiatriques issus de l'essai clinique BIOMEDE.1. Chaque colonne correspond à une tumeur et chaque ligne à un gène. Le diagramme en bâton horizontal au-dessus de l'oncoplot décrit le nombre d'altérations de la séquence codante somatique non synonyme par tumeur. Le second diagramme en bâton vertical à droite correspond à la fréquence d'altérations du gène au sein de la cohorte. Les tumeurs sont ordonnées selon le statut de l'histone H3 (*Kergrohen et al., 2021*). (B) Analyses statistiques de co-occurrences ou d'exclusivités mutuelles entre deux mutations parmi les 50 gènes retrouvés le plus fréquemment mutés dans les DIPG (tests exacts de Fisher par paires) (*Kergrohen et al., 2021*).

Dans la population adulte, à ce jour, il y a eu un seul patient adulte qui a développé un DMG H3.1K27M dont le profil mutationnel est inaccessible (*Schulte et al., 2020*).

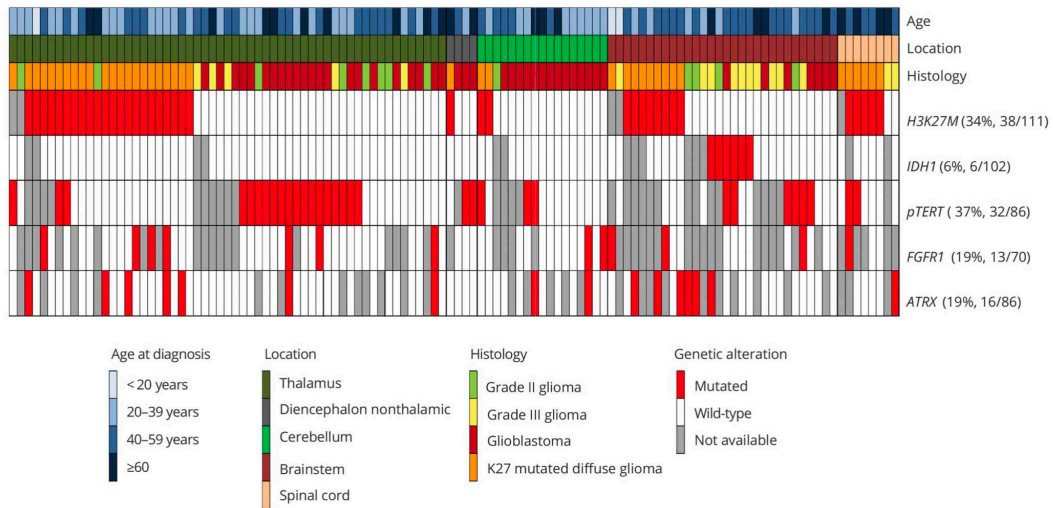
Altérations récurrentes associées à H3.3K27M au sein de DMG

Parmi les cas pédiatriques, presque deux tiers des gliomes H3.3K27M sont mutés *TP53* (Fig. 6A,B) (Kergrohen et al., 2021). *TP53* est un gène suppresseur de tumeur codant pour le facteur de transcription nucléaire p53 impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose, mort programmée cellulaire (Oren and Rotter, 2010). *TP53* est retrouvé muté dans plus de 50% des cancers quel que soit le type tumoral mais les DMG H3.1K27M ne présentent que très rarement une mutation de *TP53* (moins de 6%) (Fig. 6A,B) (Soussi et al., 2006; Olivier, Hollstein and Hainaut, 2010; Kergrohen et al., 2021). *ATRX* est souvent retrouvé muté avec *TP53* (10/14) au sein de gliomes H3.3K27M. À l'opposé, H3.3K27M est très peu associé à des mutations dans *HIST1H3B* (0/19) ou *ACVR1* (2/22). *PDGFRA* est très souvent retrouvé surexprimé dans les DMG H3.3K27M par amplification génique ou gain chromosomique (Castel et al., 2015). Il peut aussi être activé par mutations (Puget et al., 2012; Paugh et al., 2013). *PDGFRA* code pour le récepteur aux facteurs de croissances dérivés des plaquettes alpha (PDGFR α pour Platelet-derived growth factor alpha) qui est aussi impliqué dans le contrôle de la survie et prolifération cellulaire (Farooqi and Siddik, 2015). Parmi les cas adultes, il n'existe à ce jour aucune étude robuste exposant le profil mutationnel « classique » des DMG H3K27M adultes. Cela peut s'expliquer par deux problèmes majeurs : (i) la rareté de la pathologie chez l'adulte et (ii) le coût financier de l'étude pour un nombre important d'échantillons afin de pouvoir capter au maximum l'hétérogénéité s'il y en a une. En effet, les quelques études réalisées par la communauté scientifique étaient soit limitées par le nombre de patients adultes soit par l'absence de séquençages : WES ou séquençages ADN du génome entier (WGS pour whole genome sequencing) (Fig. 7, table 1 et 2) (Picca et al., 2018; Wang et al., 2018; Schulte et al., 2020; Zheng et al., 2022).

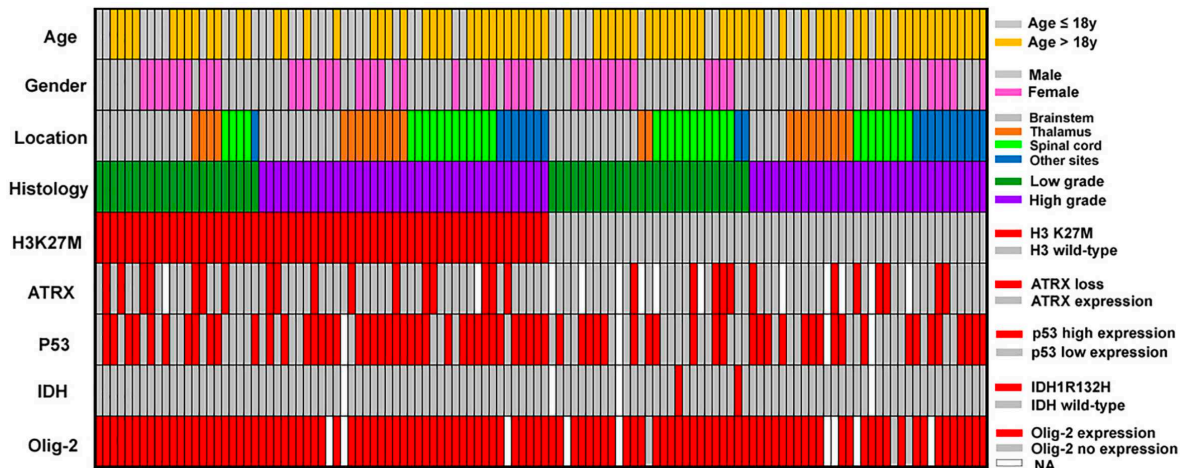
A



B



C



D



Figure 7 : État de l'art sur les études du profil mutationnel des DMG H3K27M adultes

Pour l'ensemble des oncoplots de la figure, chaque colonne représente le profil moléculaire d'une tumeur et chaque ligne représente un gène. Oncoplot des DMG H3K27M adultes issu de la publication (Schulte et al., 2020) (A). Oncoplots des gliomes diffus de la ligne médiane adultes comprenant des DMG

H3K27M adultes issus de (Picca et al., 2018) (B) ou de (Wang et al., 2008) (C). Oncoplot de DMG H3K27M pédiatriques et adultes issu de la publication (Zheng et al., 2022) (D).

	TP53					ATRX				
	Muté	Non muté	Total	% muté	Méthode	Muté	Non muté	Total	% muté	Méthode
Wang et al. 2018	40	21	61	65,6	IHC	17	44	61	27,9	IHC
Zhen et al. 2022	53	24	77	68,8	IHC	25	48	73	34,2	IHC
Picca et al. 2018	Non disponible					8	24	32	25	IHC
Schulte et al. 2020	7	13	20	35	Séquençage	6	14	20	30	Séquençage

Table 1 : Récapitulatif du nombre et pourcentage de patients adultes avec un DMG H3K27M muté TP53, ATRX.

	FGFR1					PPM1D				
	Muté	Non muté	Total	% muté	Méthode	Muté	Non muté	Total	% muté	Méthode
Wang et al. 2018	Non disponible									
Zhen et al. 2022	Non disponible									
Picca et al. 2018	6	17	23	35,3	Séquençage	Non disponible				
Schulte et al. 2020	7	13	20	35	Séquençage	5	10	15	33,5	Séquençage

Table 2 : Récapitulatif du nombre et pourcentage de patients adultes avec un DMG H3K27M muté FGFR1, PPM1D.

Les DMG H3K27M adultes semblent aussi être fréquemment mutés TP53 avec un pourcentage variant de 69 à 75% selon les études, plutôt équivalent par rapport aux DMG H3K27M (65%) pédiatriques à l'exception de l'étude Schulte et al. 2020 (Fig. 7) (Picca et al., 2018; Wang et al., 2018; Ebrahimi et al., 2019; Schulte et al., 2020). Il semble que le pourcentage d'occurrences de mutations ATRX soit plus élevé chez l'adulte, avec entre 25 à 40% selon les études chez l'adulte contre 14% chez l'enfant (Kergrohen et al., 2021). Cette observation est en corrélation avec l'étude de Khuong-Quang et al. 2012 qui a démontré que ATRX muté apparaissait plus souvent chez des sujets pédiatriques plus âgés, supérieurs à 10 ans. Picca et al. 2018 et Schulte et al. 2020 montrent que les DMG adultes sont fréquemment mutés (FGFR1 30-35%), ce qui est observé à 1% chez l'enfant dans le tronc (Kergrohen et al., 2021). FGFR1 code pour le récepteur 1 aux facteurs de croissance de fibroblastes (FGFR1 pour fibroblast growth factor receptor 1). FGFR1 est un membre de la voie MAPK (Mitogen-activated protein kinases) qui participe au contrôle de la survie et la prolifération cellulaire (Xie et al., 2020). Nous reviendrons sur FGFR1 dans la seconde partie de cette introduction. Schulte et al. 2020 ont souligné la fréquence mutationnelle élevée de PPM1D de 33,5%, il n'y a aucune autre étude chez l'adulte pour confirmer ce résultat. Chez l'enfant, nous avons vu que la fréquence est moins élevée (19%) (Kergrohen et al., 2021).

BRAFV600E, altération rare associée à H3.3K27M au sein de LGGs

La mutation H3K27M est retrouvée exclusivement dans une entité tumorale du SNC que sont les DMG comme nous l'avons vu jusqu'à présent. De manière surprenante, l'équipe de l'Hôpital Sainte-Anne a trouvé l'existence de 5 gangliogliomes pédiatriques de grade I et II (bénins) mutés H3.3K27M et BRAFV600E (Pagès *et al.*, 2018). La cooccurrence des deux mutations au sein des cellules tumorales à caractéristiques gliales et neuronales a été validée par immunofluorescence (IF) avec un double marquage anti-H3.3K27M et anti-BRAFV600E (Fig. 8). *BRAF* code pour la protéine BRAF, membre de la voie MAPK. BRAF sera plus détaillé aussi dans la seconde partie de l'introduction.

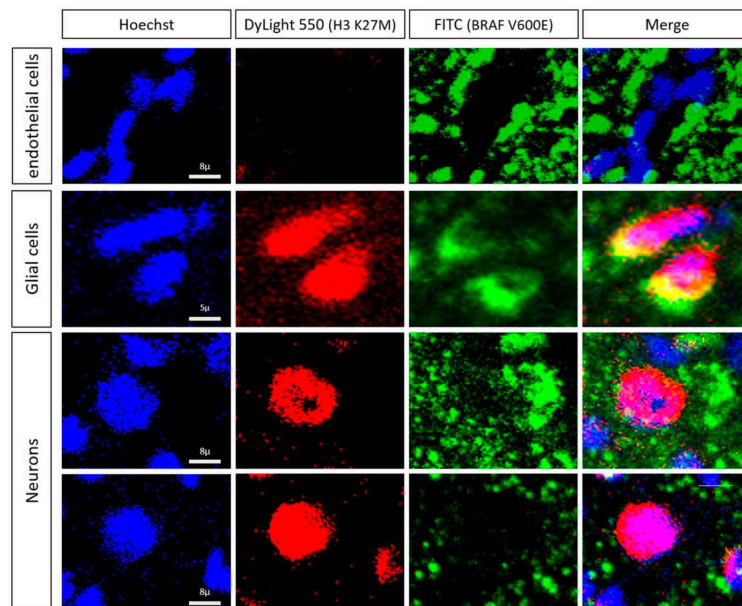


Figure 8 : Double marquage d'immunofluorescence H3K27M et BRAFV600E d'un gangliogliome pédiatrique de la ligne médiane de bas grade

Les cellules endothéliales de la première ligne constituent les contrôles négatifs des marquages H3K27M (rouge) et BRAFV600E (vert). Les cellules gliales (seconde ligne) sont positives aux deux marquages avec une colocalisation plutôt nucléaire. Les cellules neuronales sont aussi positives mais avec une colocalisation plutôt cytoplasmique. Il existe des neurones seulement marqués H3K27M. (Pagès *et al.*, 2018)

Transcriptome des DMG

En 2018, notre équipe a montré que le transcriptome des DMG était influencé par le statut mutationnel de l'histone (H3K27M *versus* H3WT *versus* H3G34R/V) plutôt que la localisation tumorale (pontique *versus* Thalamique *versus* Hémisphérique) par ACP (Fig. 9) (Castel *et al.*, 2018).

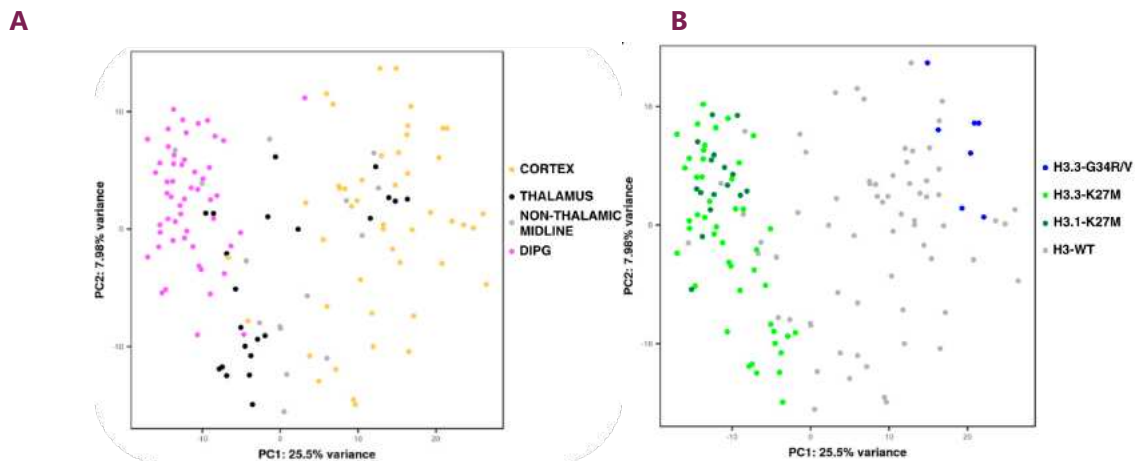


Figure 9 : Classification des HGGs selon le profil transcriptomique

ACP des HGGs selon le profil des 120 gènes les plus variants en fonction de la localisation tumorale (A) ou du statut H3 (B). L'étude du transcriptome a été réalisée à partir de micropuces. (Castel *et al.*, 2018).

La différenciation génomique que l'on observe jusqu'à présent entre DMG H3.1- *versus* H3.3K27M est aussi retrouvée au niveau du transcriptome. En effet en ACP, il y a une séparation selon le variant d'histone H3 muté en K27M à partir du profil des 250 gènes les plus variants (Fig. 10) (Castel *et al.*, 2018).

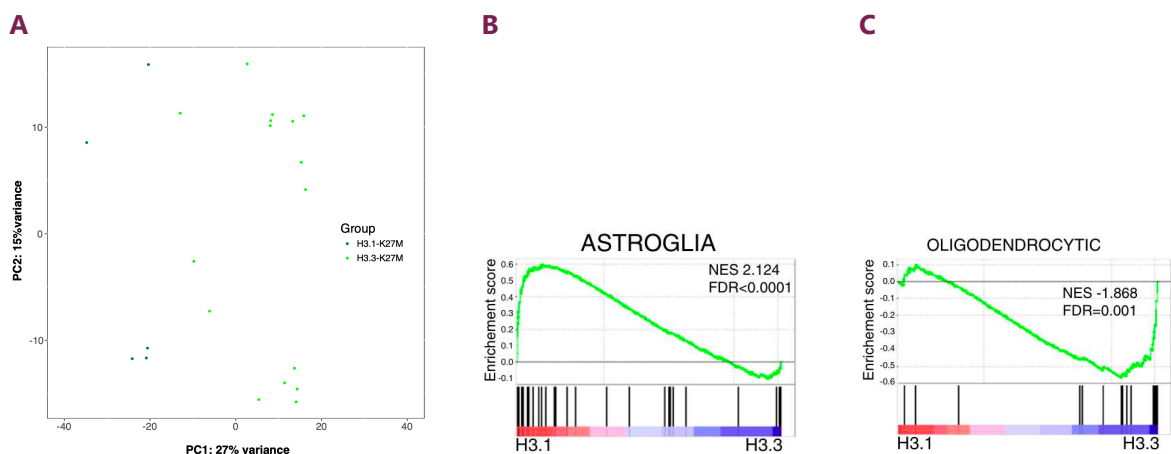


Figure 10 : Caractéristiques transcriptomiques des DMG H3.1- et H3.3K27M

(A) ACP des DMG H3.1- ou H3.3K27M selon le profil des 250 gènes les plus variants. (Castel *et al.*, 2018). Plots d'analyses GSEA issus d'un contraste DMG H3.1- *versus* H3.3K27M pour la signature astrogliale (B) ou oligodendrocytique (C). (Castel *et al.*, 2015).

Les analyses d'enrichissement en groupes de gènes (GSEA, Gene Set Enrichment Analysis) sont une méthode, plutôt robuste, pour interpréter le profil d'expression génique entre deux conditions à partir de listes de gènes impliqués dans des processus biologiques (Subramanian *et al.*, 2005). Les DMG H3.1K27M par rapport à ceux mutés H3.3 sont caractérisés par une signature génique astrogliale alors qu'inversement ceux mutés H3.3K27M par une signature oligodendrogliale (Fig. 10) (Castel *et al.*, 2015).

Pour récapituler, le profil moléculaire des DMG semble être hétérogène avec une forte divergence H3.1-*versus* H3.3K27M basée sur la distribution génomique de la marque H3K27me3, et les profils mutationnels, transcriptomiques et de méthylation de l'ADN. On observe aussi de l'hétérogénéité parmi les gliomes H3.3K27M avec une diversité d'associations mutationnelles plus importantes. Nous allons maintenant nous intéresser à l'impact de l'hétérogénéité moléculaire sur le plan clinique chez les patients atteints de DMG.

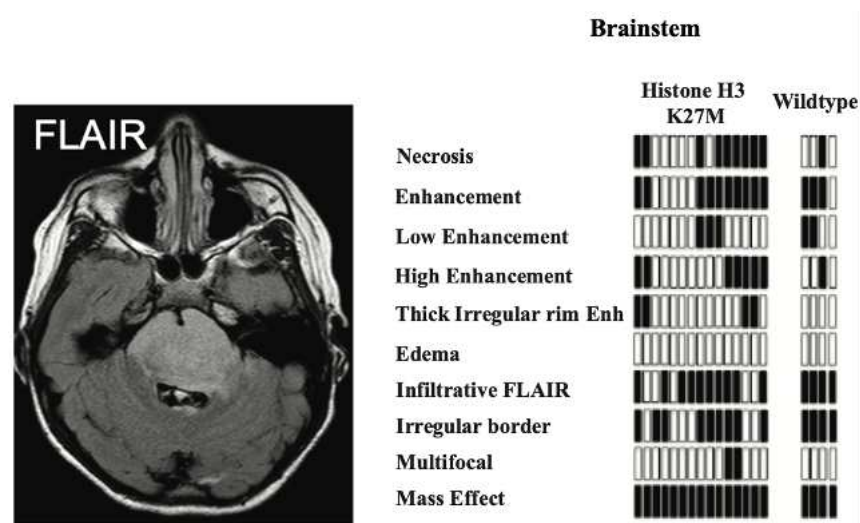
1.3. Portrait clinique hétérogène des patients avec DMG

Radiologie

À ce jour, les caractéristiques radiologiques d'un gliome diffus de la ligne médiane pédiatrique ou adulte permettent difficilement de déterminer s'il s'agit d'un DMG H3K27M ou d'un autre gliome H3K27WT d'où la nécessité de la biopsie comme décrit précédemment (Aboian *et al.*, 2017; Schulte *et al.*, 2020; Kathrani *et al.*, 2022; Khalid *et al.*, 2023). Une équipe de l'Université de San Francisco a étudié le portrait radiologique des DMG H3K27M dans un premier temps pédiatriques et ensuite adultes aux travers de deux études indépendantes (Aboian *et al.*, 2017; Schulte *et al.*, 2020).

Dans une population pédiatrique, le profil radiologique de gliomes diffus H3WT (négatif en IHC pour H3K27M) ou H3 muté dans le tronc, le thalamus, le cervelet et la moëlle épinière a été étudié (Aboian *et al.*, 2017). L'accès au statut H3K27 a été réalisé par IHC ce qui ne permet pas l'identification du variant d'histone muté. Aboian *et ses collègues* ont observé que les caractéristiques radiologiques étaient hétérogènes et ne permettent pas de prédire le statut H3 ou la survie (Fig. 11).

A



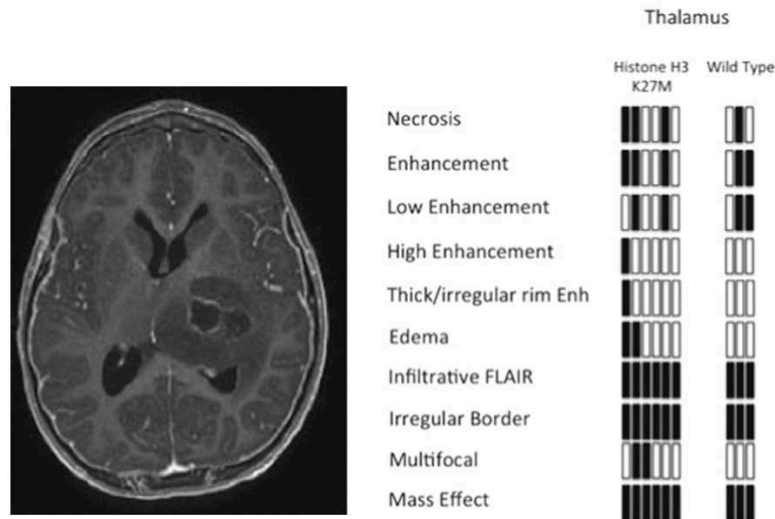
B

Figure 11 : Caractéristiques radiologiques des DMG H3K27M pédiatriques

(A) Séquence FLAIR d'un DMG H3K27M du tronc cérébral. Caractéristiques d'imageries de gliomes avec ou sans mutation de H3 pour la nécrose, les schémas de rehaussement, l'œdème et les caractéristiques d'infiltration. Les barres noires et les barres blanches représentent, respectivement la présence ou l'absence de la caractéristique. (B) Imagerie d'un DMG H3K27M du thalamus. Caractéristiques d'imagerie de gliomes avec ou sans mutations de H3 pour la nécrose, les schémas de rehaussement, l'œdème et les caractéristiques d'infiltration. Les barres noires et les barres blanches représentent respectivement la présence ou l'absence de la caractéristique. (Aboian *et al.*, 2017)

Dans la population adulte, l'équipe de San Francisco a conclu que les caractéristiques radiologiques étaient toujours hétérogènes d'un patient à l'autre avec aucune corrélation selon la survie ou la survie sans progression (Schulte *et al.*, 2020). De plus, ils considèrent qu'il n'y a pas de différence entre la radiologie pédiatrique *versus* adulte.

Localisation tumorale

Chez l'enfant, on observe une fréquence d'apparition plus élevée dans le tronc cérébral (77,8%), un peu moins élevée dans le thalamus (20,5%) et très rarement dans la moëlle épinière (1,7%) (Castel *et al.*, 2015). La localisation tumorale diffère aussi considérablement selon le variant d'histone muté, ce qui corréle avec les données moléculaires observées jusqu'à présent puisqu'en effet, les DMG H3.1K27M sont restrictifs au tronc cérébral contrairement aux DMG H3.3K27M que l'on retrouve sur l'ensemble de la ligne médiane (Fig. 12A).

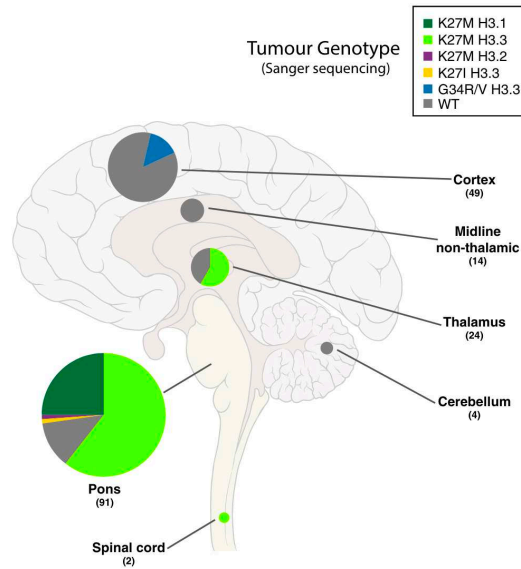
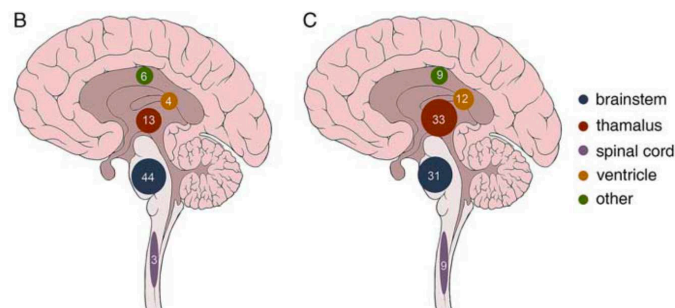
A**B**

Figure 12 : Localisations tumorales des DMG H3K27M pédiatriques et adultes

(A) Distribution de la localisation tumorale des HGGs selon le génotype tumoral dans la population pédiatrique. (Castel *et al.*, 2015). (B) Distribution de la localisation tumorale des DMG H3K27M pédiatriques (gauche) ou adultes (droite). (Zheng *et al.*, 2022).

Dans la population âgée de plus de 18 ans, la tendance est inversée. Les DMG se développent autant ou plus dans le thalamus que dans le tronc cérébral (Fig. 12B) (Zheng *et al.* 2022 ; Schulte *et al.* 2020 ; Picca *et al.* 2018) (Picca *et al.*, 2018; Schulte *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2022). La proportion de DMG localisés dans la moëlle épinière semble aussi être augmentée.

L'âge au diagnostic

Chez les enfants, l'âge au diagnostic varie en fonction du statut H3 (Fig. 13A) (Castel *et al.*, 2015, 2020; Mackay *et al.*, 2017). En effet, les patients atteints de DMG H3.1K27M ont un âge médian au diagnostic autour de 5,7 années contre respectivement 7,35 et 10,1 années pour les patients dont la tumeur est H3.3K27M ou H3WT avec une surexpression de *EZH1P*. Les patients avec DMG H3.3WT ont un âge médian équivalent à ceux mutés H3.3K27M pourtant leurs localisations sont principalement pontiques (Castel *et al.*, 2020).

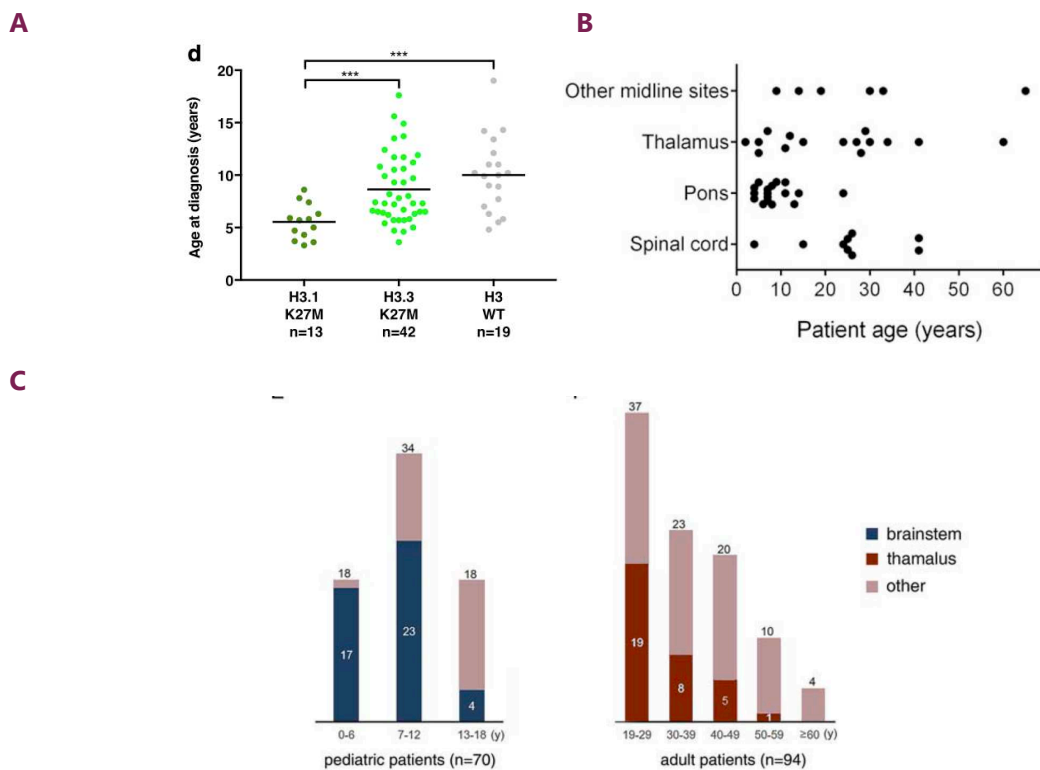


Figure 13 : Age au diagnostic des patients avec DMG H3K27M

Distribution de l'âge au diagnostic des patients pédiatriques avec DMG selon le statut d'histone (A) (Castel *et al.*, 2020) ou des patients tous âges confondus avec DMG selon la localisation tumorale (B) (Solomon *et al.*, 2016) (C) (Zheng *et al.*, 2022).

L'âge au diagnostic peut varier de 1 an à plus de 80 ans. Dans une population mixte pédiatrique-adulte, il semble que l'âge au diagnostic des patients avec gliomes H3.3K27M varie en fonction de la localisation tumorale, avec un âge médian dans le tronc de 7 années et dans le thalamus de 24 ans et la moëlle épinière de 25 ans (Fig. 13B) (Solomon *et al.*, 2016). L'âge médian chez l'adulte varie entre 32 et 33 ans en fonction des études (Fig. 13C) (Picca *et al.*, 2018; Schulte *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2022).

La survie

La survie post-diagnostic est très bien étudiée chez les patients de moins de 18 ans atteints de DMG et elle est aussi dépendante du statut H3 (Castel *et al.*, 2015, 2020; Mackay *et al.*, 2017). Les patients atteints de DMG avec l'histone muté H3.1 ou l'histone H3WT ont une meilleure survie (respectivement médiane : 15,1 et 15,9 mois) que ceux mutés H3.3K27M (médiane : 10,8 mois) (Fig. 14A) (Castel *et al.*, 2020). Le statut *TP53* peut être un marqueur pronostic (Werbrouck *et al.*, 2019). En effet, le statut du gène est un biomarqueur de la réponse clinique du patient à la radiothérapie. Les patients avec gliomes *TP53* mutés sont plus résistants à la radiothérapie que ceux non mutés p53 et ont donc une survie moindre (Fig.

14B). Les statuts d'histone et de *TP53* ont été validés comme marqueurs pronostics en analyses multivariées (Fig. 14C).

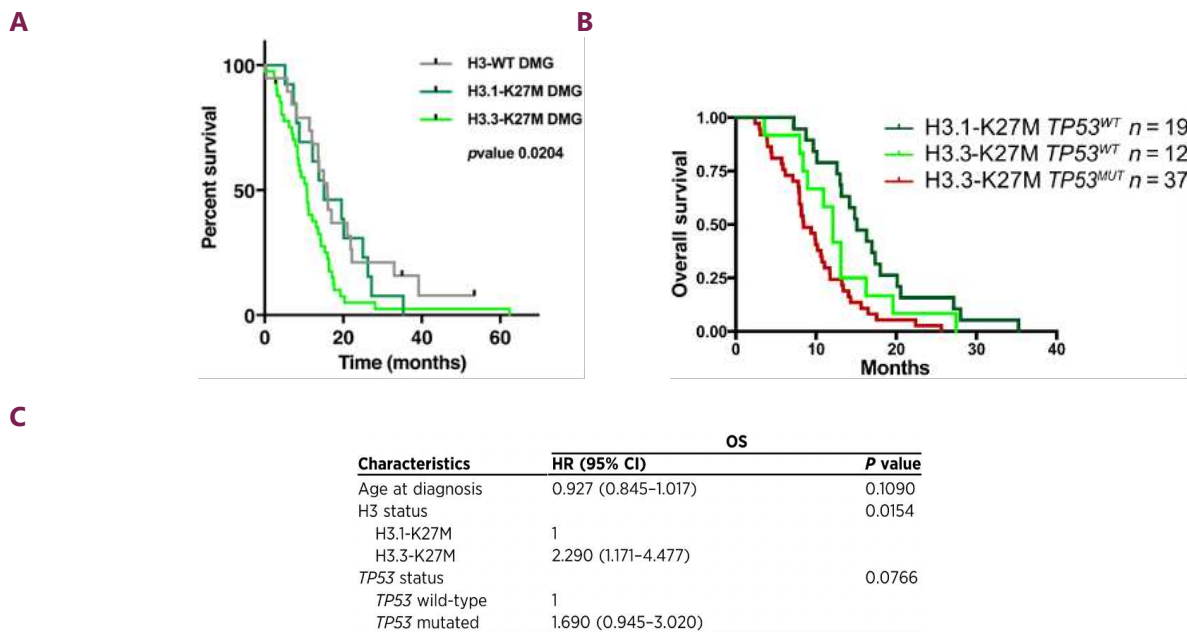


Figure 14 : La survie post-diagnostic chez l'enfant atteint d'un DMG

Analyse Kaplan-Meier de la survie post-diagnostic chez l'enfant selon le statut d'histone H3 (A) (Castel *et al.*, 2020) ou selon le statut d'histone et *TP53* (B) (Werbrouck *et al.*, 2019). (C) Modèle de régression multivariée à risques proportionnels de Cox (approche de Firth) pour la OS (Adaptée de (Werbrouck *et al.*, 2019)).

Dans la population adulte, la médiane de survie varie en fonction des différentes études de 13 à 28 mois, pas tout à fait équivalente à la survie chez l'enfant comprise entre 9 et 12 mois (Table. 3) (Castel *et al.*, 2015; Mackay *et al.*, 2017; Picca *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Schulte *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2022). Le statut *TP53* comme marqueur pronostic a été très peu étudié chez l'adulte. Lors d'une seule étude, Zheng *et al.* n'observent pas de différence significative de survie selon une accumulation supérieure ou inférieure à 30% de p53 en IHC (Zheng *et al.*, 2022). En effet, la protéine a une durée de demi-vie très faible et donc p53 est accumulée dans le noyau surtout en cas de mutations avec perte de fonctions. D'après Picca *et ses collègues*, *FGFR1*^{MUT} est un marqueur de bon pronostic pour les patients atteints de DMG H3WT /K27M dont 34% de la cohorte est muté H3K27M (Picca *et al.*, 2018). L'étude ne montre pas si le statut *FGFR1* est toujours un marqueur parmi une population avec 100% de DMG H3K27M. Cependant, ils ont aussi montré au sein de leur cohorte de DMG H3WT /K27M que le statut d'histone muté n'est pas un facteur pronostic chez l'adulte.

	Médiane de survie des patients avec DMG H3K27M (mois)		
	Pédiatrique	Adulte	Pédiatrique - adulte
Wang et al. 2018	13,5	13,1	13,1
Zheng et al. 2022	5	16	
Picca et al. 2018		23	
Schulte et al. 2020		28	

Table 3 : La survie post-diagnostic de DMG chez l'adulte

1.4. Classification des DMG en sous-groupes

Classification des tumeurs du SNC de l'OMS

En 1979, l'OMS publie, pour la première fois, une classification des tumeurs du SNC dans le but d'uniformiser le diagnostic dans le monde entier. Les deuxième et troisième classifications incorporent toujours plus les avancées scientifiques et technologiques dans le domaine.

En 2016 pour sa 4^{ème} édition, l'OMS ajoute, pour la première fois, une analyse moléculaire à la définition d'une tumeur du SNC, jusqu'à présent uniquement basée sur l'aspect histopathologique (*Louis et al., 2016*). C'est cette même année que l'entité tumorale « DMG H3K27M » est créée : gliome diffus de la ligne médiane avec une mutation H3K27M. Comme nous l'avons vu au cours de cette première partie de l'introduction, cette pathologie s'est révélée très hétérogène à la fois sur plan phénotypique et moléculaire.

En 2021 pour sa 5^{ème} édition, l'OMS ajoute un autre outil pour aider à une meilleure classification des tumeurs du SNC : le méthylome (*Louis et al., 2021*). Le méthylome consiste en l'ensemble des modifications de méthylation des guanines et cytosines au niveau des sites CpG de l'ADN d'un génome. Avec les avancées technologiques à hauts débits, il est maintenant possible d'avoir accès au méthylome soit du génome entier par séquençage au bisulfite ou alors à une partie du méthylome, par conversion au bisulfite, amplification et hybridation de l'ADN sur puces offrant une information pour un nombre conséquent d'îlots CpG (*Fig. 15*). La conversion au bisulfite est une étape qui permet de garder l'information de méthylation de la cytosine par conversion des cytosines non méthylés en uraciles. Le diagnostic devient très intégratif. Basé sur les propositions des scientifiques, l'OMS modifie l'entité : DMG H3K27-altéré (en anglais « DMG H3K27-altered ») (*Louis et al., 2021*). Cette nouvelle appellation permet d'intégrer les DMG avec une surexpression de *EZH1P*, qui induit une altération du paysage épigénétique en H3K27 comme les DMG avec une mutation de l'histone.

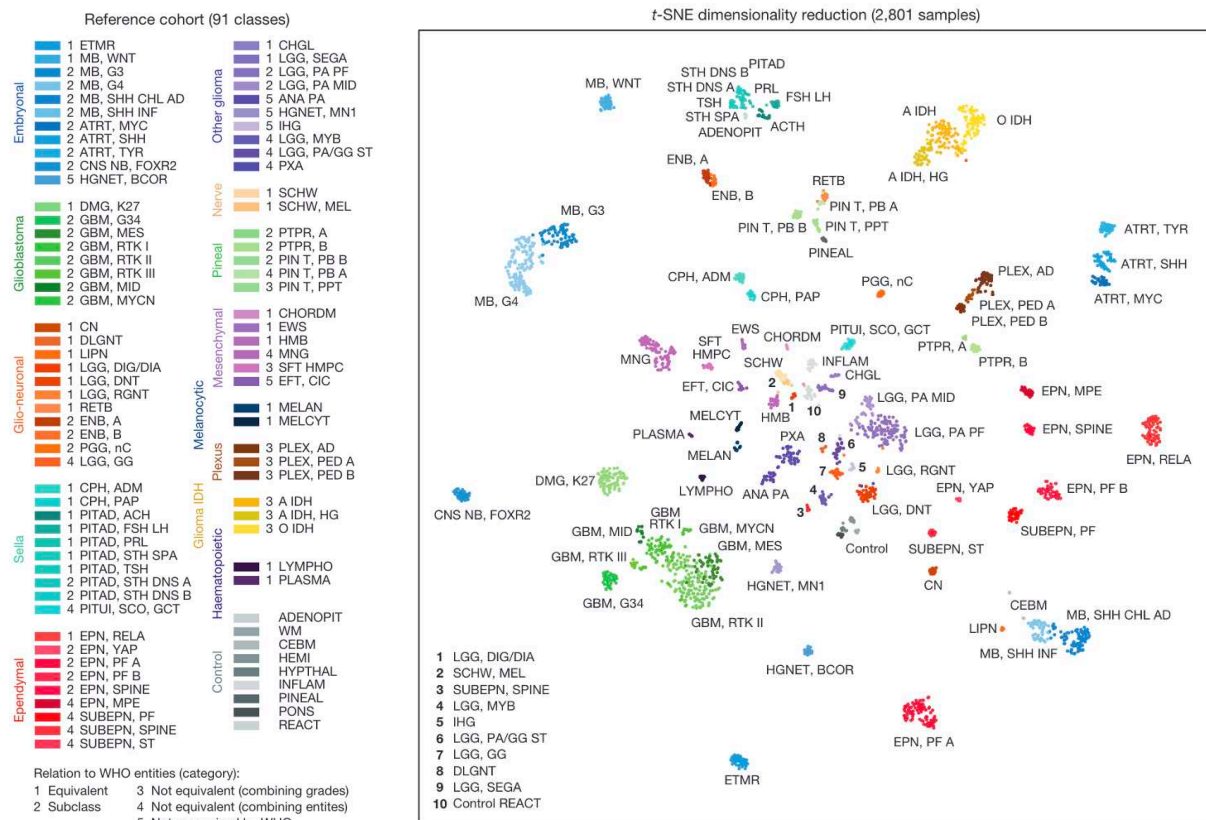


Figure 15 : Classification des tumeurs du SNC selon le profil de méthylation de l'ADN

Liste des 82 classes de méthylation de l'ADN des tumeurs du SNC et des neuf classes de méthylation des tissus témoins de la cohorte de référence par *Capper et al. 2018*. Les classes de méthylation de l'ADN sont regroupées selon histologie. Un code couleur est ensuite associé à chaque classe. L'ensemble des classes est catégorisé par rapport à la classification des SNC de l'OMS (WHO en anglais). Les classes de méthylation de l'ADN de catégorie 1 sont équivalentes à une entité OMS ; les classes de méthylation de catégorie 2 sont un sous-type d'une entité OMS ; les classes de méthylation de catégorie 3 ne sont pas équivalentes à une entité OMS unique mais avec une combinaison de grades OMS ; les classes de méthylation de catégorie 4 ne sont pas équivalentes à une entité unique de l'OMS mais avec une combinaison d'entités de l'OMS ; et les classes de méthylation de catégorie 5 ne sont pas reconnues comme une entité de l'OMS. Regroupement non supervisé de 2801 tumeurs du SNC selon le profil de méthylation de l'ADN à l'aide de la réduction de dimension t-SNE. Chaque point représente un échantillon individuel codé par la couleur de classe référencée à gauche. (*Capper et al., 2018*)

Plus précisément, le méthylome d'une cellule tumorale consiste en la combinaison du profil de méthylation de la cellule d'origine au moment de la transformation et le profil de méthylation induit par les mutations somatiques (*Fernandez et al. 2012*). En 2018, la révolution du diagnostic des tumeurs du SNC est enclenchée avec l'apparition d'une classification selon le profil de méthylation de l'ADN (*Capper et al., 2018*). En effet, *Capper et ses collègues* ont identifié de manière non-supervisée des profils de méthylations de l'ADN spécifiques à chaque entité tumorale du SNC permettant la prédiction de classes pour les nouveaux échantillons soumis à l'outil de classification (Fig. 15). Il s'agit d'un algorithme d'apprentissage profond par Forêt aléatoire (arbre de décision) qui classe le profil de méthylation de l'ADN d'une tumeur en fonction de sa similitude avec celui d'une entité connue sur une échelle de 0 à

1. Lorsque le score est insuffisant, inférieur à 0,9, cela peut signifier que le prélèvement est altéré, la population cellulaire est trop hétérogène (i.e. pas assez de cellules tumorales) ou alors qu'il s'agit d'une nouvelle entité tumorale. Dans ce dernier cas, il est nécessaire de projeter sur un plan les tumeurs de références et à classes indéterminées selon les sondes de méthylation de l'ADN les plus variables via une méthode réduction de dimension (tSNE pour t-distributed stochastic neighbor embedding). Cela permet d'observer comment les tumeurs à classes indéterminées se positionnent par rapport aux tumeurs de référence. *Capper et al.* ont comparé les classes tumorales révélées par le profil de méthylation de l'ADN avec le classement des tumeurs du SNC de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), qui est mis à jour régulièrement selon les avancées scientifiques. Ils ont rangé les classes de méthylation en 5 catégories. La catégorie 1 contenait 29 classes de méthylations qui sont équivalentes à une entité décrite par l'OMS. 29 classes de méthylations correspondant à des sous-entités tumorales de l'OMS ont formé la catégorie 2. La catégorie 3 comprenait 8 classes de méthylation qui n'ont pas une entité unique équivalente dans la classification de l'OMS mais oscille entre plusieurs grades. Ensuite, la catégorie 4 a contenu 11 classes de méthylation correspondant à plusieurs entités de l'OMS et pour terminer, la catégorie 5 comprend toutes 5 dernières classes de méthylations qui ne sont comparables à aucune entité de l'OMS. Cette classification est dynamique et évolue à mesure que la bibliothèque de tumeurs du SNC s'élargit, de la description de nouvelles entités par la communauté scientifique et de la classification de l'OMS. En effet, la classification des tumeurs du SNC de l'OMS a évolué en conséquence et c'est ce que nous allons voir par la suite.

Récapitulatif des différences cliniques et moléculaires entres DMG H3WT, H3.1 et H3.3K27M

Au cours des dernières années, la communauté scientifique a ainsi mis en lumière une hétérogénéité significative sur le plan clinique et moléculaire parmi les DMG H3K27M. En effet, il semble se dessiner 3 sous-types : H3.1-, H3.3- et H3WT basés sur 3 programmes oncogéniques différents (Table. 4).

Sous-groupe	H3.1K27M	H3.3K27M	H3WT
Altérations récurrentes	Mutation <i>ACVR1</i> Gain Chr 1q Gain Chr 2	Mutations <i>TP53, ATRX</i> Ampli. <i>PDGFRA</i>	Mutation <i>ACVR1</i>
Signature transcriptionnelle	Astrocytaire	Oligodendrogliale	n.a.
Localisation tumorale	Tronc cérébral	Ligne médiane	Ligne médiane
Age au diagnostic	5,7 ans	7,35 ans	10,1 ans
Médiane de survie	15,1 mois	10,8 mois	15,9 mois

Table 4 : Différences phénotypiques et moléculaires entres DMG H3WT, H3.1 et H3.3K27M pédiatriques (Castel *et al.*, 2015, 2020; Cohen, Jabado and Grill, 2017)

Validation de la classification des DMG en sous-groupe selon le méthylome

Début 2020, notre équipe étudie le profil de méthylation de l'ADN des DMG afin de valider la classification en 3 sous-types préalablement identifiés sur des caractéristiques phénotypiques et moléculaires divergentes (Fig.16) (Castel *et al.*, 2020). En effet en tSNE, on observe un regroupement en fonction du profil de méthylation de l'ADN des tumeurs selon le statut mutationnel, validant la classification en 3 sous-types. Ceci a été validé avec de récents travaux (Ajuyah *et al.*, 2023). Ces différences de profils de méthylation s'expliquent possiblement par un état /cellule d'origine différente entre les sous-types.

Début 2021, Sievers *et ses collègues* mettent en évidence un quatrième sous-type de DMG, en suivant des travaux précurseurs de Mondal *et al.* 2020 (Table 5) (Mondal *et al.*, 2020; Sievers *et al.*, 2021). Ces tumeurs sont aussi caractérisées par une perte de triméthylation en H3K27, en conséquence de la mutation H3.1-/H3.3K27M ou de la surexpression de *EZH1P*. De plus, ces DMG sont très souvent associés à une altération de *EGFR* (récepteur du facteur de croissance épithélial) (mutations ou amplifications) et présentent un profil de méthylation de l'ADN propre (indépendamment du statut d'histone) (Fig.16). Les caractéristiques cliniques des patients divergent peu. La pathologie semble se développer davantage chez l'enfant que chez l'adulte et la survie médiane ne diffère pas significativement par rapport à celle des DMG H3K27M d'après les auteurs de l'étude. La majeure différence phénotypique est un développement tumoral majoritairement dans le thalamus.

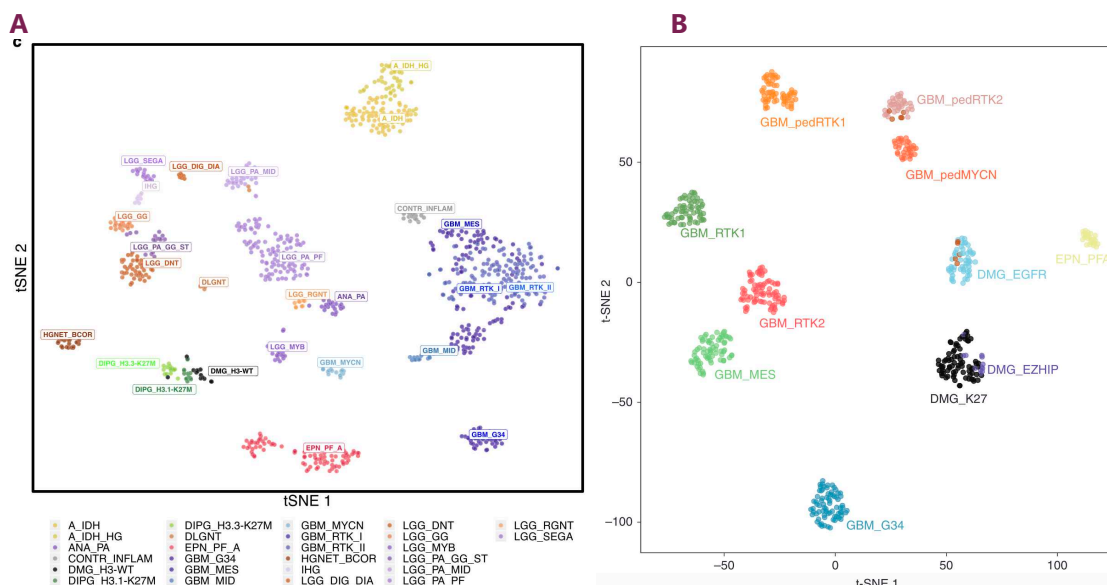


Figure 16 : Classification des types et sous-types tumoraux du SNC selon le profil de méthylation de l'ADN

(A) Analyse tSNE du profil de méthylation de l'ADN de tumeurs du SNC provenant de plusieurs études Capper *et al.* 2018, Castel *et al.* 2018 et 2020. Le profil de méthylation est basé sur les sites les plus

différentiellement méthylés ($SD > 0.25$) au sein d'une cohorte de référence. (Castel *et al.*, 2020). (B) Deuxième analyse tSNE du profil de méthylation de l'ADN de 58 gliomes issue de Sievers *et al.* 2020 impliquant aussi des gliomes de Mondal *et al.* 2020. (Sievers *et al.*, 2021).

Sous-groupe	H3.1K27M	H3.3K27M	H3WT	EGFR
Altérations récurrentes	Mutations <i>ACVR1</i> Gain Chr 1q Gain Chr 2	Mutations <i>TP53</i> , <i>ATRX</i> Ampli. <i>PDGFRA</i>	Mutations <i>ACVR1</i>	Mutations ou amplification de <i>EGFR</i>
Signature transcriptionnelle	Astrocytaire	Oligodendrogliale	n.a.	n.a.
Localisation tumorale	Tronc cérébral	Ligne médiane	Ligne médiane	Thalamus
Age au diagnostic	5,7 ans	7,35 ans	10,1 ans	8,2 ans (range : 1-43 ans)
Médiane de survie	15,1 mois	10,8 mois	15,9 mois	Entre 12-16 mois*

Table 5 : Récapitulatif des caractéristiques moléculaires et cliniques des sous-groupes de DMG H3K27M

* La médiane exacte n'est pas disponible dans la publication (Sievers *et al.*, 2021).

L'amélioration du diagnostic des tumeurs du SNC est maintenant un processus intégratif comprenant : la radiologie, l'histopathologie, le profil moléculaire et le profil de méthylation de l'ADN de la tumeur du patient. Ce diagnostic intégratif est essentiel : (i) pour une meilleure prise en charge du patient (ii) et une meilleure classification des tumeurs pour l'identification de traitements lors des essais cliniques. Une bonne classification tumorale est autant importante pour le patient que pour le chercheur. En effet, les modèles dérivés d'une entité tumorale ou sous-entité seront biologiquement plus homogènes et informatifs que ceux d'une entité mal caractérisée.

1.5. Modèles *in-vitro* & *in-vivo* de DMG

La modélisation pré-clinique est indispensable à l'étude des mécanismes biologiques et à la prédiction de la réponse ou résistance à un traitement. Cette modélisation doit récapituler au plus près la biologie de la tumeur primaire dont elle est dérivée. Des modèles d'étude peuvent être générés à partir des cellules tumorales de patients sans transformation génétique spécifique ou en modifiant génétiquement des cellules tumorales ou non tumorales. Conscients de l'importance du contexte cellulaire pour l'oncogenèse, il est préférable d'utiliser des cellules de patients à chaque fois que c'est possible.

Modélisation *in-vitro* de LGGs

À ce jour, il n'y pas de protocole standard et de lignées standards 2D de gliomes de bas grades (LGG pour en anglais low grade gliomas) comme l'on retrouve dans la culture de HGGs. Nous rentrerons plus

en détail sur les caractéristiques moléculaires et les conséquences sur la modélisation *in-vitro* au cours de l'introduction. Ces dernières années, trois protocoles ont été publiés récemment afin d'obtenir quelques lignées de LGGs.

En 2017, *Selt et ses collègues* ont établi à long terme une lignée d'astrocytome pilocytique avec une fusion génique KIAA1549:BRF1 à partir d'une lignée à court terme dérivée de la tumeur primaire par ingénieries génétiques (*Selt et al., 2017*). En effet, ils ont transduit les cellules afin qu'elles expriment l'antigène grand T du virus Simian vacuolant 40 (SV40-TAG) qui agit comme un inhibiteur de TP53/CDKN1A et CDKN2A/RB1. Ces deux voies, impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, sont réprimées ; les cellules tumorales prolifèrent mais cela altère la biologie de la cellule.

En 2021, *Yuan et son équipe* proposent un mode de culture basé sur le reconditionnement de milieu par fibroblastes associé à un inhibiteur Rock anti-apoptotique pour l'établissement de cultures de LGGs (*Yuan et al., 2021*). Ce protocole ne fonctionne pas toujours pour l'établissement de tous les LGGs.

En 2022, une équipe de l'Université du Texas décrit l'établissement de modèles 3D- organoïdes de gliomes de bas grade dérivés de tumeurs primaires (*Abdullah et al., 2022*). Leur protocole est basé sur celui de *Jacob et al.*, développé pour la culture d'organoïdes de HGGs, consistant à la mise en culture directe d'un morceau entier d'une biopsie fraîche (*Jacob et al., 2020*). L'optimisation du protocole par l'équipe du Texas est la culture en hypoxie à 5% d'oxygène, qui est en réalité le niveau physiologique des tissus cérébraux (*Carreau et al., 2011*). Les organoïdes semblent récapituler les caractéristiques des tumeurs parentales sont cultivables pour plusieurs mois et peuvent être congelés (*Abdullah et al., 2022*). Ils ont réussi à établir principalement des LGGs IDH-mutant et un astrocytome avec une mutation V600E de *BRF1* de grade I. L'hypoxie et/ou la présence d'un microenvironnement spécifique pour le développement de modèles *in-vitro* de LGG semblent être la/les clés. Il ne faut pas oublier que ces tumeurs sont bénignes chez le patient et occasionnent peu le décès. Pour rappel, un niveau trop élevé d'oxygène par rapport au niveau physiologique (4 à 14% selon les organes chez l'humain) dans l'environnement d'une cellule induit une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour reactive oxygen species) pouvant mener à un stress oxydatif chez la cellule (*Jagannathan, Cuddapah and Costa, 2016*). En effet, une quantité de ROS intracellulaire trop élevée peut occasionner des dommages cellulaires comme des altérations de l'ADN et /ou de la conformation protéique ; de l'inflammation et de la sénescence. La sénescence est un arrêt du cycle cellulaire physiologiquement irréversible. Cet état sera détaillé ultérieurement dans l'introduction.

Modélisation *in-vitro* de HGG

Les premiers modèles *in-vitro* endogènes de HGG ont été cultivés, en normoxie, en 2D supplémentés avec 10% de sérum, méthode standard pour la dérivation de beaucoup de cancers hors du SNC actuellement. En 2006, *Lee et ses collègues* montrent que ce mode de culture ne récapitule que très peu la tumeur parentale et n'est pas stable dans le temps (*Lee et al., 2006*). De plus, les cellules tumorales cultivées en sérum acquièrent dans le temps des altérations génétiques non présentes dans la tumeur parentale. Cette même équipe a dérivé des HGGs dans les mêmes conditions de cultures utilisées pour les cellules souches neurales (NSC) à cette période permettant la multiplication sans différenciation cellulaire. Le milieu se compose d'un milieu souche (Neurobasal) supplémenté avec les facteurs EGF et FGF. Les flasques sont, au préalable, recouvertes de laminine, composante de la matrice extracellulaire favorisant l'adhérence des cellules au support plastique. Ces conditions permettent aux modèles de récapituler la tumeur à la fois sur le plan génétique, transcriptomique et histologique. La culture en normoxie, 2D et en condition souche neurale est, actuellement, devenue la méthode de culture standard 2D pour les lignées cellulaires dérivées de HGGs et DMG dans notre équipe. Cependant, la diversité clonale semble se limiter au cours des passages (*Ledur et al., 2017*).

La culture 3D en tumoroïde se développe fortement en parallèle et est indispensable pour répondre à des questions biologiques comme l'invasion /migration tumorale. Cette méthode récapitule davantage l'hétérogénéité tumorale *in-vitro* par rapport au 2D. La culture 3D permet le maintien à la fois des cellules souches tumorales et des cellules souches tumorales en différenciation /différenciées qui ne sont pas maintenues en 2D à cause des conditions de cultures souches et permet aussi l'étude des interactions cellules-cellules (*Linkous et al., 2019; Riedel et al., 2022*). Le désavantage est la complexité technique du modèle par rapport à la 2D mais celui-ci diminue avec l'optimisation du protocole. Ce modèle est limité pour des questions biologiques liées à l'impact du microenvironnement dans l'oncogenèse. Afin de modéliser et d'étudier le microenvironnement tumoral des DMG, notre équipe développe des organoïdes de cerveau dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) issues de la reprogrammation de fibroblastes des patients malades et les co-cultivent avec les cellules tumorales et les cellules immunitaires du patient, aussi issues de la reprogrammation des iPSC (*Pasqualini et al., 2020*).

Modèles *in-vivo* : xénogreffes orthotopiques dérivées de biopsies de patient (PDOX)

Les modèles de PDOX sont des modèles *in-vivo* où les cellules dissociées issues de biopsies tumorales sont transplantées dans une autre espèce comme la souris (xénogreffe) et injectées à l'endroit anatomique exacte où les cellules ont été prélevées (orthotopique) (*Fig.17*) (*Plessier et al., 2017*).

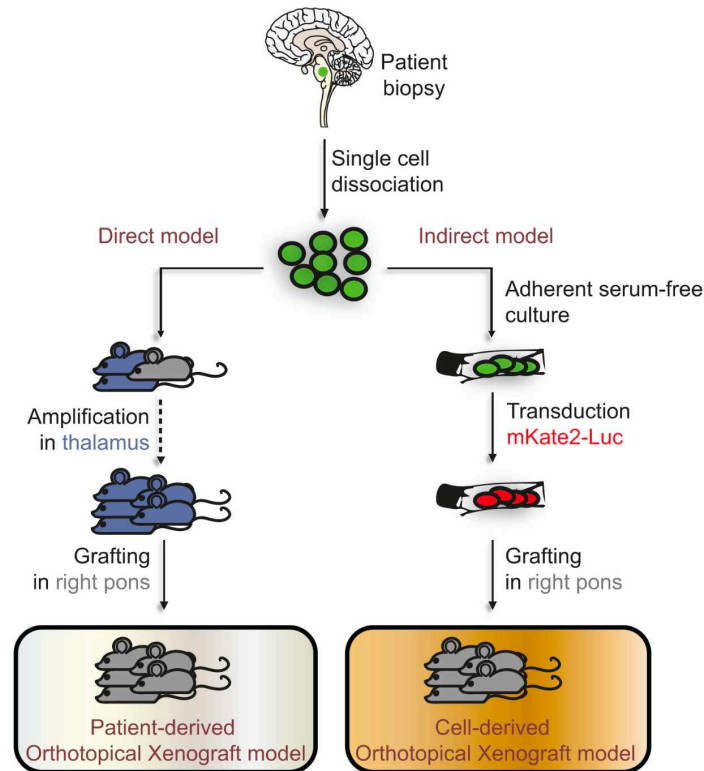


Figure 17 : Les modèles *in-vivo* directs et indirects de DMG H3K27-altérés

Le modèle de xélogreffe orthotopique dérivé de patient (PDOX) est un modèle dit « direct » sans étape intermédiaire : la biopsie est dissociée puis greffée successivement dans le tronc et/ou le thalamus. Le second modèle est dit « indirect » avec une étape de culture et de modification génétique. Après dissociation cellulaire, les cellules sont transduites afin d'exprimer la luciférase et la mKate2 pour un meilleur suivi tumoral, respectivement pendant et post-sacrifice de la souris. Les souris sont immunodéficientes. (Plessier *et al.*, 2017).

Au laboratoire, les souris utilisées pour le développement de PDOX de DMG sont des souris NMRI/Nudes, immunodéficientes athymiques. En 2017, l'équipe a montré que les PDOX récapitulent les caractéristiques tumorales majeures des DMG : infiltration, expression de marqueurs gliaux, perte globale de H3K27me3 (Plessier *et al.*, 2017). Cette approche directe de greffe post-biopsie n'est pas biaisée par une étape de culture et donc une potentielle perte d'hétérogénéité cellulaire par rapport à l'approche indirecte mais il n'y a pas de suivi de la croissance tumorale. Les souris sont sacrifiées en point final lors du développement de symptômes neuromoteurs (faiblesses dans les membres, tête inclinée, troubles des mouvements) associés ou non à une perte de poids.

Modèles *in-vivo* : xélogreffes orthotopiques dérivées de cellules (CDOX)

Le modèle CDOX comprend, avant greffe, une étape de culture en condition de cellules souches neurales afin de transduire les cellules afin qu'elles expriment la luciférase et la mKate2 (Fig. 17) (Plessier *et al.*, 2017). La luciférase est utilisée pour le suivi en temps réel de la croissance tumorale par bioluminescence ; et la mKate2 (protéine rouge fluorescente) pour marquer les cellules tumorales

humaines post-sacrifices des souris. Ce modèle est indispensable pour l'évaluation thérapeutique au préalablement validée *in-vitro*.

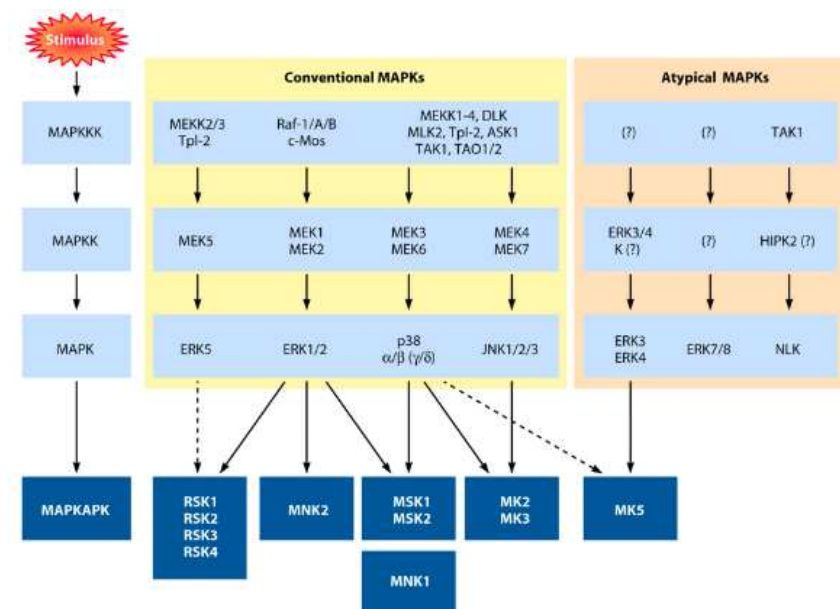
2. Les oncogènes BRAF et FGFR1

2.1. La voie MAPK

Généralités

La signalisation MAPK est impliquée dans le contrôle de la survie, la prolifération cellulaire, senescence, apoptose, migration par conversion de signaux extracellulaires en multiples réponses cellulaires. Nous reviendrons plus tardivement sur quelques réponses à la signalisation des MAPK. Comme le nom l'indique, les membres de la voie MAPK sont des protéines avec une activité kinase c'est-à-dire qui phosphorylent certains résidus sérines ou thréonines induisant généralement l'activation protéique. Le schéma classique d'activation en cascade de la signalisation cellulaire commence par (i) la fixation d'un ligand, souvent un facteur de croissance, à un récepteur (ii) qui active une MAPKKK (iii) qui phosphoryle et active MAPKK, (iv) qui à son tour phosphoryle et active une MAPK qui pour terminer (v) active diverses protéines dont principalement des facteurs de transcriptions (Fig. 18) (Cargnello and Roux, 2011).

A



B

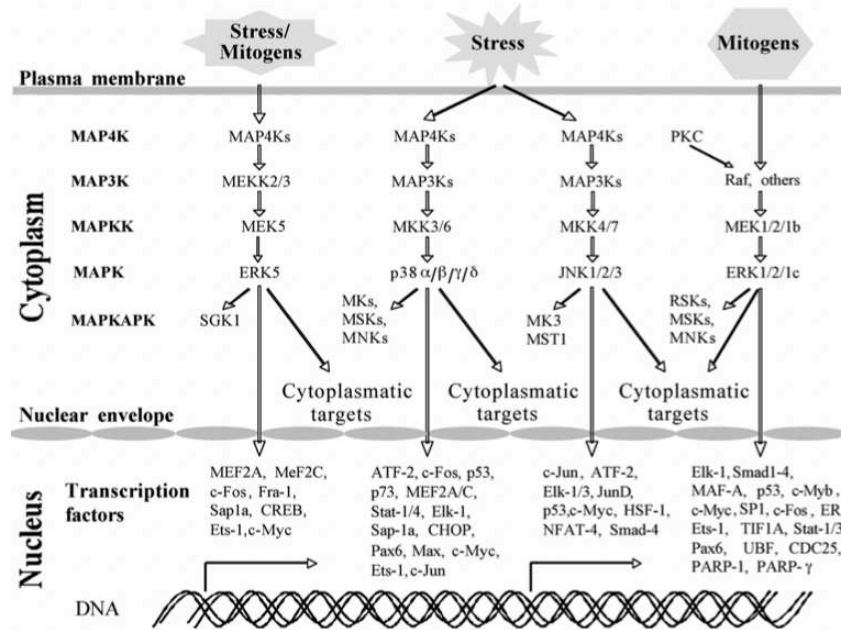


Figure 18 : Les membres de la signalisation MAPK

(A) Le schéma classique de la signalisation MAPK est l'activation d'une des voies par un stimuli extérieur qui va être transduit à l'intérieur de la cellule et va activer une cascade de kinases : MAPKKK active MAPKK qui ensuite active MAPK. La signalisation est séparée en deux groupes de voies : les conventionnelles et les non-conventionnelles. (Cargnello and Roux, 2011). (B) Schéma plus détaillé des membres des voies conventionnelles de la signalisation MAPK. (Plotnikov et al., 2011).

À noter, l'activation transcriptionnelle par la cascade d'activation en amont n'est pas la seule finalité. Au cours de la cascade, les protéines MAPK ont aussi des protéines cibles dans le cytoplasme. La signalisation MAPK est divisée en plusieurs voies : conventionnelles et atypiques (Cargnello and Roux, 2011). Il existe 4 voies conventionnelles impliquant chacune les MAPK suivantes : ERK5, ERK1/2, p38 et JNK1/2/3. Ces 4 voies ne sont pas redondantes et chacune n'est pas impliquée dans le contrôle de l'ensemble des fonctions cellulaires vues précédemment comme la prolifération ou l'apoptose. Il semble que les voies JNK et p38 soient davantage impliquées dans la réponse au stress et l'induction de l'apoptose (Xia et al., 1995; Roux and Blenis, 2004). Au contraire, la voie ERK1/2 est majoritairement impliquée dans la régulation de la prolifération mais peut aussi induire de la sénescence (Pearson and Pelicci, 2001). Les voies atypiques sont moins employées et en conséquence, beaucoup moins bien caractérisées. ERK3/4, ERK7/8 et NLK sont les MAPK des trois voies atypiques (Cargnello and Roux, 2011). Pour résumer, la signalisation MAPK comporte plusieurs voies avec chacune plusieurs membres formant un grand réseau.

La complexité de la voie provient aussi de l'existence d'un nombre élevé de diaphonies ou plus connu sous le nom de « crosstalk » en anglais. Un crosstalk existe lorsqu'un ou plusieurs membres d'une voie

influencent l'activité d'un ou plusieurs membres de cette même voie. Par exemple en 2004, *Liu et son équipe* ont été les premiers à démontrer l'existence d'un crosstalk indirect entre p38 et ERK1/2 (Fig. 19A) (*Liu and Hofmann, 2004; Grethe and Pörn-Ares, 2006*).

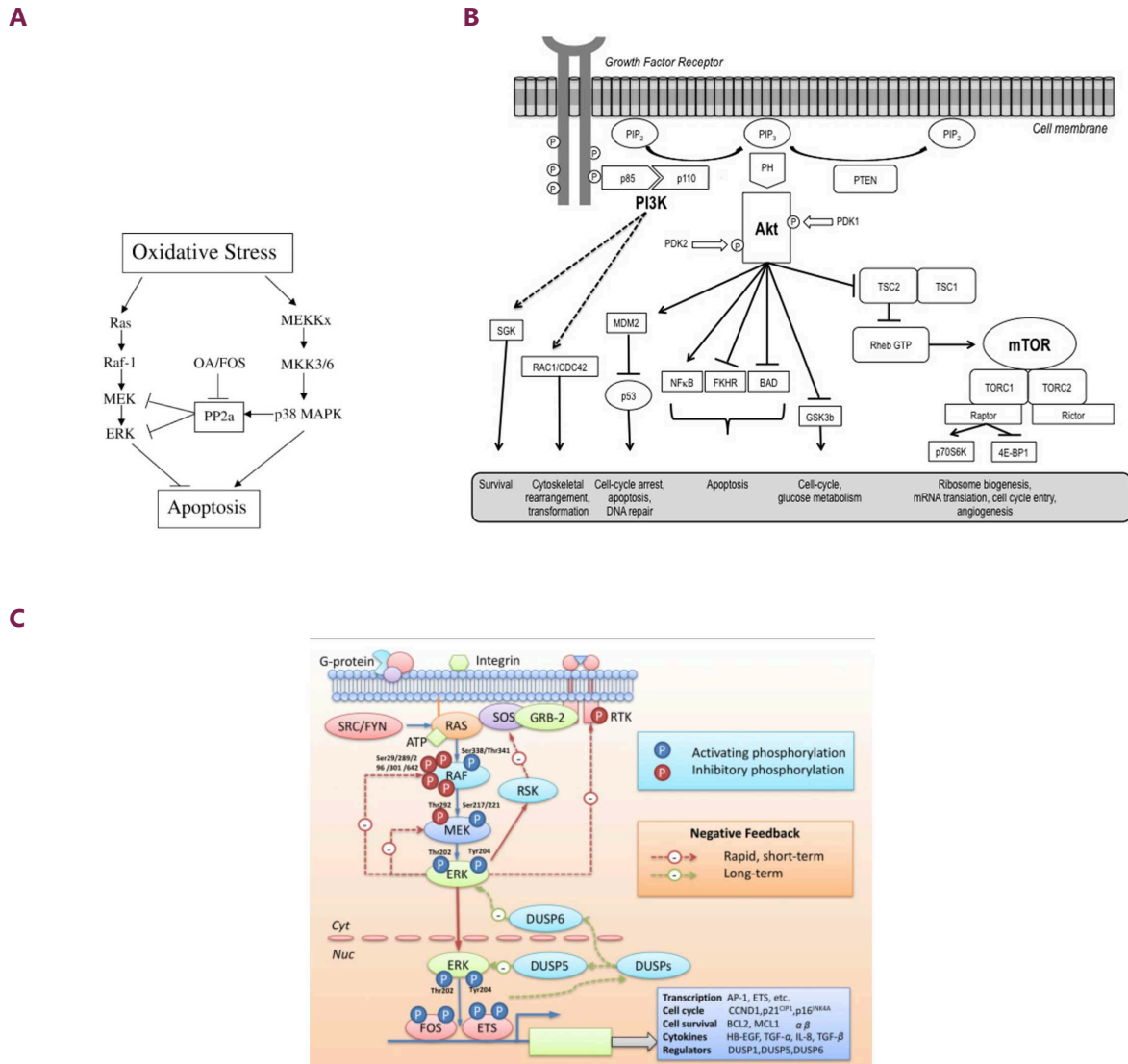


Figure 19: Cross-talks et rétro-inhibitions dans la signalisation MAPK

(A) Modèle de cross-talk indirect entre les MAPK p38 et ERK1/2. (*Liu and Hofmann, 2004*). (B) Schéma simplifié de la signalisation PI3K/AKT/mTOR (*Porta, Paglino and Mosca, 2014*). (C) Schéma simplifié des mécanismes de rétroinhibitions sur court et long termes de la signalisation MAPK – voie ERK1/2. (*Liu et al., 2018*).

En effet, en condition physiologique, la présence de mitogènes active la voie ERK1/2 et induit la prolifération. Lorsqu'un stress important apparaît, la voie p38 est activé ce qui induit (i) une inhibition de la prolifération par inhibition de ERK1/2 via la protéine phosphatase 2A (PP2A) et (ii) l'induction de l'apoptose. À plus large échelle, il existe aussi des crosstalks entre les signalisations : MAPK et PI3K/AKT/mTOR (schéma de la signalisation Fig.19B).

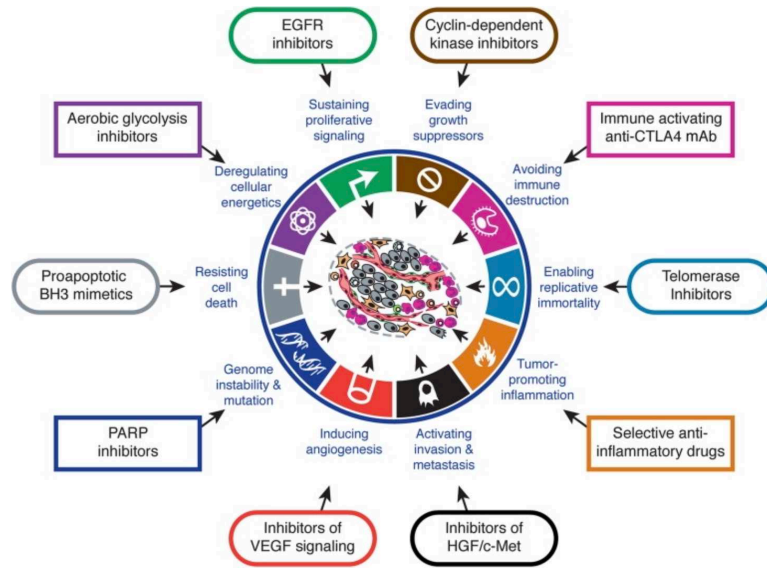
En 2010, une équipe de l'Université de médecine de Yamagata au Japon traite *in-vitro* des modèles de glioblastomes avec une combinaison de médicaments afin d'inhiber les deux signalisations. Ils ont observé une meilleure inhibition de la prolifération en combinant les deux médicaments qu'en monothérapie, avec une induction de la différenciation cellulaire et une perte de la tumorigénicité *in-vivo* (Sunayama et al., 2010). Ils ont étudié le mécanisme cellulaire à l'origine de cette synergie et ont découvert que l'activation de la signalisation MAPK réprime la signalisation PI3K/AKT/mTOR et inversement. Ce mécanisme n'est pas présent dans les LGGs avec une altération activatrice de *FGFR1* où il y a la fois une activation de la voie MAPK et PI3K/AKT/mTOR (Hütt-Cabezas et al., 2013; Ryall, Tabori and Hawkins, 2020). Ces deux exemples démontrent aussi un facteur dépendant du contexte cellulaire, augmentant la complexité de la voie MAPK.

Pour encore ajouter de la complexité à la signalisation MAPK, il existe un nombre conséquent de boucles de rétro-inhibitions. Les mécanismes peuvent être de diverses natures et peuvent être classifiés selon leurs impacts dans le temps : à court ou long terme. Les plus connus concernent la voie ERK1/2 (Fig. 19C) (Liu et al., 2018). Il existe des rétro-inhibitions à court terme donc directes entre membres de la voie : comme ERK inhibe MEK et RAF ; ou indirectes avec l'activation d'un inhibiteur de la voie : ERK active RSK qui inhibe SOS, composant essentiel à la transduction du signal extracellulaire. La boucle de rétro-inhibition à long terme implique les protéines DUSP, phosphatases agissant comme régulateurs négatifs de la voie MAPK. L'activation de la voie MAPK induit l'expression transcriptionnelle et protéique des DUSP.

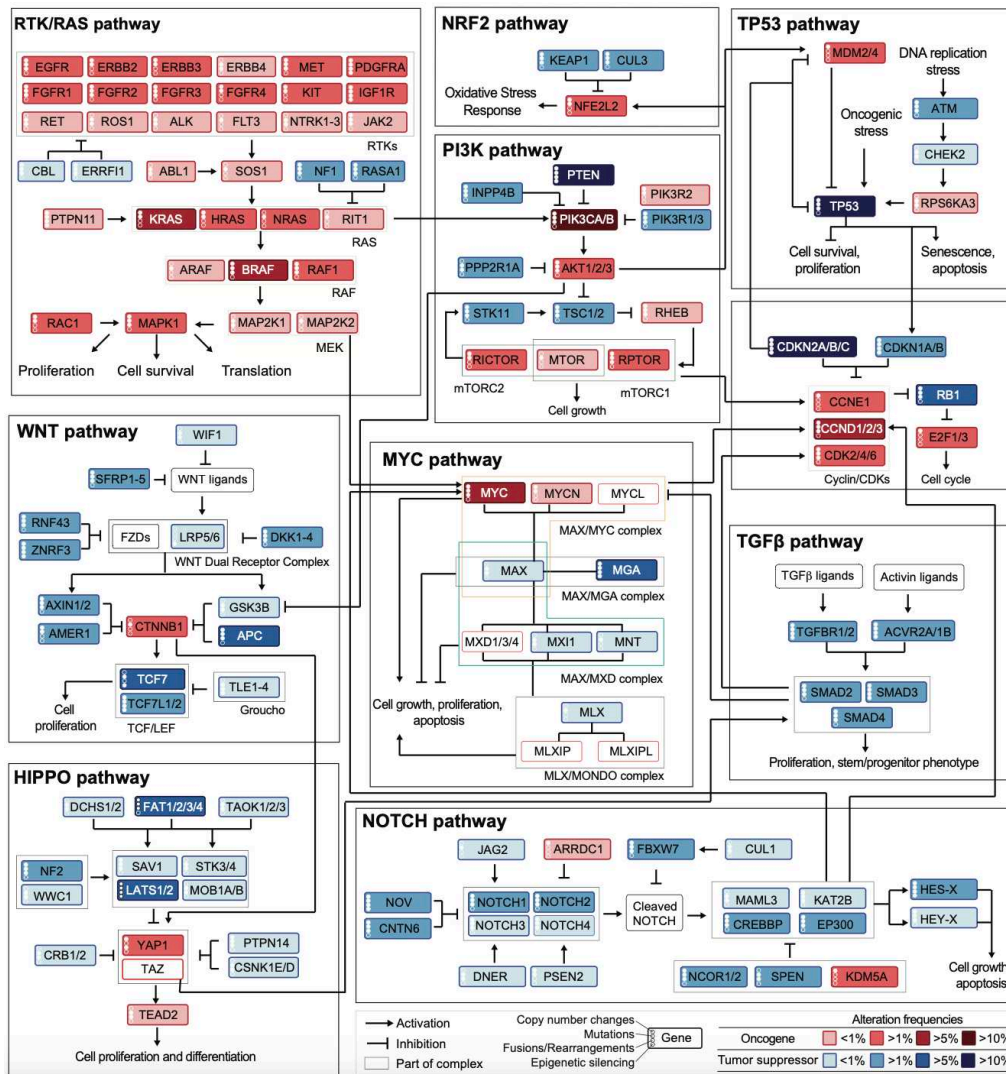
Activation de la voie MAPK, caractéristique majeure des cancers

En 2011, Hanahan et son collègue Weinberg présentent les 10 caractéristiques communes acquises au cours de l'oncogenèse de la plupart des cancers (Fig. 20A) (Hanahan and Weinberg, 2011). Ces caractéristiques ne sont pas toutes acquises au même moment et ne sont pas nécessaires à l'initiation de la tumorigenèse. La prolifération indépendante aux mitogènes est l'un des traits fondamentaux et arrive précocement contrairement à l'invasion et le développement métastatique qui arrivent beaucoup plus tardivement dans l'histoire tumorale.

A



B



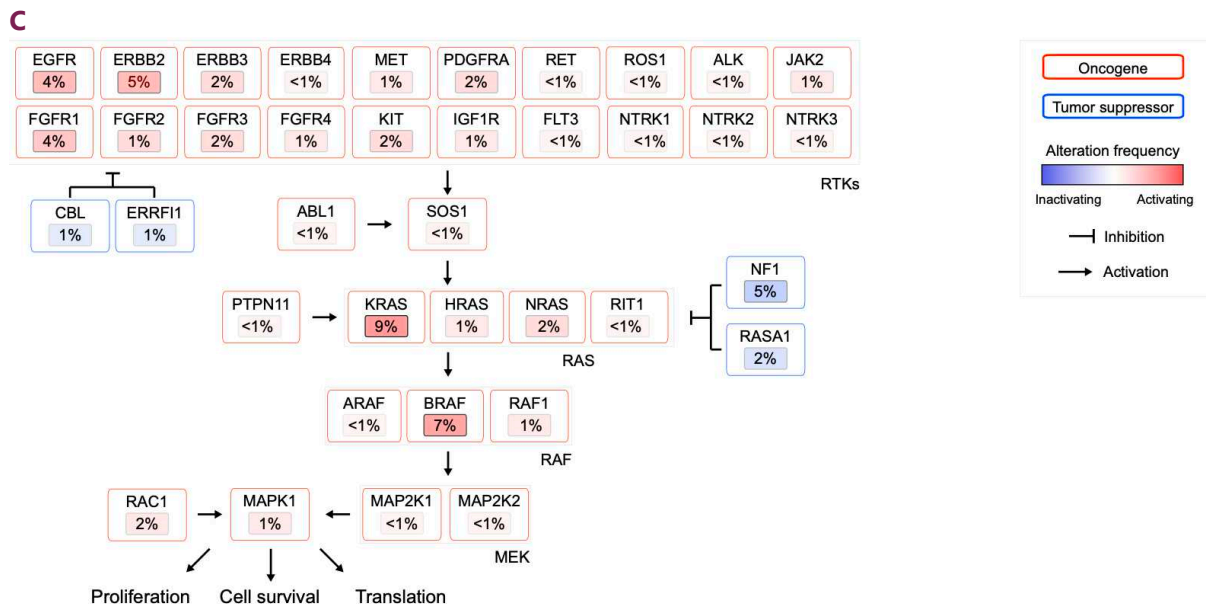


Figure 20 : Caractéristiques et altérations les plus fréquentes des cancers

(A) Schéma récapitulatif des caractéristiques générales des cancers acquises au cours de l'oncogenèse. (Hanahan and Weinberg, 2011). (B) Fréquence des altérations génétiques par signalisation cellulaire au sein des cancers issues de l'analyse du TCGA par Sanchez-Vega et al. 2018. (C) Zoom sur les altérations génétiques les plus fréquentes dans la signalisation MAPK. (Sanchez-Vega et al., 2018).

En 2006, le programme TCGA (en anglais the cancer genome atlas) naît de l'union de l'Institut National du Cancer et de l'Institut National de Recherche sur le génome humain dans le but de former un atlas de la génomique des cancers ouverts à toute la communauté scientifique. Cet atlas comprend plus de 20 000 tumeurs primaires issues de plus de 35 types tumoraux et peut comprendre un large panel de données : profil génétique, transcriptionnel, épigénétique ou protéique formant un outil très robuste (Tomczak, Czerwińska and Wiznerowicz, 2015). Récemment, Sanchez-Vega et ses collaborateurs ont étudié les altérations génétiques parmi 10 signalisations cellulaires au sein de plus de 33 cancers différents, regroupant plus de 9000 tumeurs (Sanchez-Vega et al., 2018). Les auteurs ont montré que la signalisation qui arborait le plus d'altérations est, sans surprise, la voie MAPK, touchant majoritairement des oncogènes (Fig. 20B). Plus précisément parmi les oncogènes, les 5 gènes que l'on retrouve les plus fréquemment altérés dans cette voie sont : *KRAS* (9%), *BRAF* (7%), *ERBB2* (5%), *FGFR1* (4%) et *EGFR* (4%).

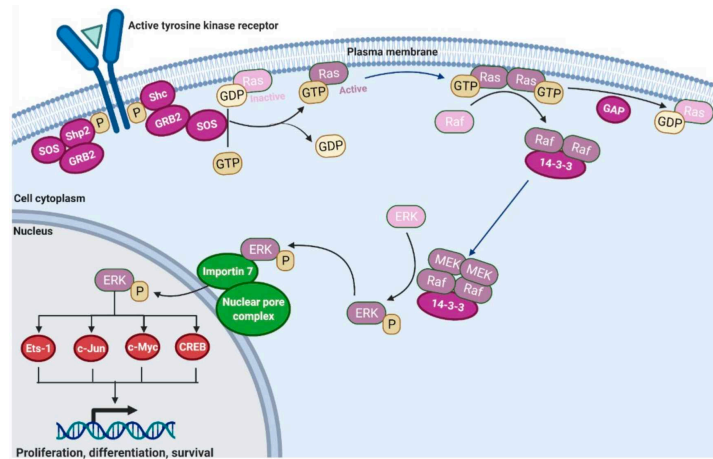
2.2. L'oncogène *BRAF*

Informations générales

BRAF (B-Raf proto-oncogène) est une sérine-thréonine kinase de 766 acides aminés (transcrit : ENST00000646891, sur le génome de référence humain GRCh38). Cette protéine est le second messenger de la voie MAPK-ERK1/2 et appartient à la famille RAF comprenant trois isoformes : ARAF, BRAF et CRAF

ou RAF1 (Fig. 21A). Le gène codant pour cette protéine est *BRAF* et est situé sur le chromosome 7 locus q34 (Fig. 21B).

A



B

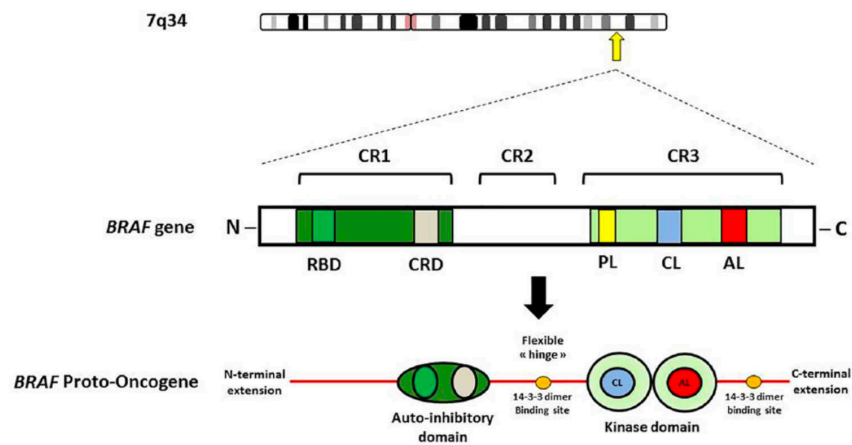


Figure 21 : Signalisation, structure et fonctionnement de BRAF

(A) Schématisation plus détaillée de la cascade signalétique MAPK-ERK1/2 : de la fixation du ligand sur le récepteur à la transcription de facteurs spécifiques. (Dillon *et al.*, 2021). (B) Structures et domaines fonctionnels de BRAF (AL, boucle d'activation ; CL, boucle catalytique ; CR, région conservée ; CRD, domaine riche en cystéines ; KD, domaine kinase ; P-L, boucle de liaison au phosphate ; RBD, domaine de liaison à RAS). (Durrant and Morrison, 2018).

Structure et fonctionnement de la protéine

Du côté N-terminal, BRAF est composé d'un domaine d'auto-inhibition comprenant un site de liaison à la protéine RAS. Du côté C-terminal de BRAF, il y a un domaine tyrosine kinase et deux sites de liaison à la protéine régulatrice 14-3-3 (Fig. 21B). Le mécanisme exact d'activation-inactivation de BRAF en condition physiologique n'est pas encore bien connu. En 2019, Park et son équipe proposent un modèle d'activation-inactivation dirigé par 14-3-3 par des jeux de changements de conformations et montrent

que BRAF est toujours associé à sa protéine régulatrice indépendamment de son activité (Park *et al.*, 2019).

Généralement, la signalisation MAPK classique s'active par liaison d'un ligand à un récepteur à tyrosine kinase induisant sa dimérisation et des phosphorylations (Fig. 21A) (Katz, Amit and Yarden, 2007). Ces sites nouvellement phosphorylés permettent le recrutement et la formation d'un complexe shc ou shp2-GRB2, protéine adaptatrice permettant le recrutement, à son tour, de Son of Sevenless (SOS) (Durrant and Morrison, 2018; Dillon *et al.*, 2021). SOS est un facteur d'échange de guanosine diphosphate (GDP) en guanosine triphosphate (GTP) qui permet la régulation de Ras. En effet, SOS active RAS par échange de son GDP en GTP, forme active. RAS est une protéine membranaire et une fois activée, les protéines se dimérisent et recrutent BRAF/MEK/14-3-3 à la membrane aussi (Park *et al.*, 2019). Le recrutement du complexe à RAS supprime son auto-inhibition par induction d'un changement de conformation du complexe BRAF/MEK/14-3-3. RAS est une GTPase et va activer le complexe BRAF par hydrolyse du GTP en GDP (transfert de phosphate de RAS à BRAF). Les BRAF/MEK/14-3-3, activés à leurs tours, se dimérisent. Le complexe ensuite phosphoryle en cascade MEK, qui va être relâché du complexe et ensuite va phosphoryler à son tour ERK. Pour terminer, ERK activé par phosphorylation, est transloqué dans le noyau et initie la transcription de plusieurs facteurs de transcription pro-survie /-prolifératif : Ets-1, c-Jun, c-Myc et CREB.

Les mécanismes d'inhibition de BRAF ne sont pas très connus, la majorité des recherches sont basées sur les protéines BRAF-mutées. Nous avons déjà vu que la protéine 14-3-3 est un élément clé dans la régulation de BRAF et qu'il existe des rétro-inhibitions de la part des membres de la voie MAPK comme ERK. Une seconde façon de réguler la quantité de protéines peut se faire par la dégradation de celle-ci. En 2012, une équipe coréenne montre que la ligase à ubiquitine RNF149 (protéine avec motif annulaire en anglais pour Ring Finger Protein 149) induit la dégradation protéosomale par ubiquitination de BRAF-sauvage mais pas BRAF-mutant (Hong *et al.*, 2012).

Mutations activatrices récurrentes

Comme décrit précédemment, *BRAF* est très souvent retrouvé muté dans de multiples cancers et l'ensemble des mutations induisent une suractivation de la voie MAPK. Les cancers les plus répandus avec des mutations de *BRAF* sont les mélanomes, les carcinomes de la thyroïde, les cancers colorectaux et les gliomes (Kebebew *et al.*, 2007; Ascierto *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Ryall *et al.*, 2020). COSMIC (pour en anglais catalogue of somatic mutations in cancer) est un catalogue de mutations somatiques dans les cancers gratuit et libre d'accès. Sur plus de 50 000 tumeurs *BRAF* mutés issues de COSMIC, 97%

présentent une substitution faux-sens ou non-synonyme ce qui signifie que le changement nucléotidique ponctuel induit un changement de l'acide aminé (Fig. 22A).

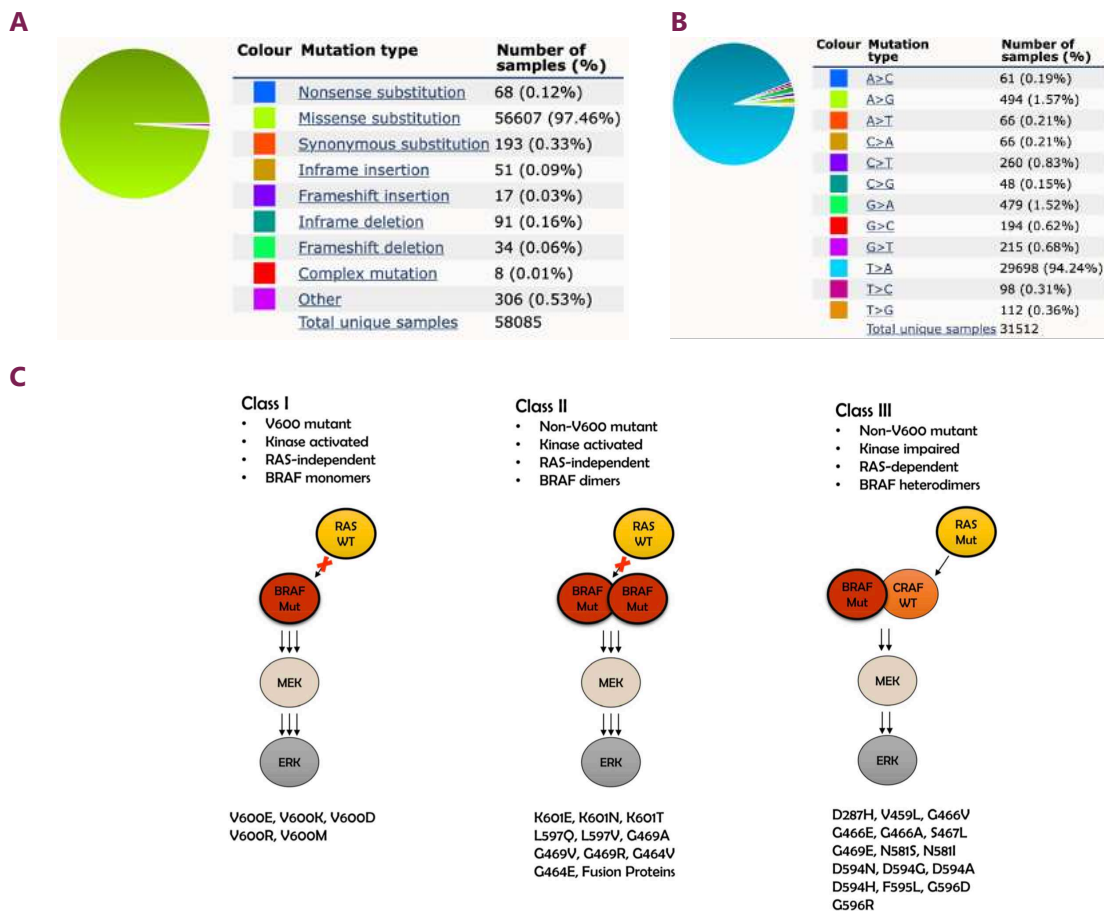


Figure 22 : Classifications des altérations géniques de *BRAF*

(A) Natures des altérations géniques de *BRAF* tous cancers confondus issues de COSMIC. (B) Fréquences des substitutions géniques dans *BRAF* issues de COSMIC. (C) Classification des altérations de *BRAF* selon la (in)dépendance à RAS et la conformation active. (Śmiech *et al.*, 2020).

Dans plus de 94% des cas, il s'agit d'une substitution de la thymine par une adénine principalement en position 1799 de la séquence codante induisant la substitution de la valine par un acide glutamique en position acide aminé 600 (V600E) (transcrit : ENST00000646891, GRCh38) (Fig. 22B). *BRAF* peut présenter aussi des fusions de gènes dont la plus fréquente est BRAF:KIAA1549 (transcrit : ENST00000440172) (COSMIC).

La communauté scientifique classe les mutations de BRAF en 3 classes selon leur (in)dépendance à RAS et la conformation de RAF lors de l'activation (monomère *versus* dimère) (Fig. 22C) (Yao *et al.* 2017 *et* 2015 ; (Yao *et al.*, 2015, 2017). Les mutations de classe I correspondent à l'ensemble des variants en position 600 de BRAF comme BRAFV600E. L'activation de BRAF muté V600E est indépendante de RAS

et est réalisée en conformation monomère car la substitution valine vers l'acide glutamique mime une activation du domaine kinase par phosphorylation (Fig. 23C) (Maloney et al., 2021). Les variants non-BRAFV600E sont les mutations de classe II et ont pour conséquence la suppression de l'auto-inhibition protéique (Yao et al., 2015). Ainsi BRAF-muté de classe II n'a pas besoin d'être recruté par RAS pour lever l'auto-inhibition et peut directement former un dimère pour l'activation par phosphorylation. Les BRAF non-V600E-mutants sont donc aussi indépendants de RAS mais l'activation de BRAF nécessite la dimérisation (Fig. 22C). Pour terminer, les mutations de *BRAF* de classes III sont des mutations induisant une diminution ou une absence d'activité kinase (Yao et al., 2017). Cependant, ces mutations augmentent (i) l'affinité BRAF-muté à RAS et (ii) l'affinité BRAF muté avec CRAF sauvage pour dimérisation provoquant une augmentation de la signalisation ERK en aval. Ce mécanisme d'amplification du signal est possible uniquement s'il y a au préalable une mutation RTK ou RAS associée à la mutation *BRAF* de classe III afin de maintenir une activation constitutive de RAS. L'association mutationnelle fonctionne de manière synergique. Les BRAF mutants de classe III sont donc aussi dépendants de RAS et l'activation de BRAF nécessite la dimérisation hétérodimérique avec CRAF sauvage (Fig. 22C).

BRAFV600E, mutation initiatrice de cancers

Une mutation initiatrice ou « driver » en anglais est une altération génique responsable de l'initiation tumorale. Une mutation peut être considérée comme initiatrice de l'oncogenèse (i) lorsqu'elle est retrouvée à forte occurrence et dont la fréquence de l'allèle muté est la plus élevée parmi les mutations somatiques et (ii) après validation fonctionnelle *in-vitro* et/ou *in-vivo*. En effet, l'expression de la mutation dite driver dans des modèles *in-vitro* et *in-vivo* doit avoir un pouvoir pro-transformant.

En 2005, le premier modèle *in-vivo* d'expression de BRAFV600E est créé dans le but d'évaluer les conséquences de l'activation de BRAF dans le développement des mélanocytes, supposé à l'origine des mélanomes (Patton et al., 2005). En effet, les chercheurs ont généré un modèle transgénique de poisson zèbre dans le but d'exprimer la mutation sous contrôle du promoteur *Mitfa*, actif au cours du développement des mélanocytes. BRAFV600E s'est révélé initiateur du développement de grains de beauté (nevis) mais pas de mélanomes, qui nécessite une seconde altération : perte de p53. En 2009, des modèles murins d'expression de BRAFV600E sont développés et la mutation est aussi validée comme initiatrice du développement de grains de beauté mais aussi de mélanomes à faible pourcentage et longue latence (Dhomen et al., 2009; Goel et al., 2009). Ces deux modèles montrent que BRAFV600E semble être initiatrice de la mélanogenèse mais la progression semble être dépendante de l'apparition

d'autres altérations. L'analyse moléculaire des grains de beauté murins et humains montrent l'expression de marqueurs de sénescences (Michaloglou *et al.*, 2005; Dhomen *et al.*, 2009; Goel *et al.*, 2009).

En 2011, Raabe *et ses collègues* montrent *in-vitro* que l'expression de BRAFV600E au sein de neurosphères humaines saines induit une transformation cellulaire et ensuite une entrée en sénescence, récapitulant la tumorigénèse des astrocytomes pilocytiques BRAFV600E (Raabe *et al.*, 2011). Nous reviendrons plus spécifiquement sur ce modèle plus loin au cours de l'introduction. En 2012, Huillard *et ses collègues* développent le premier modèle murin *in-vivo* d'astrocytome malin. Ils démontrent que BRAFV600E à lui seul n'est pas tumorigénique mais qu'il doit être associé à une seconde altération, la perte de p16 (Huillard *et al.*, 2012).

En 2013, Rad *et ses partenaires* montrent que *in-vivo* BRAFV600E est la mutation initiatrice de la tumorigène d'un sous-type de cancer de l'intestin (Rad *et al.*, 2013). En effet, les chercheurs ont développé un modèle murin exprimant BRAFV600E spécifiquement dans l'épithélium du petit et large intestin et récapitule la pathologie intestinale. Aucune signature de sénescence n'a été détectée. À l'opposé des précédents modèles, aucune altération supplémentaire n'est nécessaire et il n'y a pas de sénescence.

Depuis plusieurs années, la mutation BRAFV600E a été montrée comme initiatrice de l'oncogénèse dans plusieurs types cellulaires *in-vitro* et *in-vivo*. Cependant, les conséquences de l'oncogénèse induites par BRAFV600E semblent varier selon le type /contexte cellulaire avec l'induction de la sénescence préférentiellement dans le SNC.

Les inhibiteurs pharmacologiques

Selon l'Institut national du cancer, une thérapie ciblée consiste en un traitement ciblant spécifiquement une molécule/protéine dont les cellules tumorales sont dépendantes pour leur croissance tumorale. Cet inhibiteur peut être spécifique d'une protéine mutante et insensible à la forme sauvage ou cibler la forme mutante et/ou sauvage. En effet, certaines tumeurs peuvent développer des « addictions oncogéniques » à une signalisation comme la voie MAPK et la thérapie ciblée est une opportunité notamment dans les tumeurs mutées BRAF-V600E.

L'offre de thérapie ciblée pour les tumeurs mutées *BRAF* est dépendante de la classe mutationnelle. Les patients avec tumeurs *BRAF*-altérés de classe I répondent aux inhibiteurs sélectifs de BRAF monomérique comme le vemurafenib (Yao *et al.*, 2015). Au contraire, les tumeurs avec une mutation *BRAF* de classe II

ne sont pas sensibles aux inhibiteurs sélectifs de BRAF monomériques car l'activation de BRAF est sous forme dimérique. Ces patients sont traités avec des inhibiteurs sélectifs de BRAF dimériques (i.e. BGB659) ou des inhibiteurs de MEK (i.e. tramétinib), kinases en aval. Pour terminer, la prise en charge thérapeutique des tumeurs avec une mutation de BRAF-classe III est plus spécifique en fonction de la mutation d'activation de la voie MAPK co-occurrence. Le plus souvent il s'agit d'une mutation RTK et le traitement consiste en une combinaison d'un inhibiteur RTK et MEK (Yao et al., 2017).

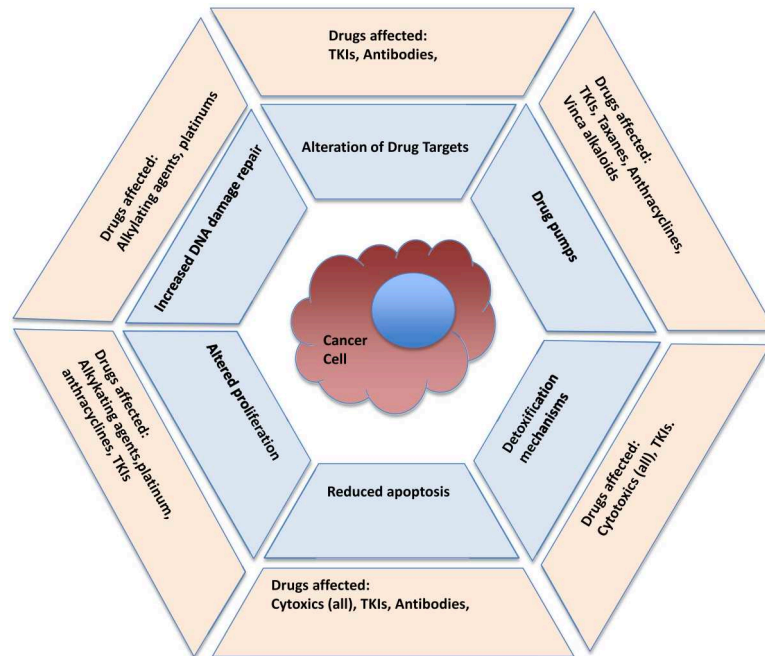
Développement de résistances aux inhibiteurs pharmacologiques

Une tumeur est dite « résistante » à un traitement pharmacologique à partir du moment où la tumeur réussit à se développer indépendamment de la présence de la drogue. La résistance peut être innée ou acquise. La résistance est innée ou primaire lorsque les cellules tumorales sont directement insensibles à la drogue indépendamment de l'évolution tumorale. La résistance acquise consiste en l'expansion d'un clone néoformé avec un changement génétique, épigénétique, phénotypique ou environnemental procurant une insensibilité à la drogue (Cree and Charlton, 2017). Le développement de mécanismes de résistance peut être prédit avec l'étude du profil transcriptomique ou protéomique et l'identification de signatures. De cette façon, la prise en charge du patient est modifiée. En 2017, des scientifiques ont catégorisé les mécanismes canoniques de résistances en 6 groupes : (1) altération de la cible de la drogue, (2) expression des pompes à médicaments, (3) expression des mécanismes de détoxification, (4) sensibilité réduite à l'apoptose, (5) augmentation de la réparation des dommages à l'ADN et (6) altération de la prolifération (Fig. 23A). La prise en charge d'un patient à la rechute due au développement d'une résistance pharmacologique est dans la plupart du temps adaptée pour chaque individu en fonction de son mécanisme de résistance. De nouvelles stratégies thérapeutiques de prévention apparaissent pour palier à ces résistances récurrentes comme c'est le cas des tumeurs BRAFV600E.

Les mélanomes BRAFV600E, répondent très bien aux inhibiteurs de BRAFV600E en comparaison avec une chimiothérapie ; avec une augmentation de la survie médiane des patients de 9,7 mois à 13,6 mois (Chapman et al., 2011; McArthur et al., 2014). Cependant, les patients rechutent indéniablement avec divers mécanismes de réactivation de la voie MAPK. En 2019, Luebker et Koepsell publient une description des divers mécanismes de résistance dans la rechute du mélanome (Fig. 23B) (Luebker and Koepsell, 2019). L'amplification du nombre de copies de *BRAF* et les mutations activatrices des membres de la voie MAPK en amont (RAS) et en aval (MEK, ERK) sont les trois types d'altérations retrouvées le plus fréquemment. Des combinaisons thérapeutiques innovantes sont nées de la compréhension des mécanismes de résistance. Plusieurs essais cliniques pour les mélanomes BRAFV600E ont montré une

augmentation significative de la survie et de la qualité de vie des patients traités avec la combinaison RAF et MEK inhibiteurs comparé à une monothérapie d'inhibiteurs de BRAF (Long et al., 2014; Robert et al., 2015; Ascierto et al., 2020).

A



B

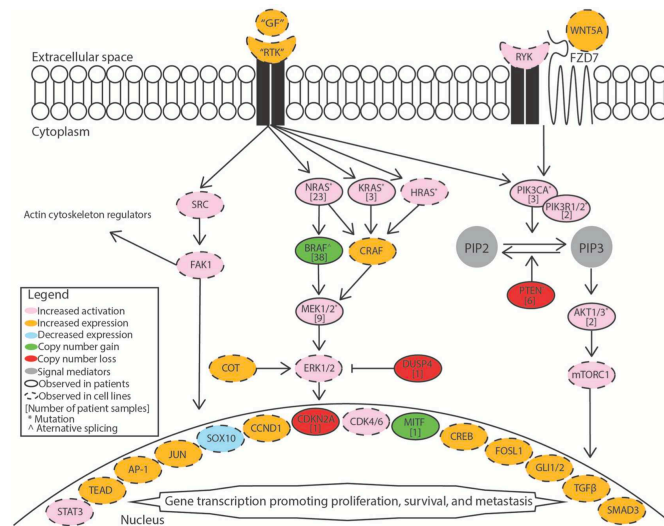


Figure 23 : Résistances aux inhibiteurs pharmacologiques de BRAFV600E

(A) Mécanismes canoiques de résistances acquises aux drogues (Adaptée de Cree et al. 2017). (B) Description des mécanismes moléculaires pouvant être à l'origine de résistances acquises aux inhibiteurs de BRAFV600E dans le mélanome (Adaptée de Luebker et al. 2019).

Il n'y a pas que les mélanomes BRAFV600E qui développent des résistances. Il semble que ce soit commun à diverses tumeurs mutées BRAFV600E. Les mécanismes de résistance dans les cancers

colorectaux BRAFV600E sont plutôt similaires à ceux du mélanome à l'exception de la réactivation de la voie MAPK par altération de *EGFR* (amplification ou SNV) (Oddo *et al.*, 2016). En conséquence, la trithérapie d'inhibiteurs de EGFR, BRAF et MEK pour le traitement de patients avec des cancers colorectaux BRAFV600E s'est montrée plus efficace qu'en combinaison ou monothérapie engendrant plus tardivement de nouvelles résistances (Oddo *et al.*, 2016).

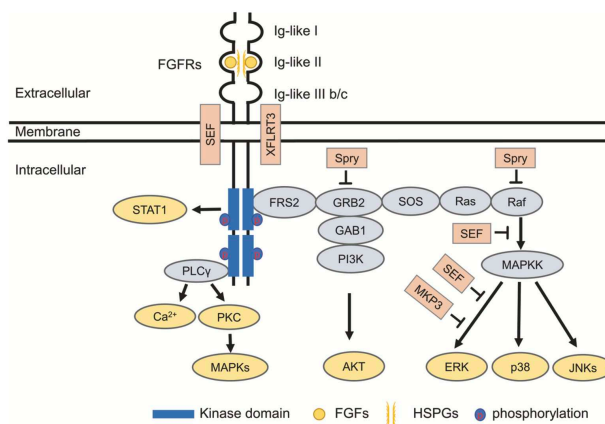
À ce jour, les combinaisons thérapeutiques dans le traitement de tumeurs BRAFV600E ne font que retarder l'apparition de résistances dans un contexte de mélanome ou cancer colorectal (Oddo *et al.*, 2016; Luebker and Koepsell, 2019).

2.3. L'oncogène *FGFR1*

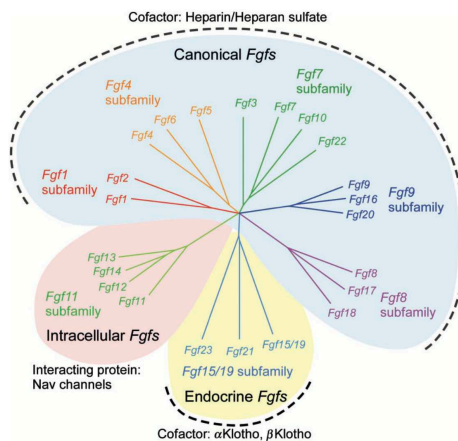
Informations générales

FGFR1 est un récepteur transmembranaire à activité kinase sur tyrosine, régulé par des facteurs de croissances aux fibroblastes (FGF en anglais pour fibroblast growth factor) (Fig. 24A,B).

A



B



C

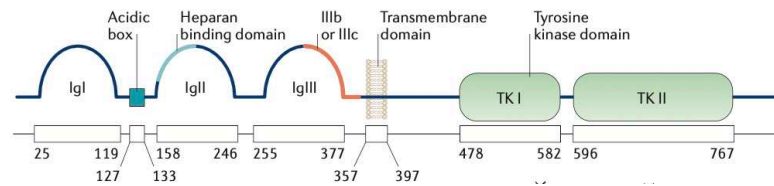


Figure 24 : Signalisation, structure et fonctionnement de FGFR1

(A) Schéma des signalisations MAPK, PI3K-AKT et STAT activées par fixation de ligands FGFs au récepteur FGFR1 en condition physiologique. Description des boucles de régulations. (Xie *et al.*, 2020). (B) Analyse phylogénétique des 22 gènes *FGF*. La longueur des branches est proportionnelle à la distance évolutive entre chaque gène. (Babina and Turner, 2017) (C) Structure et domaines fonctionnels de FGFR (Babina and Turner, 2017).

FGFR1 appartient à la famille des récepteurs aux fibroblastes (FGFR) composée de 4 membres (FGFR1, FGFR2, FGFR3 et FGFR4) impliqués dans la migration, la prolifération, la différenciation et la survie (Xie *et al.*, 2020). La voie FGFR est aussi essentielle dans l'embryogenèse et notamment le développement du SNC (Guillemot and Zimmer, 2011; Xie *et al.*, 2020). Plus précisément, ce récepteur activé est un transducteur et activateur des signalisations cellulaires : MAPK, PI3K/AKT et phospholipase C, expliquant la multitude de fonctions physiologiques de FGFR (Fig. 24A). Le gène codant pour cette protéine est *FGFR1* et est situé sur le chromosome 8 locus q12. La protéine est composée de 822 acides aminés (transcrit : ENSG00000077782, sur le génome de référence humain GRCh38) (Fig. 24B).

Structure et fonctionnement de la protéine

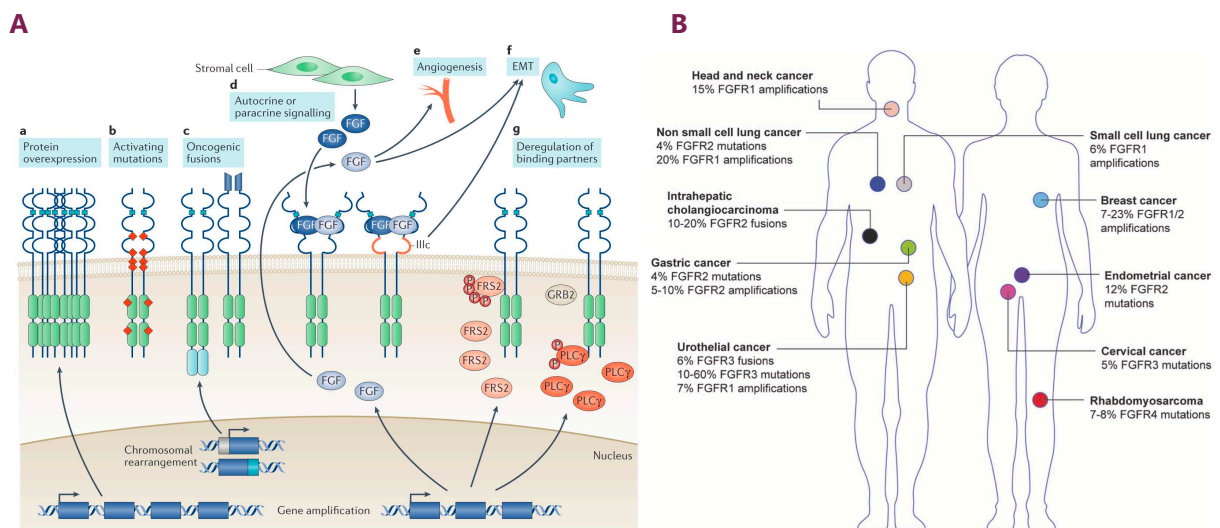
Le récepteur est composé d'une partie extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire. Plus précisément, la protéine est composée de 3 domaines extracellulaires de types immunoglobulines (Igl, IglI et IglII), un domaine transmembranaire et deux domaines intracellulaires tyrosines kinases (I et II) (Fig. 24B). Le domaine IglI contient un motif de fixation au sulfate d'héparane permettant une stabilisation du complexe FGF-FGFR. La famille des ligands FGFs se compose de 22 membres dont 18 avec une action paracrine c'est-à-dire qui se lie à un récepteur FGFR afin de l'activer (Fig. 24B) (Ornitz and Itoh, 2015). La réponse biologique diffère selon le ligand FGF en question (Hidai, 2003).

L'activation du récepteur se compose en plusieurs étapes : (i) dimérisation de FGFR, (ii) fixation du ligand aux dimères de FGFR qui induit un changement conformationnel spécifique au ligand et (iii) augmentation de la phosphorylation des récepteurs par transphosphorylation (phosphorylation croisée) (Sarabipour and Hristova, 2016). L'activation des récepteurs permet le recrutement et la phosphorylation de FRS2a, qui a son tour permet le recrutement de GAB1 et SOS pour, respectivement, activer la signalisation PI3K-AKT et MAPK (Fig. 24A) (Xie *et al.*, 2020). Il faut noter que l'activation par FGFR1 de la

signalisation MAPK passe par l'ensemble des 3 voies : ERK, p38 et JNKs. En parallèle, l'activation du récepteur recrute et phosphoryle la phospholipase C γ (PLC γ). Cette phospholipase est l'enzyme clé de la signalisation phospholipase impliquée dans la régulation des signalisations intracellulaires (Park *et al.*, 2012). En effet, l'enzyme hydrolyse les phospholipides en lipides, et plus particulièrement le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP $_2$) en phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP $_3$) et en diacylglycérol. Le PIP $_3$ induit la libération du calcium du réticulum endoplasmique, tandis que diacylglycérol active la protéine kinase C (PKC). La PKC participe à renforcer l'activation de la voie MAPK en phosphorylant RAF de manière indépendante de RAS. FGFR1 peut être nucléaire et phosphoryler d'autres protéines nucléaires en réponse à la liaison au FGF-2 (Stachowiak *et al.*, 1996). FGFR1-nucléaire est impliqué dans le contrôle de la prolifération et la différenciation cellulaire notamment au cours du développement du SNC (Stachowiak *et al.*, 2003).

Mutations activatrices récurrentes

L'altération de la signalisation FGF/FGFR, surrégulé ou sous-régulé, est impliquée dans un panel large de maladies comprenant les syndromes de nanisme, ainsi que l'insuffisance rénale chronique (IRC), l'obésité et diverses tumeurs (White *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2020; Krook *et al.*, 2021). Le spectre de cancers avec une altération activatrice de la signalisation FGF/FGFR chez l'adulte est assez large : cancers du poumon, sein, urothélial, de l'endomètre, du cerveau et du cou (Fig. 25A,B) (Krook *et al.*, 2021).



C

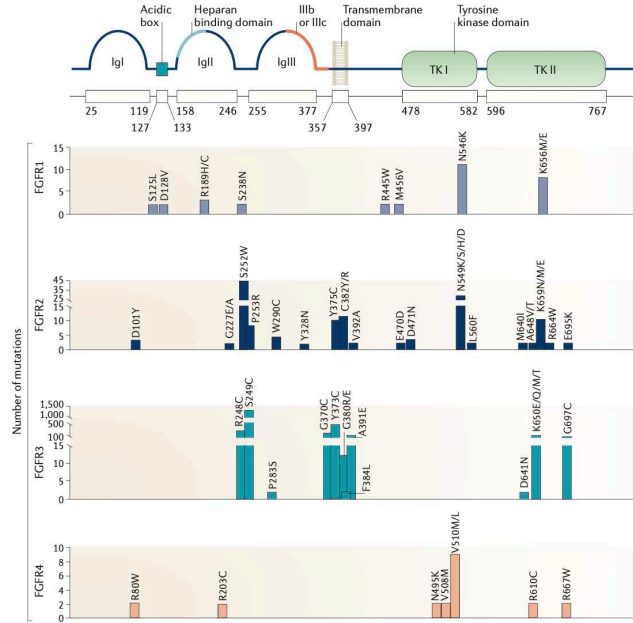


Figure 25 : Altérations récurrentes de FGFR

(A) Mécanismes d'activation pro-tumorale de la signalisation FGF/FGFR (*Babina and Turner, 2017*) (B) Panel des cancers avec une altération de FGFR (*Krook et al., 2021*) (C) Localisation et fréquence des mutations selon le récepteur FGFR (*Babina and Turner, 2017*).

Chez l'enfant, les tumeurs FGFR-altérés semblent être moins fréquentes et restreintes à quelques cancers. En effet, *De la Vega et ses collègues* ont investigué la fréquence d'altérations activatrices de la signalisation FGFR sur une cohorte de plus de 1300 tumeurs et seulement 3% étaient mutées contre entre 5 et 10% chez l'adulte (*Lazo De La Vega et al., 2022*). Cependant, il est possible que la fréquence des altérations de *FGFR1* soit sous-estimée, les fusions géniques sont majoritairement non détectables par séquençage de l'ADN. Au sein de cette étude, les altérations de *FGFR1* ont été retrouvées uniquement dans les sarcomes, tumeurs du SNC, embryonnaires et carcinomes.

L'activation aberrante de la signalisation peut se faire par divers mécanismes : la suractivation des récepteurs, ligands ou partenaires par amplification génique ; substitutions nucléotidiques activatrices ; et fusions oncogéniques (*Fig. 25A*) (*Babina and Turner, 2017*). D'après l'analyse de *Babina et ses partenaires* à partir des tumeurs altérées *FGFR1-4* de COSMIC, *FGFR2* et *FGFR3* sont le plus souvent altérés comparés à *FGFR1* et *FGFR4*. Les mutations apparaissent majoritairement dans les domaines de liaisons du ligand et transmembranaire. Pour *FGFR1* et *FGFR4*, il semble que la tendance soit inversée avec une fréquence d'altérations plus importante dans les domaines catalytiques tyrosines-kinases. Pour exemple, *FGFR1N546K* et *FGFR1K656E/M* sont des mutations activatrices présentes dans le domaine catalytique et qui apparaissent dans 6 à 7% des cancers pédiatriques du SNC et plus particulièrement

des LGGs (*the International Cancer Genome Consortium PedBrain Tumor Project et al., 2013; Ryall et al., 2020*).

En 2007, la régulation des récepteurs tyrosines kinases est détaillée pour la première fois par *Chen et ses partenaires de recherche*. Ils mettent en évidence l'existence d'un frein moléculaire (« molecular brake ») auto-inhibiteur, contrôlé par 3 résidus présents dans le domaine kinase, impliqués dans la régulation des récepteurs (*Fig. 26*) (*Chen et al., 2007*).

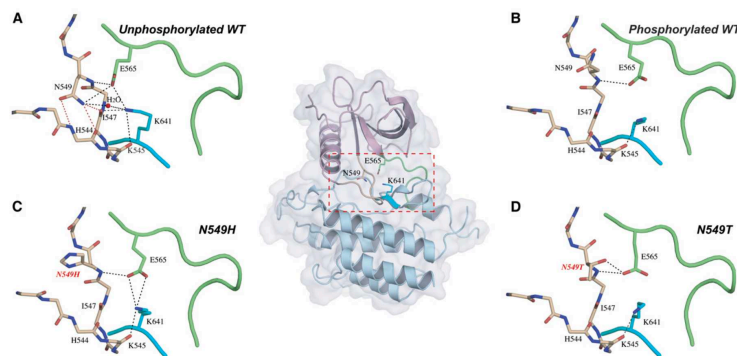


Figure 26 : Régulation des FGFR par liaison au ligand ou par la présence de mutations pathogéniques.

(A) Structure moléculaire de FGFR2 sauvage non phosphorylé en conformation inactive. Cette conformation, appelé « frein moléculaire » est maintenue grâce aux liaisons hydrogènes entre N549, E565 et K641. (B) Structure moléculaire de FGFR2 phosphorylé en conformation active induite par liaison au ligand. Perte du frein moléculaire en réponse à la fixation du ligand. (C, D) Structure moléculaire de FGFR2 muté N549H ou N549T non-phosphorylé. La perte du frein moléculaire peut aussi être induite par un changement d'acide aminé. (*Chen et al., 2007*).

En effet, ces trois acides aminés clés permettent de maintenir une conformation inhibitrice au récepteur via des liaisons hydrogènes entre les résidus (*Table. 6*).

FGFR2	FGFR1
N549	N546
E565	E562
K641	K638

Table 6 : Correspondance des résidus clés impliqués dans la régulation des FGFR (*Chen et al., 2007*)

Ce frein moléculaire peut-être éliminé soit par fixation du ligand induisant la boucle d'activation du récepteur ou alors par la présence d'altérations. Une mutation faux-sens engendrant un changement de résidus au niveau de ses trois résidus comme FGFR1N546K induit une perte du frein moléculaire par remodelage des liaisons hydrogènes au profit d'une conformation activatrice. Ainsi, la présence de la

mutation FGFR1N546K induit une activation constitutive du domaine kinase (*Chen et al. 2007*). Le mécanisme d'activation constitutive de FGFR1 par la mutation K656E/M diffère peu de celui de N546K. K656 ne fait pas partie des 3 résidus impliqués dans le frein moléculaire du récepteur mais correspond aux résidus proches. En effet, *Chen et al.* montrent aussi que la substitution d'acides aminés induit un remodelage des liaisons hydrogènes au sein des régions clés stabilisant le récepteur FGFR dans sa conformation active. Les auteurs ont identifié cette régulation comme universelle dans les récepteurs FGFR1-4 mais aussi PDGFR, KIT et autres.

Les fusions de gènes FGFR1:TACC1 et FGFR3:TACC3 sont les plus courantes dans les cancers du SNC et plus précisément gliomes et glioblastomes (De Luca *et al.*, 2020; Métais *et al.*, 2023). Ces fusions géniques causées par translocations chromosomiques induisent une activation constitutive du récepteur tyrosine kinase FGFR (*Singh et al.*, 2012).

Un dernier type d'altération de *FGFR1* existe : duplication du domaine FGFR1-tyrosine kinase (FGFR1-TKD) (Qaddoumi *et al.*, 2016). La duplication comprend les exons de 10 à 18 codant le domaine tyrosine kinase entier et s'est insérée comme une fusion génique avec maintien du cadre de lecture. FGFR1-TKDD apparaît dans les LGGs et n'est pas restrictif à un type tumoral (i.e. astrocytome, tumeurs dysembryoplasiques neuroépithéliales). *FGFR1* est retrouvé altéré dans plus de 80% des tumeurs neuroépithéliales dysembryoplasiques dont, principalement, la moitié correspond à des mutations points chauds de *FGFR1* et l'autre moitié à des FGFR1-TKD (Qaddoumi *et al.*, 2016).

FGFR1N546K, FGFR1K656E/M, mutations initiatrices

Une évaluation fonctionnelle de plus 160 mutations non-synonymes des récepteurs aux FGF au sein de fibroblastes murins a été réalisée dans le but de déterminer quels variants ont une activité transformante (*Nakamura et al.*, 2021). Dans cette étude, un variant est considéré avec une activité transformante lorsqu'un fibroblaste avec le variant donné est (i) capable de redonner une colonie /foyer et (ii) est peu /pas dépendant des facteurs mitogènes présents dans le milieu supplémenté en sérum. Les résultats ont montré que FGFR1-N546K ou K656E/M ont une activité transformante plutôt importante.

À ce jour, aucune étude avec introduction de la mutation FGFR1-N546K ou K656E dans une cellule souche neurale ou un précurseur neural n'a été réalisée afin de montrer un rôle initiateur et/ou transformant comme c'est le cas pour BRAFV600E. Cependant en 2022, *Cimmino et ses collègues* ont étudié le rôle de FGFR1 dans le neuroblastome (*Cimmino et al.*, 2022). Quelques neuroblastomes sont retrouvés mutés FGFRN546K au diagnostic et à la rechute ce qui suggère un rôle précoce de FGFR1 dans

l'oncogénèse. L'expression de FGFR1N546K au sein des HEK293T ou de modèles de neuroblastomes augmente la prolifération. L'inhibition par shRNA de *FGFR1* dans des modèles de neuroblastomes induit une diminution de la prolifération. Ces résultats soulignent l'addiction de la suractivation de la voie FGFR1 des neuroblastomes. L'expression de FGFR1N546K au sein de ces modèles semble être cytoplasmique et nucléaire. Les auteurs n'excluent pas que l'expression de la mutation activatrice FGFR1N546K réactive la signalisation cellulaire embryonnaire via FGFR1N546K nucléaire. En effet pour rappel, FGFR1-nucléaire est un élément clé à la signalisation embryonnaire lors du développement du SNC (*Stachowiak et al., 2003*).

La présence d'altérations activatrices diverses de FGFR au diagnostic comme à la rechute et les expériences *in-vitro* issues de 2 études indépendantes semblent valider les variants FGFR1-N546K ou K656E/M comme des mutations drivers de cancers.

Les inhibiteurs pharmacologiques

Au vu du large éventail de cancers FGFR mutés, plusieurs inhibiteurs pharmacologiques ont été développés. Il est nécessaire de rappeler (i) qu'il existe un nombre conséquent de diverses altérations de FGFR et (ii) l'homologie de structures et fonctionnement entre différents récepteurs tyrosines kinases comme PDGFRA, VEGFR, RET est forte. Les inhibiteurs peuvent être classifiés en plusieurs catégories selon la /les cible(s) : les inhibiteurs FGFR1-3, les inhibiteurs de FGFR4, les pan-inhibiteurs et les inhibiteurs multi-kinases (*Table. 7*) (*Katoh, 2019*). Un pan-inhibiteurs de FGFR cible spécifiquement l'ensemble des récepteurs FGFR1-4 à l'inverse d'un inhibiteur multi kinases qui cible les FGFR1-4 et d'autres kinases à forte homologie. Les inhibiteurs peuvent être aussi irréversibles ou réversibles c'est-à-dire que le complexe drogue-cible est maintenu ou non par des liaisons covalentes. Malheureusement, il n'existe pas de thérapie ciblée pour les variants mutés de FGFR1 comme N546K ou K656E/M dont l'occurrence est très faible en dehors du SNC.

Agent	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGFR4	VEGFR2	Other targets with IC ₅₀ <10 nM
FGFR 1/2/3 inhibitors						
AZD4547	<1	3	2	165	24	–
Debio 1347	9	8	22	290	>1,000	–
Infigratinib (BGJ398)	1	1	1	60	180	–
FGFR4 inhibitors						
BLU-554	624	>1,000	>1,000	5	NR	–
BLU9931	591	493	150	3	NR	–
H3B-6527	320	>1,000	>1,000	≤1	NR	–
Pan-FGFR inhibitors						
ASP5878	<1	1	1	4	25	–
Erdafitinib (JNJ-42756493)	1	3	3	6	37	–
FIIN2	3	4	27	45	NR	–
LY2874455	3	3	6	6	7	–
PRN1371	1	1	4	19	705	–
Rogaratinib	15	<1	19	33	120	–
Multi-kinase inhibitors						
Anlotinib	12	NR	NR	NR	6	PDGFRB
Derazantinib (ARQ 087)	5	2	5	34	21	CSF1R, DDR2, KIT, PDGFRs and RET
Dovitinib	8	40	9	NR	13	FLT3, KIT and VEGFR1/3
E7090	1	1	1	120	16	DDR2, RET and VEGFR1
Lenvatinib	61	27	52	43	3	RET and VEGFR1/3
Lucitanib	18	83	238	>1,000	25	CSF1R and VEGFR1/3
Nintedanib	41	47	96	421	3	CSF1R, KIT, RET and VEGFR3
Ponatinib	2	2	18	8	2	CSF1R, PDGFRs, RET and VEGFR1/3
S49076	18	17	15	NR	NR	AXL, MERTK and MET
SOMCL-085	2	2	7	320	1	PDGFRB and VEGFR1

Table 7 : Classifications des inhibiteurs pharmacologiques de FGFR et listes des cibles avec IC50
Les IC50 correspondent à des IC50 pharmacologiques et l'unité est le nanomolaire (Kato, 2019).

Nakamura et ses partenaires de recherches ont aussi testé l'impact des altérations transformantes de FGFR exprimées dans les fibroblastes murins en réponse aux différents inhibiteurs pharmacologiques de FGFR par une méthode d'évaluation fonctionnelle à haut débit nommée MANO (dont les résultats sont rapportés dans la Fig. 27) (Nakamura et al., 2021). Les variants FGFR1N546K ou FGFR1K656E/M semblent être plus résistants que les autres altérations de FGFR1 à ses inhibiteurs (Fig. 27). Par exemple, FGFR1N546K semble le plus sensible à l'E7090 et au Futibatinib avec des IC50 comprises entre 40 et 80 nM alors que les IC50 pour la fusion génique FGFR1:TACC1 pour les deux drogues les plus efficaces, AZD4547 et Infigratinib, est comprise entre 1 et 9 nM. L'E7090, l'AZD4547 et l'Infigratinib sont des inhibiteurs sélectifs réversibles de FGFR1-3 en se fixant sur le site de liaison de l'ATP bloquant ainsi l'activation des sites tyrosines kinases des récepteurs (Guagnano et al., 2011; Gavine et al., 2012; Miyano et al., 2016). Le Futibatinib est un pan-inhibiteur de FGFR irréversible et fonctionne différemment. La molécule se fixe au domaine kinase par liaisons covalentes afin de l'inhiber irréversiblement (Sootome et al., 2020). Une seconde étude indépendante a démontré aussi une résistance *in-vitro* aux inhibiteurs de FGFR2 avec le variant N549K/H (N550K/H pour l'isoforme non-canonique), qui est l'homologue de FGFR1N546K (Byron et al., 2013). Les résultats *in-vitro* corrélaient avec ceux *in-vivo*. Un modèle murin muté FGFR1N546K traité à l'E7090 ou à l'Erdafitinib ne montre aucune amélioration de la survie par rapport aux souris non-traitées (Nakamura et al., 2021). Une partie de cette résistance pharmacologique

pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'affinité de FGFR1N546K avec l'ATP diminuant ainsi, par compétition, la liaison avec un inhibiteur compétitif de l'ATP (Yoza *et al.*, 2016).

		IC ₅₀ (nM)	<=5	>5, <=10	>10, <=50	>50, <=100	>100		
		Color							
Gene	Variant	AZD4547	Infigratinib	E7090	Erdaftinib	Futibatinib	Pemigatinib	Dovitinib	H3B-6527
FGFR1	FGFR1 WT	0.67	0.06	4.44	4.91	8.40	1.97	29.33	117.63
	FGFR1-TACC1	8.90	1.73	22.43	10.34	18.56	6.07	505.20	>1000
	FGFR1 N546K	270.27	116.70	41.85	364.86	78.51	276.74	774.40	>1000
	FGFR1 K656E	20.05	1.69	24.81	9.06	10.21	5.26	477.19	876.62
	FGFR1 K656M	68.83	19.75	72.07	36.26	17.76	21.01	>1000	>1000

Figure 27 : IC50 des inhibiteurs pharmacologiques de FGFR selon l'altération moléculaire présente dans les fibroblastes murins (3T3) par méthode MANO

La méthode MANO permet une évaluation fonctionnelle à haut débit. Cette méthode utilise un vecteur rétroviral qui permet l'intégration stable de gènes individuels, ici une version altérée ou non de FGFR1, dans le génome des cellules associé à un code-barres unique de 10 paires de bases. Les cellules transduites sont ensuite cultivées avec ou sans drogue pour évaluer la sensibilité aux médicaments selon l'altération de *FGFR1* présente. À la fin du test de drogue, l'ADN des cellules est extrait et séquencé et l'abondance relative des codes-barres reflète l'abondance des cellules survivantes dans chacune des configurations génétiques. (Nakamura *et al.*, 2021).

Un patient atteint d'astrocytome pilocytique FGFR1N546K a été traité en rechute par monothérapie au Pemigatinib, inhibiteur sélectif réversible de FGFR1-3, dans le cadre de l'essai clinique de phase I/II FIGHT-101 (NCT02393248) (Capone *et al.* 2022 ; Subbiah *et al.* 2022) (Capone *et al.*, 2022; Subbiah *et al.*, 2022). La réponse clinique a été partielle. Ce résultat corrèle en partie avec les résultats observés *in-vitro* et *in-vivo*.

2.4. La sénescence induite par un oncogène

La sénescence

En 1961, Hayflick *et ses collègues* démontrent un arrêt de prolifération de cellules diploïdes normales après une année de culture, causé par un facteur non environnemental mais intrinsèque à la cellule (Hayflick and Moorhead, 1961). Cet arrêt est appelé « limite de Hayflick » ou sénescence. En effet, à mesure des multiplications cellulaires, les cellules accumulent naturellement des altérations géniques et il est nécessaire d'éliminer ces cellules. C'est une sénescence dite « répllicative », c'est-à-dire induite par l'érosion des télomères au cours des division cellulaires (Marcotte and Wang, 2002). Les télomères sont des régions d'ADN répétées situées aux extrémités des chromosomes qui ont pour but de protéger l'information codante contenue à l'intérieur contre la dégradation (i.e. le système de réparation ADN-

coupure double brins) et les fusions d'extrémités chromosomiques. La sénescence peut être induite par différents facteurs. Après plusieurs décennies de recherches, la sénescence se définit, généralement, par un arrêt prolongé irréversible du cycle cellulaire en phase G1/S associé à une altération du métabolisme (Leonardo et al., 1994; Gorgoulis et al., 2019). Cet état est différent de la quiescence, qui correspond à un arrêt temporaire du cycle cellulaire en phase G0, ou de la différenciation terminale, qui est un arrêt durable du cycle après acquisition d'une spécialisation cellulaire. La sénescence est un processus qui permet l'élimination de cellules âgées ou altérées par le système immunitaire afin de maintenir une homéostasie tissulaire (Muñoz-Espín and Serrano, 2014). Ce mécanisme est majoritairement utilisé dans deux cas : (i) le re/modelage tissulaire ou (ii) l'élimination de cellules endommagées.

Plus précisément, la sénescence induit un remodelage tissulaire en 3 étapes : (i) un arrêt stable du cycle cellulaire, (ii) la modification du microenvironnement par sécrétions moléculaires impliquées dans le recrutement d'effecteurs du système immunitaire et de la matrice extracellulaire et (iii) mobilisation de progéniteurs pour régénérer le tissu (Fig. 28) (Muñoz-Espín and Serrano, 2014). L'ensemble constitue le modèle de régénération par élimination cellulaire induite par la sénescence ou en anglais « senescence-clearance-regeneration model ».

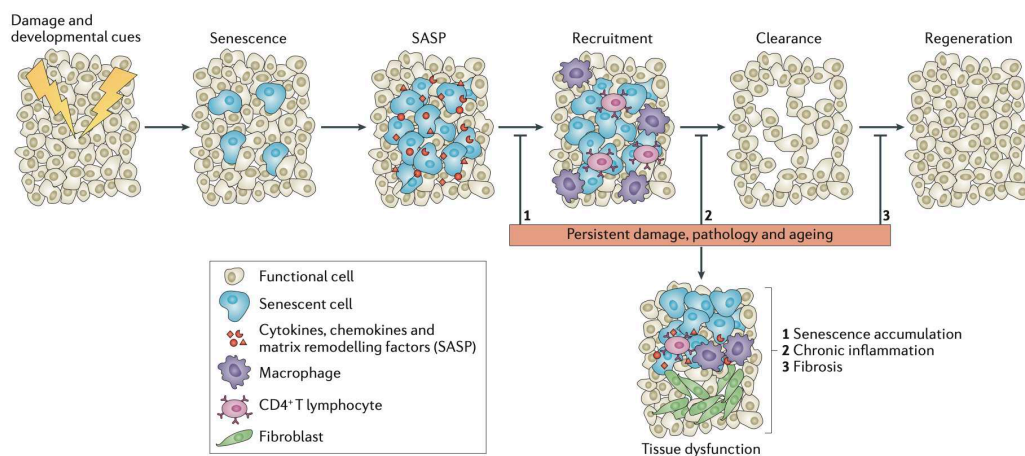


Figure 28 : Modèle de régénération par élimination cellulaire induite par la sénescence

La sénescence est aussi à l'origine d'un processus de remodelage tissulaire impliquant des cellules immunitaires et des cellules progénitrices impliquées dans la régénération tissulaire recrutées par le SASP des cellules tumorales sénescents. Les macrophages éliminent les cellules sénescents et les cellules progénitrices repeuplent et régèrent les tissus endommagés. Cette élimination de cellules tumorales peut être altérée lors de lésions persistantes ou d'état pathologique. (Muñoz-Espín and Serrano, 2014)

Par exemple, l'embryogenèse comprend plusieurs programmes de sénescences développementales impliquées à différentes étapes et pour multiples structures humaines (Storer et al., 2013). Entre autres, Storer et ses partenaires démontrent que la sénescence développementale est impliquée dans la

formation du système nerveux central au moment de la fermeture du tube neural, qui donnera la moëlle épinière et les futures structures du cerveau. Ces résultats s'appuient sur l'observation et la disparition de cellules sénescents dans des embryons murins et de poulet au cours du temps, basée sur la technique de coloration cellulaire selon le niveau d'activité β -galactosidase. Nous verrons la spécificité de cette enzyme plus tardivement au cours du chapitre.

La sénescence est aussi un mécanisme de défense pour éliminer les cellules endommagées nuisant à l'intégrité du micro-environnement ou plus largement du tissu. En effet, une cellule altérée a deux options si l'arrêt transitoire du cycle cellulaire n'a pas permis à la cellule de réparer son dommage : la mort cellulaire par apoptose ou l'entrée en sénescence afin d'être éliminée par les macrophages du système immunitaire ou par nécrose (Fig. 29) (Soto-Gamez, Quax and Demaria, 2019).

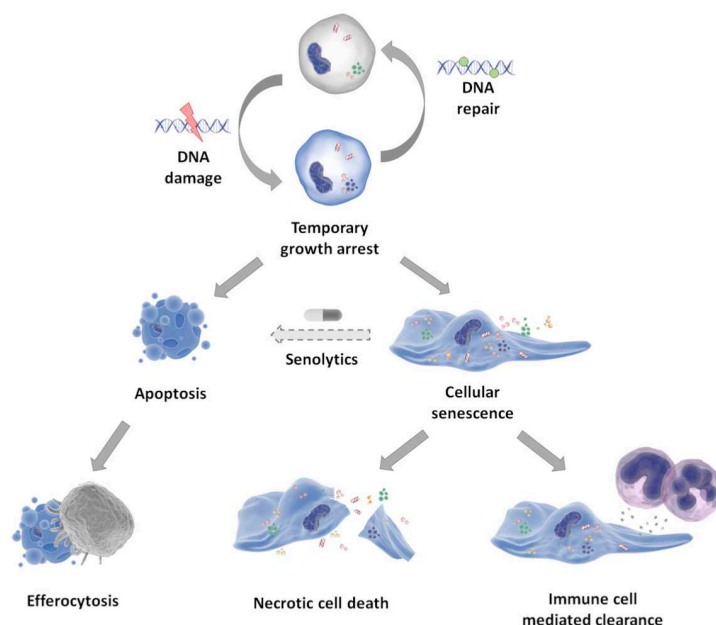


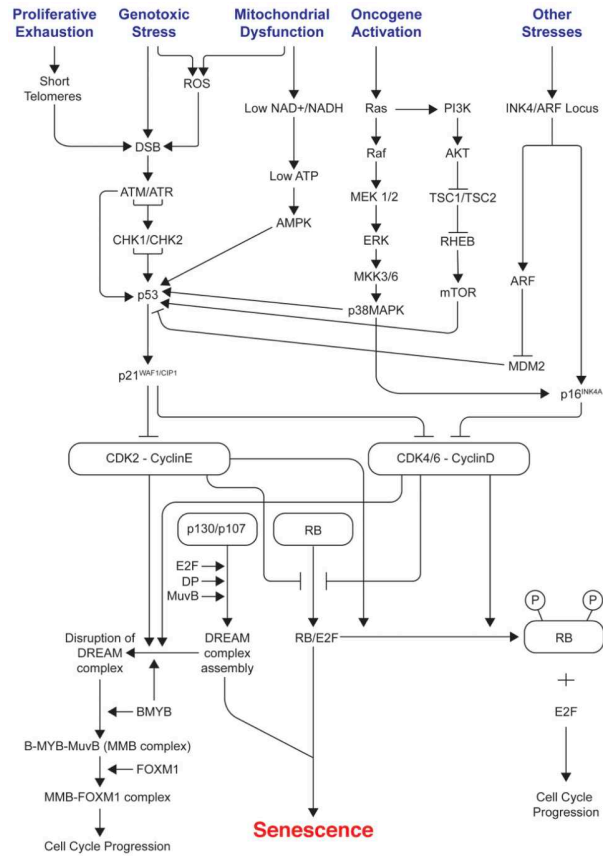
Figure 29 : Modèle d'élimination des cellules endommagées

À la suite de dommages à ADN, les cellules normales arrêtent temporairement leurs cycles cellulaires et tentent de réparer leur ADN. Si les dommages ne sont pas résolus, les cellules altérées peuvent entrer en apoptose. Alternativement, les cellules endommagées peuvent devenir sénescents et persister dans les tissus jusqu'à leur élimination par les cellules du système immunitaire. Cependant, si les dommages s'aggravent, les cellules sénescents peuvent être éliminées par nécrose, favorisant davantage l'inflammation. Les traitements sénolytiques peuvent cibler spécifiquement les cellules sénescents par induction de l'apoptose, les cellules normales sont insensibles (Soto-Gamez, Quax and Demaria, 2019).

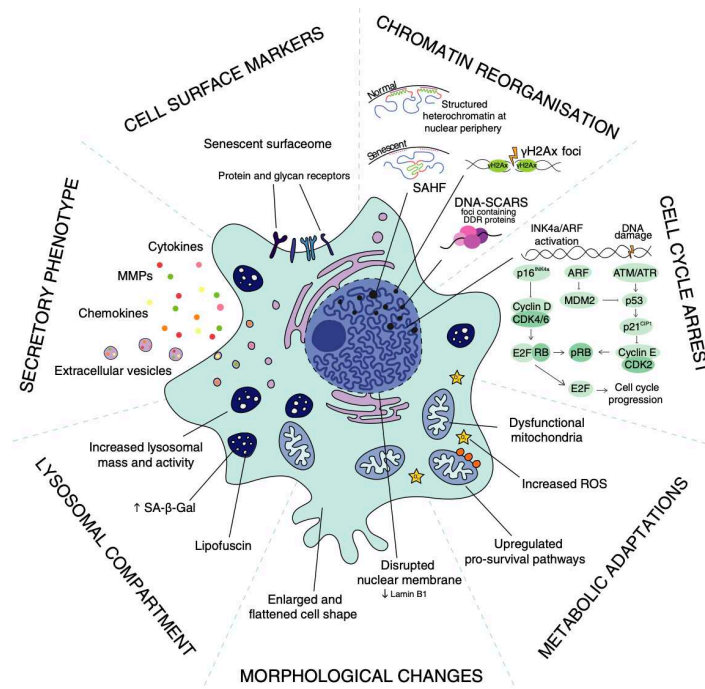
Il existe la sénescence répliquative comme décrit précédemment, et les sénescences dites « prématures » c'est-à-dire qui apparaissent avant la sénescence répliquative, prélude de la fin de vie cellulaire. La sénescence peut-être induite en réponse à différentes variétés de stress liées à l'environnement comme

les irradiations, les chimiothérapies génotoxiques ou le stress oxydatif (Fig. 30A, C) (Gewirtz, Holt and Elmore, 2008; Jagannathan, Cuddapah and Costa, 2016).

A



B



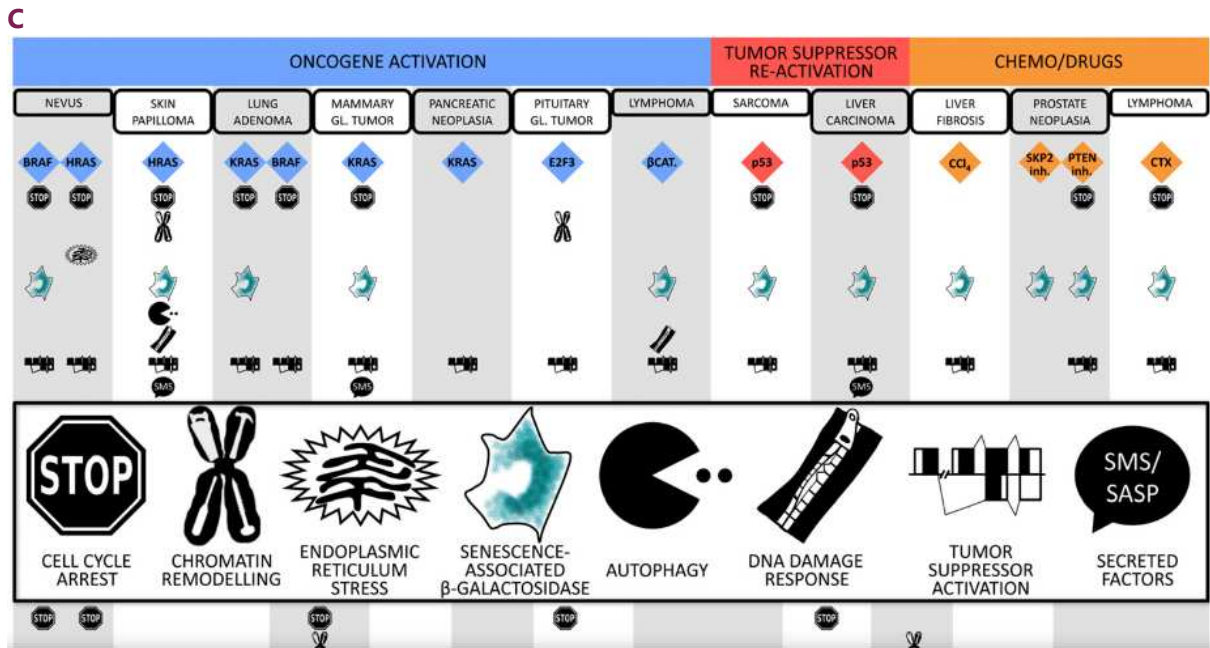


Figure 30 : Inducteurs, signalisations et caractéristiques de la sénescence

(A) Inducteurs et signalisations de la sénescence. (Kumari and Jat, 2021). (B) Caractéristiques morphologiques, métaboliques et moléculaires des cellules en sénescence. (González-Gualda et al., 2021). (C) Biomarqueurs *in-vivo* de sénescences hétérogènes selon l'inducteur et le contexte cellulaire. (Kuilman et al., 2010).

La sénescence peut aussi être induite par l'activation d'un oncogène (OIS pour en anglais « oncogene induced senescence ») (Collado et al., 2005; Michaloglou et al., 2005; Jacob et al., 2011; Raabe et al., 2011). La sénescence apparaît comme un mécanisme biologique paradoxal qui peut être à la fois antitumoral (mécanisme suppresseur de tumeur) et pro-tumoral (mécanisme favorable au développement tumoral). Il est antitumoral lorsque les cellules altérées entrent en sénescence en réponse à un stress toxique et sont éliminées par le système immunitaire, dans ce cas l'anomalie (i.e. BRAFV600E) n'est pas transmise à la descendance par division cellulaire. Par exemple, certains grains de beauté mélanocytaires bénins présentent la mutation initiatrice BRAFV600E, prévenant dans la majorité des cas, la transformation maligne par le développement de la sénescence (Michaloglou et al., 2005). Au contraire, la sénescence est pro-tumorale lorsque les cellules cancéreuses en réponse à des traitements thérapeutiques comme la radio- ou chimiothérapies peuvent entrer en sénescence. Dans un contexte immunosuppresseur induit par les cellules tumorales, ces mêmes cellules tumorales ne sont pas éliminées et peuvent donc être à l'origine de radio- ou chimio-résistance (Jagannathan, Cuddapah and Costa, 2016; Faget, Ren and Stewart, 2019).

Pour résumer, la sénescence peut être induite par une multitude de facteurs et peut selon le contexte participer au maintien de l'équilibre homéostatique ou alors être pathologique.

Caractéristiques générales des cellules sénescences

La diversité d'inducteurs a aussi des conséquences directes sur les caractéristiques morphologiques et moléculaires des cellules en sénescence. En effet, toutes les cellules sénescences ne présentent pas le même phénotype (*González-Gualda et al., 2021*). Le panel de caractéristiques est donc plutôt large et c'est l'association de plusieurs marqueurs qui détermine la présence de sénescences au sein des cellules (Fig. 30B, C).

D'un point de vue morphologique, les cellules sénescences sont généralement plus élargies et aplaties avec la présence de vésicules intra- et extra-cellulaires (Fig. 30B). Le noyau est souvent élargi (*Kuilman et al., 2010*). La membrane nucléaire est souvent retrouvée altérée, identifiable au niveau moléculaire avec une diminution de l'expression génique et protéique de lamine B1 (codé par *LMNB1*).

D'un point de vue fonctionnel, les cellules sénescences sont caractérisées par un arrêt du cycle cellulaire induit par l'axe p16^{INK4a}/Rb et/ou p53/p21^{CIP1} selon l'inducteur de la sénescence (Fig. 31A). Il semble que, dans la majorité des cas l'axe p53/p21^{CIP1} est activé alors que l'activation de l'axe p16^{INK4a}/Rb diverge selon l'inducteur. En conséquence, un régulateur du cycle cellulaire est très souvent retrouvé surexprimé comme p16 ou p21. P16 est codé par le gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* (*Rayess, Wang and Srivatsan, 2012*). Une fois activée, p16 interagit et inhibe les kinases dépendantes des cyclines (CDK pour en anglais cyclin-dependent kinase) 4 ou 6 (CDK4/6) associées à la cycline D (Fig.31). Le complexe CDK4/6-CyclineD ne peut plus phosphoryler la protéine rétinoblastome (Rb) et séquestre donc le facteur E2F1 dans le cytoplasme. E2F1 ne peut donc pas être transloqué dans le noyau pour amorcer la transcription des gènes cibles indispensables à la transition G1/S. La sénescence peut être induite par une autre signalisation : l'axe p53/p21^{CIP1}. P53 est l'élément central de cette voie, la majorité des stress peuvent l'activer. p53-activé va à son tour activer directement en aval p21. Cette protéine est aussi un inhibiteur des CDKs mais à large spectre c'est-à-dire avec la capacité d'inhiber différentes CDKs dont CDK4/6 et CDK2 (Fig. 31) (*Xiong et al. 1993*). Son rôle majeur est l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S par inhibition de CDK2-cyclineE ou CDK4/6-cyclineD.

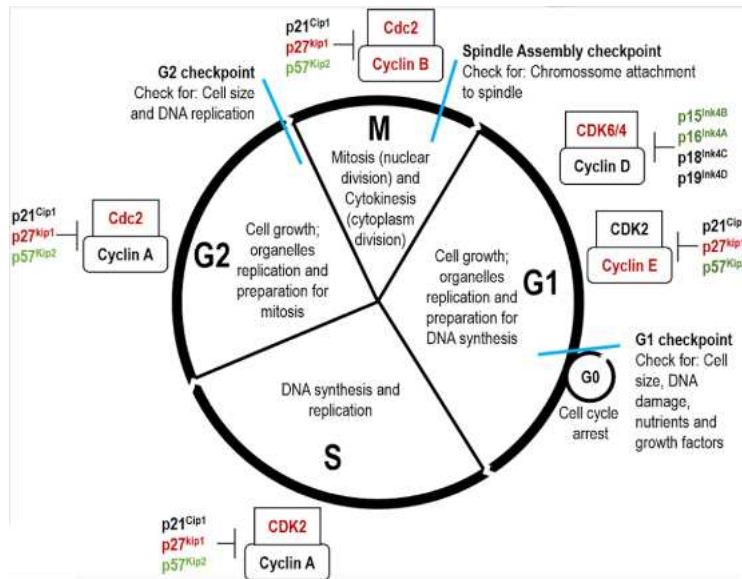


Figure 31 : Régulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est principalement régulé par (i) des kinases cyclines-dépendantes (CDK) dont CDK2, CDK4, CDK6 et Cdc2, (ii) des cyclines (cyclines A, B, D et E) et (iii) des inhibiteurs de CDK (p15, p16, p18, p19, p21, p27 et p57) (Pereira *et al.*, 2018).

D'un point de vue moléculaire, l'activation de la sénescence par l'un des axes p16^{INK4a}/Rb ou p53/p21^{CIP1} induit un remodelage de la chromatine et transcriptionnel (Fig. 32) (Zhang, Chen and Adams, 2007). En effet, il y a une altération de la chromatine avec la formation de foyers d'hétérochromatines associés à la sénescence (SAHF pour en anglais senescence-associated heterochromatin foci). Ce remodelage, plus ou moins important, de la chromatine induit l'induction d'un programme génique pro-sénescence et la répression des gènes pro-prolifératifs comme *CCNA1*, codant pour la cycline A.

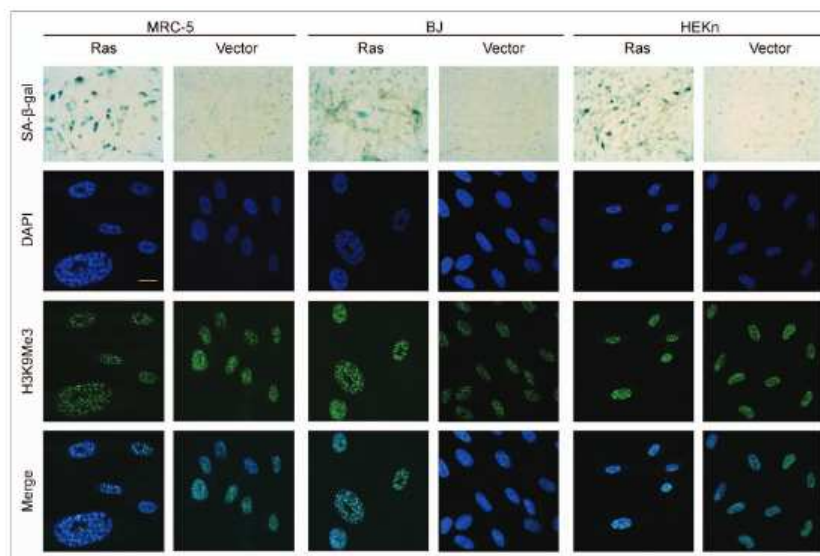


Figure 32 : Foyers d'hétérochromatines associés à l'OIS

Les cellules MRC-5, BJ et HeKn contenant une mutation activatrice de HRAS ou un vecteur vide ont été colorées pour l'activité β -galactosidase, DAPI et H3K9Me3 (Kosar et al., 2011).

Malgré l'arrêt du cycle cellulaire, les cellules sénescées sont métaboliquement actives. Plus particulièrement, le programme d'expression génique pro-sénescée mis en place comprend aussi l'expression de facteurs sécrétés qui ont le pouvoir d'influencer le microenvironnement et plus particulièrement les cellules avoisinantes (Coppé et al., 2011). On dit que les cellules présentent alors un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP pour en anglais The Senescence-Associated Secretory Phenotype). Le sécrétome peut se composer de facteurs solubles comme des interleukines (IL), chimiokines (CXCL, CCL), facteurs régulateurs, de croissances, inflammatoires et protéases. Des facteurs insolubles peuvent aussi être présents comme les ROS, collagènes et autres. Le sécrétome est variable au sein d'une même population, d'un type cellulaire à l'autre, de l'inducteur et a plusieurs fonctions (Wiley et al., 2017; Faget, Ren and Stewart, 2019; Kumari and Jat, 2021). L'analyse du sécrétome est en cours de recherche ces dernières années. Les dernières études montrent que le sécrétome pourrait avoir plusieurs rôles : il participe au recrutement des cellules immunitaires pour l'élimination des cellules sénescées mais aussi le recrutement des cellules impliquées dans la réparation du tissu environnant et le recrutement de progéniteurs cellulaires dans le but de les remplacer (Kumari and Jat, 2021). Les cellules sénescées avec SASP sont capables aussi d'induire un phénotype de sénescence dans les cellules avoisinantes, appelé sénescence « paracrine » (Acosta et al., 2013). IGFBP3, IGFBP4, et IGFBP7 pourraient être des composants clés de la sénescence paracrine dans le contexte du mélanome (Wajapeyee et al., 2008; Severino et al., 2013; Özcan et al., 2016). C'est en fonction de la composition du sécrétome et du contexte que la sénescence devient bénéfique ou délétère au développement tumoral (Fig.33). À noter, le SASP n'est pas un critère obligatoire de sénescence donc des cellules peuvent être sénescées sans SASP (Coppé et al., 2011).

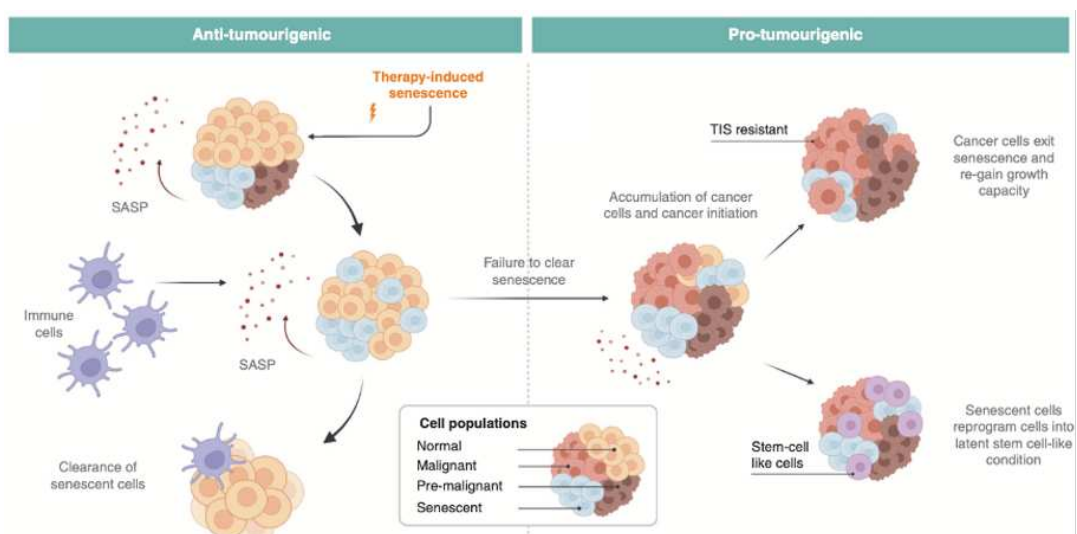


Figure 33 : Mécanisme pro- et antitumoral de la sénescence

La sénescence peut jouer un rôle antitumoral ou protumoral en fonction du contexte cellulaire. Différents inducteurs comme l'activation d'oncogène, dommages à l'ADN ou encore des thérapies inductrices de sénescence (TIS) peuvent être à l'origine de l'induction de sénescence. Le rôle est antitumoral lorsque cet état induit un arrêt de la prolifération et suscite le recrutement des cellules immunitaires via la sécrétion de SASP dans le microenvironnement induisant leur propre élimination par les cellules du système immunitaire. Au contraire, la sénescence est protumorale lorsque les cellules sénescents échappent à l'élimination par le système immunitaire pouvant reconduire à une réamplification cellulaire. En effet, l'inflammation chronique induite par le SASP des cellules sénescents instaure un microenvironnement pro-tumorigène qui favorise l'expansion tumorale. Lors de cette étape, l'émergence d'un clone avec un échappement à la sénescence peut apparaître et donner un lieu à une tumeur plus agressive. (Zanotti et al., 2022).

En outre, les cellules sénescents peuvent avoir une augmentation de leur activité lysosomale. L'autophagie est un mécanisme lysosomal de dégradation des composants cytoplasmiques dont l'activité est augmentée en réponse à un stress et à la sénescence (Fig. 30B) (Rajendran et al., 2019; González-Gualda et al., 2021). Il est aussi possible d'observer une augmentation de l'activité β -galactosidase. Cette enzyme lysosomale a pour rôle d'hydrolyser différents β -galactosides en oses simples. Son activité est très souvent retrouvée augmentée en contexte de sénescence. Ce niveau d'activité peut être quantifié *in-vitro* et *in-vivo* (modèles transgéniques) avec un test β -galactosidase. Ce test repose sur l'hydrolyse du X-gal, substrat chromogénique de la β -galactosidase. Le niveau de l'activité de l'enzyme est donc relativement proportionnel à la quantité de produit coloré précipité au sein de la cellule.

Pour résumer, il n'existe pas de marqueur de sénescence universel car la sénescence est un état cellulaire complexe et hétérogène (Fig. 30B,C) (Kuilman et al., 2010; González-Gualda et al., 2021). Cependant, il existe une liste de caractéristiques morphologiques et phénotypiques et c'est la présence de plusieurs d'entre elles qui permettent de déterminer si la cellule est sénescence. Il n'existe pas une mais des sénescences qui varient selon le contexte : type d'inducteur, intensité du stress, type cellulaire.

Généralités sur la sénescence induite par un oncogène (OIS)

La sénescence induite par un oncogène (OIS pour en anglais oncogene induced senescence) est un programme cellulaire complexe en réponse à un stress lié à une suractivation d'une signalisation. Principalement, il s'agit de l'activation d'un oncogène comme *RAF*, *RAS* mais aussi *AKT* ou *E2F1* ou alors de l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur comme *PTEN* ou *NF1* qui engendre une prolifération cellulaire excessive (Courtois-Cox, Jones and Cichowski, 2008).

La suractivation de la voie MAPK, induite par différents oncogènes comme RAS et BRAF, peut activer les deux axes de signalisation p16^{INK4a}/Rb et/ou p53/p21^{CIP1} (Serrano *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1998). Les kinases p38 et MKK3/6 semblent être les éléments médiateurs de l'activation des deux axes (Marcotte and Wang, 2002; Xu *et al.*, 2014). Cependant ce n'est pas toujours le cas, l'expression de BRAFV600E peut aussi induire l'OIS via p16 uniquement (Michaloglou *et al.*, 2005; Bigenwald *et al.*, 2021). De manière intéressante, Carné Trécesson et ses collègues montrent que p21 a la capacité d'induire l'OIS en réponse à l'activation de l'oncogène RAS, indépendamment de p16 et p53, au sein de lignées colorectales établies p16 et p53 déficientes (de Carné Trécesson *et al.*, 2011). En 2010, Keizer et ses collègues proposent un mécanisme cellulaire pour expliquer l'activation de p21, indépendant de p53 et p16, lors de l'OIS induite par BRAFV600E (de Keizer *et al.*, 2010). BRAFV600E suractive la voie ERK1/2 entraînant une augmentation de ROS intra-cellulaires. Ce niveau élevé induit l'activation de JNK et cette kinase, en aval, phosphoryle FOXO4, un facteur de transcription impliqué dans multiples réponses dont la régulation du cycle cellulaire. FOXO4, à son tour, induit l'expression transcriptionnelle de *CDKN1A* (p21), plutôt que *CDKN2A* (p16) ou *CDKN1B* (p27) et induit la sénescence. Ce mécanisme a été découvert *in-vitro* mais les modèles *in-vivo* semblent corrélés avec l'activation de p21 et FOXO4. Ces résultats corrélaient aussi avec ceux de Dhomen *et al.* qui montrent *in-vivo* le développement de grains de beauté et mélanomes avec OIS induit par BRAFV600E indépendamment de p16 (Dhomen *et al.*, 2009).

En condition physiologique chez les eucaryotes, le réticulum endoplasmique est une organelle importante permettant la biosynthèse et l'adressage des protéines membranaires et sécrétoires. En cas de stress induit par divers facteurs comme l'activation d'oncogènes ou autres, le réticulum endoplasmique peut produire des protéines altérées (non ou mal repliées) et cette rupture homéostatique du réticulum endoplasmique active un mécanisme cellulaire précis pour y remédier, appelé réponse aux protéines mal-repliées (UPR en anglais pour Unfolded Protein Response) (Sykes, Mactier and Christopherson, 2016). L'activation de cette réponse permet à la cellule de prendre deux destinées : (i) augmentation de l'efficacité de la machinerie de repliement protéique du réticulum endoplasmique et de l'élimination de ses protéines anormales par autophagie ou (ii) l'apoptose, le stress induit ne pouvant être compensé. En 2015, Corazzari et ses partenaires démontrent que la mutation BRAFV600E en contexte d'OIS au sein des mélanomes induit un stress du réticulum endoplasmique avec en conséquence une augmentation du flux autophagique qui garantit à la cellule la survie au lieu d'entrer en apoptose (Corazzari *et al.*, 2015). De manière intéressante, les tumeurs du SNC BRAFV600E présentent aussi une augmentation du flux autophagique et semblent être sensibles à l'inhibition génétique et pharmacologique autophagique (Levy *et al.*, 2014). En effet, cette même équipe rapporte l'amélioration

clinique d'un patient traité avec l'inhibiteur BRAFV600E (vemurafenib) et l'inhibiteur autophagique (chloroquine).

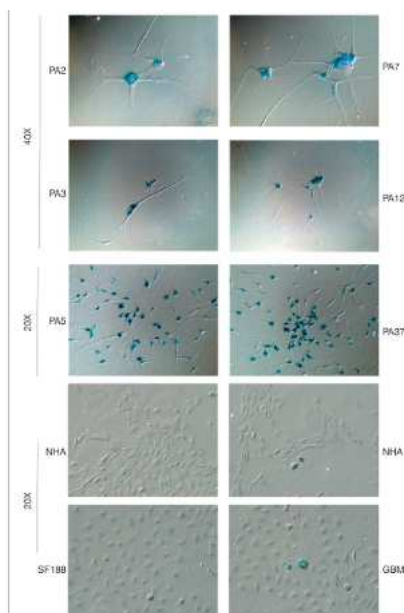
Malgré le même inducteur de sénescence comme l'activation d'un oncogène, le phénotype des cellules sénescents semble toujours aussi complexe et hétérogène (Fig. 30C). Dans l'OIS, le phénotype de sénescence est variable en fonction de l'oncogène et du type et du contexte cellulaire.

Exemple : OIS dans les gliomes de bas grades

En 2020, les résultats d'une méta-analyse de plus de 1000 gliomes de bas grades pédiatriques démontrent que l'activation de la voie MAPK est une caractéristique partagée par toutes les tumeurs analysées (Ryall et al., 2020). En effet, indépendamment de la présence ou l'absence d'une altération activatrice de la voie MAPK, l'ensemble des tumeurs présentent une activation de cette voie. Plus de 2/3 des gliomes présentent une altération activatrice de la voie médiée par la fusion génique KIAA1549-BRAF, BRAFV600E, et diverses mutations de *NF1* ou de *FGFR1*. Plus précisément dans une population pédiatrique, presque 17% des LGGs sont mutés BRAFV600E et 6,1% présentent une altération de FGFR dont 1,5% correspondent à une mutation point chaud (en anglais hotspot) de *FGFR1*.

En 2011, des chercheurs de Montréal (Canada), démontrent que la présence d'altérations activatrices de la voie MAPK dans les gliomes de bas grades et plus particulièrement dans les astrocytomes pilocytiques induisent l'OIS, *in-vitro* et histologiquement sur tumeurs fraîches de 2 cohortes indépendantes (Jacob et al., 2011). La cohorte de Montréal est composée de 52 patients avec des astrocytomes pilocytiques dont 37 avec une fusion génique KIAA1549-BRAF, 2 mutés BRAFV600E, 2 mutés KRAS et 11 sans altérations identifiées mais avec une activation aberrante de la signalisation. La majorité de ses gliomes présente (i) une activité β -galactosidase augmentée (Fig. 34A), (ii) une activité proliférative faible évaluée par un marquage de Ki67 (Fig. 34B) et (iii) une expression de p16 mais pas /peu de p53 (Fig. 34B). Au niveau transcriptomique, ces tumeurs sont caractérisées par une surexpression de *CDKN1A* (p21), *CDKN2A* (p16) et *CEBPB*, *GADD45A* et *IGFBP7*, codant pour des protéines ou facteurs de transcription impliqués dans la réponse au stress (Fig. 34C).

A



B

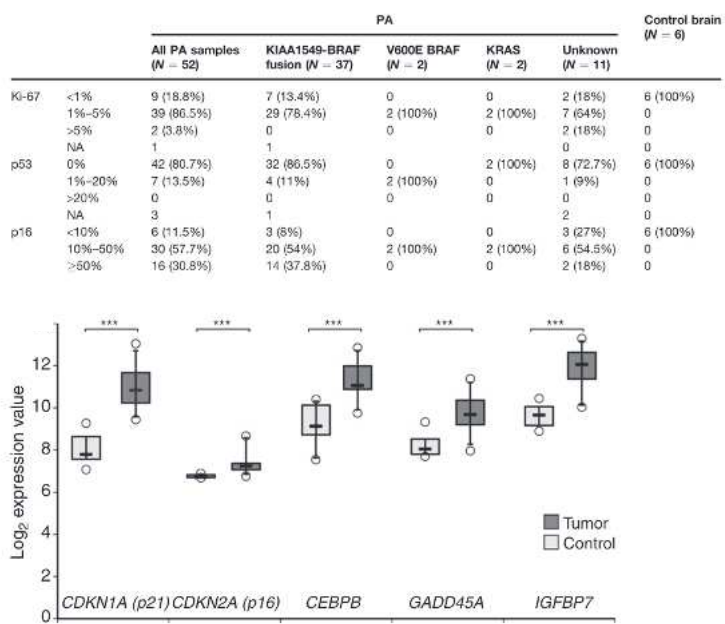


Figure 34 : OIS dans les astrocytomes pilocytiques sporadiques

(A) Évaluation de l'activité β -galactosidase sur astrocytomes pilocytiques primaires frais. Les contrôles négatifs correspondent à des lignées astrocytaires immortalisées (NHA) ou à une tumeur fraîche ou une lignée cellulaire dérivée d'un glioblastome pédiatrique (respectivement GBM et SF188). (B) Récapitulatif des résultats par IHC sur 52 astrocytomes pilocytiques *versus* cerveaux contrôles : niveau de Ki-67, marquage nucléaire p53 et marquage de p16. (C) Niveau d'expression de différents gènes dans les astrocytomes pilocytiques *versus* cerveaux contrôles. (Jacob *et al.*, 2011).

En parallèle, ils démontrent aussi *in-vitro* que l'expression de BRAF sauvage accrue ou BRAFV600E dans deux lignées cellulaires astrocytaires immortalisées induit l'OIS, suggérant que la suractivation de la voie MAPK serait à l'origine de l'OIS. Ces résultats sont ensuite validés par une seconde étude dirigée par Pfister qui démontrent que les astrocytomes pilocytiques sont caractérisés par une activation aberrante de la voie MAPK conduisant à l'OIS (*the International Cancer Genome Consortium PedBrain Tumor Project et al.*, 2013). À noter qu'en général, les astrocytomes pilocytiques sont mono-altérés sur le plan génomique. La communauté scientifique pose l'hypothèse que c'est l'OIS qui est à l'origine de la nature bénigne des astrocytomes pilocytiques. En effet, la sénescence semble dans les astrocytomes pilocytiques antitumorale par une action de prévention contre la transformation maligne. En effet, les astrocytomes pilocytiques ne progressent que très rarement vers des gliomes de plus hauts grades. Cette hypothèse semble se valider avec l'étude récente de Buhl *et al.* 2018 qui démontre la présence de SASP médiées par IL1B dans les astrocytomes pilocytiques (Buhl *et al.*, 2018). Il est possible que le SASP participe au maintien de l'OIS antitumoral. Le microenvironnement dans une tumeur est déterminant dans le développement tumoral. Il existe des différences significatives d'infiltration de cellules

immunitaires entre les astrocytomes pilocytiques (LGG) et les glioblastomes (HGG) en termes de proportions et types cellulaires (Yang et al., 2011). Il est possible que la différence immunologique soit associée au microenvironnement des astrocytomes pilocytiques instaurés par le SASP.

Lors de mes recherches bibliographiques, je n'ai pas trouvé de publications reliant directement une mutation point chaud de *FGFR1* et l'OIS au sein des LGGs. Cependant, plusieurs observations laissent à penser qu'un lien existe. Il est reconnu dans la communauté scientifique que des altérations de *FGFR3* ou *FGFR2*, suractivant la signalisation MAPK, induisent l'OIS (Ota et al., 2009; Krejci et al., 2010). La mutation *FGFR2S252W* consiste en la substitution de la sérine par tryptophane en position 252. Ce variant augmente l'affinité du ligand au récepteur induisant une activation de la voie MAPK, même en condition très limitante de ligand, mimant une activation constitutive (Anderson, 1998). La seconde mutation est *FGFR2K659E* est prédite comme constitutivement activatrice du récepteur (Ota et al., 2009). L'expression de ces deux mutations dans des fibroblastes murins ou humains a induit l'OIS. Cette sénescence comprend une augmentation de l'activité β -galactosidase et est médiée par les deux voies $p16^{\text{INK4a}}/\text{Rb}$ et/ou $p53/p21^{\text{CIP1}}$. L'activation aberrante de la voie MAPK via une liaison excessive de *FGF1/2-FGFR1* dans divers types cellulaires conduit à une sénescence prématurée médiée par l'axe $p53/p21$ (Jung et al., 2016). Les chercheurs ne font aucune mention du niveau d'expression de $p16$ à tous niveaux. Cette étude ne démontre pas spécifiquement le développement d'OIS en réponse à l'induction de *FGFR1* par une mutation point chaud mais tend à supposer que cela est possible. En effet, le phénotype suractivé de la voie MAPK est le même que ce soit *via* une mutation point chaud de *FGFR1* ou alors une liaison excessive *FGF1/2-FGFR1*. Aux vues des solides démonstrations *in-vitro* et sur tissus frais, il est très plausible sur le fait que la suractivation de la voie MAPK, induite par *FGFR1N546K* au sein de LGGs, conduise à l'OIS.

3. Concepts de l'oncogénèse

3.1. Cellule d'origine et modèles de l'oncogénèse

3.1.A Cellule d'origine et cellules souches cancéreuses

Un cancer est le résultat d'une prolifération cellulaire hétérogène et incontrôlée à partir d'une ou plusieurs cellules altérées mais unique à l'origine (Parsons, 2018). En effet, l'initiation d'un cancer peut être à l'origine de la multiplication cellulaire à partir d'une cellule altérée (monoclonale) ou deux ou plusieurs cellules altérées distinctes (multi- ou polyclonale) (Fig. 35).

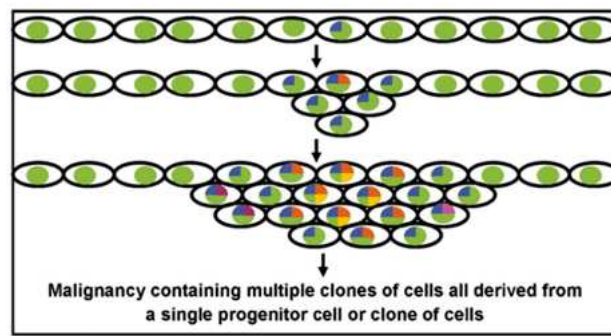
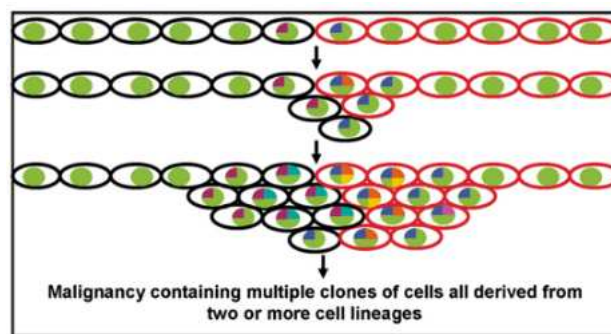
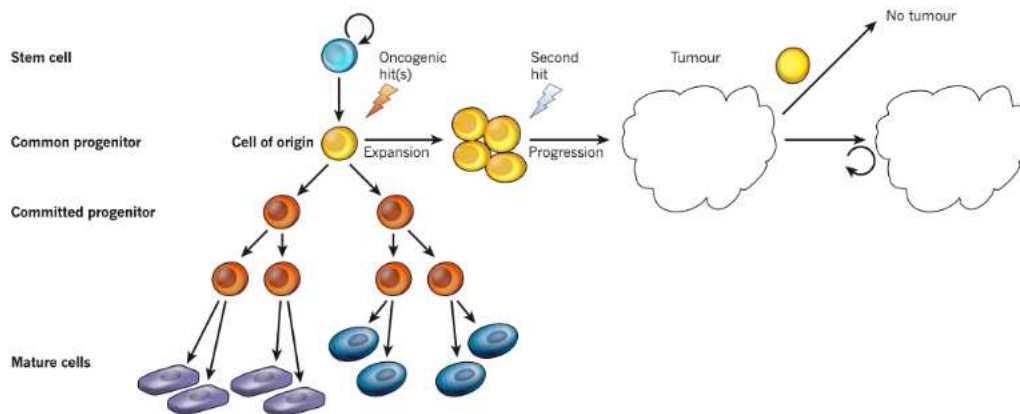
A**B****C**

Figure 35 : Évolution tumorale : de la cellule d'origine à la cellule souche cancéreuse

Un cancer peut avoir une origine monoclonale (A) ou multiclonale (B) (Parsons, 2018). C En condition physiologique, les types cellulaires sont en général hiérarchisés. Les cellules souches s'autorenouvellent et génèrent des progéniteurs qui se différencient progressivement pour donner des cellules différenciées matures. Une première altération initiatrice peut survenir dans un progéniteur et l'accumulation d'une seconde ou plusieurs autres altérations génétiques ou épigénétiques peuvent mener à l'émergence d'une cellule souche tumorale. La cellule souche cancéreuse est capable de reformer la tumeur alors que la cellule d'origine, où le premier hit a eu lieu, ne peut pas. Il est possible dans certains cas que la cellule d'origine soit directement une cellule souche cancéreuse après l'apparition d'un premier hit (Visvader, 2011).

Quelques types tumoraux pourraient avoir une origine polyclonale comme le montre les travaux de Cooper sur le cancer de la prostate ou (the ICGC Prostate Group *et al.*, 2015; McGranahan and Swanton,

2017). Les DMG H3K27M semblent ne pas être concernés par une origine polyclonale. En effet, la fréquence allélique de la mutation H3K27M est toujours la plus élevée parmi l'ensemble des variants mutationnels de la tumeur lors des séquençages et les analyses de séquençages à l'échelle d'une cellule, ce qui corrobore avec une origine monoclonale (Filbin *et al.*, 2018). L'ensemble des concepts de l'oncogenèse que nous verrons au sein de cette dernière partie concernera uniquement les tumeurs à origine monoclonale.

La cellule normale où est apparue la première altération protumorale est appelée « cellule d'origine » (Visvader, 2011). Cette cellule d'origine n'est pas une cellule souche cancéreuse (CSC) ou tumorigénique (Visvader, 2011). Une CSC se définit par i) sa capacité à redévelopper la tumeur dans une souris immunodéprimée même avec très peu de cellules ii) à être isolée parmi une population cellulaire mixte normale et tumorale, basée sur des marqueurs biologiques spécifiques iii) la capacité de recréer l'hétérogénéité de la tumeur primaire (Visvader and Lindeman, 2012). La proportion en CSC diffère en fonction de l'entité tumorale et peut varier de quelques cellules pour les cancers pancréatiques ou pulmonaires à la grande majorité comme pour certaines tumeurs cérébrales (Ishizawa *et al.*, 2010; Filbin *et al.*, 2019). Les CSC apparaissent comme complexes et plastiques. Certaines CSC peuvent entrer en quiescence en réponse à une thérapie (Talukdar *et al.*, 2019). On dit alors que la tumeur entre en dormance. Ces cellules dormantes peuvent ensuite être réactivées et être à l'origine de récurrence, même plusieurs années après thérapie. Le phénotype des CSC peut aussi être réversible en réponse à une pression médicamenteuse ou micro-environnementale. Par exemple, les mélanomes BRAFV600E peuvent développer une résistance adaptative et réversible à l'inhibition de BRAFV600E via un jeu d'entrée-sorties de sénescence (réversible en condition pathologique) (Sun *et al.*, 2014).

Malgré la présence d'auto-renouvellements et de différenciations cellulaires chez les CSC, cela ne signifie pas obligatoirement que la cellule d'origine de l'oncogenèse soit issue d'une cellule souche même si l'hypothèse de celle-ci est très souvent privilégiée. La cellule transformée peut aussi être un progéniteur déjà engagé dans un lignage comme les cellules progénitrices oligodendrogiales (OPC) pour les DIPG (Filbin *et al.*, 2018). En effet, la cellule primitive possède déjà une capacité d'auto-renouvellement et une longévité importante, permettant à la cellule d'acquérir les mutations indispensables à l'oncogenèse (Visvader, 2011). Néanmoins, n'importe quelle cellule avec une activité proliférative peut être à l'origine d'un cancer à partir du moment où les altérations accumulées au cours de l'oncogenèse permettent de (ré)acquérir une capacité d'auto-renouvellement et un arrêt de différenciation. Par exemple, une cellule progénitrice voire différenciée, issue de la différenciation d'une cellule souche, peut retrouver par dédifférenciation des capacités souches tumorales en réponse à une rupture homéostatique (Dufour *et*

al., 2009; Visvader and Lindeman, 2012). Attention, dans les cas de plasticité phénotypique ou de dédifférenciation (comme décrit ci-dessus) de la cellule d'origine lors du processus néoplasique, alors celle-ci pourrait ne plus ou seulement en partie présenter les marqueurs de lignages et/ou les signatures géniques de la cellule normale dont elle est dérivée.

Il existe deux stratégies majeures, basées sur des modèles *in-vivo* génétiquement modifiés, pour étudier la cellule d'origine des cancers (Visvader, 2011; Rycaj and Tang, 2015). La première repose sur l'expression conditionnelle d'une ou plusieurs altérations *in-vivo* dans des types cellulaires précis grâce à des promoteurs « tissu-spécifiques » c'est-à-dire dont l'expression du transgène est conditionnée à un type cellulaire. Cette stratégie peut être limitante s'il n'existe aucun promoteur spécifique identifié pour le type cellulaire ciblé. Cette stratégie a été utilisée pour l'étude de la cellule d'origine du glioblastome (Holland *et al.*, 2000). En effet, l'activation combinée de RAS et AKT dans les cellules progénitrices neurales ciblées via un promoteur spécifique aux cellules neurales au sein de souris a été à l'origine d'un développement tumoral avec les caractéristiques histologiques d'un glioblastome. La seconde approche consiste en : i) une modification génétique d'une population cellulaire précise et homogène *ex-vivo* afin d'exprimer l'altération étudiée et ensuite en ii) une greffe orthotopique des cellules dans les souris afin d'évaluer la capacité à initier un cancer. Cette approche a permis d'identifier les cellules d'origines de sous-type de leucémies (Krivtsov *et al.*, 2013). L'avancée technologique de cette dernière décennie offre une nouvelle stratégie pour l'identification de la cellule d'origine des cancers basée sur des études génomiques sur cellule unique : transcriptome, épigénome, architecture de la chromatine (Jessa *et al.*, 2022). La comparaison des profils génomiques intégrés entre les cellules normales et les cellules tumorales permet ainsi d'identifier /d'avoir une piste sur la cellule d'origine. Cette stratégie nécessite une connaissance avérée des types cellulaires normaux, par exemple la connaissance des différents types cellulaires impliqués dans le développement du système nerveux central afin de déterminer la cellule d'origine d'un gliome. Les organoïdes développés à partir des cellules de patients prédisposés au cancer ont pu être utilisées pour découvrir la cellule d'origine des tumeurs dans la sclérose tubéreuse de Bourneville (Eichmüller *et al.*, 2022).

L'identification de la cellule d'origine d'un cancer pourrait avoir des implications thérapeutiques assez conséquentes (Visvader, 2011; Zong, Parada and Baker, 2015). À l'avenir, il est possible que des approches préventives ou alors précoces, afin de reverser un phénotype, soient développées dans le but d'une meilleure prise en charge thérapeutique du patient. La rechute tumorale à partir d'un clone pré-malin, proche de la cellule d'origine, pourrait être monitorée si des marqueurs de la cellule d'origine sont identifiés. L'étude des CSC est aussi un axe de recherche important afin de développer des

combinaisons thérapeutiques optimales afin d'éliminer à la fois les CSC et les non-CSC et d'éviter l'émergence de résistances.

3.1.B Hétérogénéité intratumorale

L'hétérogénéité intratumorale a initialement été identifiée par histologie et plus tardivement avec l'émergence des techniques génomiques à hauts débits.

Modèle stochastique d'évolution clonale

Le développement tumoral s'est modélisé, historiquement, par la capacité de chaque cellule cancéreuse d'une population clonale (patrimoine génétique et épigénétique identique entre cellules) à être tumorigénique. C'est ce que Nowell et ses collègues ont appelé le modèle stochastique de l'évolution clonale (Fig. 36A) (Nowell, 1976). Ainsi, l'hétérogénéité intratumorale se traduisait par l'acquisition stochastique de changements génétiques et/ou épigénétiques au sein d'un clone et qui vont être sélectionnés sous la pression de l'environnement. Cependant, ce modèle est controversé par des expériences de xéno-greffes de clones de cellules tumorales humaines dans des souris immunodéprimées (Lapidot et al., 1994). Les résultats ont démontré que toutes les cellules d'une tumeur n'ont pas la capacité de redévelopper une tumeur chez la souris et donc que seulement une partie de ces cellules est tumorigène.

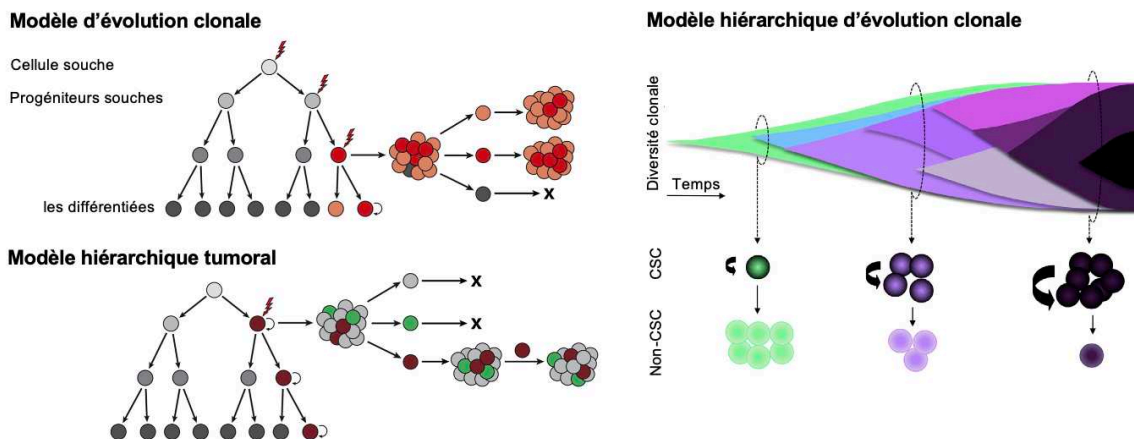


Figure 36 : Modèles de l'hétérogénéité intratumorale

Le modèle d'évolution clonale est un modèle non-hiérarchique où l'ensemble des cellules sont tumorigéniques. C'est l'apparition d'un ou d'une série de hits génétiques ou épigénétiques qui va procurer un avantage prolifératif à la cellule au moment T et donc qui va être amplifié et devenir plus ou moins dominant. L'hétérogénéité provient de la diversité des cellules tumorales présentes dans la tumeur. Adaptée de (Visvader and Lindeman, 2012). Le modèle hiérarchique tumoral repose sur l'existence d'une hiérarchie où seulement une petite portion de ces cellules est tumorigène (CSC). Ces CSC génèrent de l'hétérogénéité via la différenciation cellulaire. Adaptée de (Visvader and Lindeman,

2012). Le modèle hiérarchique d'évolution clonale consiste en une unification des deux modèles précédents. L'hétérogénéité peut provenir à la fois (i) de la différenciation avec accumulation d'altérations et (ii) de l'expansion clonale formant des sous clones qui peuvent accumuler aussi des mutations et former une nouvelle hiérarchie de CSC. Seules les cellules avec des altérations qui procurent un avantage sélectif seront maintenues. (Kreso and Dick, 2014).

Modèle hiérarchique tumoral

Vingt années plus tard avec les avancées de la biologie moléculaire, un second modèle fait son apparition et repose sur une hiérarchie tumorale (Fig. 36B). En effet, au sein de la tumeur co-existent des CSC et de multiples cellules tumorales différenciées dérivées des CSC non tumorigènes issues de divisions symétriques et asymétriques (Fig. 37) (Lathia et al., 2011). À l'opposé du premier modèle, l'hétérogénéité tumorale s'explique uniquement par la capacité des CSC à générer de l'hétérogénéité via la différenciation cellulaire et l'acquisition d'autres anomalies génétiques.

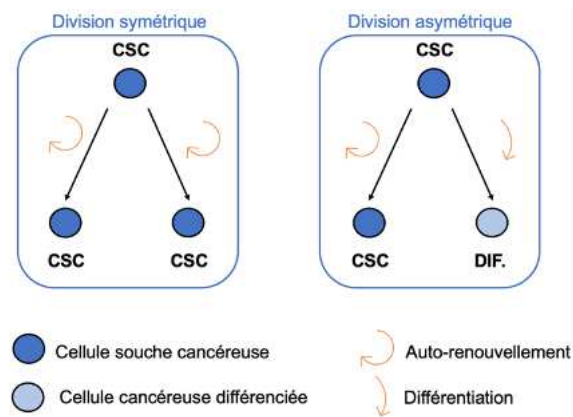


Figure 37 : Divisions symétriques et asymétriques des cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses (CSC) peuvent effectuer deux types de division cellulaire : symétrique permettant l'auto-renouvellement du pool de CSC et asymétrique permettant le maintien du pool de CSC et la différenciation cellulaire. (Adaptée de (Lathia et al., 2011)).

Modèle hiérarchique d'évolution clonale

Finalement, il semble que les deux modèles participent en concert à expliquer comment une tumeur évolue (Fig. 36C). En effet, la diversité intratumorale peut provenir de l'expansion de CSC avec acquisition d'altérations formant des sous clones comme décrit dans le premier modèle. Cependant, l'hétérogénéité peut aussi provenir de la différenciation des CSC et des sous clones avec accumulations de mutations comme souligné dans le modèle précédent.

3.1.C Hétérogénéité intertumorale

L'hétérogénéité intertumorale consiste en la diversité entre les tumeurs issues d'un même organe mais de patients différents. Les tumeurs peuvent différer à tous les niveaux : le type (diffus, circonscrit...), la composition (types cellulaires, proportions de CSC...), les altérations (génétiques, épigénétiques, métaboliques...), le profil épigénétique, transcriptomique et autres. À ce jour, deux mécanismes ont été conceptualisés afin d'expliquer la différence intertumorale.

Modèle d'acquisition d'altérations génétiques /épigénétiques

L'hétérogénéité intertumorale peut s'expliquer par l'acquisition de différentes altérations génétiques ou épigénétiques au sein d'une même cellule d'origine qui va engendrer des phénotypes tumoraux différents (Fig. 38A) (Visvader, 2011).

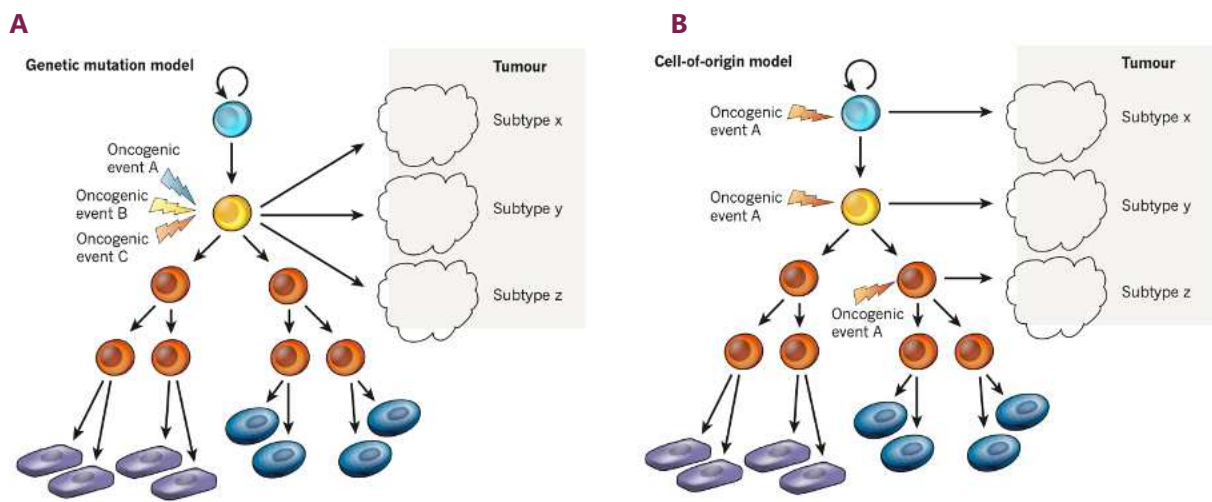


Figure 38 : Modèles de l'hétérogénéité intertumorale

(A) Modèle d'acquisition d'altérations génétiques /épigénétiques. L'hétérogénéité entre tumeurs et donc le phénotype tumoral est déterminé par les conséquences de la /les altérations génétiques /épigénétiques. (B) Modèle de la cellule d'origine. L'hétérogénéité est une conséquence de la cellule d'origine où a été initiée la tumorigenèse et non de(s) altérations acquises. (Adaptée de (Visvader, 2011)).

Modèle de la cellule d'origine

À l'inverse, une cellule d'origine tumorale différente mais avec la même altération génétique ou épigénétique peut engendrer des sous-groupes tumoraux différents (Fig. 38B) (Visvader, 2011). Par exemple, la surexpression de *EZH1P* dans la cellule d'origine des épépendymomes ou des DMG engendre deux entités tumorales distinctes avec des profils cliniques et moléculaires spécifiques (Castel *et al.*, 2020). Et vice et versa, puisque la mutation H3K27M est aussi rencontrée dans un petit pourcentage

d'épendymomes de la fosse postérieure comme montré récemment (Mariet *et al.*, 2022). En effet, le profil de méthylation de l'ADN des DMG diffère de celui des épendymomes malgré la même altération initiatrice. Pour rappel, le profil de méthylation de l'ADN correspond à la combinaison du profil de la cellule d'origine et de l'impact de l'oncogenèse. Attention, les deux modèles décrits ci-dessus ne sont pas exclusifs (Ferone *et al.*, 2020).

Il faut noter que le microenvironnement ou stroma, région locale comprenant les composants cellulaires et non cellulaires, peut aussi jouer un rôle dans le développement tumoral et être à l'origine de la diversité intertumorale (Tlsty and Coussens, 2006). Plus précisément, le microenvironnement comprend les interactions entre cellules tumorales et non tumorales (fibroblastes, cellules immunitaires...), la matrice extracellulaire et le métabolisme local (hypoxie, pH, métabolites comme le D-2-hydroxyglutarate dans les gliomes IDH1 mutés ; mais aussi, les molécules sécrétées et l'architecture des vaisseaux sanguins et lymphatiques). Par exemple, le processus métastatique des cancers du pancréas est dépendant des signaux moléculaires extracellulaires HGF et IGF-1 médiés par les cellules du stroma (Rucki *et al.*, 2017). Second exemple, le développement des glioblastomes est lié à la communication et la manipulation des cellules normales du microenvironnement ce qui favorise la progression tumorale et la résistance aux thérapeutiques (Broekman *et al.*, 2018).

3.2. Interactions oncogéniques

Les types de mutations

Chaque tumeur est caractérisée par une charge mutationnelle qui varie en fonction de l'âge du patient et du type de cancer (Chalmers *et al.*, 2017; ICGC PedBrain-Seq Project *et al.*, 2018). Les tumeurs pédiatriques se caractérisent par une charge mutationnelle plus faible avec une médiane 0,13 mutation par mégabase alors que chez l'adulte, la médiane est 10 fois supérieure, de l'ordre de 1,8 mutations par mégabase. Chaque mutation n'a pas le même impact sur le développement tumoral. En effet, seules quelques mutations appelées « conductrices » sont responsables du phénotype tumorigène (El Tekle *et al.*, 2021). Plus particulièrement, ces mutations sont impliquées dans le maintien tumoral jusqu'à l'expansion métastatique. L'ensemble des gènes du cancer sont généralement classés en deux groupes : 1) les gènes suppresseurs de tumeurs et 2) les proto-oncogènes. Les gènes suppresseurs de tumeurs codent pour des protéines impliquées dans la prévention du développement tumoral. En effet, ces protéines peuvent être la cible d'altérations inactivatrices ou à effets dominants négatifs (mutations ou délétions) et donc ne pourront plus remplir leur rôle antitumoral. Les proto-oncogènes sont des gènes codant pour des protéines qui favorisent la croissance tumorale lorsqu'elles sont altérées. L'activation

de ces protéines peut être causée par des mutations, des amplifications de gènes ou des fusions géniques par translocation chromosomique.

En contrepartie, toutes les mutations délétères qui ne sont pas conductrices sont appelées par défaut « passagères » (*Stratton, Campbell and Futreal, 2009*). En effet, la tumeur acquiert au cours du temps d'autres altérations aléatoires par division cellulaire qui n'interviennent pas directement dans la tumorigenèse. La quantité de ces mutations peut varier en fonction de la stabilité génomique de la cellule. Le rôle de ces mutations est très variable (*Kumar et al., 2020*). Historiquement, ces mutations ont été classées comme « neutres », sans conséquence sur la tumeur, mais de plus récentes études démontrent des impacts pro- et antitumoral selon le contexte (*Roche-Lestienne et al., 2002; Castro-Giner, Ratcliffe and Tomlinson, 2015; McFarland et al., 2017; Kumar et al., 2020*). Kumar et ses partenaires ont étudié l'impact des mutations passagères dans plus de 2500 cancers et proposent la classification suivante : il existe des mutations passagères à « faible impact » c'est-à-dire avec une sélection clonale neutre. Ces mutations n'apportent aucun avantage ou désavantage à la tumorigenèse. En parallèle, il existe des mutations passagères « avec impact » qui peuvent être (i) des mutations dites « faiblement conductrices » ou (ii) « délétères ». Les mutations faiblement conductrices procurent un faible avantage tumoral généralement par l'augmentation d'une des 10 caractéristiques générales des cancers (e.i. résistance à la mort cellulaire, réplication illimitée...) (Hanahan and Weinberg, 2011). L'inhibition sélective de ces variants ne procure pas une inhibition tumorale majeure et ne peut être suffisante en monothérapie. Les mutations délétères, au contraire, freinent la progression tumorale et sont négativement sélectionnées au cours de la tumorigenèse. La quantité de mutations passagères est délétère aussi. En 2017, MacFarland et ses collègues démontrent *in-vitro* et *in-vivo* qu'un niveau trop élevé de mutations passagères diminue significativement la prolifération cellulaire /croissance tumorale (*McFarland et al., 2017*). Ces expériences démontrent que l'instabilité génomique menant à l'accumulation d'altérations passagères est une épée à double tranchant pour la tumeur, car d'un côté l'accumulation d'altérations peut promouvoir l'émergence de mutations conductrices ou passagères, faiblement conductrices, mais aussi une quantité importante de mutations passagères délétères.

La classification d'une mutation comme conductrice ou passagère est dynamique. En effet, une mutation passagère peut devenir conductrice et /ou redevenir passagère selon le contexte. Les glioblastomes sont très génétiquement très hétérogènes et peuvent donc développer des résistances innées à des traitements seulement par sélection d'un clone, initialement avec une mutation passagère, qui va devenir conductrice le temps de la période de traitement (Osuka and Van Meir, 2017).

L'épistasie positive

Une « interaction oncogénique » se définit par la réaction réciproque de deux altérations géniques, souvent conductrices impliquées dans le processus tumoral. On peut aussi parler d'épistasie, forme d'interaction entre deux gènes pouvant affecter un phénotype. Les interactions oncogéniques sont classées en deux catégories : épistasie positive ou négative (Fig. 39) (El Tekle et al., 2021).

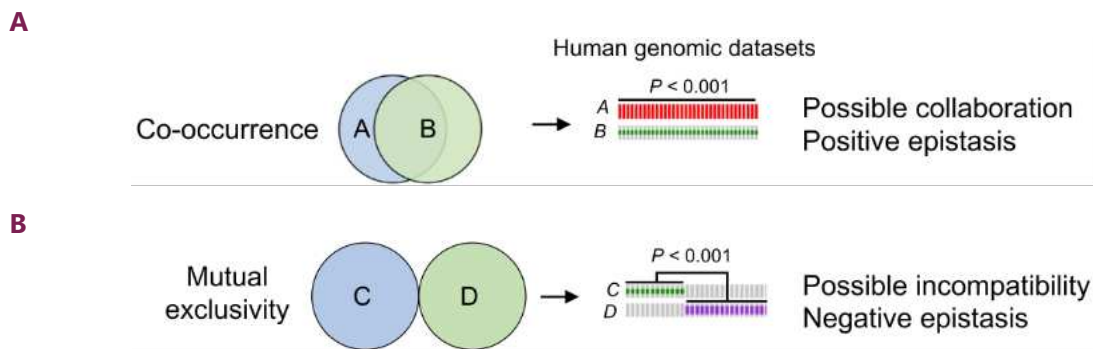


Figure 39 : Description des deux types d'interactions oncogéniques

Représentations schématiques du profil génomiques de multiples tumeurs lorsque deux mutations sont dites « co-occurentes » (A) ou « mutuellement exclusives » (B). La co-occurrence de deux variants souligne une possible collaboration soit une épistasie positive entre les deux mutations dans le processus tumorigénique alors que deux mutations mutuellement exclusives questionnent d'une possible incompatibilité, épistasie négative (Adaptée de (El Tekle et al., 2021).

Une épistasie positive signifie que l'interaction entre deux gènes altérés conforte une synergie /coopérativité dans le processus oncogénique. Ce type d'interactions est identifiable selon le pattern mutationnel. En effet, ces mutations vont avoir une fréquence associée plus élevée que la co-occurrence de ces deux mutations aléatoirement (Fig. 39A). Usuellement, la co-occurrence de deux mutations dans des gènes moteurs active des signalisations oncogéniques collaboratives (El Tekle et al., 2021). Par exemple, la co-occurrence des mutations *KRAS* et *TP53* au sein des tumeurs du poumons définit à elle seule un sous-type tumoral et souligne donc une collaboration indispensable dans le développement tumoral (Skoulidis et al., 2015). Cette association semble aussi être fréquente dans d'autres types tumoraux comme celui du pancréas (Datta et al., 2022). En effet, la co-altération de *KRAS* et *TP53* au sein de tumeurs du pancréas aggrave la survie comparée à celle des patients dont les tumeurs sont mono-altérées *TP53* ou *KRAS*. Un second exemple d'épistasie positive concerne les LGGs. Les tumeurs glioneuronales formant une rosette sont souvent caractérisées par une mutation activatrice de *FGFR1* et par la co-occurrence de mutations activatrices de *PI3KCA* et /ou inactivatrices de *NF1* (Sievers et al., 2019). Ces observations soulignent que les signalisations cellulaires MAPK et PI3K/AKT fonctionnent en synergie dans le développement tumoral de certains gliomes.

L'épistasie négative

Une épistasie négative signifie que l'interaction entre deux gènes altérés induit un désavantage dans le processus tumoral. Ce type d'interaction peut aussi être identifiable via le pattern mutationnel. En effet, ces mutations vont avoir une fréquence associée moins élevée que la co-occurrence des deux mutations aléatoirement (Fig. 39B). Deux possibilités existent afin d'expliquer la quasi-absence d'association de deux mutations : la redondance fonctionnelle et l'antagonisme fonctionnel (Fig. 40) (El Tekle et al., 2021).

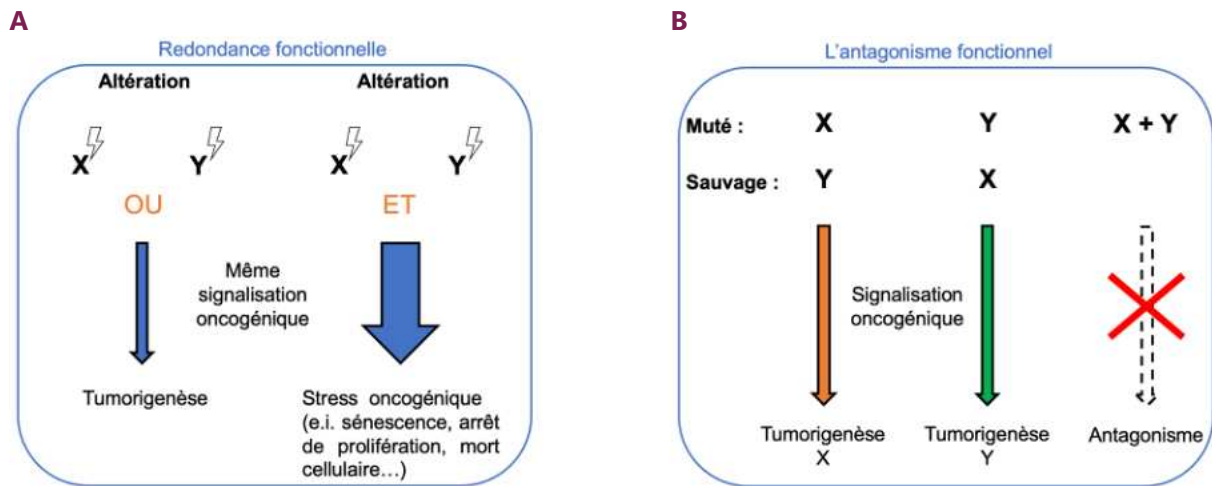


Figure 40 : Deux mécanismes à l'origine de l'exclusivité mutuelle mutationnelle

(A) Les mutations X et Y induisent le même phénotype via la même signalisation cellulaire oncogénique. Ces mutations ont donc une redondance fonctionnelle. La co-occurrence des deux mutations au sein de la cellule provoque une suractivation de la signalisation induisant un stress cellulaire délétère à la cellule (B) La mutation X induit la tumorigenèse X via la signalisation orange. La mutation Y induit la tumorigenèse Y via la signalisation verte. Les signalisations orange et verte sont antagonistes et donc les deux mutations ne peuvent se retrouver dans la même cellule. Adapté de (El Tekle et al., 2021).

La redondance fonctionnelle existe lorsque deux mutations oncogéniques induisent le même phénotype via la même signalisation. L'exemple le plus connu concerne les mutations activatrices de *NRAS* et *BRAF* qui induisent, toutes deux, une suractivation de la voie MAPK-ERK1/2. Ces deux gènes sont retrouvés mutés dans 82% (242/294) des mélanomes et mutuellement exclusives dans la totalité des cas à l'exception de deux patients (0,7%) (Edlundh-Rose et al., 2006). On retrouve exactement le même scénario avec les LGGs pédiatriques qui présentent en général une seule altération de la voie MAPK notamment avec *BRAF* altérés (Ryall et al., 2020). De même dans les gliomes associés à la neurofibromatose de type 1, où l'activation de la voie des MAPK est la conséquence de la perte de fonction du gène *NF1*, on ne retrouve presque jamais d'autres altérations susceptibles d'activer cette même voie de signalisation. Le dernier exemple concerne le mélanome et souligne que l'exclusivité mutuelle, déterminée par un test statistique, ne signifie pas exactement une impossibilité stricte de la co-occurrence de deux mutations mais indique une association négative pour le développement

tumoral (Yu et al., 2022). Les mélanomes sont souvent retrouvés mutés, mutuellement exclusifs *BAP1* ou *SF3B1* induisant des caractéristiques moléculaires et cliniques distinctes. Seuls 2/60 patients présentent cette combinaison mutationnelle. Les chercheurs de cette étude proposent un mécanisme fonctionnel à l'origine, basé sur des expériences *in-vitro* et *in-vivo*. Les deux gènes jouent un rôle dans la réparation de l'ADN mais n'affectent pas la même voie. Ainsi, la combinaison de mutations inactivatrices de *BAP1* et *SF3B1* altère totalement la capacité des cellules à réparer les dommages à l'ADN endogène issus de la réplication et d'autres processus, et conduit par conséquent à une entrée en sénescence.

L'antagonisme fonctionnel existe lorsque deux mutations oncogéniques induisent des phénotypes conflictuels /opposés dont la conséquence est très souvent létale pour la cellule. L'antagonisme fonctionnel est très peu fréquent comparé à la redondance fonctionnelle comme le montre les travaux de Ding et al. 2018 (Ding et al., 2018). L'exemple le plus connu concerne deux sous-types de cancers de la prostate, respectivement avec une mutation de *SPOP* ou avec la fusion *TMPRSS2-ERG* (Bernasocchi et al. 2021). En effet, la mutation de *SPOP* induit une augmentation de la signalisation des récepteurs aux androgènes alors que la fusion génique *TMPRSS2-ERG* induit une extinction de la voie. Au niveau moléculaire, cela est incompatible.

Intervention paradoxale

Matheus Henrique Dias et René Bernards proposent un concept de thérapie antitumorale innovante basée sur l'activation supplémentaire d'une voie de signalisation oncogénique déjà activée afin de rompre l'homéostasie des cellules tumorales et augmenter leur sensibilité à une drogue en combinaison (Fig. 41) (Dias and Bernards, 2021). Les auteurs nomment ce type d'action thérapeutique « intervention paradoxale ». En effet, plusieurs études expérimentales soutiennent ce concept notamment dans les tumeurs avec une altération activatrice d'un membre de la voie MAPK (Unni et al., 2015; Nieto et al., 2017). En conditions non traitées, ces cellules présentent un niveau basal élevé de signalisation mitogénique associé à un stress comparé aux cellules normales (Fig. 41). En conditions de stimulation de la voie MAPK (thérapie #1), les cellules tumorales ne peuvent pas contenir une aussi forte suractivation de la voie MAPK (boucle de régulation défective) ce qui induit une rupture de l'homéostasie, comme une entrée en sénescence et un stress très important. Au contraire, les cellules normales présentent une activation de la voie en réponse à la thérapie mais celle-ci est contrôlée par les boucles de rétrocontrôles fonctionnelles. Une seconde thérapie (thérapie #2) ciblant les cellules stressées peut être combinée dans le but d'éliminer sélectivement les cellules stressées (uniquement tumorales) comme l'utilisation des sénolytiques sur les cellules sénescents.

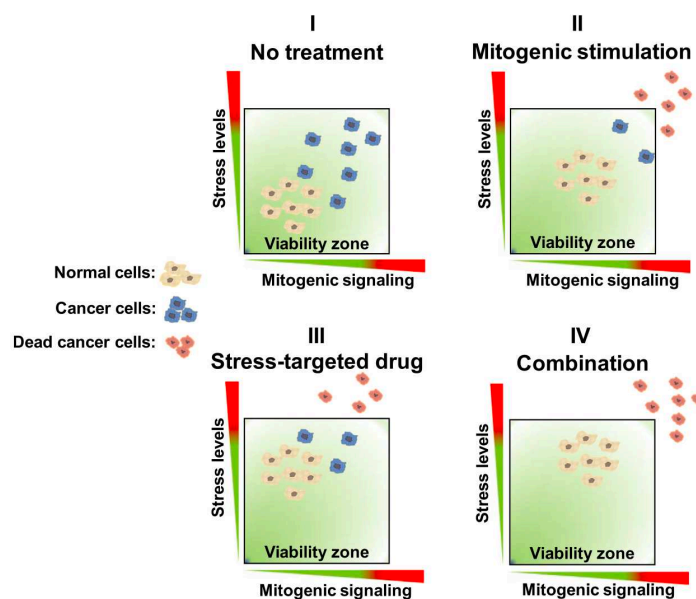


Figure 41 : Modèle d'intervention paradoxale comme thérapie antitumorale

En condition non traité (I), les cellules tumorales présentent une signalisation mitogénique et un stress associé à une hétérogénéité plus élevée inhérent à la tumorigenèse comparée aux cellules normales. En condition de stimulation mitogénique (II), les cellules normales peuvent tamponner la stimulation grâce à un système de rétroactions négative intact et efficace. À l'opposé, les cellules tumorales présentent des rétroactions homéostatiques défectueuses, poussant une partie de ces cellules hors de la zone de viabilité et augmentant les niveaux de stress globaux. (III) Il existe des traitements ciblant les cellules stressées par augmentation du niveau de stress global fonctionnant sur le même principe que décrit précédemment. (IV) La combinaison de la stimulation mitogène et du ciblage des voies de réponses au stress devrait conduire les cellules cancéreuses vers un phénotype de stress trop important, hors de la zone de viabilité, favorisant la destruction sélective. Les cellules normales conservent suffisamment de mécanismes de rétroaction homéostatique pour survivre à ces perturbations (*Dias and Bernardis, 2021*).

3.3. Application aux DMG H3K27M

Origine développementale

Les HGGs H3K27M sont restreints spatiaux-temporellement (*Mackay et al., 2017*). Les DMG H3.1 se développent uniquement dans le tronc cérébral et touchent majoritairement les jeunes enfants. *ACVR1* et *PI3KCA* sont souvent altérés permettant, respectivement, l'activation des signalisations BMP et PI3K/AKT. À l'opposé, les DMG H3.3K27M peuvent se développer tout le long de la ligne médiane et apparaissent chez des enfants plus âgés, chez les adolescents et chez les adultes. Deux altérations sont très souvent retrouvées dont une inactivation de *TP53* et une activation de *PDGFRA* par mutation et/ou amplification. Cette restriction spatio-temporelle suggère que les DMG sont issus d'une anomalie lors du développement du SNC. Afin de mieux comprendre l'oncogenèse des DMG, il est nécessaire d'avoir quelques connaissances sur le développement du SNC et plus particulièrement l'organisation et la différenciation des différents types cellulaires. Nous allons voir succinctement les étapes clés de l'organogenèse du cerveau (Fig. 42).

Le développement du système nerveux requiert des processus cellulaires et moléculaires extrêmement complexes et strictement réglementés (Fig. 42) (Silbereis et al., 2016). Les gènes homéotiques, dont les gènes appartenant à la famille *HOX*, sont responsables de l'orchestration de la mise en place des différentes structures : cellules, tissus, organes et membres selon l'axe antéro-postérieur (tête-pied). Ces gènes fonctionnent par colinéarité spatiale, c'est-à-dire que l'ordre des gènes *HOX* dans le génome correspond à l'ordre d'activation dans l'organogenèse.

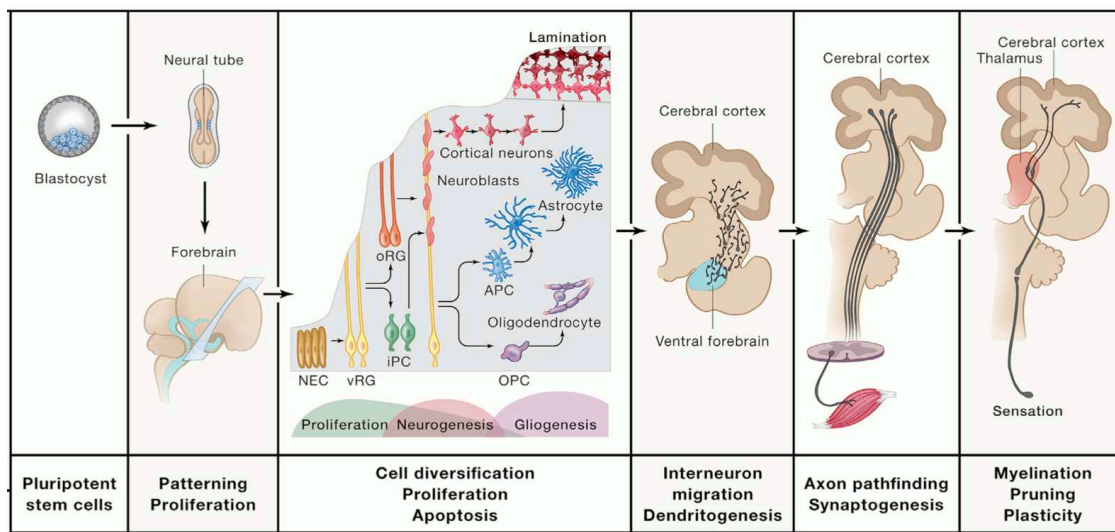


Figure 42 : Étapes clés de l'organogenèse du cerveau humain

La formation du cerveau des mammifères est hautement régulée et consiste au développement d'un système nerveux mature différencié et complexe à partir de l'amplification et différenciation de cellules neuroépithéliales (NEC) – aussi appelées cellules souches neurales (Kelley and Paşca, 2022).

La structure initiatrice est le tube neural issu du feuillet embryonnaire ectodermique par neurulation à 28-30 jours post-conception (Fig. 42) (Kelley and Paşca, 2022). Ce tube neural va ensuite progressivement acquérir une architecture organisationnelle selon un axe antéro-postérieur. L'extrémité antérieure va donner place à trois vésicules primitives qui formeront le futur cerveau : proencéphale, mésencéphale et rhombencéphale.

Dans un premier temps, le proencéphale va subir une étape de prolifération. Les cellules neuroépithéliales (NEC), ou plus communément appelées cellules souches neurales (NSC), vont fortement proliférer /s'amplifier par division symétrique afin de former un pool assez conséquent de cellules nécessaires pour la prochaine étape de diversification cellulaire.

Dans un second temps, ces cellules donnent naissance à la glie radiale ventriculaire (vRG), cellules progénitrices neurales communes aux neurones et cellules de la glie (à l'exception de la microglie, originaire du sac vitellin). Ces RG sont à la base de la seconde étape : la neurogenèse, formation des neurones. Cette étape se déroule tout au long du développement fœtal et jusqu'après la naissance dans certaines régions du cerveau. Les RG se divisent symétriquement ou asymétriquement donnant une cellule RG fille (oRG) pour la formation des cellules de la glie ou une cellule progénitrice intermédiaire (iPC), aussi appelée neurone naissant (Fig. 42). Les iPC vont se différencier en neuroblastes, cellules progénitrices des neurones. Ces neuroblastes vont migrer jusque leur zone d'accueil dans le cortex. Successivement, ces neurones primitifs vont mûrir avec la formation des dendrites, l'allongement de l'axone, la formation des synapses et la myélinisation jusqu'à devenir des neurones fonctionnels et intégrés dans le réseau du SNC.

Dans un troisième temps, la gliogenèse se met en place, formation des cellules de la glie. Les cellules filles RG peuvent se différencier en cellules progénitrices astrocytaires par division asymétrique pour former des astrocytes après maturation. Les astrocytes ont de multiples fonctions dans le SNC, centrées sur le soutien et la protection des neurones. En effet, les astrocytes participent à la régulation du microenvironnement dont la production de nutriments, le maintien de l'équilibre redox, l'absorption de neurotransmetteurs et autres (Sidoryk-Wegrzynowicz et al., 2011). Les oligodendrocytes sont des cellules supports aux neurones. Ces cellules produisent de la myéline indispensable pour la formation de la gaine de myéline entourant les axones des neurones. Cette gaine est isolante et permet d'augmenter significativement la vitesse de l'influx nerveux. Les cellules filles RG peuvent aussi se différencier en cellules progénitrices oligodendrogiales (OPC) par division asymétrique pour former après migration et maturation des oligodendrocytes fonctionnels. Les OPC sont observées lors de trois vagues de l'organogenèse dont deux pendant le développement fœtal et une dernière après la naissance. Une première vague de production des OPC est originaire du proencéphale ventral (partie proche du notochorde, structure embryonnaire primitive à la colonne vertébrale) (Kessaris et al., 2006; van Tilborg et al., 2018). La seconde vague d'apparition des OPC dérive du proencéphale dorsal et, en condition physiologique, remplace les OPC de la première vague. La dernière vague a lieu après la naissance et son origine n'est pas claire.

La production des neurones, des astrocytes et oligodendrocytes lors du développement du SNC comporte diverses étapes de prolifération, différenciation et migration. Ces étapes sont strictement régulées par diverses voies de signalisation et facteurs de transcription. Une anomalie génétique

/épigénétique au sein d'une cellule au cours de cette période embryonnaire pourrait suffire à une rupture homéostatique et contribuer à une initiation tumorale.

H3K27M, mutation initiatrice non transformante

Pour rappel, la mutation K27M de l'histone a toujours la fréquence allélique la plus élevée au sein des DMG (à une exception avec une mutation de *TP53* avec perte d'hétérozygotie de l'allèle sain), présupposant un rôle initiateur dans l'oncogenèse des DMG. De manière surprenante, la mutation H3K27M à elle seule n'est pas transformante *in-vitro* comme cela a été montré par de multiples études (Lewis et al., 2013; Funato et al., 2014; Koncar et al., 2019; Larson et al., 2019). En effet, l'expression de H3.3K27M *in-vitro* au sein des NSC provenant du proencéphale induit une perte globale de triméthylation en H3K27 et une augmentation de l'auto-renouvellement seulement sur une période restreinte (Larson et al., 2019). En effet, ces cellules avec expression ectopique de la mutation ne s'immortalisent pas et entrent en sénescence. L'apparition de la mutation H3K27M semble induire un blocage cellulaire à un stade souche, peu différencié, via un remodelage épigénétique (Filbin et al., 2018; Harutyunyan et al., 2019). Effectivement *in-vitro*, l'élimination de la mutation d'histone au sein d'un modèle de DMG *TP53* muté induit une faible expression de protéines d'acides fibrillaires gliales (GFAP en anglais pour Glial fibrillary acidic protein) en conditions de cultures souches et une très forte expression en condition de différenciation (Jessa et al., 2019). GFAP est une protéine à filament intermédiaire retrouvées dans les cellules différenciées astrocytiques et épendymales du SNC. Ce résultat souligne deux points importants. Premièrement, la mutation H3K27M conduit à un arrêt à un stade souche, corrélant avec les autres données de la littérature. Deuxièmement, l'expression de H3K27M est indispensable à la maintenance tumorale. Il n'est pas possible actuellement de déterminer dans la tumeur si le stade cellule souche est issu d'une dédifférenciation d'une cellule d'origine plutôt différenciée en une cellule souche ou alors un arrêt de la cellule d'origine à un stade souche ne permettant plus à la cellule de se différencier.

L'expression de la mutation H3K27M semble aussi activer la voie MAPK (Koncar et al., 2019; Pajovic et al., 2020). Il est possible que l'augmentation de la prolifération restreinte dans le temps observé *in-vitro* s'explique par l'activation de la voie MAPK en réponse à l'expression de la mutation. Nous avons vu précédemment que les DMG arboraient régulièrement une altération de la voie MAPK différente selon le sous-groupe : fréquemment *PDGFRA* ou plus rarement *BRAF* ou *FGFR1* chez les DMG H3.3K27M, *EGFR* chez les DMG EGFR. Cette observation laisse supposer qu'un hit activateur de la voie MAPK pourrait être nécessaire pour verrouiller l'activation de la voie MAPK et donc une prolifération indéfinie, caractéristique tumorale universelle.

In-vitro, l'expression de H3K27M semble induire une rupture de l'homéostasie au sein des NSC. Plus particulièrement, cette rupture semble être dépendante du contexte cellulaire (Funato et al., 2014). En effet, l'expression de H3.3K27M dans des cellules souches embryonniques humaines, des astrocytes humain ou dérivés de cellules souches embryonniques humaines ou des fibroblastes humains de poumons n'augmente pas la prolifération. Au contraire, dans certains cas, il peut y avoir induction de sénescence, soulignant une toxicité du phénotype induit par la mutation. Les mêmes observations sont retrouvées *in-vivo*. L'expression de la mutation H3.3K27M est létale lorsqu'elle est exprimée trop précocement au sein de modèles murins et au contraire, l'expression post-natale au sein de cellules progénitrices neurales n'induit pas de tumeurs (Pathania et al., 2017).

In-vitro la mutation H3.3K27M, combinée à une perte de fonctions de *p53* et une activation constitutive de PDGFRA, est transformante dans les cellules progénitrices neurales (Funato et al., 2014). Les cellules présentent une augmentation de la prolifération, une capacité à reformer des colonies et une résistance à la radiothérapie. *In-vivo*, la combinaison de la mutation d'histone avec la perte de *TP53*, exprimée *in-utero* pendant la neurogenèse embryonnaire est suffisante pour le développement d'une tumeur récapitulant les caractéristiques des DMG diffus au sein de souris (Pathania et al., 2017). L'addition d'une activation constitutive de PDGFRA à H3.3K27M et une perte de fonction de *p53* diminue la latence et augmente l'invasion tumorale alors que l'association avec une perte de fonction de *ATRX* induit des gliomes plus circonscrits. La combinaison de H3.1K27M avec ACVR1^{G328V} et PI3KCA^{H1047R} (toutes deux activatrices) induit aussi le développement de DMG diffus chez la souris (Fortin et al., 2020).

Ainsi, la mutation d'histone n'est pas transformante mais pourrait induire une rupture homéostatique au sein de la cellule par remodelage du paysage épigénétique (Fig. 43). Il faut noter que le transcriptome semble très peu altéré en réponse à l'expression de la mutation d'histone (Chan et al., 2013; Larson et al., 2019). Cette rupture homéostatique induite par H3K27M ou surexpression de *EZH1P* pourrait favoriser l'acquisition d'autres événements oncogéniques et, par association, transformer la cellule. En effet, les altérations de *ACVR1* ou *TP53* sont très souvent retrouvées clonales, respectivement à H3.1- et H3.3K27M ou sous-clonales mais avec une haute fréquence allélique à la mutation d'histone, ce qui est cohérent avec l'hypothèse d'un second hit indispensable à la transformation. A noter, il existe des DMG H3.3K27M où il n'y a pas de second hit identifié et donc cette hypothèse est à considérer avec précaution. Cette étape de transformation semble être dépendante du contexte cellulaire /cellule d'origine. Notamment, la cellule ne doit pas être trop indifférenciée ou différenciée, démontrée par les expériences de Pathania et al. 2017 décrites précédemment.

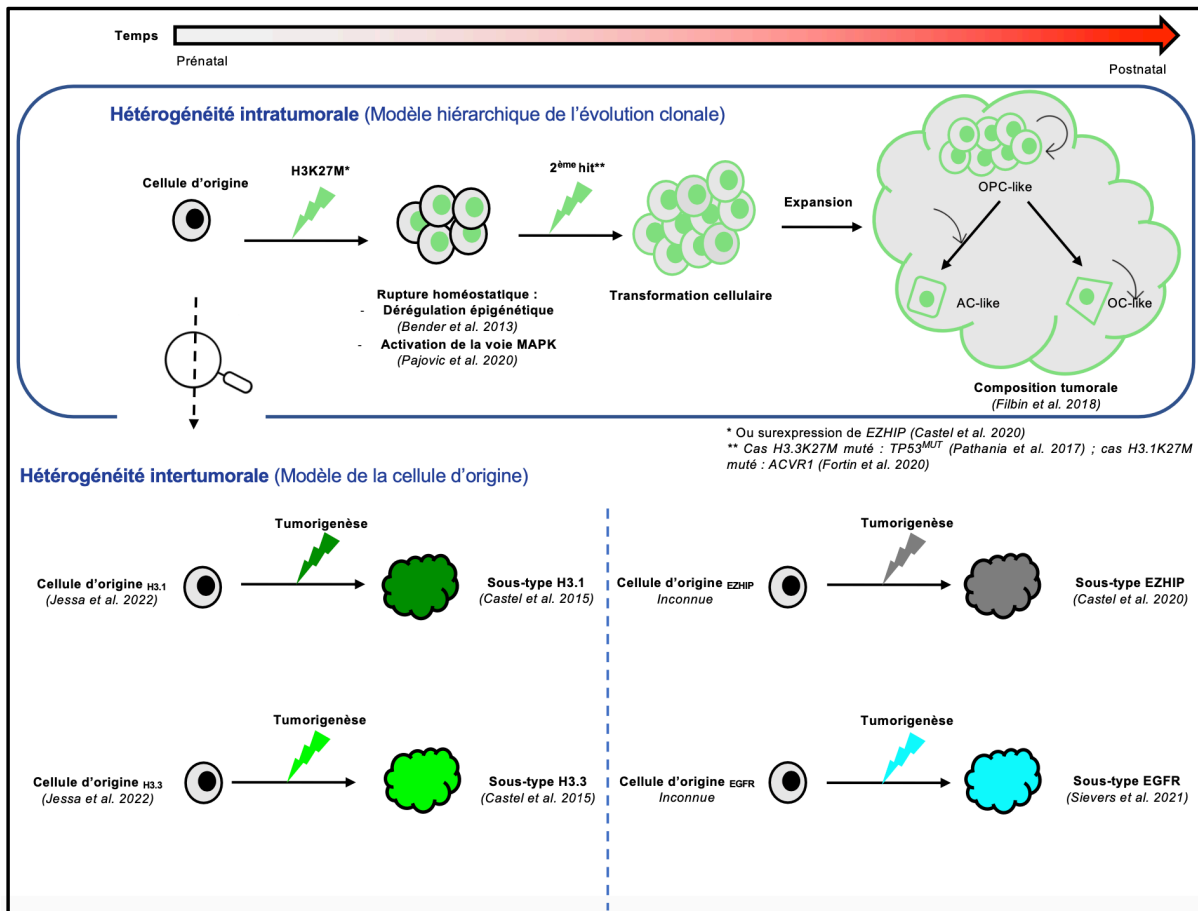


Figure 43 : Récapitulatif des connaissances sur l'oncogenèse des DMG H3K27M

L'hétérogénéité intratumorale des DMG semble être issue d'un modèle hiérarchique de l'évolution clonale où la majorité des cellules sont des OPC-like donnant par division asymétriques des cellules AC- ou OC-like. L'hétérogénéité intertumorale entre sous-types de DMG s'expliquerait par une cellule d'origine distincte induisant une oncogenèse unique avec un phénotype clinique et moléculaire associé spécifique. La cellule d'origine n'est peu ou pas connue en fonction des sous-types de DMG H3K27M-altérés. OPC, progéniteur oligodendroglial ; AC, cellule astrocytique ; OC, cellule oligodendrogliale.

Hétérogénéité intratumorale

L'étude du transcriptome à l'échelle d'une cellule a permis d'inférer sur la composition et la présence d'une hiérarchie cellulaire putative dans les DMG H3K27M (Fig. 44) (Filbin et al., 2018).

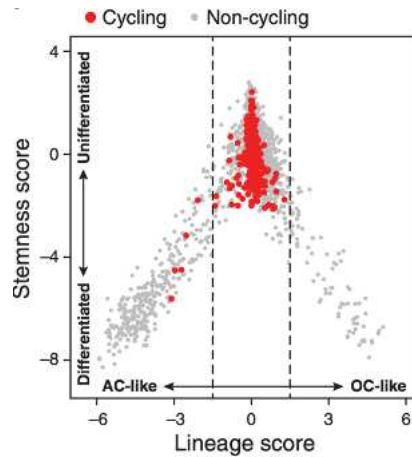


Figure 44 : Composition cellulaires des DMG H3K27M

Graphique regroupant à la fois le score souche (axe y) et lignage AC-like ou OC-like (axe x). Chaque point représente une cellule tumorale. (Filbin *et al.*, 2018). AC, cellule astrocytique ; OC, cellule oligodendrogliale.

Le RNAseq sur cellule unique a permis l'identification de trois programmes transcriptionnels similaires à : un progéniteur de cellule oligodendrogliale indifférenciée (OPC-like), une cellule différenciée astrocytique (AC-like) ou oligodendrogliale (OC-like). Chaque cellule présente un score pour chacun des trois programmes transcriptionnels. Basé sur les résultats des différents scores, la plupart des cellules cycliques semblent être des OPC-like et donc vraisemblablement s'auto-renouvellent par divisions symétriques et donnent des AC /OC-like non-cycliques par divisions asymétriques.

Parfois d'autres altérations géniques sous-clonales à la mutation d'histone sont retrouvées comme *NF1* ou *ATRX* au sein des DMG. Il n'y a pas de données exactes pour ces mutations permettant de déterminer si ces cellules sous-clonales sont issues d'un OPC-like différenciée (AC- ou OC-like) par division asymétrique ou d'un sous-clone OPC-like qui a acquis la mutation au cours d'une division symétrique. Cependant, Vinci *et al.* démontrent la présence d'une hétérogénéité intratumorale avec l'existence de plusieurs populations sous-clonales dont certaines inférieures à 1% (Vinci *et al.*, 2018). L'isolation de rares sous-clones a permis de démontrer un caractère souche à cette population et l'existence de coopérativités fonctionnelles pro-invasives entre différentes populations.

L'hétérogénéité intratumorale des DMG H3K27M paraît reposer sur le modèle hiérarchique d'évolution clonale (Fig. 45). Il semble qu'il y ait au moins une hiérarchie avec une proportion importante de cellules souches cycliques OPC-like (CSC) donnant des cellules différenciées AC-like et OC-like. D'autres sous-clones tumoraux génétiquement différents avec des propriétés de CSC semblent exister. Il est important d'étudier l'hétérogénéité intratumorale afin de comprendre, prédire et ajuster la réponse au traitement.

Hétérogénéité intertumorale

Pour rappel, nous avons vu précédemment que l'hétérogénéité intertumorale peut provenir (i) d'une cellule d'origine différente, (ii) des altérations conductrices différentes ou (iii) d'un combiné des deux. En parallèle, nous avons observé antérieurement que l'étude de la méthylation de l'ADN des DMG H3K27M a permis de séparer les DMG H3K27M selon leur profil de méthylation (*Castel et al., 2020; Sievers et al., 2021*). Cette différence pourrait s'expliquer par (i) une différence d'identité de la cellule d'origine entre les différents sous-types de DMG (ii) ou alors par un remodelage du profil de méthylation de l'ADN spécifique aux altérations conductrices /passagères : mutation H3.1-, H3.3K27M, surexpression de *EZH1P*, *TP53* ou *PDGFRA*. En effet, les DMG présentent des altérations drivers et secondaires spécifiques à chaque sous-type. La seconde option étant moins plausible car la méthylation de l'ADN est une marque épigénétique fortement impliquée dans l'identité cellulaire. L'expression de H3.1K27M dans un modèle *in-vitro* de DMG où H3.3K27M est éteint a montré une absence d'altération du dépôt et de la distribution des marques épigénétiques H3K27me2 et -me3 (*Jessa et al., 2022*). Le profil épigénétique semble se révéler plutôt dépendant de la cellule d'origine et non de la nature de la mutation conductrice.

En 2019, *Jessa et ses collaborateurs* décrivent la cinétique cellulaire et diverses signatures transcriptomiques spécifiques du développement du tronc cérébral sain chez la souris (*Jessa et al., 2019*). Ils démontrent une complexité conséquente avec de multiples stades cellulaires pour arriver à une cellule différenciée. Par exemple, 8 signatures différentes existent pour les OPC. Il est indispensable de connaître le développement normal du cerveau afin d'identifier la cellule d'origine des DMG. La découverte de la cellule d'origine peut être une opportunité thérapeutique pour identifier une vulnérabilité spécifique à ces cellules. Basées sur le profil transcriptomique, épigénétique et l'architecture chromatinienne, trois cellules d'origines différentes correspondant à des OPC anatomiquement distinctes, ont été identifiées excluant une cellule d'origine partagée migrant tout au long de la ligne médiane (*Jessa et al., 2019, 2022*). En effet, les gliomes pontiques H3.1-, H3.3K27M pontiques et thalamiques n'ont probablement pas les mêmes cellules d'origine. H3.1K27M apparaît probablement dans les cellules dérivées des premières vagues de spécification OPC, les progéniteurs ventraux dépendants de l'expression de *NKX6-1* et de la signalisation sonic hedgehog (SHH). Cette signalisation implique un morphogène, molécule qui spécifie différents types cellulaires ou régions d'un organisme en fonction de sa concentration. SHH joue un rôle primordial dans le développement du SNC et plus particulièrement la génération des neurones et oligodendrocytes. H3.3K27M affecte préférentiellement les progéniteurs dorsaux, issus des vagues de spécification des OPC plus tardives, dépendants de l'expression de *PAX* et de la signalisation BMP pour les gliomes issus du tronc cérébral. La cellule d'origine des DMG H3.3K27M thalamiques est moins précise. H3.3K27M semble se produire lors du développement du diencéphale et de la

segmentation. Les gliomes H3.3K27M pontiques et thalamiques ne semblent pas avoir la même cellule d'origine. En effet sur le plan clinique, les DMG H3.3K27M thalamiques apparaissent à un âge au diagnostic plus élevé que ceux du tronc (*Solomon et al., 2016*). Les cellules d'origines des DMG EZHIP ou EGFR sont inconnues à ce jour dû à une absence d'étude.

L'hétérogénéité intertumorale des DMG semble provenir *a minima* d'une différence au niveau de la cellule à l'origine de l'oncogénèse.

Interactions oncogéniques

Les mutations d'histones H3.1K27M et H3.3K27M ou une surexpression de *EZH1P* sont mutuellement exclusives du fait de leur redondance fonctionnelle, même si le phénotype n'est pas strictement identique (*Castel et al., 2015; Mackay et al., 2017; Kergrohen et al., 2021*).

L'association oncogénique de H3.3K27M et de la perte de fonction de *TP53* est associée à un phénotype plus agressif. En effet, les patients avec un DMG H3.3K27M *TP53^{MUT}* ont une survie significativement inférieure à la survie sans mutation de *TP53* (*Werbrouck et al., 2019*). Le programme oncogénique induit par la mutation d'histone est modulable par une mutation secondaire. Cela souligne une épistasie positive entre les deux mutations.

En 2020, Chung et ses collaborateurs démontrent *in-vitro* que l'expression transitoire des mutations H3.3K27M et IDH1R132H est létale dans des modèles de DMG (*Chung et al., 2020*). En effet, la mutation H3K27M induit un phénotype hypométhylateur de l'ADN et de H3K27 alors que IDH1R132C induit un phénotype hyperméthylateur de l'ADN et de H3K27. Cela souligne une épistasie négative entre les deux mutations.

OBJECTIFS INITIAUX DU PROJET DOCTORAL

Comme détaillé en introduction, les DMG H3K27-altérés (DMG K27) forment un type tumoral hétérogène divisé actuellement en 4 sous-types dont chacun est caractérisé par un programme oncogénique unique. Mon projet doctoral s'est fondé sur des données préliminaires du laboratoire soulignant à nouveau de l'hétérogénéité au sein du sous-type H3.3. En effet, des associations mutationnelles préférentielles à H3.3K27M semblaient corrélées avec un phénotype clinique plus ou moins agressif chez le patient (*data non publiées, Werbrouck et al. 2019 ; Pagès et al. 2015 ; Puget al. 2012*). Ainsi, il nous est apparu opportun d'étudier l'impact de ces altérations sur le programme oncogénique induit par la mutation d'histone au sein des DMG.

Plus précisément, nous souhaitons donc initialement répondre aux interrogations suivantes :

> **Quel est le portrait clinique des patients atteints de DMG en fonction des associations préférentielles de mutations : H3.3K27M et $BRAF^{MUT}$ ou $FGFR1^{MUT}$?** Dans un premier temps, nous voulions approfondir l'évaluation de la survie en fonction des différentes associations préférentielles de mutations. Les gliomes avec une mutation H3.3K27M sont de mauvais pronostics mais l'équipe au cours de ces dernières publications souligne que l'agressivité pourrait être modulée selon une altération secondaire comme $TP53^{MUT}$ avec une survie très courte ou $BRAF^{V600E}$ à l'opposé avec une survie allongée (*Pagès et al., 2018; Werbrouck et al., 2019*). La caractérisation de ce paramètre clinique est à la fois importante pour la prise en charge du patient et pour une meilleure stratification dans les essais cliniques. Pour rappel, plus de 200 essais cliniques ont été réalisés sans succès. Ainsi, nous avons pour objectif d'évaluer la survie de manière robuste au sein d'une cohorte conséquente composée de patients issus du laboratoire /collaborations et de la littérature. Dans un second temps, nous voulions intégrer la survie à un portrait clinique complet afin d'identifier de potentiel(s) marqueur(s) indépendant(s) du statut mutationnel et obtenir des informations qui pourraient aider à la compréhension de la biologie de la tumeur.

> **Pourquoi les combinaisons oncogéniques H3.3K27M $BRAF^{MUT}$ ou $FGFR1^{MUT}$ semblent être de bon pronostic ? Quel est le mécanisme biologique à l'origine de la modulation de l'agressivité tumorale ?** La première stratégie avait une visée exploratoire avec l'étude du profil de méthylation de l'ADN et du transcriptome des tumeurs primaires des patients à bons *versus* mauvais pronostics. Les buts étaient de (i) valider le diagnostic : DMG H3K27M avec une altération secondaire MAPK ou LGG $BRAF$ ou $FGFR1$ muté associé à une mutation secondaire d'histone et (ii) émettre une /des hypothèse(s)

sur le mécanisme moléculaire à l'origine de la longue survie. La seconde stratégie avait une visée plus fonctionnelle avec l'étude de la modulation (inhibition /expression) des altérations oncogéniques *BRAF* ou *FGFR1* au sein de modèles *in-vitro* de DMG. Nous souhaitons valider notre /nos hypothèses sur le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) responsables de la survie allongée.

> **La compréhension de la biologie des tumeurs à bon pronostic peut-elle être à l'origine de l'identification de vulnérabilités thérapeutiques ? Est-ce que l'identification du mécanisme à l'origine d'un bon pronostic dans un DMG pourrait donner lieu à des opportunités thérapeutiques pour les patients avec un mauvais pronostic ?** Au travers de ce projet, nous souhaitons identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour les DMG qui sont malheureusement incurables à ce jour.

Le but a été de comprendre la biologie des DMG K27 dont les patients sont caractérisés par une plus longue survie. En conséquence, le premier objectif a été de réaliser une analyse clinique et moléculaire comparative des DMG K27 à bon *versus* mauvais pronostic et le second de développer des modèles d'études *in-vitro* et *in-vivo*.

RESULTATS

L'accumulation de données cliniques et moléculaires sur les gliomes diffus de la ligne médiane avec altération de la lysine 27 de l'histone H3 (DMG K27) nous a permis de nous rendre compte que la survie de ces patients était variable alors même que l'altération initiatrice était la même. Nous avons ainsi établi que chez ces patients, une résistance primaire à la radiothérapie était expliquée par une mutation de *TP53* entraînant aussi un phénotype plus agressif et une survie plus courte (Werbrouck *et al.*, 2019). On peut ainsi considérer que les mutations de *TP53* représentent le premier marqueur pronostique identifié dans cette maladie. Mon projet doctoral se base sur l'identification des patients atteints de DMG_K27 d'évolution moins agressive afin d'identifier le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) à l'origine de la survie allongée, dans l'objectif d'identifier des altérations susceptibles d'être utilisées dans des thérapeutiques futures. En premier lieu, il est donc indispensable de différencier les patients de bons et mauvais pronostics selon leur génotype. Nous avons vu au cours de l'introduction que la mutation H3.3K27M peut-être associée à diverses altérations de la voie MAPK. En 2012, l'équipe a montré que les patients avec une amplification ou une mutation activatrice de *PDGFRA* avaient un mauvais pronostic (Puget *et al.*, 2012). Puis, l'équipe de neuropathologie de l'hôpital Sainte-Anne à Paris en collaboration avec notre laboratoire rapporte quelques patients avec des gangliogliomes de bas grades doublement mutés H3.3K27M BRAFV600E qui semblent avoir un meilleur pronostic que ceux avec des DMG simple muté H3.3K27M (Pagès *et al.*, 2018). Et pour terminer, de rares patients atteints de DMG H3K27M *FGFR1*^{MUT} suivis à Gustave Roussy semblent aussi présenter des survies plus longues qu'usuellement. Nous avons donc étudié la survie globale (OS) des patients après diagnostic selon leur génotype afin de discriminer ceux à bons ou mauvais pronostic. Pour cela, nous avons composé différentes cohortes dont les patients proviennent de Gustave Roussy/Necker Enfants Malades et de la littérature (Mackay *et al.*, 2017; Picca *et al.*, 2018; Castel *et al.*, 2020; Ryall *et al.*, 2020; Schüller *et al.*, 2021).

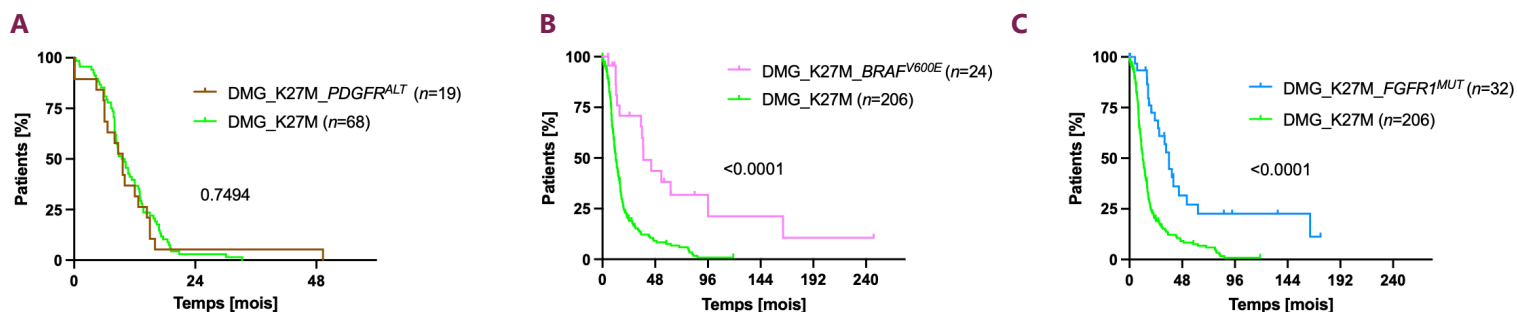


Figure R1. Survie globale des patients atteints de DMG_K27 selon la mutation secondaire
Comparaison de la survie globale des patients atteints de DMG H3.3K27M selon le statut mutationnel de *PDGFRA* (A), *BRAF* (B) ou *FGFR1* (C) selon la méthode Kaplan-Meier. ALT = altéré (amplification ou SNV) et MUT = muté (SNV).

Premièrement, nous n'observons pas de différences de survie en analyses univariées des patients atteints de DMG H3.3K27M en fonction du statut *PDGFRA* (altéré *versus* sauvage) avec des médianes, respectives, de 9,6 et 9,7 mois post-diagnostic (*test log rank, p value = 0.7494*) (Fig. 1A). L'association des altérations *PDGFRA* et H3.3K27M au sein des DMG n'influence pas la survie des patients. Deuxièmement, nous notons une augmentation significative de la survie lorsque *BRAF* ou *FGFR1* sont mutés avec des médianes de survies, respectives de 37,2 et 36 mois post-diagnostic soit 3 fois la médiane de survie des patients atteint de DMG simples mutés H3.3K27M qui est de 12 mois (*test log rank, p-value = <0.0001*) (Fig. 1B, C). Nous appellerons ces patients associés à un bon pronostic avec une altération de *BRAF* ou *FGFR1* "DMG_K27-MAPKa" (abréviation de DMG_K27, MAPK-altérés). Ces résultats corrélerent avec les données publiées et préliminaires du laboratoire avant mon arrivée.

Ces observations corroboraient nos premiers résultats : le programme oncogénique H3.3K27M pourraient être modulé par des altérations de *BRAF* ou *FGFR1*. Dans le but de comprendre la biologie des DMG_K27-MAPKa, le premier objectif a été de réaliser une analyse comparative des DMG_K27-MAPKa *versus*. DMG_K27 et le second de développer des modèles d'études *in-vitro* et *in-vivo*.

1. Caractérisation phénotypique clinique et moléculaire des DMG_K27-MAPKa

L'ensemble des résultats a fait l'objet d'un article scientifique qui est soumis pour publication. Cet article est inclus à la suite ci-dessous. Certaines parties sont manquantes car elles sont en cours d'écriture.

Ces découvertes ont été réalisées en collaboration avec la Pr Pascale Varlet et le Dr Arnault Tauziède-Espariat pour la caractérisation histopathologique, les Dr Jacques Grill et Dr Volodia Dangouloff-Ros pour les relectures radiologiques. De plus, ce travail a été réalisé avec l'aide de Yassine Ajlil et Thomas Kergrohen, ingénieurs bio-informaticiens de l'équipe, pour respectivement, les analyses de méthylation de l'ADN et de séquençage d'exome.

Title:

A new subtype of DMG, H3K27-altered with MAPK-activating co-driver mutations: clinical and molecular characterization

Author names and affiliations:

Lucie Auffret¹, Yassine Ajlil¹, Arnault Tauziède-Espariat^{2,3}, Thomas Kergrohen^{1,4}, Chloé Puisseux⁵, Laurent Riffaud⁶, Alberto Picca⁷, Mehdi Touat⁸, Marc Sanson⁸, Kévin Beccaria^{1,9}, Thomas Blauwblomme⁹, Volodia Dangouloff-Ros¹⁰, Nathalie Boddaert¹⁰, Pascale Varlet^{3,4}, Marie-Anne Debily^{1,11}, Jacques Grill^{1,2}, David Castel^{1,2}.

¹ Molecular Predictors and New Targets in Oncology, Inserm, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif, France

² Department of Neuropathology, GHU Paris-Psychiatrie et Neurosciences, Sainte-Anne Hospital, Paris, France

³ Inserm, UMR 1266, IMA-Brain, Institut de Psychiatrie et Neurosciences de Paris, Paris, France.

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

⁵ Department of Pediatric Oncology, Rennes University Hospital, Rennes, France

⁶ Department of Pediatric Neurosurgery, Rennes University Hospital, Rennes, France

⁷ Neurooncology Unit, IRCCS C. Mondino Foundation, Pavia, Italy

⁸ Sorbonne Université, Inserm U1127, CNRS UMR 7225, Institut du Cerveau, ICM, AP- HP, Hôpitaux Universitaires La Pitié Salpêtrière - Charles Foix, Service de Neurologie 2-Mazarin, Paris, France

⁹ Department of Pediatric Neurosurgery, Necker Enfants Malades Hospital, APHP, Université Paris Cité, Paris, France

¹⁰ Department of Neuroradiology, Hôpital Necker-Enfants Malades, APHP, Paris, France. Université Paris Cité, Paris, France

¹¹ Département de Biologie, Université Evry Paris-Saclay, Evry, France

Contact Information of the corresponding authors:

Drs Jacques Grill and David Castel

U981 INSERM, Team " Genomics & Oncogenesis of Pediatric Brain Tumors "

& Département de Cancérologie de l'Enfant et de l'Adolescent

Institut de Cancérologie Gustave Roussy

114 rue Édouard Vaillant, 94805 Villejuif cedex, France

Emails = jacques.grill@gustaveroussy.fr / david.castel@gustaveroussy.fr

Abstract

Diffuse midline gliomas H3K27-altered (DMG) are incurable high-grade gliomas (HGG) and represent a major challenge in neuro-oncology. This tumor type is now classified in 4 subtypes by the latest edition of the WHO Classification of the Central Nervous System (CNS) tumors. However, the H3.3K27M subgroup still appears heterogenous. Recent publications reported that rare patients presenting a co-occurrence of H3.3K27M with *BRAF* or *FGFR1* alterations tended to have a better prognosis. To better study the role of these co-driver alterations, we assembled a large pediatric and adult cohort of DMG comprising 25 new DMG patients mutated in *BRAF* or *FGFR1* and 37 previous cases from the literature. We performed a comprehensive histological, radiological, genomic, transcriptomic and DNA methylation analysis on this extended cohort. Interestingly, unsupervised t-distributed Stochastic Neighbor Embedding (tSNE) analysis of DNA methylation profiles regrouped *BRAF*^{V600E} or *FGFR1*^{MUT} DMG in a unique methylation cluster, distinct from the other subgroups of DMG. The analyses of a H3.3K27M BRAFV600E tumor at diagnosis and relapse allowed us to determine that H3.3K27M was the first event in the oncogenesis. These tumors are more frequent in the thalamus (58%) and patients are characterized by a longer overall survival with a median superior to 3 years. These gliomas harbored atypical radiological and histopathological profiles for DMG with macrocalcification and /or a more circumscribed tumor in 91% for *BRAF*^{V600E} and in 78% for *FGFR1*^{MUT} H3K27M DMG. In conclusion, DMG, H3K27-altered harboring MAPK activating mutations represent a new subtype of DMG and deserve further attention with respect to specific therapeutic challenges.

Keywords:

Pediatric-type high-grade glioma ; Adult glioma ; BRAF-V600E mutation; FGFR1 mutation ; DNA methylation profiling

Introduction

Thanks to significant advances in genomics, the 2016 then 2021 World Health Organization (WHO) Classification of Tumors of the Central Nervous System have defined tumor entities by histologic but also molecular features, like the driver genetic event [1, 2]. Diffuse Midline Gliomas (DMG) H3 K27-altered have now been identified as a new type of malignant gliomas which occur in the pediatric and adult populations, although with disparities according to the preferential location, *i.e.* brainstem in children and thalamus in adults [3, 4].

H3 K27-altered DMG are either characterized by the substitution in histone H3 of the lysine at position 27 by a methionine (H3K27M), or the overexpression of *EZH1* [5, 6] . In both case, the Polycomb Repressor Complex 2 (PRC2) is inhibited leading to by a global loss of H3K27me3 [7, 8], and major epigenetic and transcriptomic remodeling [6, 9]. According to different molecular and clinical parameters, including specific DNA methylation profiles, this tumor type is more heterogenous than initially thought justifying the classification in four subtypes: *H3-3A* K27M (H3.3), *H3C2* K27M (H3.1), H3-wildtype (*EZH1* overexpression) and *EGFR*-altered [2, 6, 10, 11]. Despite this subdivision, we still observed some heterogeneity within the H3.3 K27M subtype. We already demonstrated that *TP53* co-driver mutations are associated with a worse tumor response to radiotherapy and a poorer outcome [12] suggesting that additional molecular alterations can deeply modify the phenotype induced by the driver histone H3 mutation. Recently, two small studies showed a possible longer survival in patients with H3.3K27M *BRAF*^{V600E} midline gangliogliomas or H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} diffuse gliomas [13, 14]. *BRAF* and *FGFR1* mutations are driver mutations in low-grade gliomas specifically activating the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway [15]. In order to understand how these alterations could mitigate the prognosis of these aggressive neoplasms, we analyzed a larger pediatric and adult H3 K27M-altered cohort, comprising tumors harboring *BRAF*^{V600E} or *FGFR1*^{MUT} from previous studies and completed with 25 new cases from our center. We also did a comprehensive radiological, histological, genomic, transcriptomic and DNA methylation analysis of these 25 new cases.

Patients, materials & methods

Patients and tumor samples

The first part of the cohort is composed of 62 selected patients, diagnosed with H3K27M or *EZH1P* overexpressing-tumors harboring a coding mutation in *BRAF* or *FGFR1* genes, from published cohorts (n=37) and new cases Necker Enfants-Malades or Ste Anne Hospital /Gustave Roussy center and Biomed.1 (NCT02233049) (n=25) and [3, 6, 13–16]. The control cohort includes patients with wild-type *FGFR1/BRAF*, in the above-mentioned cohorts of H3K27M or *EZH1P*-overexpressing DMG (flowchart in Supplementary Fig.1, online resource).

Univariate and multivariate survival analyses

Overall survival (OS) was estimated with the Kaplan–Meier method and median overall survival was performed using a log-rank test. OS was obtained from the post-diagnosis until death patient or last known information. This analysis was realized in Prism9 software. Multivariable Cox proportional hazards regression model on OS was performed including H3, *BRAF*, *FGFR1*, *TP53* status, age at diagnosis and tumor location with R software using the function `coxph()` of the ‘survival’ package (Version 3.2-13).

Radiology analysis

All available radiology (CT and MRI) of patients with H3.3K27M tumors from our cohort were reviewed centrally (VDR, NB, JG) review of scans and MRIs performed at diagnosis. Parameters specifically recorded were: the radiological presentation (diffuse, nodular and diffuse, nodular/circumscribed), the presence of contrast enhancement (yes/no) and calcifications (yes/no).

Histology, immunohistochemistry (IHC)

In writing

DNA /RNA extraction & sequencing

DNA and RNA were extracted from frozen tumors using Allprep DNA/RNA kit (Qiagen). Then, DNA and RNA were quantified using, respectively, the Qubit Broad Range double-stranded DNA assay (Life Technologies) or the Qubit RNA high sensibility (Life Technologies) following manufacturer instructions. For some tumors, DNA was extracted from formol-fixed paraffin-embedded (FFPE) material sections by the dedicated department of Diagenode. Targeted DNA sequencing or whole exome sequencing was performed as previously described [12, 17]. For DMG primary tumor samples, PolyA-containing mRNA molecules were initially purified from at least 100 ng of total RNA with the Magnetic mRNA Isolation Kit

from NEB. Primary tumor libraries were then prepared following supplier recommendations with the NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (NEB). Paired-end reads of 100 bp were generated on an Illumina NovaSeq.

DNA Methylation Array Processing

Genome-wide DNA methylation analysis was performed using either the Illumina HumanMethylation450 BeadChip (450 k) or EPIC arrays (Diagenode). Data from EPIC and 450k methylation array were analyzed with R language (v4.0.4). For t-SNE (t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding) analysis, the minfi package was used to load idat file and preprocessed with function preprocess.illumina with dye bias and background correction. Probes located on sex chromosomes and not uniquely mapped to the human reference genome were removed. Probes containing single nucleotide polymorphisms or that are not present in both EPIC and 450k methylation array were also eliminated. A batch effect correction was done with removebatchEffect function from limma package, to remove difference between formalin-fixed paraffin-embedded and frozen samples. The probes were sorted by standard deviation. The 10,000 most variable probes were kept for the clustering analysis. These probes were used to calculate the 1-variance weighted Pearson correlation between samples. The distance matrix was used as input in t-SNE from Rtsne package. For the second analysis, DNA methylation-based classification of CNS tumors from DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum—German Cancer Research Center) were used in order to predict the CNS tumor class based of the V12.5 version. This classifier based on random forest algorithm is available on the following web platform www.moleculareuropathology.org.

Gene expression analysis

Reads were pre-processed using the nf-core RNAseq pipeline (v3.0), mapped to the reference genome GRC38/hg38 with the STAR tool (v2.6.1d), annotated with GENCODE v36 and counting was performed with the Salmon quantification tool (v1.4.0). Differential gene expression analysis was performed with the DESeq2 package (v1.30.0, minReplicatesForReplace = 7, betaPrior = TRUE) with a threshold of 0.01 for Benjamini-Hochberg adjusted p-value (adj-p). For gene set enrichment analysis (GSEA), hypergeometric tests were used to identify gene sets, from the MSigDB v7.4 database, overrepresented among the lists of up- or down-regulated genes, using Benjamini-Hochberg multiple testing correction. Catalogues considered included Hallmark and C2. Differences were considered as significant when false discovery rate (FDR) q was < 0.02. Gene expression comparison was evaluated with Wald test (DESeq2).

Statistical Analyses

Distribution of age at diagnosis according to different parameters was assessed by Mann-Whitney test. Presence of macrocalcification, contrast enhancement, radiologic profile and sex ratio were evaluated by Fisher's exact test. Chi-square test for trend was used to evaluate tumor type and location. All statistic test was performed using prism 9 software.

Results

***BRAF*-V600E and *FGFR1* N546K/D or K656E/M mutations are not rare in H3.3K27M DMG**

We analyzed a study cohort of H3K27-altered gliomas harboring *BRAF* or *FGFR1* mutations by assembling 37 cases from published studies with 25 new patients from Necker Enfants-Malades/Gustave Roussy historical cohort and BIOMEDE clinical trial (NCT02233049) (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1, online resource) [3, 13–16]. Of these, 45 were children and 17 adults. In parallel, we analyzed control cases of patients with *BRAF*^{WT}/*FGFR1*^{WT} H3K27-altered DMG from the corresponding cohorts. All H3-K27M *BRAF*^{MUT} DMG harbored a somatic V600E substitution. *FGFR1*^{MUT} tumors all displayed N546K/D and/or K656E/M hotspots substitutions preferentially described in central nervous system (CNS) tumors (Fig. 1b) [18]. *BRAF*^{V600E}, *FGFR1*^{N546K} and *FGFR1*^{K656E/M} mutations are widely known to induce an aberrant MAPK activation [18–22] while the rarer *FGFR1*^{N546D} mutation is only suspected to activate the MAPK pathway. We estimated the prevalence of *BRAF*-V600E DMG and *FGFR1*^{MUT} DMG within the H3.3K27M tumors in our composite pediatric-adult cohort at 8.3% and 12.3%, respectively (Fig.1c,d). Thus, *BRAF*^{MUT}/*FGFR1*^{MUT} DMG together could represent up to 20% of all H3.3K27M DMG.

Mutation profile of H3.3-K27M *BRAF/FGFR1*^{MUT} DMG

For the purpose of a full molecular characterization of these DM gliomas, we studied the genomic profile when the material was available (Fig.1a). We observed first that *BRAF*^{MUT} or *FGFR1*^{MUT} were mostly associated with H3.3K27M mutation conversely to H3.1K27M mutation. One tumor harbored an *FGFR1*^{MUT} in the context of an H3K27 wild-type DMG with *EZH1* overexpression (case #62). Second, despite their redundant function, *BRAF* and *FGFR1* mutations were not mutually exclusive, as one patient presented both hits (case #24; Fig.1a). Finally, we observed that in 90% (9/10) of H3-K27M-*FGFR1*^{MUT} tumors for which we had the information, *FGFR1* mutation was likely clonal to *H3-3A* with a similar VAF suggesting a role in the early steps of oncogenesis of these tumors (Fig.1a). It was less frequently the case for patients with *BRAF*^{V600E} H3K27M DMG with only 33,3% (2/6) patients where *BRAF* mutation was apparently clonal to H3K27M. *TP53* mutations were found in 10% (1/10) and 9.3% (3/32) of the *BRAF*^{MUT}

and *FGFR1^{MUT}* tumors, respectively (Fig.1a). For one H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* patient, *TP53* mutation was clonal to H3.3K27M and it was sub-clonal for the other case for which information was available. In addition, *ATRX* was mutated in 54.2% (13/24) *FGFR1^{MUT}* DMG and this was never associated to *TP53^{MUT}*. In addition, H3-K27M-*FGFR1^{MUT}* tumors presented often another hit in the MAPK pathway with *NF1* mutated in (13/31) 42%, or *PTPN11* mutated in (3/21) 14.3% as the topmost mutated genes. H3-K27M-*FGFR1^{MUT}* tumors harbored also in 19% (4/21) a mutation in a member of the PI3K/AKT/mTor signaling pathway (Fig. 1a). Additional MAPK activating mutations seemed to be less frequent for *BRAF^{MUT}* tumors with 1/6 case harboring an *NF1* mutation.

***BRAF* and *FGFR1* mutational status are prognostic in pediatric and adult H3-K27 altered DMG**

We previously demonstrated that Histone H3 and *TP53* mutational status impacts the prognosis of patients with DMG [10, 12]. As *TP53* mutations and *BRAF* V600E and *FGFR1* mutations are usually mutually exclusive and to avoid the confounding effect of *TP53* mutations on the outcome of H3.3K27M DMG without these MAPK-activating alterations, we matched Histone H3 and *TP53* genotypes of both groups in Kaplan-Meier overall survival (OS) analyses. With both all H3.3-K27M and *TP53* wild-type (WT) patients, this analysis showed a significant better OS for H3-K27M DMG pediatric and adult patients with an activating *BRAF* or *FGFR1* mutation (Fig.2a; median of 36-37.2 versus 12 months, *p* value < 0.0001, global log-rank test). Further, we performed a multivariable analysis to evaluate the association of Histone H3, *BRAF*, *FGFR1* and *TP53* mutational status, age at diagnosis and tumoral location with survival. As expected from our previous publications, Histone H3 and *TP53* status were significantly associated with OS (Table 1) [10, 12]. Age was significantly associated with prognosis, but its overall impact was only marginal compared to other variables. We also demonstrate that *BRAF^{V600E}* (HR: 0.2115, 95% CI 0.1121-0.3989, *p* value = 1.6e-06) and *FGFR1^{MUT}* (0.3374, 95%CI 0.1940-0.5867, *p* value = 0.0001, respectively) are strong and independent prognostic markers in H3K27-altered DMG (Table 1).

Clinical disparities in pediatric and adult patients with H3-K27M *BRAF/FGFR1^{MUT}* DMG

We next compared other clinical parameters. The sex ratio was balanced in DMG with MAPK activating mutations (MAPKa) (Supplementary Fig. 2a, online resource). However, we identified a significant difference in age at diagnosis between H3.3-K27M DMG, *BRAF^{MUT}* and *FGFR1^{MUT}* DMG (Fig. 2b). More precisely, H3.3-K27M *BRAF^{V600E}* DMG developed only in children (no patients > 18 years) with a median of age at onset of 7.2 versus 7.6 years for also pediatric patients with H3.3K27M DMG (Fig. 2b and supplementary Fig. 2b, online resource). In contrast, patients with *FGFR1^{MUT}* have a significant higher age at diagnosis compared to those *FGFR1^{WT}* with respective median of 14.8 and 9.8 years (Fig. 2b; *p* value = 0.0001, Mann Whitney test). These differences of age at onset were independent of the tumor location.

Indeed, the age at diagnosis of H3-K27M DMG can vary according to initial tumor locations, with a higher age of onset for thalamic *versus* pontine tumors [3, 23]. We found this difference of age according to tumor location only in *BRAF*^{WT} and *FGFR1*^{WT} H3.3-K27M DMG (Supplementary Fig. 2c, online resource). Finally, DMG with *BRAF* and *FGFR1* mutations were significantly more frequent in the thalamus compared to H3.3-K27M DMG (Fig. 2c; 58% (14/24) and 58% (21/36), respectively *versus* 28% (55/199), $p = <0.0001$, *Chi-square test for trend*). No variation in term of OS, age at diagnosis and tumor location was noted according to *FGFR1* mutated variant: *FGFR1*N546K/D *versus* *FGFR1*N656E (Supplementary Fig. 3, online resource).

Circumscribed presentation and calcifications are radiologic hallmarks of *BRAF*^{MUT}/*FGFR1*^{MUT} DMG

As radiology is the first step in the integrated diagnosis of DMG, we studied the radiological profile of *BRAF*^{MUT}/*FGFR1*^{MUT} DMG in order to highlight a specificity. We identified that these tumors are less diffuse than the control DMG_K27 with a significant enrichment of a mixed nodular-diffuse aspect (Fig. 3a, b; (7/11) 64% and (5/9) 56% *versus* (4/47) 8%; p value = <0.0001 , *Chi-square test for trend*) or even completely circumscribed (Fig. 3a, b – (3/11) 27% and (2/9) 22% *versus* (0/47) 0%; p value = <0.0001 , *Chi-square test for trend*). Secondly, *BRAF*^{MUT} or *FGFR1*^{MUT} H3K27M DMG were more often contrast enhancing (Supplementary Fig. 2d, online resource; (11/11) 100% and (9/9) 100% *versus* 47% (22/47); p value = 0.0013 and 0.0029, respectively Fisher's exact test). Thirdly, they developed more calcifications than DMG_K27 (Fig. 3c, d; (6/11) 55% and (5/9) 56% *versus* (1/38) 3%; p value = <0.0001 , Fisher's exact test). To evaluate these radiological features to detect rapidly MAPK-mutated DMG, we classified DMG according to a 'classic' or 'atypical' (nodular-diffuse or circumscribed aspect and/or presence of macrocalcifications) radiological profile independently of their genotype. We show that 91% (10/11) of DMG with *BRAF*^{V600E} and 78% (7/9) DMG with *FGFR1*^{MUT} H3K27M DMG are classified as atypical *versus* only 8.5% (4/47) DMG_K27 (Supplementary Fig. 2e, online resource; p value = <0.0001 , Fisher's exact test).

Histopathology

In writing

DNA-methylation profiling distinguished this subgroup of DMG H3K27-altered with MAPK activating mutations

Given the disparities in clinical characteristics between MAPK-altered DMG and classical DMG_K27altered, we next wondered if they corresponded to (i) DMG or (ii) atypical aggressive MAPK driven low-grade gliomas. We analyzed the DNA methylation profile of 13 *BRAF*^{V600E} and 15 *FGFR1*^{MUT}

H3.3-K27M DMG and 1 H3-WT (*EZH1P* overexpressing) *FGFR1^{MUT}* DMG. Based on the Heidelberg DNA-methylation brain classifier V12.5, 46% (6/13) of *BRAF^{MUT}* and 73 % (11/15) of *FGFR^{MUT}* DMG clustered as DMG_27, 15% (2/13) and 7% (1/15) were within another class and the remaining were undefined (score <0.9) (Supplementary Fig. 5a, online resource). In contrast, all *BRAF^{WT}/FGFR^{WT}* H3.3K27M DMG clustered as DMG_K27. We then performed an unsupervised clustering based of DNA methylation profiles of these samples and reference gliomas from Capper *et al.* (Fig. 4a, and supplementary Fig. 5b, online resource). All *BRAF^{MUT}* or *FGFR1^{MUT}* H3-K27M gliomas but one (case #48) separated from H3K27M DMG on the tSNE, independently of their H3 mutational status or brain classifier score. They also separated from midline *BRAF^{V600E}* low grade gliomas (LGG). Furthermore, they were grouped according to the nature of the secondary MAPK mutation in *BRAF* or *FGFR1*.

H3.3K27M is the first hit in the oncogenesis of H3.3K27M *BRAF^{V600E}* gliomas

We next wondered if the sequence of appearance of mutations was identical in these tumors, and more largely if the corresponded to (i) DMG (H3-K27M as a first hit) or (ii) atypical aggressive low-grade gliomas (*BRAF^{V600E}* as first hit). To address this question, we analyzed *BRAF* copy-number variation (CNV) for one tumor by digital droplet Polymerase Chain Reaction (ddPCR) on genomic DNA from *BRAF^{V600E}* clone or a *BRAF^{WT}* H3.3K27M clone deriving from the same H3.3K27M *BRAF^{V600E}* primary tumor (case #2 in the oncoplot; Supplementary Fig. 4, online resource). The *BRAF^{WT}* clone had two *BRAF* alleles and thus resulted from the re-amplification of an ancestral H3.3K27M-only clone, but not from a genetic loss of the *BRAF^{V600E}* allele, demonstrating that H3.3K27M was the first hit in one H3.3K27M *BRAF^{V600E}* glioma. DNA methylation profile from this ancestral clone *BRAF^{WT}* H3-K27M of patient #2 and from a tumor relapse enriched in *BRAF^{WT}* H3.3-K27M clone from patient #7, initially diagnosed with H3.3K27M *BRAF^{V600E}* glioma, clustered with MAPK-K27 DMG instead of H3.3-K27M DMG (Supplementary Fig. 5b, online resource). This strongly suggests a different identity of cell origin in the H3K27M/*BRAF^{V600E}* from the four DMG subgroups already discovered H3.1-K27M, H3.3-K27M, EGFR and *EZH1P* overexpressed and not only a modification of the DNA methylation pattern secondary to the MAPK-activating mutation.

H3.3-K27M *BRAF/FGFR1^{MUT}* DMG show a transcriptomic signature of senescence with up-regulation of *CDKN1A* (p21)

In order to investigate the possible specificities of the H3.3-K27M *BRAF/FGFR1^{MUT}* DMG, we compared the transcriptome of H3.3K27M DMG versus H3.3K27M/*BRAF^{V600E}* or *FGFR1^{MUT}* DMG, separately. We found 676 up-regulated and 633 down-regulated differentially expressed genes (DEG) in the contrast *BRAF^{WT}* H3.3K27M versus H3.3K27M *BRAF^{V600E}* DMG and 228 up-regulated and 274 down-regulated DEG in the contrast H3.3K27M *FGFR1^{WT}* versus H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* DMG (adj. *p* value ≤ 0.001)

(Supplementary Fig. 6, online resource). Ninety-four up-regulated and 111 down-regulated DEGs were common to the two contrasts. Using gene set enrichment analyses (GSEA), we observed common transcriptomic signatures from both *BRAF^{MUT}* and *FGFR1^{MUT}* DMG of MAPK and PI3K/AKT/MTOR signaling activation (Fig.5b; Supplementary Fig. 6, online resource). These tumors were also characterized by the presence of common transcriptomic signatures of angiogenesis and hypoxia (Supplementary Fig. 6, online resource). In parallel, transcriptomic signature of senescence and p53 signaling pathway activation were noted in both contrasts. The p53 protein is a tumor suppressor implicated in the permanent cell cycle arrest by inducing senescence or apoptosis in response to stress like oncogene activation [24, 25]. p53 activation was validated at the protein level in the primary tumors by IHC with a heterogenous, weak to strong p53 staining in these H3.3K27M *TP53^{WT}* MAPK-altered DMG. Moreover *CDKN1A*, coding senescent marker p21, was overexpressed at the RNA level in both H3.3K27M/*BRAF^{MUT}* or *FGFR1^{MUT}* gliomas compared to those only H3.3K27M mutated (adj. *p* value <0.0001, Wald test DESeq2) (Supplementary Fig. 6 online resource). *CDKN2A*, which codes for the tumor suppressor p16, was overexpressed at the RNA level only in *BRAF*-mutant gliomas (adj. *p* value = 0.0048, Wald test DESeq2). As a whole based on transcriptome and IHC, DMG_K27 *BRAF/FGFR1^{MUT}* were characterized by a senescence program induced through a p21-p53 axis.

Discussion

The recent creation of the entity 'DMG, H3K27-altered' and its sub-classification into four subgroups based on molecular and clinical features does not capture completely the diversity of this disease [2]. Our data support the individualization of a new subgroup with distinct clinical, genomic, and epigenetic features that we call "DMG, H3K27-altered with MAPK-activating co-driver mutations" (DMG_K27-MAPK) which may represent up to 20% of DMG H3K27altered. Using unsupervised analysis of DNA methylation tumor profiles, we demonstrate that DMG H3K27/MAPK-altered are grouped in a separate cluster, independent of the other DMG_K27 subtypes or MAPK-altered LGG. This highlights a possibly distinct cell origin [26] [27]. The slight separation of H3K27M/*BRAF^{V600E}* and H3K27M/*FGFR1^{MUT}* on the tSNE could even suggest that this entity could be even further separated.

Several other clinical and biological characteristics support the individualization of this new entity from classical DMG H3K27altered. First, the overall survival of patients with these tumors is significantly different from the one of classical DMG H3K27-altered. Median OS was around three years for both *FGFR1^{MUT}* and *BRAF^{MUT}* H3.3K27M DMG which is significantly better than classical H3.3K27M DMG. Moreover, our multivariate analysis demonstrated for the first time that the presence of these mutations

is an independent prognostic factor for improved OS. Previously, Schüller *et al.* showed, by univariate analysis, without taking account histone H3 and *TP53* status and in a small population ($n=7$), that patients with *FGFR1^{MUT}* DMG have a better survival [14]. Anecdotal reports have also suggested a better survival for patients with BRAF alterations [13]. The identification of a new DMG H3K27altered subtype with longer survival is also a step forward for clinical research highlighting the new for patient's stratification in trial or at least molecular documentation of the cases. Another meaningful difference is that DMG H3K27/MAPK-altered are more frequent in the thalamus than the brainstem compared to DMG from the H3.3 subtype. The age at diagnosis also differs according to the presence of the MAPK alteration. Patients with BRAFV600E DMG have a median of age at onset of 7.2 years and for the moment to our knowledge, there are no adults affected by a H3.3K27M BRAFV600E gliomas. The age at onset for *FGFR1^{MUT}* DMG is significantly higher with a median of 14.8 years. This finding can presently not be explained but may also point towards a different oncogenesis. The radiological and histopathological profiles are very heterogeneous and raise questions to the scientific community about their acceptance or the boundaries within the entity of DMG (Fig. 3 et 4). Indeed, these tumors are less diffuse and more nodular to circumscribed. Then, some MAPK-K27M tumors can present an LGG-like histological profile with, not only a glial-like component, but a mixed of neuronal- and glial-like cells. According to the last 2016 and 2021 versions of the SNC classification by the WHO, a tumor is diagnosed as H3K27-altered DMG when H3K27M or *EZH1P* overexpression is present in midline location which is always the case for the tumors described above. In consequence, we proposed to gather these gliomas as the fifth MAPK-H3K27-altered DMG subtype. We also investigated the transcriptome in order to hypothesize a mechanism that could explain, in part, this better prognosis. We observed a senescence signature including an up-regulation of *CDKN1A* (p21) specific to MAPK-H3K27-altered DMG which is more usually present in LGGs (Fig. 5). LGG are characterized by an overactivated MAPK signaling in consequence to activated MAPK member oncogene alteration (e.i. *BRAF* or *FGFR1*) [15]. The main hypothesis of a slow tumoral evolution in LGG is based on the induction of oncogene-induced-senescence (OIS) which gives a growth advantage in a restricted window during brain development [21, 28–31]. Of note the DMG H3K27altered-MAPK share other characteristic with LGGs like calcifications and preferential association of mutations: *FGFR1* with *NF1*, *PI3KCA*, *PTPN11* (Fig. 1 et 3) [22, 32–34]. In consequence, we hypothesize that the better OS of the MAPK-K27M DMG could be the result of both a specific cell origin and the OIS. More precisely, *BRAF* and *FGFR1^{MUT}* would be the second transforming hit in the oncogenesis of DMG and could give a proliferative advantage to the H3.3K27M BRAFV600E clone in the specific developmental window like LGGs. Finally, it would be the senescence triggered via the p53/p21 axis, as for LGGs, that could explain the slow tumor evolution.

We also demonstrated that H3.3K27M is the first event in the oncogenesis of a H3.3K27M BRAFV600E DMG from this new subtype. In addition, the H3.3K27M ancestral clone derived from H3.3K27M BRAFV600E DMG harbored the same DNA methylation profile which confirms that the specific DNA methylation of MAPK-H3K27-altered DMG is due to a different cell of origin and not the consequence of *BRAF* alterations. Deciphering the steps of the oncogenesis like we proceeded is essential for future therapeutic interventions.

In conclusion, we have identified a fifth subtype of H3 K27-altered DMG which we have named H3K27-altered with MAPK-activating co-driver mutations DMG (DMG H3K27altered-MAPK). The identification of this subtype is of importance for the interpretation of trials and may deserve specific treatment strategies.

Table

Variable	Hazard Ratio (95%CI)	pvalue
H3 status		
H3.1K27M	1	
H3.3K27M	1.5768 (1.0500-2.3679)	0.0281
H3-WT	1.0106 (0.5473-1.9201)	0.9736
BRAF status		
<i>BRAF</i> wild-type	1	
<i>BRAF</i> mutated	0.2115 (0.1121-0.3989)	1.6e-06
FGFR1 status		
<i>FGFR1</i> wild-type	1	
<i>FGFR1</i> mutated	0.3374 (0.1940-0.5867)	0.0001
TP53 status		
<i>TP53</i> wild-type	1	
<i>TP53</i> mutated	1.4590 (1.0583-2.0113)	0.0211
Age at diagnosis	0.9584 (0.9364-0.9808)	0.0003
Tumor location		
Pons	1	
Thalamus	0.7112 (0.4830-1.0472)	0.0843
Other midline	1.0027 (0.6311-1.5933)	0.9908

Table 1 : Multivariable Cox proportional hazards regression model for the OS of patients with H3-K27M DMG

CI, confidence interval ; WT, wild-type.

Main figures

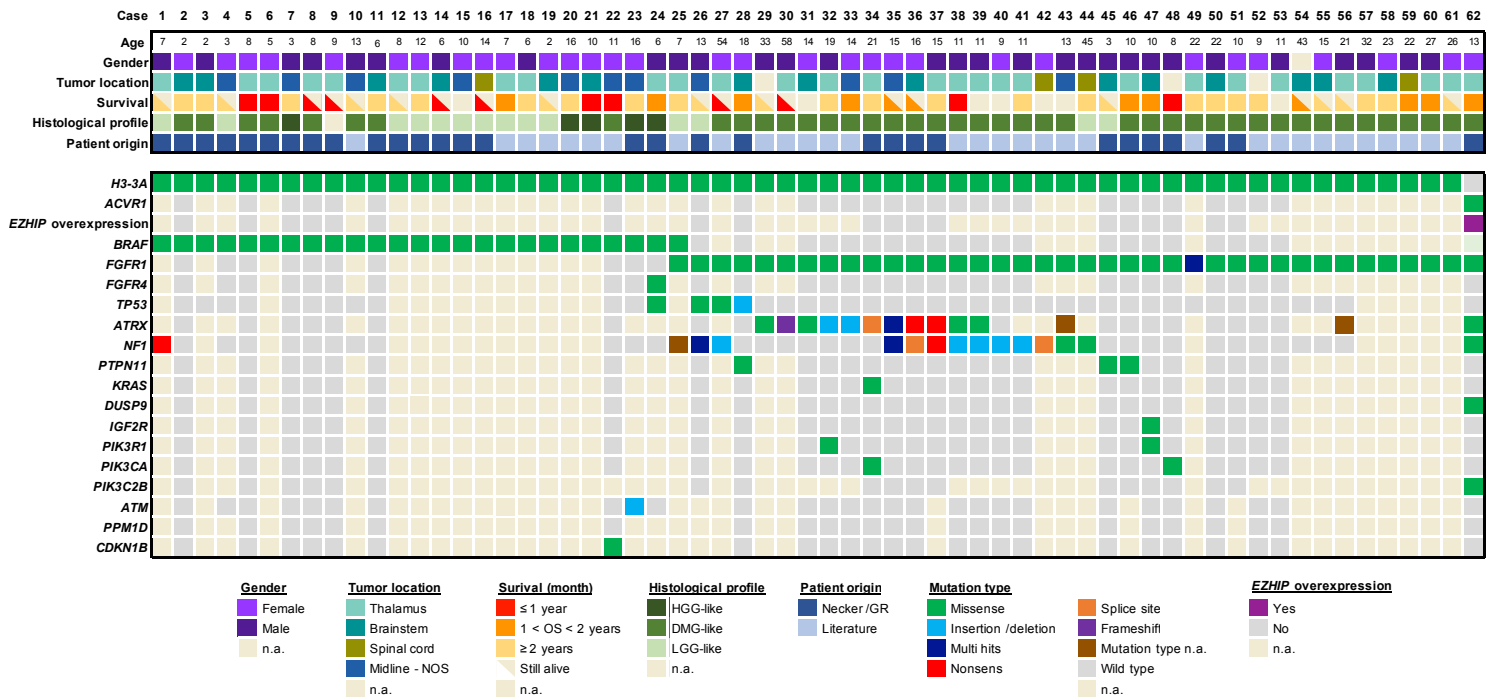


Fig. 1: Clinical and molecular characteristics of the pediatric and adult patients cohort of DMG H3-K27M with *BRAF* and *FGFR1* mutations

Overview of the clinical and molecular annotations of 62 pediatric and adult DMG patients presenting *BRAF* or *FGFR1* mutations. Cases are presented in columns and genes status in rows. Age is reported in years. All molecular information is derived from DNA whole-exome or RNA sequencing analyses.

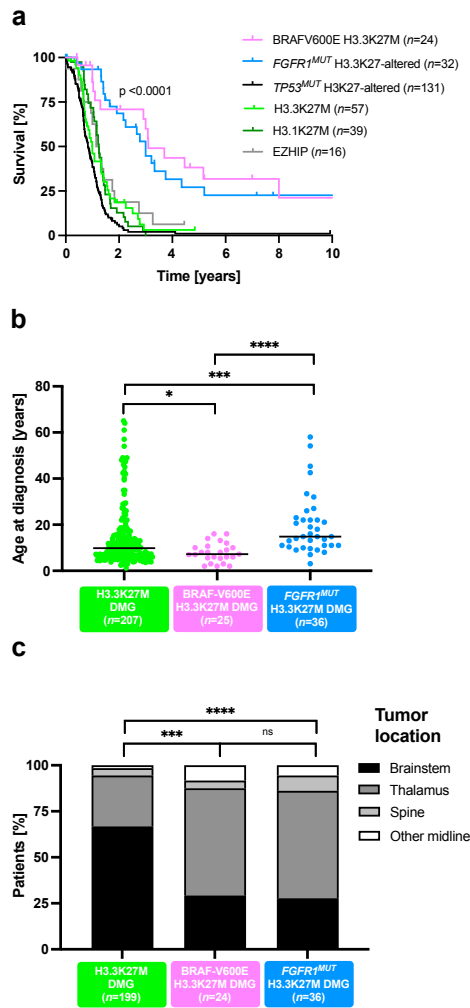


Fig. 2: Clinical specificities of pediatric and adult patients with DMG H3-K27M BRAF/FGFR1^{MUT}

a Comparison of OS estimated by using Kaplan-Meier method according to the mutation status of Histone H3, BRAF, FGFR1 and TP53 (log-rank test, p value = <0.0001).

b Distribution of age at diagnosis according to BRAF and FGFR1 mutation status (Mann-Whitney test; * p value = 0.0168, *** p value = 0.0001, **** p value = <0.0001).

c Comparison of tumor location according to the mutation status of BRAF and FGFR1 (Chi-square test for trend: ns, **** p value. = <0.0001).

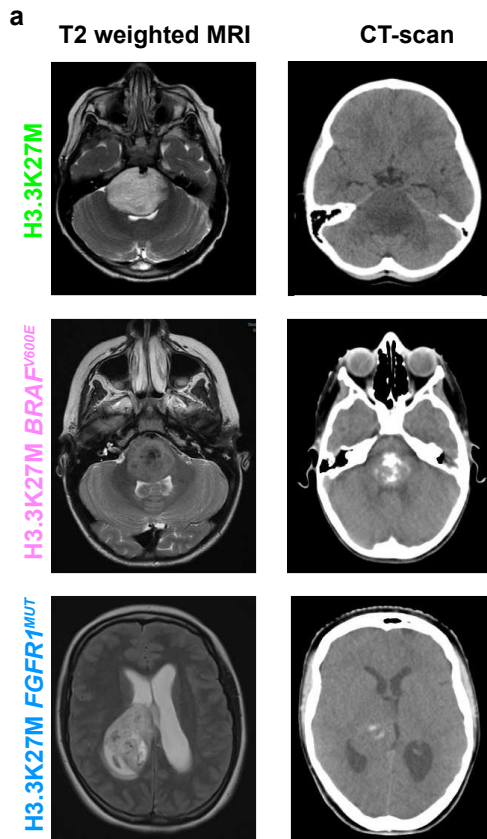


Fig. 3: Radiological specificities of DMG H3K27M *BRAF*^{V600E} or *FGFR1*^{MUT}

a T2-FLAIR (Fluid-attenuated inversion recovery) MR-images sequences or CT-scans (computed tomography) of DMG H3K27M according to *BRAF* or *FGFR1* mutation status.

b Comparison of the tumor radiological presentation (diffuse, circumscribed or mixed) of DMG according to their genotype (Chi-square test for trend: ns, **** p value <0.0001).

c Comparison of presence of macrocalcifications in DMG CT-scans according to the presence of MAPK alteration (Fisher's exact test: **** p value <0.0001, * p = 0.0210, * p = 0.0348).

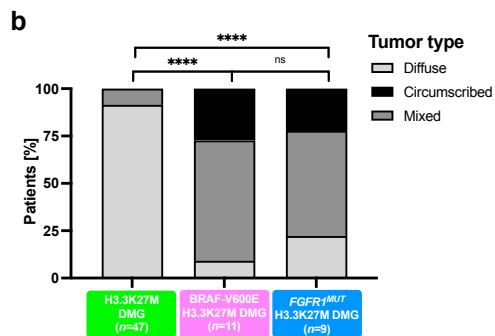
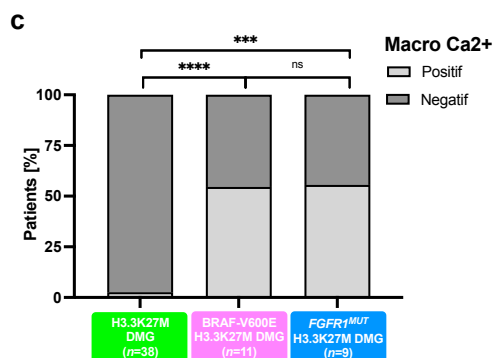


Fig. 4: Histopathological characteristics of DMG K27 with *BRAF* or *FGFR1* mutations.

In writing



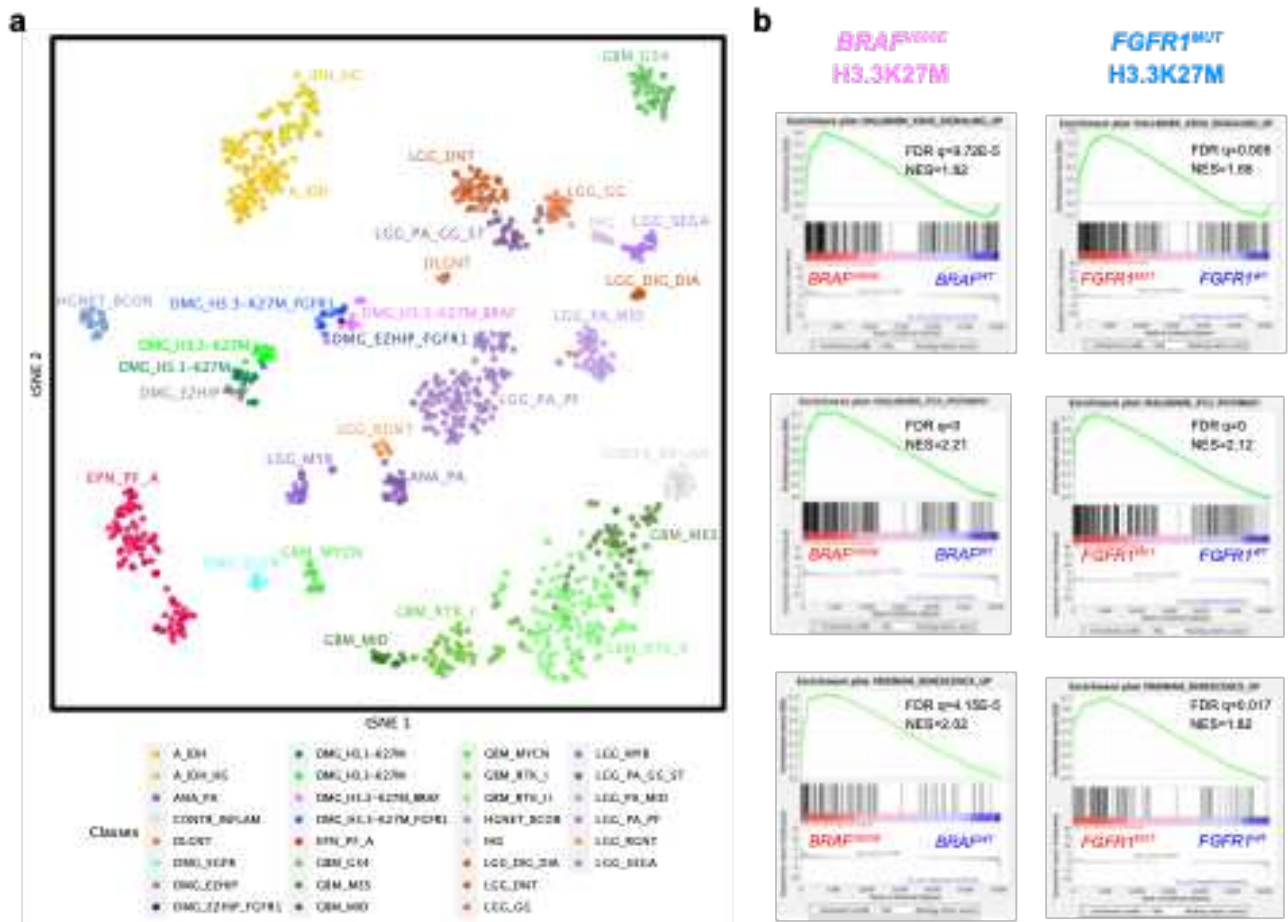
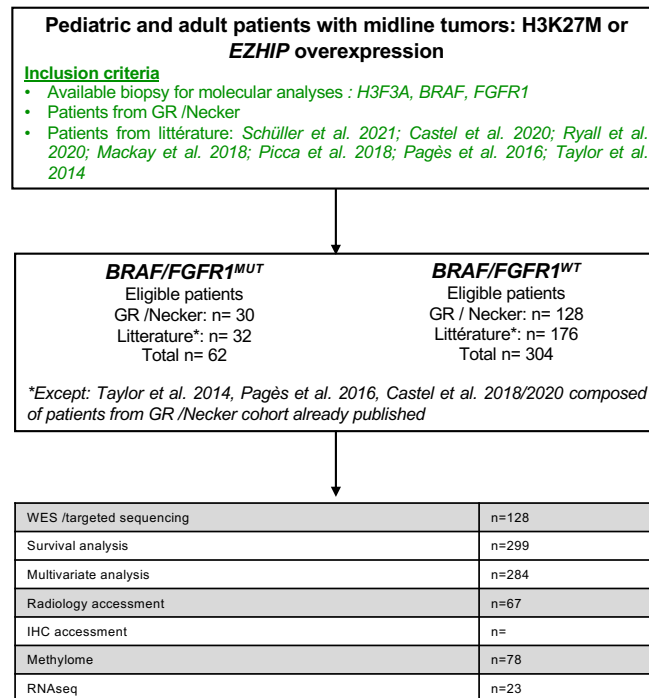


Fig. 5: DNA methylation and transcriptomic profiling of *BRAF/FGFR1^{MUT}* H3.3-K27M DMG

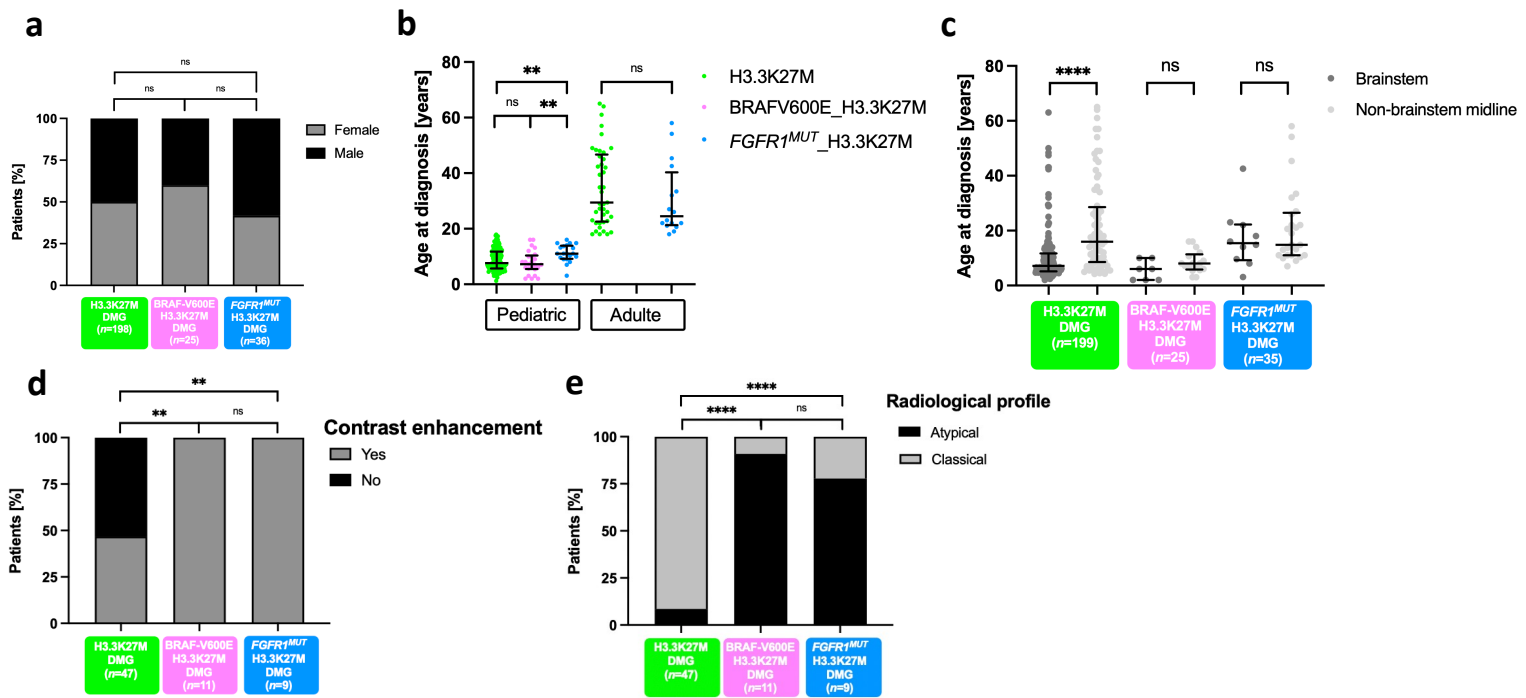
a CNS tumor classification based on DNA-methylation profiles. Unsupervised clustering by t-SNE analysis of tumors based on their DNA methylation profiles using topmost differentially methylated probes across the reference sample set composed of samples from *Capper et al.* ($n = 936$) and *Castel et al.* ($n = 41$).

b GSEA plot showing common transcriptomic signature from DMG H3.3K27M vs. DMG H3.3K27M *BRAF^{V600E}* or *FGFR1^{MUT}*. The normalized enrichment score (NES) and the false discovery rate (FDR q) are indicated in each plot.

Supplementary figures



Supplemental Fig. 1: Inclusion flowchart



Supplemental Fig. 2: Complement of clinical characterization of patients with H3K27M *BRAF^{MUT}/FGFR1^{MUT}* DMG

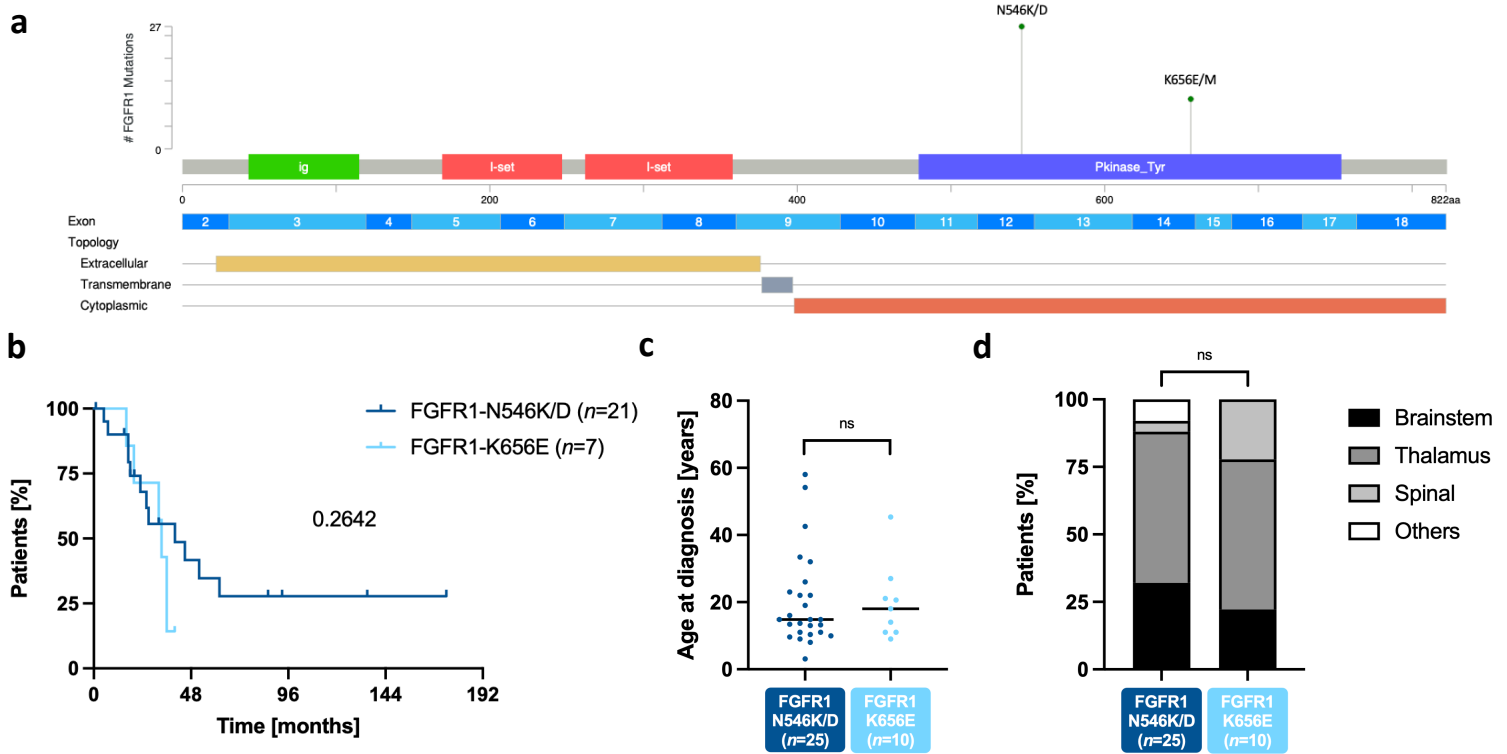
a Sex ratio according to DMG genotype (Fisher exact's test: ns).

b Distribution of the age at diagnosis, according to the MAPK mutational status, under or superior to 18 years (Mann-Whitney test: ns, ** p value = 0.0050, ** p value = 0.0027).

c Distribution of age at diagnosis according to the tumor location and *BRAF/FGFR1* mutational status (unpaired t test: ns, **** p value <0.0001).

d Distribution of the contrast enhancement according to the MAPK status (Fisher exact's test: ns ; ** p value = 0.0013, p value = 0.0029).

e Distribution of the radiologic profile (atypical *versus* classical) of H3K27-altered DMGs according to the mutational status (Fisher exact's test: ns, **** p value <0.0001). The profile is considered as atypic when there is a nodular-diffuse or circumscribed aspect and/or presence of macrocalcifications in contrast to the classic profile with a diffuse pattern and no calcification.



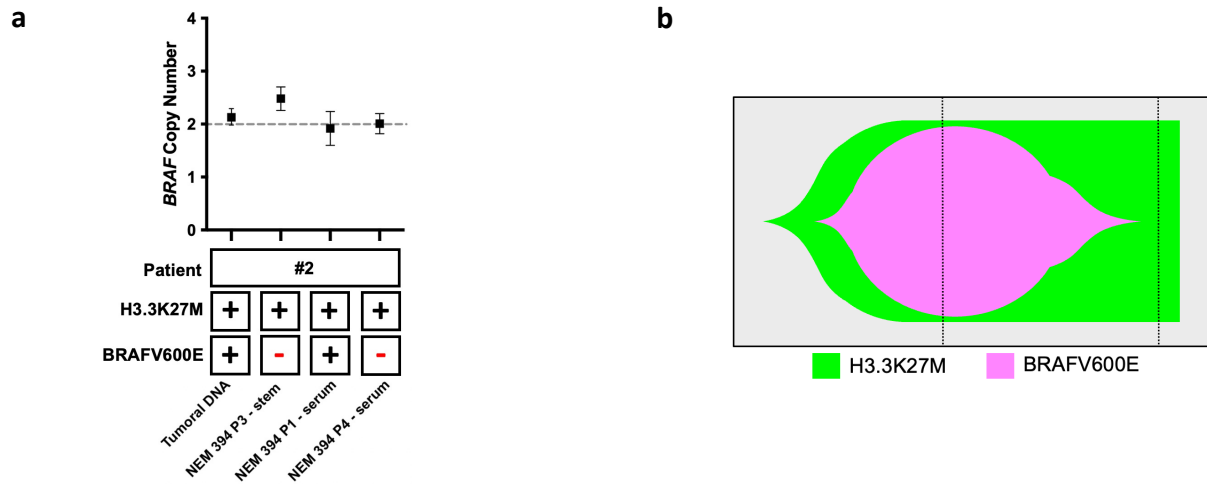
Supplemental Fig. 3: The different *FGFR1* mutations have an identical impact on the clinical profile of patients with DMG H3.K27M *FGFR1*^{MUT}.

a Lollipop representing *FGFR1* SNV in DMG H3.K27M *FGFR1*^{MUT}. *FGFR1* receptor is composed of an extracellular part composed of 3 immunoglobulin domains (ig and I-set) involved in the FGF ligand binding and an intracellular catalytic unit composed of two tyrosine protein kinase domains (Pkinase_Tyr).

b Kaplan–Meier of the overall survival of DMG patients stratified according to the different *FGFR1* variants (log-rank test, *p* value = 0.2642).

c Age distribution of patients at diagnosis stratified according to the different *FGFR1* variants (Mann-Whitney test: ns).

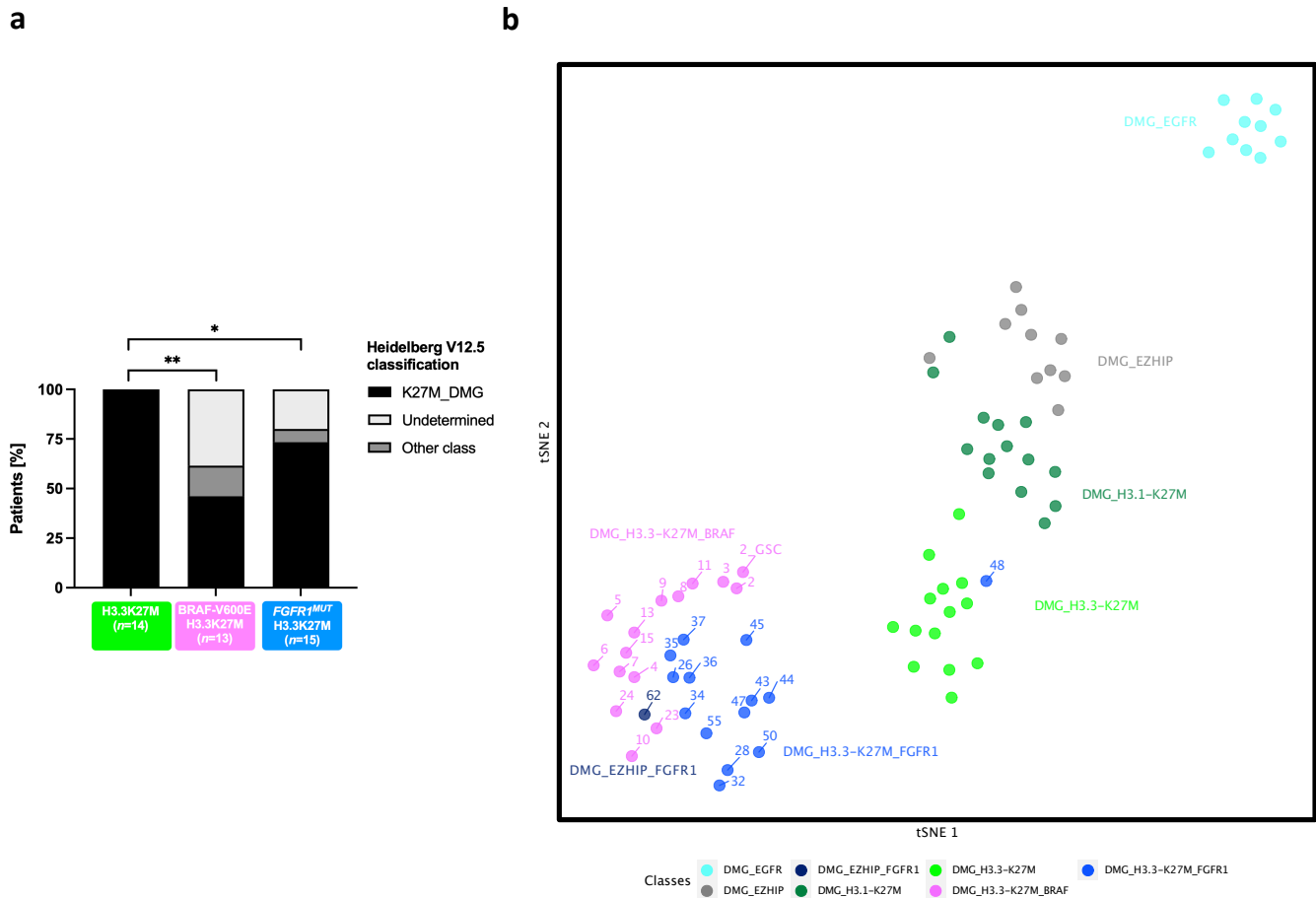
d Comparison of tumor locations according to the different *FGFR1* variants (Fisher exact’s test: ns).



Supplemental Fig. 4: Study of the sequence of mutations in the oncogenesis of a DMG H3.3-K27M $BRAF^{V600E}$

a *BRAF* copy number analysis and *BRAF^{V600E}* & H3.3K27M mutation status in the tumor biopsy or tumor cells cultured in different conditions. The results of the analysis by ddPCR of *BRAF* copy number normalized to the *AP3B1* loci are displayed for the tumor biopsies or from tumor cells cultured in different conditions originating from the same H3.3K27M *BRAFV600E* glioma corresponding to case #2 in the oncoplot (top). The mutational status for *BRAF* & *H3F3A* is indicated (bottom). "Serum" or "stem" refers to the culture condition of cells in serum-supplemented medium or in NSC medium, respectively. Error bars represent Poisson 95% confidence intervals. "P" refers to the passage at which DNA was extracted for the genotyping and ddPCR. ddPCR, Droplet Digital PCR; NSC, neural stem cell.

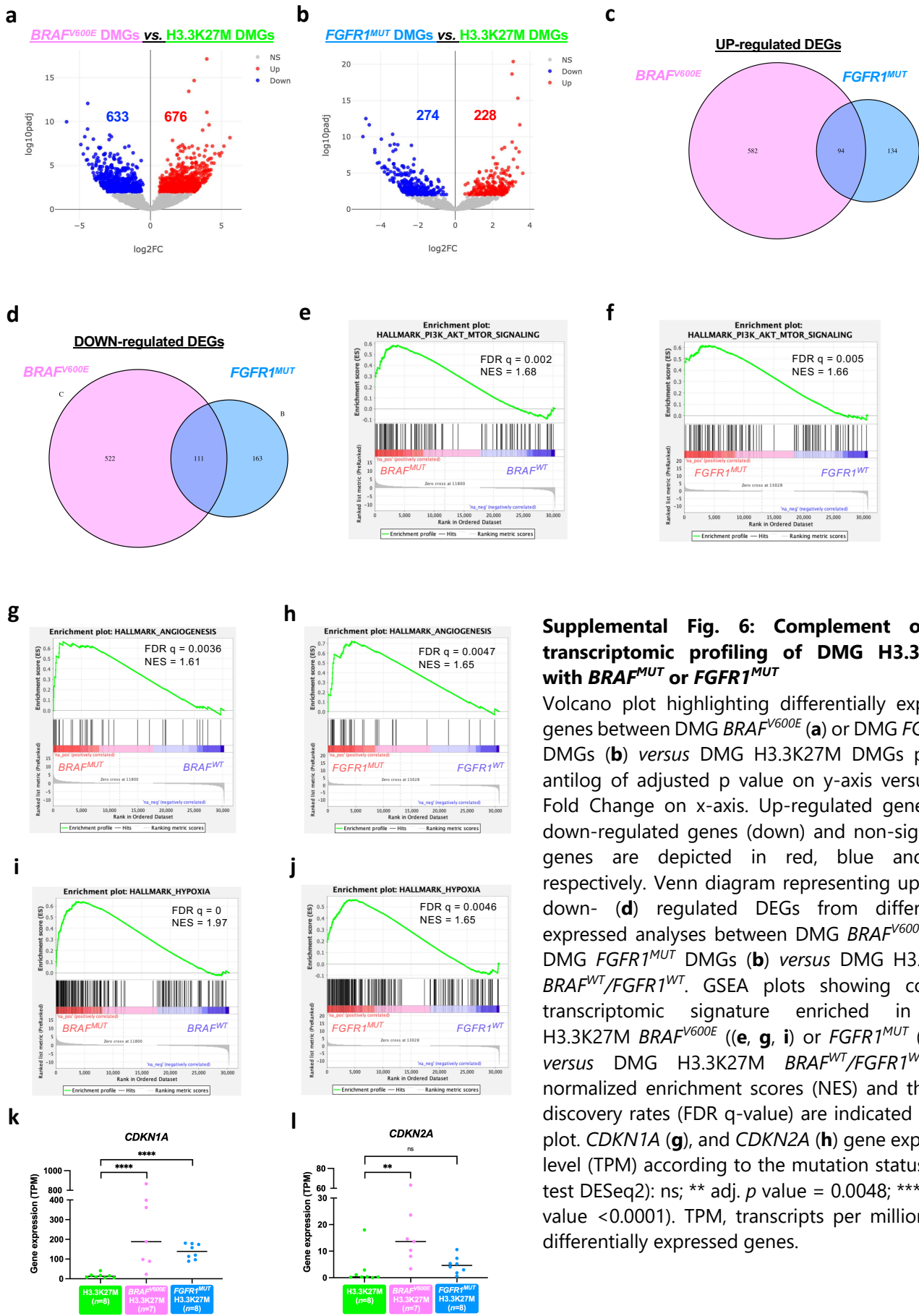
b Fishtail plot of a DMG H3.3K27M with *BRAF^{V600E}* mutation. H3.3K27M is the driver mutation, followed by the appearance of *BRAF^{V600E}* secondary driver mutation. According to time, the H3.3K27M *BRAFV600E* population is not maintained compared to the H3.3K27M ancestral clone re-amplification that has a *BRAF^{WT/WT}* genotype.



Supplemental Fig. 5: Detailed DNA-methylation based classification of DMG H3.3-K27M harboring *BRAF* or *FGFR1* mutation

a Distribution of DMG H3-K27M according to the DNA methylation Heidelberg classifier (V12.5). A tumor is classified in a group only if the score is ≥ 0.9 . A sample is categorized automatically in “Undetermined” if the score is < 0.9 . “Others” refer to groups different from DMG_K27 (Chi-square test for trend: ** p value = 0.0023; * p value = 0.443).

b Unsupervised clustering by t-SNE analysis of tumors based on their DNA methylation profiles using topmost differentially methylated probes across all DMG_K27 displayed ($n=70$). Numbers are referring to the case ID from the oncoplot in Fig. 1a. Sample #2_GSC corresponds to the H3-K27M *BRAF*^{WT} ancestral clone amplified *in-vitro* from the case #2 H3.3K27M *BRAF*V600E primary tumor. Case #7 corresponds to a H3K27M *BRAF*^{WT} clone enriched at tumor relapse in a patient initially diagnosed with a DMG H3K27M *BRAF*^{V600E}. (GSC, Glioma stem cell).



Supplemental Fig. 6: Complement on the transcriptomic profiling of DMG H3.3-K27M with *BRAF*^{MUT} or *FGFR1*^{MUT}

Volcano plot highlighting differentially expressed genes between DMG *BRAF*^{V600E} (a) or DMG *FGFR1*^{MUT} DMGs (b) versus DMG H3.3K27M DMGs plotting antilog of adjusted p value on y-axis versus log2 Fold Change on x-axis. Up-regulated genes (up), down-regulated genes (down) and non-significant genes are depicted in red, blue and grey respectively. Venn diagram representing up- (c) or down- (d) regulated DEGs from differentially expressed analyses between DMG *BRAF*^{V600E} (a) or DMG *FGFR1*^{MUT} DMGs (b) versus DMG H3.3K27M *BRAF*^{WT}/*FGFR1*^{WT}. GSEA plots showing common transcriptomic signature enriched in DMG H3.3K27M *BRAF*^{V600E} (e, g, i) or *FGFR1*^{MUT} (f, h, j). versus DMG H3.3K27M *BRAF*^{WT}/*FGFR1*^{WT}. The normalized enrichment scores (NES) and the false discovery rates (FDR q-value) are indicated in each plot. *CDKN1A* (g), and *CDKN2A* (h) gene expression level (TPM) according to the mutation status (Wald test DESeq2): ns; ** adj. p value = 0.0048; **** adj. p value < 0.0001). TPM, transcripts per million; DEG, differentially expressed genes.

Acknowledgements

LA, MAD, JG and DC acknowledge the Etoile de Martin charity (annual grant support to LA and RARE program with the Fondation Carrefour “Les Boucles du Coeur”) and Imagine for Margo for the financial support of this project, Necker Imagine Tumor and DNA biobank (BB-033-00065) for tumor and blood samples and centers participating in the BIOMEDE International Study and national PIs (Karsten Nysom, Klas Blomgren, Darren Hargrave, Dannis Van Vuurden, Francisco Bautista-Sirvent, Geoffrey McCowage).

References

- [1] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* 2016; 131: 803–820.
- [2] Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology* 2021; noab106.
- [3] Mackay A, Burford A, Carvalho D, et al. Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* 2017; 32: 520-537.e5.
- [4] Zheng L, Gong J, Yu T, et al. Diffuse Midline Gliomas With Histone H3 K27M Mutation in Adults and Children: A Retrospective Series of 164 Cases. *American Journal of Surgical Pathology* 2022; 46: 863–871.
- [5] Wu G, Broniscer A, McEachron TA, et al. Somatic Histone H3 Alterations in Paediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas and Non-Brainstem Glioblastomas. *Nat Genet* 2012; 44: 251–253.
- [6] Castel D, Kergrohen T, Tauziède-Espariat A, et al. Histone H3 wild-type DIPG/DMG overexpressing EZHIP extend the spectrum diffuse midline gliomas with PRC2 inhibition beyond H3-K27M mutation. *Acta Neuropathol* 2020; 139: 1109–1113.
- [7] Lewis PW, Müller MM, Koletsky MS, et al. Inhibition of PRC2 Activity by a Gain-of-Function H3 Mutation Found in Pediatric Glioblastoma. *Science* 2013; 340: 857–861.
- [8] Chan K-M, Fang D, Gan H, et al. The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev* 2013; 27: 985–990.
- [9] Bender S, Tang Y, Lindroth AM, et al. Reduced H3K27me3 and DNA Hypomethylation Are Major Drivers of Gene Expression in K27M Mutant Pediatric High-Grade Gliomas. *Cancer Cell* 2013; 24: 660–672.
- [10] Castel D, Philippe C, Calmon R, et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathologica* 2015; 130: 815–827.

- [11] Sievers P, Sill M, Schimpf D, et al. A subset of pediatric-type thalamic gliomas share a distinct DNA methylation profile, H3K27me3 loss and frequent alteration of *EGFR*. *Neuro-Oncology* 2021; 23: 34–43.
- [12] Werbrouck C, Evangelista CCS, Lobón-Iglesias M-J, et al. TP53 Pathway Alterations Drive Radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG). *Clin Cancer Res* 2019; 25: 6788–6800.
- [13] Pagès M, Beccaria K, Boddaert N, et al. Co-occurrence of histone H3 K27M and BRAF V600E mutations in paediatric midline grade I ganglioglioma: Histone H3 K27M and BRAF V600E mutations in GG. *Brain Pathology* 2018; 28: 103–111.
- [14] Schüller U, Iglauer P, Dorostkar MM, et al. Mutations within FGFR1 are associated with superior outcome in a series of 83 diffuse midline gliomas with H3F3A K27M mutations. *Acta Neuropathol* 2021; 141: 323–325.
- [15] Ryall S, Zapotocky M, Fukuoka K, et al. Integrated Molecular and Clinical Analysis of 1,000 Pediatric Low-Grade Gliomas. *Cancer Cell* 2020; 37: 569-583.e5.
- [16] Picca A, Berzero G, Bielle F, et al. FGFR1 actionable mutations, molecular specificities, and outcome of adult midline gliomas. 2018; 10.
- [17] Kergrohen T, Castel D, Le Teuff G, et al. *Copy-number alterations reshape the classification of diffuse intrinsic pontine gliomas. First exome sequencing results of the BIOMEDE trial*. Preprint, Oncology. Epub ahead of print 30 April 2021. DOI: 10.1101/2021.04.29.21256183.
- [18] Nakamura IT, Kohsaka S, Ikegami M, et al. Comprehensive functional evaluation of variants of fibroblast growth factor receptor genes in cancer. *npj Precis Onc* 2021; 5: 66.
- [19] Yoon K. Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling Promotes Radial Glial Identity and Interacts with Notch1 Signaling in Telencephalic Progenitors. *Journal of Neuroscience* 2004; 24: 9497–9506.
- [20] Lew ED, Furdui CM, Anderson KS, et al. The Precise Sequence of FGF Receptor Autophosphorylation Is Kinetically Driven and Is Disrupted by Oncogenic Mutations. *Sci Signal*; 2. Epub ahead of print 17 February 2009. DOI: 10.1126/scisignal.2000021.
- [21] Raabe EH, Lim KS, Kim JM, et al. BRAF Activation Induces Transformation and Then Senescence in Human Neural Stem Cells: A Pilocytic Astrocytoma Model. *Clinical Cancer Research* 2011; 17: 3590–3599.
- [22] the International Cancer Genome Consortium PedBrain Tumor Project, Jones DTW, Hutter B, et al. Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nature Genetics* 2013; 45: 927–932.
- [23] Solomon DA, Wood MD, Tihan T, et al. Diffuse Midline Gliomas with Histone H3-K27M Mutation: A Series of 47 Cases Assessing the Spectrum of Morphologic Variation and Associated Genetic Alterations: Diffuse midline gliomas with histone H3-K27M mutation. *Brain Pathology* 2016; 26: 569–580.

- [24] Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, et al. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep* 2014; 15: 1139–1153.
- [25] Liu X, Ding J, Meng L. Oncogene-induced senescence: a double edged sword in cancer. *Acta Pharmacol Sin* 2018; 39: 1553–1558.
- [26] Capper D, Jones DTW, Sill M, et al. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature* 2018; 555: 469–474.
- [27] Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature* 2011; 469: 314–322.
- [28] Jacob K, Quang-Khuong D-A, Jones DTW, et al. Genetic Aberrations Leading to MAPK Pathway Activation Mediate Oncogene-Induced Senescence in Sporadic Pilocytic Astrocytomas. *Clinical Cancer Research* 2011; 17: 4650–4660.
- [29] Tabori U, Vukovic B, Zielenska M, et al. The Role of Telomere Maintenance in the Spontaneous Growth Arrest of Pediatric Low-Grade Gliomas. *Neoplasia* 2006; 8: 136–142.
- [30] Warrington NM, Woerner BM, Daginakatte GC, et al. Spatiotemporal Differences in CXCL12 Expression and Cyclic AMP Underlie the Unique Pattern of Optic Glioma Growth in Neurofibromatosis Type 1. *Cancer Research* 2007; 67: 8588–8595.
- [31] Gnekow AK, Walker DA, Kandels D, et al. A European randomised controlled trial of the addition of etoposide to standard vincristine and carboplatin induction as part of an 18-month treatment programme for childhood (≤ 16 years) low grade glioma – A final report. *European Journal of Cancer* 2017; 81: 206–225.
- [32] Lucas C-HG, Gupta R, Doo P, et al. Comprehensive analysis of diverse low-grade neuroepithelial tumors with FGFR1 alterations reveals a distinct molecular signature of rosette-forming glioneuronal tumor. *acta neuropathol commun* 2020; 8: 151.
- [33] Sievers P, Appay R, Schrimpf D, et al. Rosette-forming glioneuronal tumors share a distinct DNA methylation profile and mutations in FGFR1, with recurrent co-mutation of PIK3CA and NF1. *Acta Neuropathol* 2019; 138: 497–504.
- [34] Johnson DR, Giannini C, Jenkins RB, et al. Plenty of calcification: imaging characterization of polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young. *Neuroradiology* 2019; 61: 1327–1332.

Résultats complémentaires à l'article

Cette section comprend un approfondissement sur (i) l'étude de la séquence d'apparition des mutations dans les DMG_K27-MAPKa qui est présentée en supplément de l'article, (ii) l'étude des altérations du nombre de copies des gènes des DMG_K27-MAPKa, (iii) l'évolution tumorale de ces gliomes et (iv) l'étude du transcriptome de deux cas particuliers dans le but d'explorer l'impact des altérations et de la cellule d'origine dans l'oncogenèse des DMG.

Étude de la séquence d'apparition des mutations dans les DMG K27-MAPKa

Face à des patients à longues survies avec les gliomes K27_MAPKa, nous nous sommes demandés si ces gliomes étaient (i) des DMG_K27 avec une mutation H3.3K27M initiatrice dont l'agressivité tumorale a été diminuée par l'apparition d'une seconde mutation BRAFV600E ou s'il s'agit (ii) de LGGs avec une altération de la voie MAPK dont l'agressivité tumorale a été exacerbée par l'apparition d'une mutation H3.3K27M secondaire. Nous avons donc étudié la séquence d'apparition des altérations H3.3K27M et BRAF-V600E d'un DMG K27-MAPKa.

Un cas clinique de transformation maligne *in situ* d'un gangliogliome H3.3K27M BRAFV600E avec une disparition de la mutation BRAFV600E à la rechute a été rapporté (Joyon *et al.*, 2016). En parallèle, nous avons aussi observé une disparition du clone H3.3K27M BRAFV600E au profit de l'amplification du clone H3.3K27M *BRAF^{WT}* lors de l'établissement d'une lignée cellulaire dérivée d'un autre DMG H3.3K27M BRAFV600E. Nous reviendrons sur ce modèle *in-vitro* par la suite. Nous pouvons donc mettre en parallèle ces deux évolutions tumorales (celle apparue chez le patient et celle apparue durant la culture des cellules souches *in-vitro*).

Deux mécanismes alternatifs d'oncogenèses pourraient ainsi expliquer l'apparition d'une population H3.3K27M unique à partir d'une population double-mutée H3.3K27M BRAFV600E au départ (Fig. R2A, B). Dans le premier scénario, la mutation H3.3K27M apparaîtrait en premier, suivie de la mutation transformante BRAF-V600E, donnant naissance à deux populations : un clone ancestral H3.3K27M *BRAF^{WT}* et un second clone H3.3K27M BRAFV600E. Ces deux populations pourraient proliférer jusqu'à la réamplification secondaire du clone ancestral H3.3K27M avec un génotype *BRAF^{WT/WT}*. Nous supposons donc que la population H3.3K27M BRAFV600E pourrait avoir un avantage de croissance au cours du développement cérébral. Puis, à la fin de la formation du cerveau, ou à l'apparition d'un deuxième hit au sein du clone ancestral H3.3K27M, la population double mutée ne se maintiendrait plus dans le temps. Dans le deuxième scénario au contraire, la mutation transformante BRAF-V600E pourrait apparaître en premier, suivie d'une mutation H3.3K27M ou inversement. Enfin, la perte génétique de

$BRAF^{V600E}$ surviendrait donnant lieu à une population uniquement H3.3K27M mais avec un génotype $BRAF^{WT/-}$. Afin de tester ces hypothèses, nous avons effectué (i) une analyse des CNV de $BRAF$ par PCR digitale en gouttelette (ddPCR pour Digital Droplet Polymerase Chain Reaction) sur l'ADN génomique d'une biopsie tumorale ou de cellules tumorales cultivées dans différentes conditions et (ii) un génotypage de $H3F3A$ et $BRAF$ (Fig. R2C).

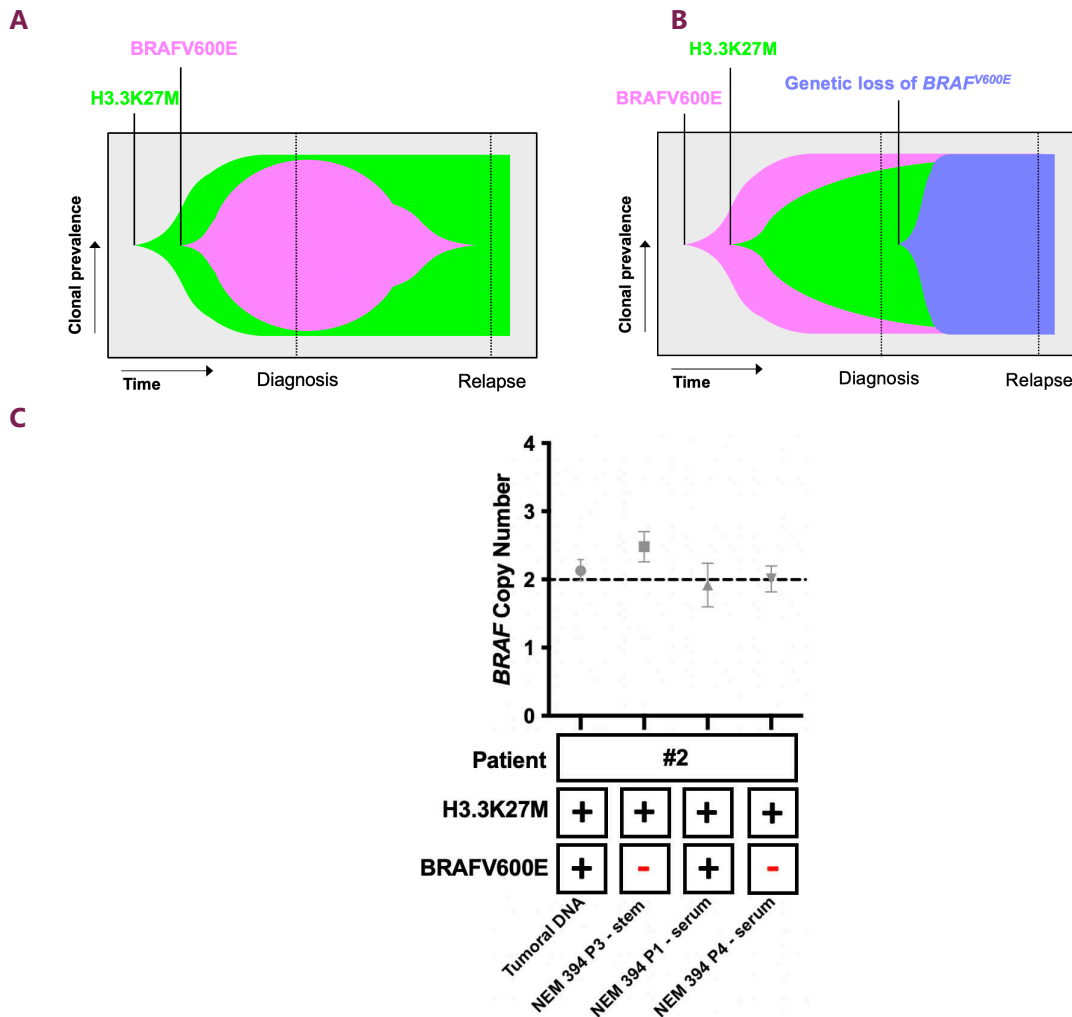


Figure R2 : Deux mécanismes oncogéniques possibles à l'origine de la transformation maligne *in situ* chez un patient H3.3K27M BRAFV600E

Deux mécanismes oncogéniques pourraient expliquer l'apparition d'une population uniquement mutée H3.3K27M. (A) Le mécanisme #1 est le suivant : H3.3K27M est la mutation initiatrice, suivie de l'apparition de la mutation transformante BRAFV600E. Au cours de l'évolution à long terme, la population double mutée n'est pas maintenue au profit de la réamplification du clone ancestral H3.3K27M qui a un génotype $BRAF^{WT/WT}$. (B) Pour le mécanisme alternatif #2, BRAFV600E est la mutation initiatrice transformante, suivie de H3.3K27M qui accélère l'oncogenèse et enfin la perte génétique de l'allèle $BRAF^{V600E}$ muté qui donne lieu à une seule population H3.3K27M avec le génotype $BRAF^{WT/-}$. (C) Graphique représentant le nombre de copies de $BRAF$ normalisées au locus $AP3B1$ évalués par ddPCR pour la biopsie tumorale ou les cellules tumorales cultivées dans différentes conditions provenant du patient #2 de l'oncoplot du manuscrit. Le statut mutationnel pour $BRAF$ et $H3F3A$ est indiqué. "Serum" ou "souche" fait référence aux conditions de culture des cellules dans un milieu additionné de sérum ou dans un

milieu de cellules souches neurales, respectivement. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95 %. "P" fait référence au passage auquel l'ADN a été extrait pour le génotypage et la ddPCR.

Nous avons observé 2 copies de *BRAF* dans la tumeur primaire et le modèle dérivé NEM394_P1-Sérum comme attendu pour les deux mécanismes en conséquence de la présence de la mutation BRAFV600E. Cependant, nous avons aussi noté deux copies de *BRAF* après disparition de BRAFV600E dans les deux modèles *in-vitro* (NEM_394_P3-Souche et NEM_394_P4-Sérum) dérivés de la même tumeur. Ce résultat signifie que le génotype de la population simple mutée H3.3K27M est *BRAF^{WT/WT}* et valide donc le mécanisme #1.

Pour résumer, nous avons démontré, pour un gliome analysé, que la mutation H3.3K27M est le premier évènement, suivie de la mutation BRAFV600E dans l'oncogénèse d'un DMG_K27-MAPKa.

Étude des CNA des DMG_K27-MAPKa

Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps d'étudier de manière approfondie les altérations du nombre de copies (CNA pour en anglais copy number alteration) des gènes à l'échelle du génome entier. Pour le moment, nous avons uniquement regardé les profils CNA dérivant du méthylome, ce qui est moins précis par rapport aux données de séquençages de l'exome. Globalement, nous avons observé des profils peu remaniés dans les DMG_K27-MAPKa. Nous n'avons pas observé de gains ou pertes chromosomiques récurrents parmi les DMG_K27-MAPKa (Fig. R2B). Nous n'avons aussi pas observé de gains des chromosomes 1q et 2, comme fréquemment retrouvé dans les DMG_K27 (Castel *et al.*, 2015; Kergrohen *et al.*, 2021). Quelques profils nous ont semblés un peu plus altérés dont certains ont un statut *TP53* muté. Ce résultat était plutôt attendu car récemment, l'équipe a montré que les DMG_K27 avec une altération de la signalisation de *TP53* avaient un profil chromosomique plus complexe (Kergrohen *et al.*, 2021). Nous avons observé une perte du locus *CDKN2A* dans un DMG_K27-MAPKa BRAFV600E *TP53^{MUT}*. Une étude complète des CNA sera nécessaire pour valider ces premières observations.

Figure R2B : Profils d'altérations du nombre de copies géniques des DMG K27-MAPKa

Profils CNA d'un DMG_K27-MAPKa $BRAF^{MUT} TP53^{WT}$ (A) ou $TP53^{MUT}$ (B) et d'un DMG_K27-MAPK $FGFR1^{MUT} TP53^{WT}$ (C) ou $TP53^{MUT}$ (D). Les profils CNA sont dérivés des données de méthylomes.

Évolution tumorale des DMG K27-MAPKa

Pour 4 patients, nous avons eu la chance d'avoir des informations sur le statut mutationnel de $H3F3A$ et $BRAF$ ou $FGFR1$ au diagnostic et à la rechute (cas #7, #24, #35, #45 de l'oncoplot du papier). Nous rapportons que 1/2 patient diagnostiqué avec un DMG H3.3K27M BRAFV600E a rechuté avec une disparition de la mutation BRAFV600E. En associant, le cas de la littérature de *Joyon et al.*, cela revient à 2/3 patients. Au contraire, 2/2 patients diagnostiqués avec un DMG H3.3K27M FGFR1N546K ont rechuté mais sans perte de la mutation de $FGFR1$. Ces observations cliniques semblent souligner une évolution tumorale différente entre les DMG_K27-MAPKa $BRAF^{MUT}$ ou $FGFR1^{MUT}$.

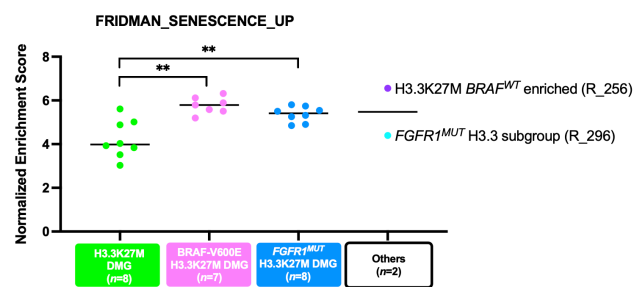
Transcriptome des cas particuliers : clone ancestral et DMG H3.3K27M $FGFR1^{MUT}$ – sous-type H3.3

Nous avons pu analyser le transcriptome d'un gliome à la rechute enrichi en clone H3.3K27M $BRAF^{WT}$ diagnostiqué initialement avec un gliome H3.3K27M /BRAFV600E (R_256 - #7 dans l'oncoplot) et le transcriptome d'un DMG H3.3K27M $FGFR1^{MUT}$ (R_296 - #48 dans l'oncoplot) appartenant au sous-type des DMG_H3.3K27M d'après le profil de méthylation de l'ADN malgré la présence de la mutation activatrice des MAPK normalement associée aux DMG_K27-MAPKa. En effet, R_296 se regroupe avec les DMG_H3.3K27M au lieu des DMG_K27-MAPKa selon le profil de méthylation de l'ADN (cf. Figure 5 du de l'article). Ces deux transcriptomes sont précieux car ils nous permettent d'explorer l'impact de de la cellule d'origine avec R_256 et l'impact de la mutation $FGFR1$ dans le contexte cellule d'origine – oncogénèse d'un DMG du sous-type H3.3.

Nous avons démontré dans l'article que les DMG_K27-MAPKa sont caractérisés par une signature transcriptomique de sénescence associée à une surexpression de $CDKN1A$ codant P21, régulateur du cycle cellulaire et marqueur de sénescence. $CDKN2A$ codant pour P16 est aussi un régulateur du cycle cellulaire et marqueur de sénescence. $CDKN2A$ est aussi retrouvé surexprimé mais uniquement dans les DMG H3.3K27M BRAFV600E et de façon plus hétérogène. Nous avons avancé l'explication que la longue survie des DMG_K27-MAPKa est causée par la sénescence induite par l'activation de l'oncogène (OIS) $BRAF$ ou $FGFR1$ comme dans les LGGs. En effet, l'OIS serait une cause du phénotype bénin de ses tumeurs (Jacob *et al.*, 2011 ; Raabe *et al.*, 2011). En conséquence, nous souhaitons (i) vérifier que la présence de la signature transcriptomique de sénescence des DMG corrélait avec le statut mutationnel MAPK (*i.e.*, $BRAF$ et $FGFR1$ mutés) et (ii) voir si la cellule d'origine peut avoir un impact sur le phénotype de sénescence (*i.e.*, cellule d'origine d'un DMG_ H3.3K27M *versus* MAPKa).

Dans un premier temps, nous avons comparé le score d'enrichissement normalisé (NES) pour la signature transcriptomique de sénescence issu de GSEA sur échantillon unique (ssGSEA) dans les transcriptomes de R_256 et R_296 par rapport au NES médian des DMG_H3.3K27M ou DMG_K27-MAPKa *BRAF* ou *FGFR1* mutés. R_256, gliome enrichi en clone H3.3K27M *BRAF*^{WT}, a un score de sénescence de 6,55 ; ce qui est très supérieur au score médian des DMG_H3.3K27M de 3,98 (intervalle de confiance (IC) de 95% : 3,29 à 5,10) mais plutôt équivalent à celui des DMG_K27-MAPKa BRAFV600E de 5,79 (IC de 95% : 5,20 à 6,30) (Fig. R3A). Ce résultat n'était pas attendu dû au fait de l'absence de la mutation BRAFV600E. À l'opposé, le cas R_296, DMG H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} appartenant au sous-type des DMG_H3.3K27M en méthylome présente un score de 4,40, score en dehors de l'IC de 95% des DMG_H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} dont la médiane est de 5,41 (IC 95% : 4,85 à 5,81) et est faiblement plus élevé que le score médian des DMG_H3.3K27M (3,98). Ce résultat était peu attendu du fait de la présence de la mutation de *FGFR1*.

A



B

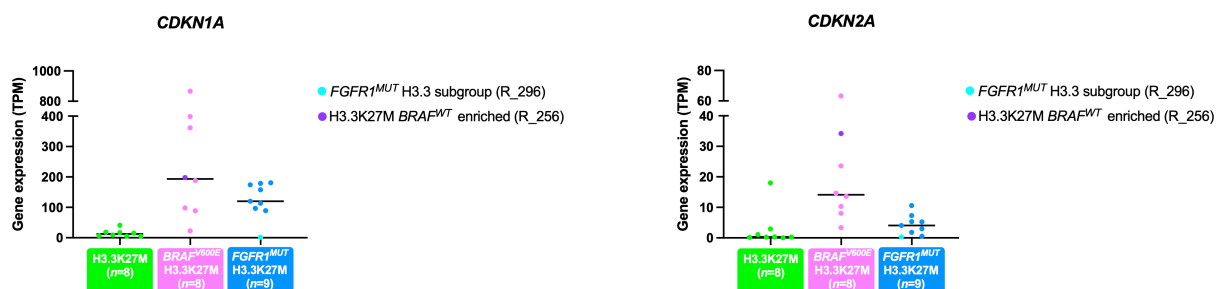


Figure R3 : Évaluation de la sénescence dans le transcriptome de DMG atypiques

(A) Comparaison du score d'enrichissement normalisé (NES) pour la signature FRIDMAN_SENESCENCE_UP en fonction du statut MAPK par GSEA sur échantillon unique. (Test t de Welch : ns, ** p value = 0,0011, p value = 0,0071). Comparaison de l'expression du gène *CDKN1A* (p21) (B) et *CDKN2A* (p16) (B) en transcrits par million (tpm) en fonction du statut MAPK.

Dans un second temps, nous avons comparé les niveaux d'expression de *CDKN1A* et *CDKN2A* de nos tumeurs particulières par rapport aux niveaux médians d'expression de ces gènes dans les DMG H3.3 ou DMG K27-MAPKa *BRAF* ou *FGFR1* mutés. Dans R_256, gliome enrichi en clone H3.3K27M *BRAF*^{WT}, le

niveau d'expression de *CDKN2A* est de 34,2 transcrits par million (TPM) et est plus élevé que le niveau d'expression médian des DMG_H3.3K27M à 0,30 TPM (CI de 95% : 0,02 à 18,01) mais similaire aux DMG_K27-MAPKa *BRAF* muté de 14,12 TPM (CI de 95% : 3,38 à 63,25) (Fig. R3B). La même observation est présente pour *CDKN1A* (Fig. R3C). Ces niveaux élevés des marqueurs d'expressions de sénescence sont en corrélation avec le score élevé de la signature transcriptomique de sénescence pour cette tumeur que nous avons vu précédemment. En ce qui concerne R_296 (DMG_H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} appartenant au sous-type des DMG_H3.3K27M simples mutés), nous avons aussi observé une expression de *CDKN2A* à 0,3 TPM soit équivalente à l'expression médiane des DMG_H3.3K27M (0,30 TPM, CI de 95% : 0,02 à 18,01) et très inférieure à celle des DMG_K27-MAPKa *FGFR1* muté et même en dehors de l'intervalle de confiance de 95% (4,05 TPM, CI de 95% : 0,55 à 7,32). La même observation est présente pour *CDKN2A*. La quasi-absence d'expression de *CDKN1A* et *CDKN2A* explique le score peu élevé de la signature transcriptomique de sénescence dans R_296 (DMG H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} appartenant au sous-type des DMG H3.3 mutés).

Ces observations ne sont que préliminaires car elles ne concernent qu'un échantillon par condition. Néanmoins, il semble que R_256, gliome enrichis en clone H3.3K27M *BRAF*^{WT}, présente une signature transcriptomique de sénescence équivalente à un DMG_K27-MAPKa, malgré l'absence de BRAFV600E ce qui est inattendu. La présence d'un phénotype pro-sénescence malgré l'absence de BRAFV600E pourrait être une spécificité intrinsèque liée à la cellule d'origine/clone ancestral dont le mécanisme n'est pas identifiable par les altérations génomiques étudiées. Pour R_296, DMG H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} appartenant au sous-type des DMG H3.3 simples mutés, il apparaît que la signature transcriptomique de sénescence est équivalente à un DMG H3.3 et présente une quasi-absence d'expression des marqueurs de sénescence malgré la présence de la mutation *FGFR1*. Cette différence phénotypique pourrait s'expliquer par une différence de cellule d'origine – oncogenèse par rapport à un DMG K27-MAPKa.

2. Développement de modèles d'études *in-vitro* et *in-vivo*

Le second objectif de ce projet a été de développer des modèles d'études *in-vitro* et *in-vivo*. En effet, nous avons pour objectif de développer deux types de modèles complémentaires dans les buts : (i) d'approfondir la compréhension de l'oncogenèse des DMG K27-MAPKa et (ii) d'identifier de nouvelles opportunités thérapeutiques aux DMG.

Premièrement, nous souhaitons établir des modèles *in-vitro* et *in-vivo* dérivés de biopsies stéréotaxiques de DMG K27-MAPKa qui récapitulent les tumeurs dont ils sont dérivés. Ces modèles sont indispensables pour de la recherche fondamentale et de l'étude préclinique (test de drogue).

Deuxièmement, nous souhaitons développer des modèles *in-vitro* dynamiques par modulation du programme oncogénique H3K27M dans le but d'étudier l'oncogenèse des DMG K27-MAPKa et, intrinsèquement liés, identifier des vulnérabilités thérapeutiques.

2.1. Modèles *in-vitro* et *in-vivo* dérivés de DMG K27-MAPKa

Les essais cliniques européens BIOMEDE 1.0 (NCT02233049) et 2.0 (NCT05476939) ont permis la mise en place de biopsies stéréotaxiques systématiques au diagnostic pour les patients atteints de DMG H3K27 altérés. Les biopsies fraîches ou congelées de ces patients sont rapatriées à Gustave Roussy pour des analyses génomiques et le développement de modèles précliniques. La biopsie fraîche ou l'exérèse (quand opérable, *i.e.*, localisation thalamique éligible) est dissociée mécaniquement et est divisée en trois : 1 tiers pour la congélation et 2 tiers pour l'établissement de modèles *in-vitro* et *in-vivo*. Chaque biopsie reçue comporte un numéro NEM pour « Necker Enfants Malades ». Il est important de se rappeler que les DMG_K27 sont rares et les DMG_K27-MAPKa le sont encore plus. Au cours de mes 4 années passées au laboratoire, nous avons reçu 5 biopsies de DMG_K27-MAPKa, dont deux mutés *BRAF* (NEM569 et 620) et 3 mutés *FGFR1* (NEM499, 576, 582), qui sont principalement arrivées dans les deux dernières années de thèse. La lignée NEM394, dérivée d'un DMG *BRAF*^{MUT} était déjà disponible au commencement de ma thèse.

2.1.A Établissement et caractérisation des modèles *in-vitro*

Établissement de modèles *in-vitro* de DMG K27-MAPKa

Au laboratoire, les modèles *in-vitro* de DMG K27 sont cultivés de manière adhérente sur laminine (2D) et milieu de culture de cellules souches neurales supplémenté en facteurs de croissances : facteur de croissance épidermique (EGF pour en anglais epidermal growth factor), facteur de croissance des fibroblastes (FGF pour en anglais fibroblast growth factor) et facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF pour en anglais platelet-derived growth factor) (sans sérum) en normoxie. Les modèles récapitulent les caractéristiques de leurs tumeurs dont ils dérivent, c'est-à-dire présentent des profils cellulaires, mutationnels, épigénétiques (H3K27me3) et transcriptomiques comparables aux tumeurs dérivées (Plessier *et al.*, 2017; Castel *et al.*, 2018). Ces cultures sont établies en normoxie et en hypoxie

au départ. L'hypoxie n'est pas continue car seulement les incubateurs sont à 3% d'O₂. Nous avons testé ces mêmes conditions dans le but d'établir les 6 modèles de DMG_K27-MAPKa.

Modèles de DMG_H3.3K27M BRAFV600E

Trois modèles sur trois ont été établis à partir de la dissociation de trois biopsies de DMG H3.3K27M BRAFV600E issues du tronc ou thalamus, en condition souche et normoxie (Fig. R4 ; Table R1).

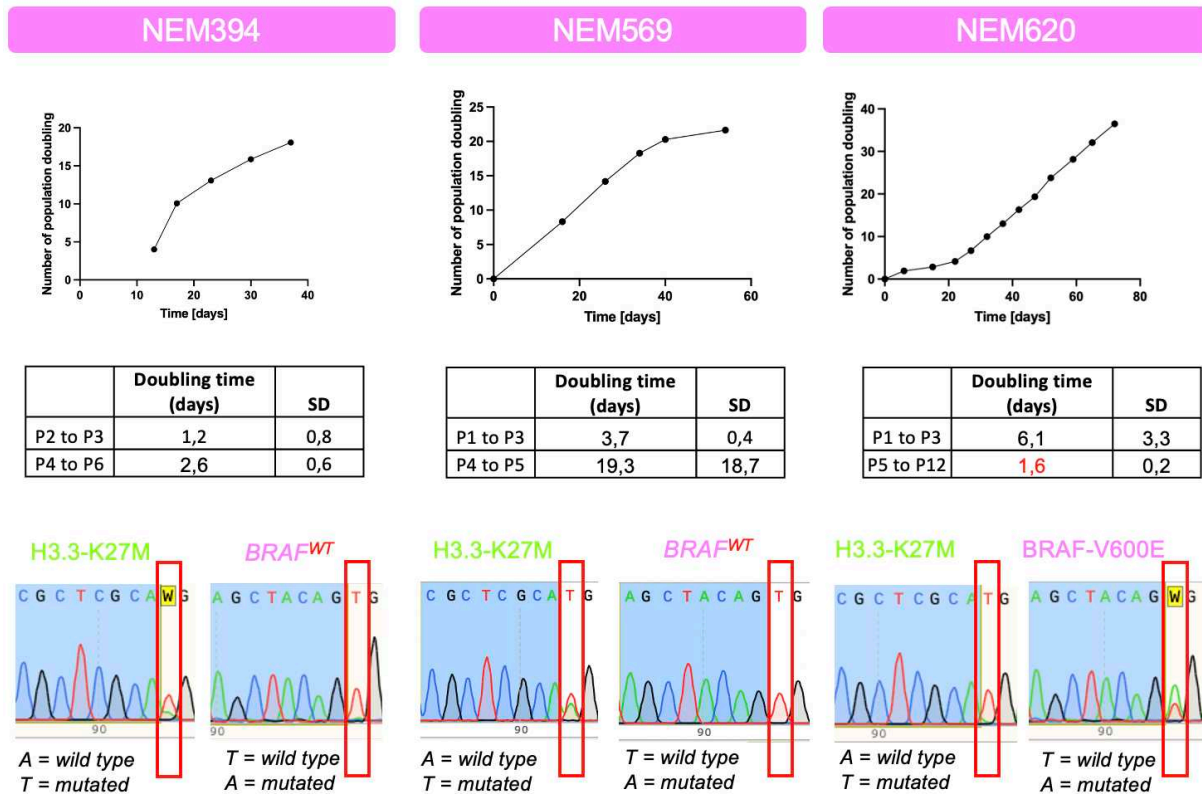


Figure R4 : Caractéristiques des trois modèles *in-vitro* de DMG H3.3K27M BRAFV600E

Courbes de prolifération des NEM394, 569 et 620 cultivées en condition de cellules souches neurales en normoxie. Les temps de doublement en fonction des passages sont indiqués en dessous de chaque graphique. Les déviations standards (SD) ont été ajoutés, de grandes déviations peuvent être observées lorsque la prolifération atteint un plateau. Les résultats de séquençage Sanger (en bas) de *H3F3A* et *BRAF* des différentes lignées réalisées entre P4 et P5 sont indiqués. *WT*, sauvage. *P*, Passage.

	NEM394 (BIOMEDE_72)	NEM569 (RARE_282)	NEM620 (BIOMEDE2_007)
Type de chirurgie & localisation tumorale	Biopsie au diagnostic (Tronc)	Biopsie au diagnostic (Thalamus)	Biopsie au diagnostic (Thalamus)
Génotype tumeur primaire	H3.3K27M TP53 ^{WT} BRAF ^{V600E}	H3.3K27M TP53 ^{WT} BRAF ^{V600E}	H3.3K27M TP53 ^{WT} BRAF ^{V600E}
Génotype tumeur à la rechute	Pas de rechute du patient	Pas de rechute à ce jour	Pas de rechute à ce jour
Établissement lignée cellulaire (normoxie)	Non, arrêt à 20 divisions cellulaires	Non, arrêt à 22 divisions cellulaires	Oui, pas d'arrêt > 35 divisions cellulaires
Génotype lignée cellulaire (normoxie) (entre passage 4 et 5)	H3.3K27M TP53 ^{WT} BRAF ^{WT}	H3.3K27M TP53 ^{WT} BRAF ^{WT}	H3.3K27M TP53 ^{WT} BRAF ^{V600E}
Établissement lignée cellule (hypoxie)	Non, arrêt à 25 divisions	n.a.	n.a.
Génotype lignée cellulaire (hypoxie)	H3.3K27M TP53 ^{WT} BRAF ^{WT}	n.a.	n.a.

Table R1 : Récapitulatif sur l'établissement de modèles *in-vitro* de DMG H3.3K27M BRAFV600E

Cependant, nous pouvons observer une hétérogénéité entre les 3 modèles. Premièrement, la composition clonale diverge entre les modèles. Les lignées NEM394 et 569 sont mutés H3.3K27M mais BRAF sauvage, comme nous pouvons le voir sur les résultats de séquençage Sanger, alors que NEM620 est H3.3K27M BRAFV600E (Fig. R1). Ces résultats indiquent que le clone double mutant H3.3K27M BRAFV600E disparaît au profit du clone ancestral simple muté H3.3K27M au cours de l'établissement des lignées NEM394 et 569 mais pas pour NEM620. Un séquençage Sanger peut indiquer des proportions. On observe pour NEM 620 (dont la tumeur d'origine n'a pas de CNA sur *H3F3A* et *BRAF*) à P4 une absence d'allèle sauvage de *H3F3A* et pour *BRAF* une plus forte proportion d'allèles mutés par rapport au sauvage. Il est possible qu'une sélection clonale ait eu lieu au profit d'un clone avec une perte des allèles sauvages *H3F3A* et *BRAF*. Afin de confirmer cette hypothèse, un nouveau séquençage ainsi qu'un nouveau génotypage à un passage plus tardif devront être réalisés. Il est légitime de se demander pourquoi l'établissement de 2/3 modèles (NEM394 et 569) dérivés de DMG H3.3K27M BRAFV600E n'a pas permis l'amplification du clone double muté au profit du clone ancestral simple muté H3.3K27M alors que le clone double muté a été amplifié lors de l'établissement du troisième modèle (NEM620). En effet, les deux premiers modèles laissent penser que les conditions de cultures ne sont pas propices au maintien et à l'expansion de la population H3.3K27M BRAFV600E mais NEM620 est une exception. Cette exception pourrait provenir d'une caractéristique intrinsèque aux cellules de la tumeur ou alors le résultat d'une pression *in-vitro* avec l'émergence d'un clone double muté adapté à la culture.

Deuxièmement, nous pouvons noter que ces mêmes deux modèles (NEM394 et 569) arrêtent de proliférer autour de 20 divisions alors que NEM620 prolifère encore, à plus de 35 divisions. Plus particulièrement, nous notons une allure de courbe de croissance cellulaire différente selon le génotype du clone H3.3K27M ou H3.3K27M BRAFV600E en culture. Le temps de doublement moyen est plutôt rapide lors des premiers passages post-mise en culture pour les cultures simples mutées NEM394 ($1,2 \pm 0,8$ jours) et NEM569 ($3,7 \pm 0,4$ jours) et ensuite elles stoppent leur prolifération. Alors que pour la culture H3.3K27M BRAFV600E NEM620, les premiers passages sont plutôt lents avec un temps de doublement moyen de $6,1 \pm 3,3$ jours et ensuite plus rapide à partir de P4 avec un temps de doublement moyen de $1,6 \pm 0,2$. Ce schéma laisse à penser à la présence d'une sélection clonale. Il faut noter que ces NEM620 effectuent une division en moins de 48 heures ce qui est très rapide. Généralement, les modèles de DMG_K27 qui prolifèrent les plus rapidement sont H3.3K27M et *TP53* mutés, dont NEM292 avec un temps de doublement moyen de 1,92 jours (Plessier *et al.*, 2017). Ce même modèle ne présente pas d'arrêt de prolifération lors d'une culture supérieure à 200 divisions cellulaires. Le génotype de *TP53* est donc à vérifier sur NEM620.

Récemment, un protocole de développement de modèles dérivés de LGGs BRAFV600E a été publié démontrant l'importance du rôle de l'hypoxie (Abdullah *et al.*, 2022). En effet, la culture en hypoxie diminue le stress oxydatif intracellulaire. Nous avons testé la culture en hypoxie à 5% d'oxygène avec une hotte à hypoxie pour une hypoxie continue (en comparaison avec seulement un incubateur en hypoxie). Cette hotte a été quelque fois défectueuse en cours d'expérimentation donc les résultats sont à prendre avec précaution. Il semblerait que la culture en hypoxie retarde l'arrêt de prolifération de 5 divisions cellulaires ce qui représente $\frac{1}{4}$ du nombre de divisions totales des NEM 394 en normoxie (Fig. R5). Ces résultats nécessitent une validation avec une hotte hypoxie 100% fonctionnelle et en parallèle la même expérience pourrait être réalisée pour NEM569 et pour les prochaines biopsies fraîches H3.3K27M BRAFV600E. Cependant, la dynamique clonale ne change pas et le clone ancestral H3.3K27M *BRAF^{WT}* devient vite majoritaire comme en normoxie.

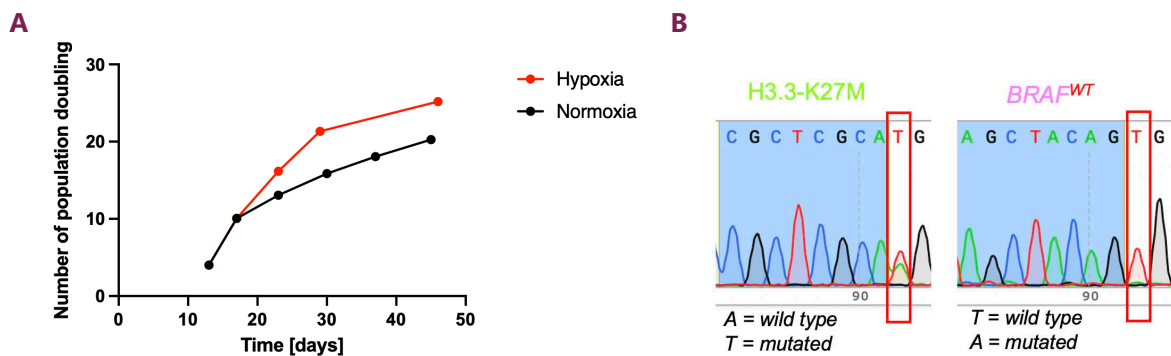


Figure R5 : Impact du niveau d'oxygène sur la croissance cellulaire des NEM394

(A) Courbe de prolifération des NEM394 en normoxie à 20% O₂ (courbe rouge) ou hypoxie à 5% O₂ (courbe noire). (B) Résultats de séquençage Sanger de *H3F3A* et *BRAF* de NEM394 en hypoxie à passage 3. *WT*, sauvage.

Modèles de DMG_H3.3K27M FGFR1N546K

Deux modèles sur trois ont proliféré à partir de la dissociation de trois biopsies de DMG_H3.3K27M FGFR1N546K issues du thalamus, en condition souche et normoxie (Fig. R6 ; Table R2).

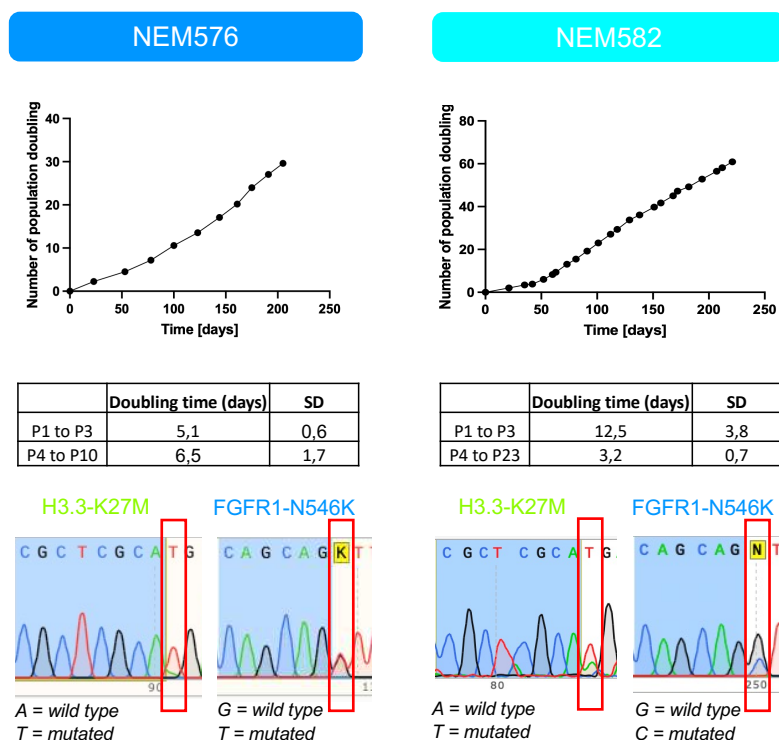


Figure R6 : Caractéristiques de deux modèles in-vitro de DMG H3.3K27M FGFR1N546K

Courbes de prolifération des NEM576 et NEM582 cultivés en condition de cellules souches neurales en normoxie. Les temps de doublement en fonction des passages sont indiqués en dessous de chaque graphique. Les résultats de séquençage Sanger de *H3F3A* et *FGFR1* des différentes lignées réalisées entre passages 4 et 5 ont été ajoutés. *WT*, sauvage. *P*, Passage.

	NEM499 (RARE_251)	NEM576 (BIOMEDE_322)	NEM582 (RARE_296)
Type de chirurgie & localisation tumorale	Exérèse après rechute (bulbo-cervical)	Exérèse après rechute (Thalamus)	Biopsie au diagnostic (Thalamus)
Génotype tumeur primaire	H3.3K27M TP53 ^{WT} FGFR1N546K	H3.3K27M TP53 ^{WT} FGFR1N546K	H3.3K27M TP53 ^{WT} FGFR1N546K
Génotype tumeur à la rechute	H3.3K27M TP53 ^{WT} FGFR1N546K	H3.3K27M TP53 ^{WT} FGFR1N546K	Pas de rechute à ce jour
Établissement lignée cellulaire (normoxie)	Non	Oui, pas d'arrêt ≥ 30 divisions	Oui, pas d'arrêt ≥ 60 divisions
Sous-type de DMG (classification méthylome)	MAPKa	MAPKa	H3.3
Génotype lignée cellulaire (normoxie)	-	H3.3K27M FGFR1N546K	H3.3K27M FGFR1N546K
Établissement lignée cellulaire (hypoxie)	n.d.	n.d.	

Table R2 : Récapitulatif de l'établissement de modèles *in-vitro* de DMG H3.3K27M FGFR1N546K (n.d, non disponible)

Les cellules de NEM499 dérivées de la rechute de RARE_251 ont adhéré mais elles n'ont pas proliféré dans ces conditions de culture. Cela peut être la conséquence d'un problème technique (i.e., mauvaise conservation lors du transport) ou alors d'une spécificité biologique intrinsèque aux cellules. Les deux autres modèles NEM576 et 582 sont H3.3K27M FGFR1N546K comme le montre les résultats de séquençage Sanger de *H3F3A* et *FGFR1* (Fig. R6). De plus, ces modèles ne sont pas caractérisés par un arrêt de prolifération malgré plus de 30 divisions pour NEM576 et 60 divisions pour NEM582. Nous pouvons constater un temps moyen de doublement lent plutôt uniforme lors des premiers passages mais aussi après passage 4, avec respectivement, des temps de $5,1 \pm 0,6$ et $6,5 \pm 1,7$ jours pour NEM576. Ce n'est pas le cas pour NEM582 qui présente une croissance plutôt lente lors des premiers passages avec un temps de doublement moyen de $12,5 \pm 3,8$ jours et après passage 4 celui-ci diminue à $3,2 \pm 0,7$ jours. Ce type de croissance pourrait laisser à penser à une sélection clonale *in-vitro*.

Malgré la présence d'une mutation FGFR1N546K, les deux modèles n'appartiennent pas au même sous-type tumoral d'après la classification par le profil de méthylation de l'ADN (cf. résultats de méthylome Fig. 5 de l'article). NEM576 dérivée de l'exérèse thalamique de BIOMEDE_322 se regroupe avec le sous-type des DMG_K27-MAPKa, alors que NEM582 dérivée de la biopsie thalamique au diagnostic de RARE_296 présente un profil spécifique du sous-type des DMG_H3.3K27M. Pour rappel, cela implique que la cellule d'origine et l'oncogenèse sont différentes entre les sous-types. Le succès de développer

deux modèles avec les mêmes altérations de *H3F3A* et *FGFR1* mais issues de différentes cellules d'origine est une opportunité unique pour mieux comprendre l'impact de la cellule d'origine. Premièrement, nous retenons que le temps de doublement moyen est deux fois plus lent dans la lignée NEM576 dérivée d'un DMG appartenant au sous-type MAPKa que dans NEM582 dérivée d'un DMG appartenant au sous-type H3.3K27M. Ces résultats préliminaires sont en corrélation avec la survie plus longue observée dans les DMG du sous-type MAPKa *versus* H3.3. Il sera intéressant de voir si cette tendance persiste dans les prochains modèles de DMG avec une altération de *FGFR1* appartenant au sous-type MAPKa.

Pour résumer, nous avons observé des disparités vis-à-vis des populations clonales et des temps de doublement entre les modèles *in-vitro* dérivés de DMG_K27-MAPKa *BRAF* ou *FGFR1* mutés. Ensuite, nous avons donc effectué une caractérisation de ces modèles afin de mieux comprendre les causes qui pourraient être à l'origine de l'hétérogénéité entre les modèles.

Caractérisation des modèles *in-vitro* de DMG K27-MAPKa

Le but d'une caractérisation d'un modèle cellulaire est de déterminer si ce modèle récapitule les spécificités de la tumeur dont il dérive. En parallèle de caractériser nos modèles de DMG_K27-MAPKa, nous voulions définir quelles différences existent entre (i) les modèles de DMG_K27 *BRAF/FGFR1^{WT}* *versus* *BRAF/FGFR1^{MUT}* et (ii) intra-DMG *FGFR1^{MUT}* vis-à-vis de la question de la cellule d'origine et de l'oncogenèse. Pour ce faire, nous avons utilisé 2 modèles de DMG_H3.3K27M *BRAF/FGFR1^{WT}* (sous-type H3.3) : NEM290 (*TP53^{MUT}*) et NEM445 (*TP53^{WT}*), 1 modèle de DMG_H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* (sous-type H3.3) NEM582 et 2 modèles de DMG_K27-MAPKa H3.3K27M et *BRAFV600E* ou *FGFR1N546K*, respectivement NEM620 et NEM576 (Table R3). Comme décrit, il s'agit uniquement des cultures de DMG_K27-MAPKa H3.3K27M *BRAF^{MUT}* or il existe deux modèles dérivés de DMG_K27-MAPKa qui ont perdu le clone H3.3K27M *BRAFV600E* au profit du clone simple muté H3.3K27M (NEM394 et 569). Nous aborderons la caractérisation de ces modèles dans un second temps.

Modèles	DMG_K27		DMG_K27-MAPK- <i>BRAF^{MUT}</i>	DMG_K27-MAPK- <i>FGFR1^{MUT}</i>	DMG_K27- <i>FGFR1^{MUT}</i>
	290	445	620	576	582
Sous-type tumoral	H3.3	H3.3	MAPKa	MAPKa	H3.3
H3.3	K27M	K27M	K27M	K27M	K27M
<i>TP53</i>	R175H	WT	WT	WT	WT
<i>BRAF</i>	WT	WT	V600E	WT	WT
<i>FGFR1</i>	WT	WT	WT	N546K	N546K

Table R-3 : Profil moléculaire des modèles de DMG_K27 et DMG_K27-MAPKa
WT, sauvage.

Pour la caractérisation de nos modèles, nous avons opté pour (i) l'étude du niveau de triméthylation en H3K27, conséquence de H3K27M ; (ii) l'étude du niveau d'activation de la voie MAPK, conséquence *BRAF/FGFR1^{MUT}* et (iii) l'étude des marqueurs de sénescence, conséquence de la suractivation voie MAPK. Les méthodes expérimentales et les résultats attendus sont décrits dans le tableau ci-dessous (Table R4).

Modèles	DMG K27	DMG K27-MAPK-BRAF _a	DMG K27-MAPK-FGFR1 _a	DMG K27-FGFR1 _a
Niveau de H3K27me3 (Western Blot)	Perte	Perte	Perte	Perte
Niveau d'activation voie MAPK (Phospho-ERK -Western Blot)	Moyen	Élevé	Élevé	Élevé
Senescence : 1) Activité β-galactosidase 2) Expression génique & protéique de p21 (RT-qPCR & western blot)	Absente*	Présente	Présente	Absente (Pas de sénescence dans la tumeur dérivée)

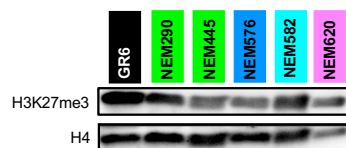
* Les modèles H3.3K27M TP53^{WT} peuvent être caractérisés par une sénescence induite par un raccourcissement des télomères *in-vitro*, résultats de thèse de Chloé Subecz au sein de l'équipe. RT-qPCR, reverse transcription PCR quantitative

Table R4 : Résultats attendus de la caractérisation des modèles *in-vitro* de DMG K27 et K27-MAPKa

Niveau de H3K27me3

Les DMG_K27 ou DMG_K27-MAPKa sont caractérisés par une perte globale de triméthylation en H3K27 à l'échelle du génome induite par la mutation H3K27M (Bender *et al.*, 2013). En conséquence, nous avons étudié le niveau global de H3K27me3 par western blot au sein de nos modèles dérivés afin de vérifier que cette caractéristique, présente dans les cellules tumorales à la biopsie, est maintenue dans les cellules tumorales *in-vitro* (Fig. R7).

A



B

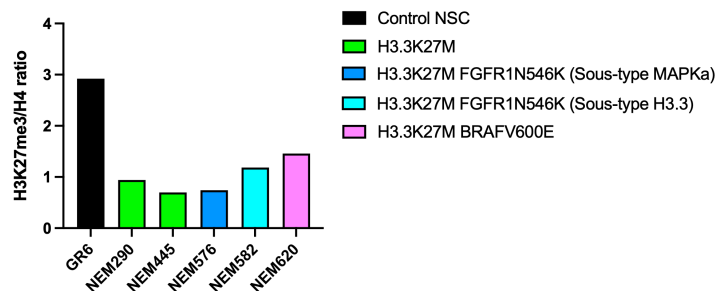


Figure R7 : Niveau de H3K27me3 au sein des modèles *in-vitro* de DMG K27 et K27-MAPKa

(A) Niveau de H3K27me3 évalué par Western Blot à partir d'extractions protéiques acides de modèles *in-vitro* de DMG_K27 (NEM290 et 445, en vert), d'un DMG_K27 *FGFR1^{MUT}* (NEM582, cyan) appartenant

aussi sous-type H3.3 et d'un DMG_K27-MAPKa *BRAF*^{MUT} (NEM620, rose) ou *FGFR1*^{MUT} (NEM576, bleu) appartenant sous-type MAPKa. Le contrôle de charge est réalisé par la quantification protéique de l'histone 4 (H4). La lignée GR6 (cellules souches neurales) est un contrôle positif avec un niveau homéostatique de H3K27me3. (B) Quantification relative du niveau de H3K27me3 par rapport au niveau d'expression de H4 issue de (A).

Nous avons utilisé la lignée GR6 qui correspond à des cellules souches neurales (NSC) dont l'histone H3 est sauvage et donc avec un niveau homéostatique de H3K27me3 (contrôle positif). Comme attendu, nous observons une diminution de H3K27me3 dans tous les modèles de DMG_K27 par rapport aux NSC d'un facteur 2 à 4 selon les modèles. Ces résultats indiquent que les modèles de DMG_K27-MAPKa conservent la diminution de H3K27me3 comme les tumeurs primaires dont ils dérivent.

Niveau d'activation de la voie MAPK

Les mutations BRAFV600E et FGFR1N546K induisent en cascade une activation constitutive des protéines en question et en conséquence une activation aberrante de la signalisation MAPK. Nous avons, dans un premier temps, confirmé l'expression des allèles mutés *BRAF* et *FGFR1* dans les modèles respectifs NEM620 et NEM576, NEM582 (Fig. R8).

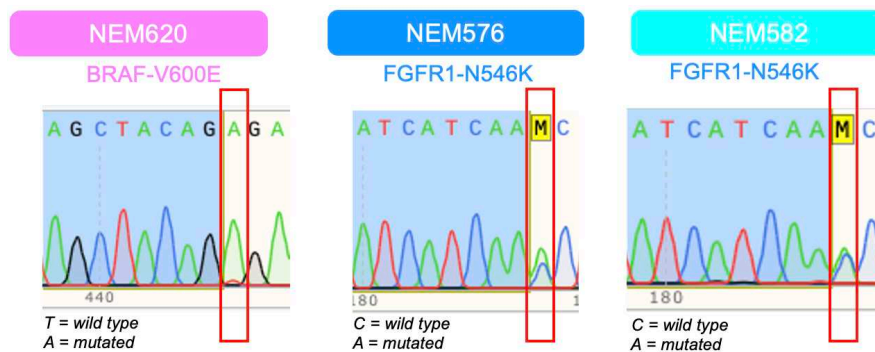


Figure R8 : Expression des allèles mutés *BRAF* et *FGFR1* au sein des modèles de DMG_K27-MAPKa
Séquençages sanger de l'ADN complémentaire de *BRAF* et *FGFR1*.

Nous pouvons noter l'expression presque exclusive de l'allèle muté *BRAF* dans NEM620 au passage 5, ce qui pourrait être causé par une répression de l'allèle sauvage, une surexpression de l'allèle muté ou à une sélection d'un clone avec une perte de l'allèle *BRAF* sauvage. Dans un second temps, nous avons étudié le niveau d'activation de la voie MAPK via ERK, kinase de la voie. Pour cela, nous avons étudié la quantité de ERK activée sous forme phosphorylée par rapport à la quantité totale de ERK par western blot, à partir d'extraits protéiques totaux issus de différents modèles de DMG (Fig. R9).

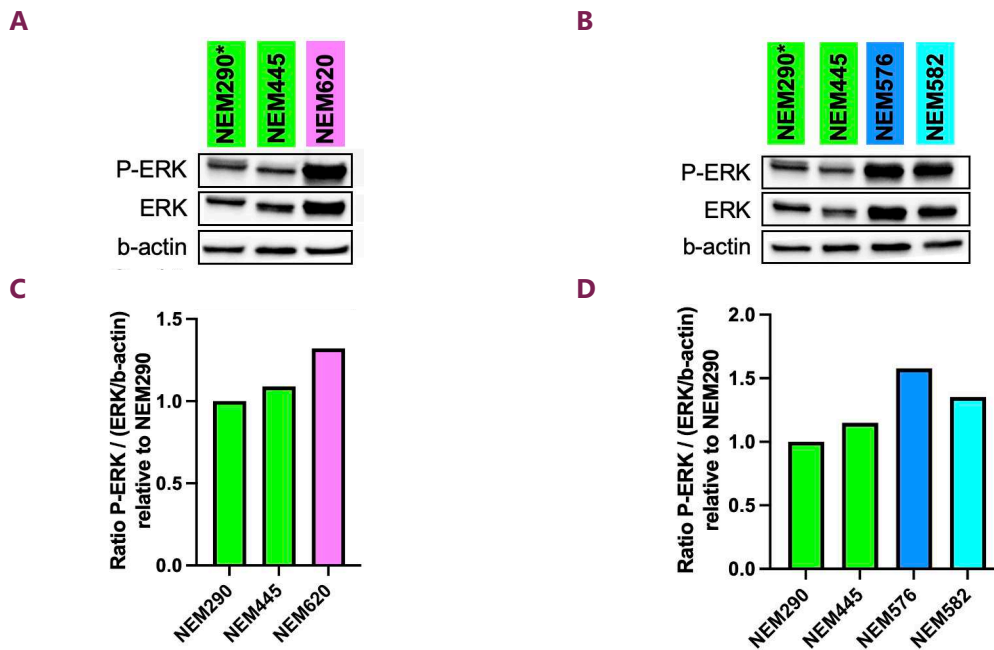


Figure R9 : Niveau d'activation de la voie MAPK au sein des modèles de DMG_K27-MAPKa

(A) Niveau d'activation de la voie MAPK évalué par Western Blot à partir d'extrait de protéines totales *in-vitro* de DMG_K27 (NEM290 et 445, en vert), d'un DMG_K27 *FGFR1^{MUT}* (NEM582, cyan) appartenant aussi sous-type H3.3 et de DMG_K27-MAPKa *BRAF^{MUT}* (NEM620, rose) ou *FGFR1^{MUT}* (NEM576, bleu) appartenant sous-type MAPKa. Le contrôle de charge est évalué par la quantité protéique de β -actine. (B) Quantification relative du niveau d'activation de la voie MAPK via le ratio ERK phosphorylé (P-ERK) par rapport à ERK total normalisé par rapport à la beta-actine. * Modèle *TP53* muté.

Comme attendu, nous avons observé une augmentation du niveau d'activation de la voie MAPK dans les modèles de DMG avec une altération de la voie MAPK et plus précisément de 1,3 fois pour le modèle H3.3K27M *BRAF^{MUT}* (NEM620), 1,6 fois pour le modèle de DMG_K27M-MAPKa *FGFR1^{MUT}* (NEM576) et 1,4 fois pour le modèle DMG_K27 *FGFR1^{MUT}* sous-type H3.3 (NEM582), par rapport au modèle simple muté DMG_H3.3K27M (NEM290). Cependant, l'augmentation est plutôt faible, en dessous d'un facteur 2 ce qui est moindre que ce que nous attendions. Cependant, nous avons noté une forte augmentation de la quantité de ERK totale dans les modèles de DMG avec une activation de la voie MAPK par rapport aux modèles *BRAF/FGFR1* sauvages. Pour résumer, l'ensemble des modèles de DMG_K27-MAPKa semble présenter une activation de la voie MAPK plus importante que dans les modèles de DMG_H3.3K27M classiques *TP53* sauvage ou muté. Mais il est nécessaire de valider ces résultats avec au minimum un second western blot, par exemple, en regardant le niveau d'activation de MEK, kinase plus en amont dans la signalisation MAPK.

Senescence

Lors de la caractérisation moléculaire des DMG_K27-MAPKa, nous avons observé une signature transcriptomique de sénescence associée à une surexpression de *CDKN1A* codant pour P21, régulateur

du cycle cellulaire et marqueur de sénescence. La sénescence est un état cellulaire complexe qui varie en fonction du facteur inducteur et du contexte ou type cellulaire. Les caractéristiques principales de la sénescence *in-vitro* sont généralement une morphologie cellulaire aplatie avec des vésicules intracellulaires, une activité élevée de la β -galactosidase, l'expression de P16 et /ou P21 (González-Gualda *et al.*, 2021). En conséquence, nous souhaitons vérifier que le modèle de DMG_K27-MAPKa NEM576 présentait aussi un phénotype sénescence par l'étude des caractéristiques citées ci-dessus. Nous nous attendons cependant à une absence de sénescence dans le modèle NEM582 car ce modèle est dérivé de la tumeur H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} appartenant au sous-type H3.3 qui n'exprime aucun marqueur de sénescence (i.e. *CDKN1A* et *CDKN2A*). Nous avons aussi étudié la sénescence dans les deux modèles de DMG_K27-MAPK *BRAF*^{MUT} mais enrichis en clone H3.3K27M *BRAF*^{WT} (NEM394 et 569) vis-à-vis de l'arrêt de prolifération *in-vitro* précoce observé.

Il semble que les 2 modèles dérivés de DMG_K27-MAPKa *BRAF*^{MUT} mais enrichis en clone H3.3K27M *BRAF*^{WT} (NEM394 et 569) présentent une morphologie de sénescence avec des cellules aplaties, élargies (Fig. R10).

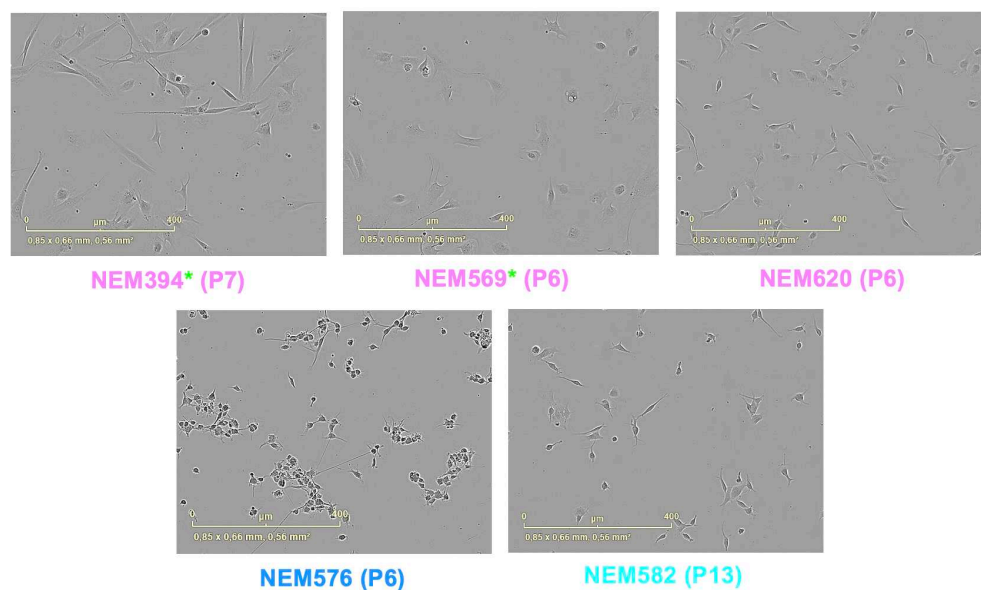


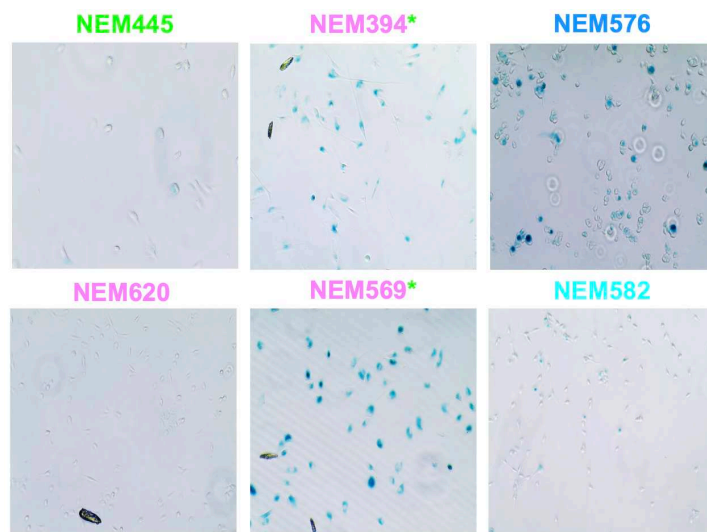
Figure R10 : Morphologies cellulaires des modèles de DMG K27-MAPKa

Images de microscopie à contraste de phase au grossissement 10X. Il y a 5 modèles de DMG K27-MAPKa dont 3 dérivés d'une tumeur H3.3K27M BRAFV600E (NEM394, 569 et 620) et un dérivé d'un gliome H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} (NEM576) (sous-type MAPKa) et un modèle de DMG K27 (sous-type H3.3) avec une mutation de *FGFR1* (NEM582). * Modèles enrichis en clone simple muté H3.3K27M *BRAF*^{WT} dérivé d'un gliome H3.3K27M BRAFV600E.

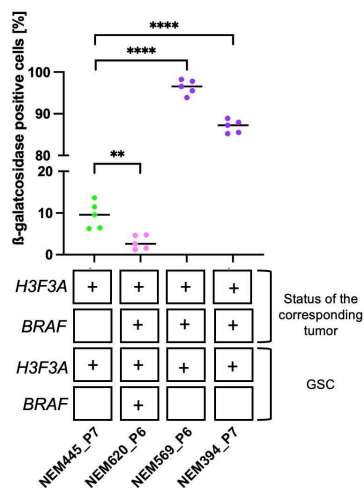
Cela ne semble pas être le cas pour le modèle H3.3K27M BRAFV600E (NEM620). Les cellules du modèle DMG_K27-MAPKa *FGFR1*^{MUT} (NEM576) (sous-type MAPKa) sont très arrondies et plutôt agrégées. Le

dernier modèle DMG K27M *FGFR1*^{MUT} (NEM582) (sous-type H3.3) semble être plus hétérogène avec un mélange de cellules élargies, aplatis et une autre population plutôt avec un profil non-sénescé (non aplati). Nous avons ensuite réalisé un test d'activité β -galactosidase (β -gal). La β -gal est une enzyme lysosomale qui catalyse l'hydrolyse des β -galactosides en monosaccharides. Ce test consiste à évaluer son activité par la catalyse du 5bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside (XGal) en galactose et un produit chromogénique bleu indigo. Les cellules bleues présentent donc une forte activité β -gal à l'opposé des cellules translucides /blanches. Visuellement, nous avons noté, en fonction des modèles, des cellules bleues avec des degrés d'intensité très diverses et des cellules blanches (Fig. R11A).

A



B



C

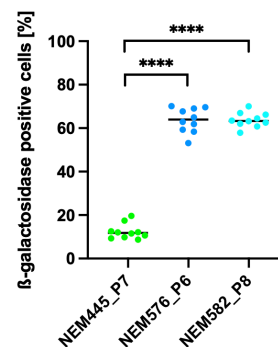


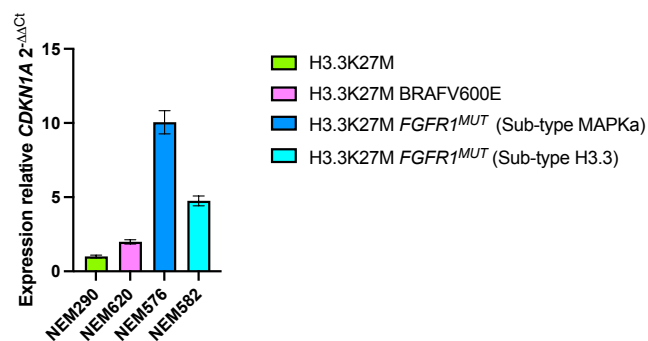
Figure R11 : Niveau d'activité β -galactosidase dans les modèles de DMG_K27-MAPKa

(A) Images prises au microscope à contraste de phase au grossissement 40X. Il y a 2 modèles de DMG_K27 (sous-groupe H3.3) avec (NEM582) ou sans (NEM445) mutation de *FGFR1*, puis 4 modèles de DMG_K27-MAPKa dont 3 dérivés d'une tumeur H3.3K27M BRAFV600E (NEM394, 569 et 620) et un dérivé d'un DMG_H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} (NEM576) et un modèle de DMG_K27 (sous-groupe H3.3) avec une mutation de *FGFR1* (NEM582). * Modèles enrichis en clone simple muté H3.3K27M *BRAF*^{WT} dérivés d'un gliome H3.3K27M BRAFV600E. Comparaison du pourcentage de cellules positives à la β -gal (bleues)

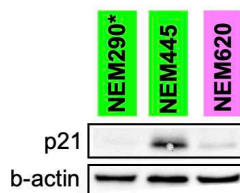
selon le statut mutationnel : *BRAF* muté (B) ou *FGFR1* muté (C). (test t non-apparié : ** p value = 0,0036 ; **** p value <0,0001).

Comme attendu, le modèle de DMG_K27 (NEM445) présente un faible pourcentage médian de 10% de cellules bleues donc avec une activité β -gal faible (Fig. R11 B, C). Les modèles de DMG K27-MAPKa enrichis en clone H3.3K27M *BRAF*^{WT} ont un pourcentage médian de cellules positives à la β -gal élevé (NEM394, 87% et NEM569, 97%), ce qui était attendu d'après la morphologie cellulaire et l'arrêt de prolifération en dessous de 25 divisions cellulaires *in-vitro*. Cependant, seul le modèle DMG_K27-MAPKa *BRAF*^{MUT} (NEM620) n'a pas d'activité β -gal (médiane à 3%). Ce résultat était attendu du fait de la vitesse de division élevée et de la morphologie cellulaire, mais non attendu du fait de la présence de BRAFV600E. Les 2 modèles mutés *FGFR1* (NEM576, 582), indépendamment du sous-type tumoral, présentent une augmentation significative du pourcentage de cellules positives à la β -gal avec une médiane supérieure à 60% *versus* 12% pour le modèle *FGFR1* sauvage (NEM445) (test-t non apparié : **** p = <0,0001). Cependant, on observe une forte différence entre les deux modèles concernant l'intensité du bleu qui est proportionnel à l'activité β -gal. Cela indiquerait que l'activité β -gal est beaucoup plus importante dans le modèle *FGFR1*^{MUT} dérivé d'un DMG_K27-MAPKa que dérivé d'un DMG_K27. Ce résultat était attendu pour NEM576 dérivé d'un DMG K27-MAPKa mais pas pour NEM582 dérivé d'un DMG_K27 qui n'exprime aucun des deux marqueurs de sénescence. Pour approfondir, nous nous sommes intéressés à l'expression génique et protéique de P21, respectivement par RT-PCR quantitative et western blot (Fig. R12).

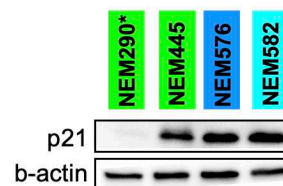
A



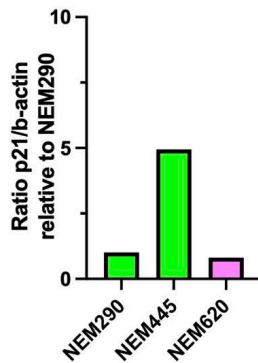
B



C



D



E

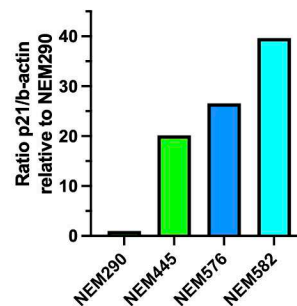


Figure R12 : Niveau d'expression du marqueur de sénescence p21 dans les modèles de DMG K27-MAPKa

(A) Expression de *CDKN1A* évaluée par RT-qPCR de 2 modèles de DMG_K27 (sous-type H3.3) avec (NEM582) ou sans (NEM290) mutation de *FGFR1*, 2 modèles de DMG_K27-MAPKa dont un *BRAF^{MUT}* (NEM620) et un *FGFR1^{MUT}* (NEM576). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type entre triplicat d'une même expérience. (B et C) Expression de P21 évaluée par western blot dans les différents modèles. * modèle avec une mutation de *TP53*. (D et E) Quantification relative de P21 par rapport à la quantité de protéines contrôles de charge β-actine.

Comme attendu, nous avons noté une faible expression de *CDKN1A* avec seulement un facteur 2 dans le modèle H3.3K27M BRAFV600E négatif au test β-gal (NEM620) par rapport au niveau d'expression dans le modèle de DMG_K27 négatif au test β-gal (NEM290) (Fig. R12A). Au contraire, l'expression de *CDKN1A* est retrouvée beaucoup plus élevée avec un facteur 5 et 10 pour les modèles *FGFR1^{MUT}* dérivés respectivement d'un DMG K27-MAPKa et DMG K27 aussi par rapport à NEM290. Il était plutôt surprenant d'observer une expression de *CDKN1A* dans NEM582 car ce gène est à peine exprimé dans la tumeur dérivée R_296 (cf. résultat complémentaire du manuscrit) mais peu surprenant au vu de la forte activité β-gal dans le modèle. Au niveau protéique, P21 est 5 fois plus exprimé dans le modèle de DMG_K27 *TP53^{WT}* (NEM445) versus *TP53^{MUT}* (NEM290) ce qui s'explique par la mise en place de la sénescence induite par un raccourcissement des télomères démontrée par Chloé Subecz dans le laboratoire (Fig. R12B, D). Comme attendu, on n'observe peu d'expression de P21 dans le modèle H3.3K27M BRAFV600E (NEM620) négatif au test β-gal, et équivalente au contrôle négatif DMG_K27 (NEM290). Dans les deux modèles *FGFR1^{MUT}*, P21 est surexprimé avec un facteur 26 et 40 respectivement dans les modèles NEM576 et NEM582 par rapport à NEM290 (Fig. R12C, E). Ces résultats sont en adéquation avec l'étude au niveau de l'expression du gène *CDKN1A* vis-à-vis de la surexpression mais on se serait attendu en conséquence à une expression protéique plus élevée dans NEM576 que NEM582.

Pour résumer, nous avons montré que :

- 1) Le modèle H3.3K27M BRAFV600E (NEM620), négatif au test β-gal avec peu d'expression de P21 ne récapitule pas la caractéristique de sénescence présente dans la tumeur primaire. L'absence de

sénescence explique la morphologie non-sénescence, la vitesse élevée de doublement et pourquoi le clone H3.3K27M BRAFV600E a été amplifié pour ce modèle et pas les deux autres (NEM394 et 569). La culture du clone H3.3K27M BRAFV600E de NEM620 est probablement le résultat d'une sélection *in-vitro* d'un clone double muté adapté à la culture cellulaire. Il est impossible de déterminer si le clone est apparu *in-vitro* ou s'il était préexistant dans la tumeur. Il serait intéressant d'identifier l'évènement à l'origine en comparant le transcriptome de la tumeur primaire avec le séquençage de l'exome de la lignée NEM620.

2) L'arrêt de prolifération des modèles H3.3K27M *BRAF*^{WT} dérivés de DMG K27-MAPKa BRAFV600E (NEM394 et 569) en dessous de 25 divisions est certainement dû à une entrée en sénescence d'après la forte activité β -gal retrouvée présente dans les modèles. Cela nécessite d'être validé avec l'étude de l'expression d'un marqueur de sénescence comme P21 ou P16.

3) Les deux modèles de DMG H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} (NEM576 et 582) présentent tous deux un phénotype pro-sénescence avec une activité β -gal et l'expression du marqueur de sénescence p21. La sénescence de NEM582 n'était pas attendue au vu de l'absence d'expressions de *CDKN1A* (p21) et *CDKN2A* (p16) dans la tumeur dérivée d'un DMG_K27.

Pour terminer, nous nous sommes demandés si la sénescence présente dans les modèles *FGFR1*^{MUT} présentait un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) capable d'impacter la prolifération des cellules présentes dans le microenvironnement par effet paracrine (Faget, Ren and Stewart, 2019). Plus précisément en fonction du sécrétome (protéines sécrétées par les cellules sénescences), la sénescence peut être induite dans les cellules avoisinantes *via* une signalisation paracrine initiée par les cellules sénescences, par exemple induite par un oncogène. Nous avons réalisé des cocultures de cellules non-sénescences marquées à la mKate2 (protéine fluorescente rouge ; NEM290MK) avec des cellules non-sénescences (NEM285) comme contrôle négatif de SASP ou alors avec des cellules *FGFR1*^{MUT} sénescences (NEM582). L'expérience n'a pas été réalisée sur les NEM576 en raison de contraintes de temps. Nous avons suivi en temps réel la prolifération cellulaire des NEM290MK par vidéomicroscopie en utilisant la fluorescence de ces dernières dans différentes conditions de co-culture. (Fig. R13A). Aucune différence de prolifération des NEM290MK sur un suivi de 130 heures n'a été observée dans les différentes co-cultures (Fig. R13B). Cela implique que le SASP du modèle dérivé d'un DMG_K27 *FGFR1*^{MUT} (NEM582) n'a pas d'effet paracrine sur la prolifération des cellules en co-culture. Ce résultat était plutôt attendu car les DMG_K27-MAPKa *BRAF* /*FGFR1*^{MUT} ne présentent pas de signature transcriptomique de SASP (Fig. R13C). Il est tout de même nécessaire de réaliser à nouveau cette expérience sur le modèle NEM576 dérivé d'un DMG_K27-MAPKa *FGFR1*^{MUT} à la différence de NEM582, dérivé d'un DMG_K27 *FGFR1*^{MUT}. En effet, le SASP est très dépendant du contexte /cellule d'origine (Faget et al. 2019).

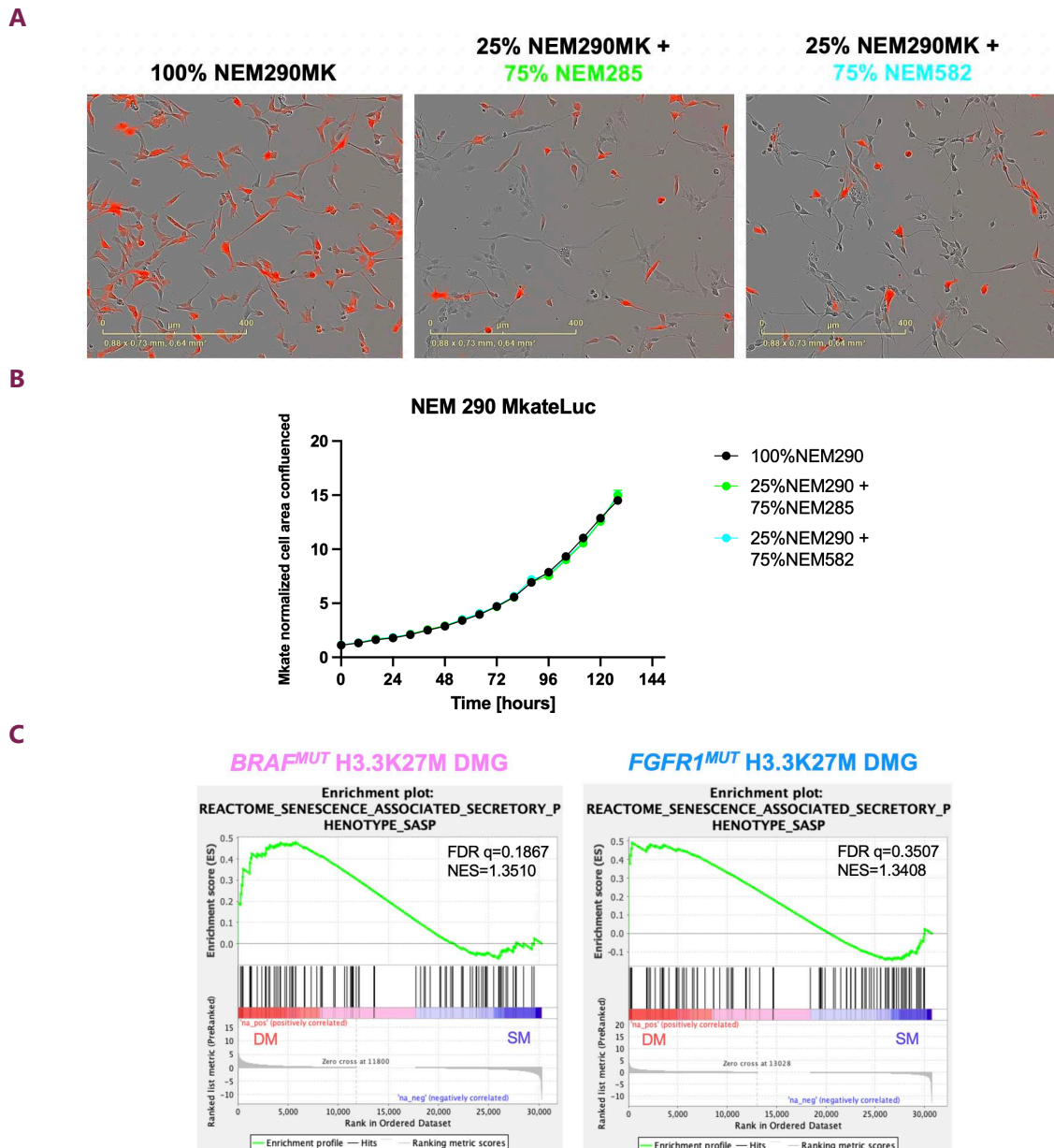


Figure R13 : Évaluation du phénotype sécrétoire associé à la sénescence dans un modèle de DMG K27 *FGFR1^{MUT}*

(A) Images prises au microscope à contraste de phase au grossissement 10X. Chaque image est représentative d'une monoculture (NEM290MK) ou de co-cultures de cellules : (i) NEM290MK marquées à la mKate2 (rouge) et (ii) NEM285 (DMG_K27) ou de NEM582 (DMG_K27 avec une altération de *FGFR1*). (B) Courbe de prolifération des NEM290MK basée sur la fluorescence de la mKate2 en fonction des différentes conditions de co-cultures. (C) Analyse de GSEA montrant l'absence du phénotype sécrétoire associé à la sénescence dans les DMG_K27-MAPKa *versus* DMG_K27. DM, double muté et SM, simple muté. Le score d'enrichissement normalisé (NES) et le taux de faux positif (FDR q) sont indiqués.

Pour conclure, nous avons réussi avec succès à développer un modèle de DMG_K27-MAPKa *FGFR1^{MUT}* (NEM576) qui récapitule les caractéristiques majeures de la tumeur dérivée à savoir la perte de triméthylation en H3K27, la suractivation de la voie MAPK et la sénescence. En ce qui concerne le second modèle *FGFR1^{MUT}* dérivé d'un DMG_K27 (NEM582), celui-ci ne récapitule pas l'ensemble des

caractéristiques de la tumeur dérivée. En effet, *CDKN1A* n'est quasiment pas exprimé dans la tumeur primaire alors que dans le modèle dérivé, P21 est exprimé au niveau génique et protéique. À l'inverse, le modèle de DMG H3.3K27M BRAFV600E dérivé d'un DMG_K27-MAPKa (NEM620) ne récapitule pas la sénescence qui est présente dans la tumeur primaire (données non montrées). L'absence d'un modèle *in-vitro* H3.3K27M BRAFV600E de DMG_K27-MAPK *BRAF^{MUT}* semble être la conséquence de conditions de cultures cellulaires non adaptées.

La sénescence, vulnérabilité thérapeutique pour les DMG MAPKa ?

Nous avons vu précédemment que les modèles de DMG_K27M-MAPKa *FGFR1^{MUT}* (NEM576 et 582) étaient caractérisés par un phénotype de sénescence. Nous nous sommes demandés si cette sénescence ne pourrait pas constituer une vulnérabilité que l'on pourrait cibler. En effet, il existe des drogues dont l'intérêt est d'induire spécifiquement l'apoptose dans les cellules sénescents et d'épargner, en conséquence, les cellules normales ; ces drogues sont appelées sénolytiques. Nous nous sommes dirigés naturellement vers l'Obatoclox qui a déjà été proposé comme sénolytique dans une combinaison thérapeutique pour des modèles *in-vitro* et *in-vivo* de DMG_K27M par *Balakrishnan et al.* en 2021. L'Obatoclox est un inhibiteur de la famille de protéines Bcl-2, protéines anti-apoptotiques. Mécaniquement, les cellules sénescents surexpriment des protéines anti-apoptotiques de la famille bcl-2 afin de ne pas entrer en apoptose, et donc l'inhibition de ces protéines par l'Obatoclox induit spécifiquement l'apoptose dans ces cellules. Nous avons donc traité à l'Obatoclox différents modèles de DMG avec une gamme de concentration allant de 1nM à 10µM dans le but d'évaluer une concentration inhibitrice médiane (IC50 pour en anglais half-maximal inhibitory concentration) c'est-à-dire la concentration de drogue nécessaire pour inhiber de moitié la prolifération cellulaire. Nous avons testé cette drogue sur 3 modèles : 1 modèle de DMG_K27 *FGFR1^{WT}* négatif à la sénescence (NEM290) et 2 modèles H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* positifs à la sénescence dont un dérivé d'un gliome appartenant sous-type H3.3 (NEM582) et un dérivé d'un gliome appartenant au sous-type MAPKa (NEM576). Avec ce design expérimental, nous avons la possibilité d'évaluer la spécificité de la drogue pour les cellules sénescents (*FGFR1^{MUT} versus FGFR1^{WT}*) et l'impact de la cellule d'origine (NEM576 *versus* NEM582). Nous avons observé des IC50 très faibles de l'ordre du nM pour les trois modèles, et dans le même ordre de grandeur pour les 3 modèles (Fig. R13B). La drogue est ainsi efficace sur les cellules indépendamment du statut de sénescence évalué via l'activité β-galactosidase et même plus efficace sur le modèle DMG_K27 *FGFR1^{WT}* (NEM290) négatif à la sénescence. Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps de réaliser de nouveaux tests avec d'autres drogues sénolytiques.

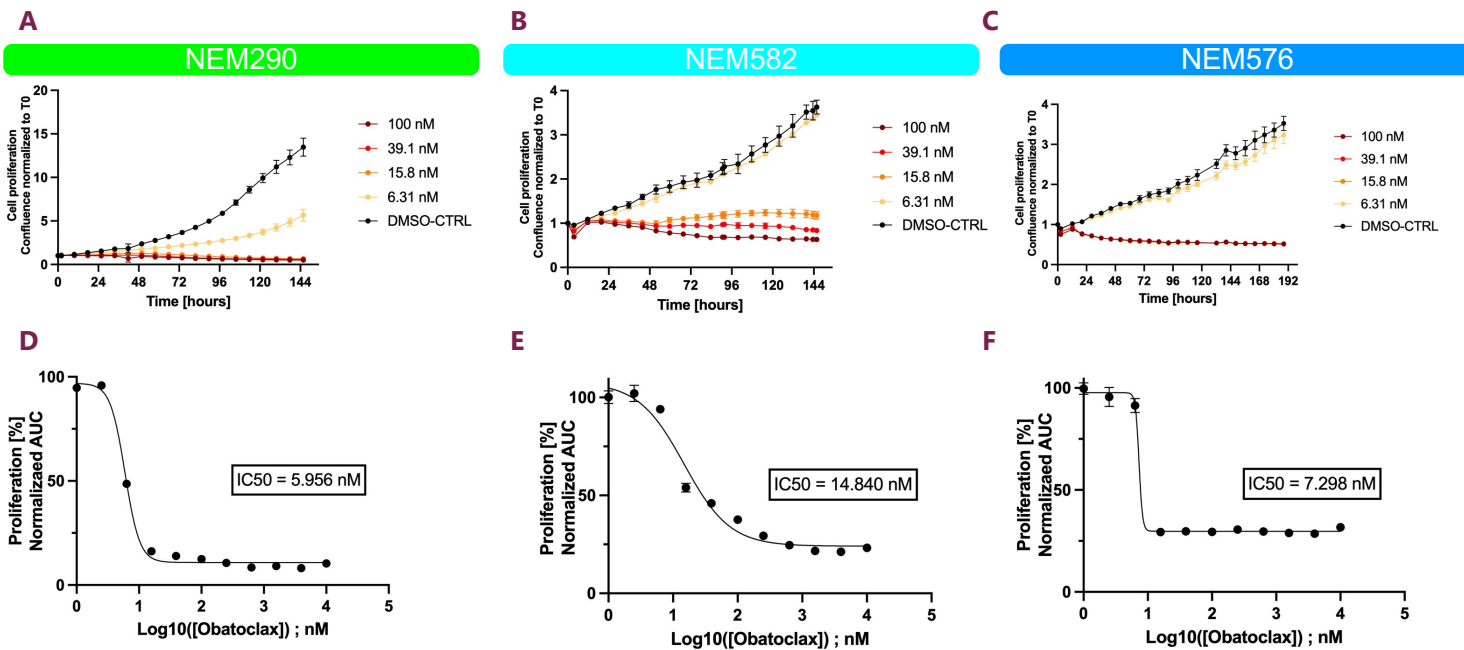


Figure R13B : Évaluation des IC50 après traitement à l'Obatoclox de modèles de DMG_K27 et DMG_K27-MAPKa

Courbes de prolifération de GSC H3.3K27M (NEM290) (A), H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} (NEM582) dérivées d'un gliome du sous-type H3.3 (B) et GSC H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} (NEM576) dérivées d'un gliome du sous-type MAPKa (C) traitées ou non à l'Obatoclox. (D, E, F) Les GSC ont été traitées à l'Obatoclox avec une gamme de 1 nM à 10µM. Les aires sous la courbe normalisées (AUC pour area under the curve) sont placées en fonction de la concentration logarithmique de la drogue afin de déterminer l'IC50 par prism9.

2.1.B Établissement des modèles *in-vivo*

L'étude préclinique ou l'étude chez l'animal constitue la dernière étape avant l'administration d'un médicament-candidat chez l'homme. Cette dernière a pour but d'évaluer l'efficacité et la toxicité de celui-ci dans un modèle plus complexe. L'équipe a mis au point un protocole pour le développement de modèles PDOX et CDOX décrits au sein de l'introduction et dans Plessier *et al.* 2017. Pour rappel, les modèles PDOX sont des xélogreffes orthotopiques de biopsies de patients et ont pour principal avantage une hétérogénéité cellulaire non biaisée par une étape de culture.

L'établissement des modèles PDOX et CDOX a été réalisé par Ludivine Le Dret et Manon Lancien, respectivement, ingénieure d'étude et technicienne d'expérimentation animale au sein de l'équipe.

En 2017, l'équipe a évalué la prise tumorale des PDOX de DMG_K27, tous profils mutationnels, entre 55 et 60% (Plessier *et al.*, 2017). La prise tumorale correspond au développement d'une tumeur au sein d'une souris lorsque celle-ci a été greffée. Nous observons, dans notre cas, une prise tumorale de PDOX de 2/2 modèles dérivés de DMG_K27-MAPKa *BRAF*^{MUT} (Table R5).

	PDOX NEM569	PDOX NEM620
Génotype biopsie	H3.3K27M BRAFV600E	H3.3K27M BRAFV600E
Génotype modèle <i>in-vitro</i> Commentaire	H3.3K27M BRAF ^{WT} (Arrêt de prolif. à 22 divisions cellulaires)	H3.3K27M BRAFV600E Non-sénescent
Survie moyenne (jours)	209,5*	113**
Déviat ion standard (jours)	40,3	22,6
Génotype <i>in-vivo</i>	H3.3K27M BRAFV600E	H3.3K27M BRAFV600E

* Moyenne sur deux passages avec 2 souris à P0 et 5 souris à P1 / **Moyenne sur un passage à P0 avec 2 souris. / P, passage.

Table R5 : Récapitulatif des modèles *in-vitro* et *in-vivo* dérivés de DMG K27-BRAFa

Les survies moyennes des PDOX NEM569 et 620 sont, respectivement de 210± 40 et 113± 23 jours post-greffe. Les tumeurs issues des PDOX NEM569 & 620 sont mutées H3.3K27M et BRAFV600E comme les tumeurs primaires dont les modèles dérivent. Cependant pour NEM569, nous observons une discordance entre le génotype des cellules issues des modèles *in-vitro* et *in-vivo*. À l'opposé *in-vivo*, nous observons le développement d'une tumeur H3.3K27M BRAFV600E.

De la même manière, trois biopsies de DMG H3.3K27M FGFR1N546K (DMG_K27 MAPKa FGFR1^{MUT}) (NEM499, 576 & 582) ont été greffées dans le thalamus de souris Nude. Les PDOX NEM499 ont été sacrifiées à 188 jours post-greffe pour cause de confinement national lié au COVID-19 donc aucun résultat n'est disponible. Concernant les autres PDOX, la prise tumorale est de 2/2 comme décrit ci-dessous (Table R6).

	PDOX NEM576	PDOX NEM582
Génotype biopsie	H3.3K27M FGFR1N546K	H3.3K27M FGFR1N546K
Génotype <i>in-vitro</i> Commentaire	H3.3K27M FGFR1N546K Sous-type MAPKa	H3.3K27M FGFR1N546K Sous-type H3.3
Survie moyenne (jours)	120,2*	136,75**
Déviat ion standard* (jours)	22,9	39,2
Génotype <i>in-vivo</i>	H3.3K27M FGFR1N546K	H3.3K27M FGFR1N546K

* Moyenne sur deux passages avec 5 souris à chaque passage / **Moyenne sur un passage à P0 avec 2 souris / P, passage.

Table R6 : Récapitulatif des modèles *in-vitro* et *in-vivo* dérivés de DMG K27-FGFR1a

La prise tumorale est de 2/2 modèles et est indépendante du sous-type tumoral depuis lequel la tumeur est dérivée. C'est-à-dire qu'un DMG H3.3K27M FGFR1^{MUT} peut induire le développement d'une tumeur dans une PDOX indépendamment si c'est un DMG issu du sous-type H3.3 ou MAPKa. La survie moyenne est, respectivement, de 120 ± 23 et de 137 ± 39 jours pour les PDOX NEM 576 et 582. Le génotype de ces tumeurs PDOX est identique à celui de la tumeur dérivée. Le clone H3.3K27M FGFR1N546K est maintenu lors du développement tumoral au sein des modèles *in-vivo* comme *in-vitro*.

Nous sommes actuellement en train de compléter la caractérisation des PDOX afin de déterminer si les tumeurs issues de ces modèles murins récapitulent les tumeurs primaires dont elles sont dérivées. En effet, le laboratoire a montré que les PDOX des DMG_K27 présentent, entre autres, un phénotype diffus, l'expression de H3K27M et la perte de triméthylation (Plessier et al. 2017). Dans le cas des DMG_K27-MAPKa, dans les biopsies de patients, nous avons montré plus spécifiquement un phénotype plus circonscrit, des macro/microcalcifications, un marquage CD34 intracellulaire et dans certains cas des marqueurs ganglionneux. Ces analyses sont en cours sur les PDOX et les résultats seront comparés à ceux de la tumeur dérivée.

Pour récapituler, des modèles *in-vivo* du nouveau sous-type de DMG_K27-MAPKa ont été développés et sont en cours de caractérisation.

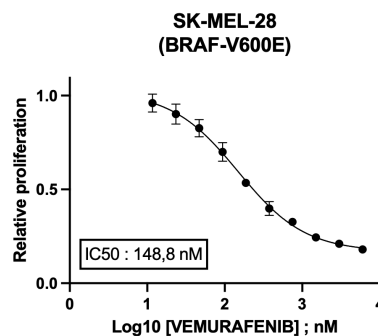
2.2. Modulation du programme oncogénique H3.3K27M

Le projet a été fondé sur l'hypothèse qu'il est possible de moduler le programme oncogénique de la mutation d'histone H3 par un second évènement oncogénique engendrant un phénotype plus ou moins agressif selon la nature du second évènement. En effet, une altération de *TP53* en combinaison avec H3K27M aggrave la survie alors que l'association *BRAF*^{V600E} avec la mutation d'histone l'améliore (Pagès *et al.*, 2018; Werbrouck *et al.*, 2019). Ce projet a mis en lumière l'existence d'un cinquième sous-type de DMG, avec altération de H3K27 et activation de la voie des MAPK appelé "*DMG_K27-MAPKa*", caractérisé par une identité de la cellule d'origine différente, une altération de *BRAF* et /ou de *FGFR1*, une signature transcriptomique de sénescence et un allongement significatif de la survie chez le patient. Cependant comme rapporté précédemment, il existe un patient avec un DMG_K27 (d'après le profil de méthylation de l'ADN) avec une mutation canonique d'activation de *FGFR1* et caractérisé par une signature transcriptomique de sénescence avec une survie très courte de 7 mois. La différence entre ce patient et les patients atteints de DMG_K27-MAPKa que nous suggérons est l'identité de la cellule d'origine. L'hypothèse d'une simple modulation négative du programme H3K27M par *BRAF*^{MUT} ou *FGFR1*^{MUT} à l'origine de la longue survie est donc questionnable. Afin d'éclaircir le rôle de la cellule d'origine et des mutations *BRAF/FGFR1*, nous avons en conséquence (i) inhibé pharmacologiquement *BRAF*^{V600E} ou *FGFR1*^{MUT} au sein de modèles *in-vitro* de DMG_K27-MAPKa et à l'inverse (ii) exprimé par transduction lentivirale *BRAF*^{V600E} et *FGFR1*^{N546K} dans des modèles de DMG_K27 ou dans le clone ancestral H3.3K27M dérivé d'un DMG_K27-MAPKa.

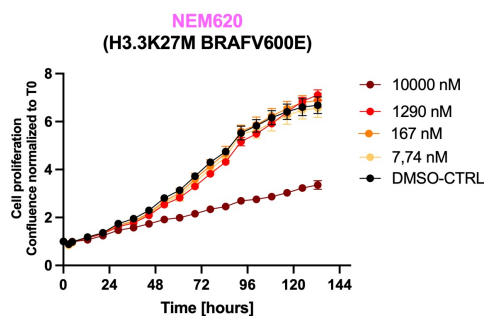
2.2.A Inhibition de BRAFV600E dans des modèles de DMG K27-MAPKa

Nous avons en premier lieu testé sur le modèle NEM620 (H3.3K27M BRAFV600E ne présentant pas de phénotype de sénescence, à l'opposé de la tumeur primaire), l'inhibition de l'activité enzymatique BRAFV600E avec le Vemurafenib. Dans un premier temps, nous avons évalué l'efficacité de la drogue sur une lignée cellulaire canonique de mélanome mutée BRAFV600E (SK-MEL-28) connue pour être sensible au Vemurafenib. L'IC50 est de 148,8 nM sur SK-MEL-28 en point final à 72 heures post-traitement *via* un test de viabilité cellulaire (Fig. R13B).

A



B



C

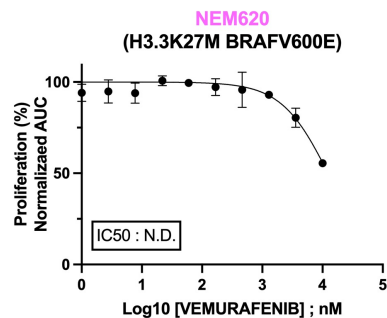


Figure R13B : Inhibition de BRAFV600E au Vemurafenib sur différents modèles *in-vitro*

(A) Prolifération de SK-MEL-28, lignée cellulaire dérivée d'un mélanome BRAFV600E, en réponse à différentes concentrations de Vemurafenib (gamme de 11 nM à 6 μ M) évaluée en point final à 72 heures post-traitement. (B) Prolifération de NEM620 dérivé d'un DMG H3.3K27M BRAFV600E en réponse au Vemurafenib (gamme de 1 nM à 10 μ M) évalué par vidéomicroscopie en temps réel. (C) Évaluation de l'IC50 du Vemurafenib sur NEM620. Les aires sous la courbe normalisées (AUC) de la courbe de confluence sont représentées en fonction du logarithme de la concentration de la drogue afin de déterminer l'IC50.

Celle-ci est équivalente à l'IC50 de 500 nM obtenue sur la même lignée cellulaire et avec le même fournisseur de Vemurafenib dans la littérature (Xiao *et al.*, 2018). Nous avons ensuite traité le modèle NEM620 (DMG_K27-MAPKa BRAFV600E). La gamme de Vemurafenib de 1 à 10 000 nM n'a pas été assez large pour permettre l'évaluation optimale de l'IC50 avec un plateau maximal (Fig. R13B, C). En effet à l'allure des courbes de prolifération selon les différentes conditions de traitements, nous pouvons

observer que NEM620 n'est que peu sensible au Vemurafenib ne semble pas présenter une addiction oncogénique à BRAFV600E. Il est nécessaire de dupliquer l'expérience.

2.2.B Inhibition de *FGFR1^{MUT}* dans des modèles de DMG K27-MAPKa

Comme décrit précédemment, nous avons réussi à développer deux modèles H3.3K27M *FGFR1N546K* dérivés, respectivement, d'un DMG_K27 issu du sous-type H3.3 (NEM 582) ou MAPKa (NEM 576). Nous avons aussi inhibé un modèle de DMG_K27 *FGFR1^{WT}*, comme contrôle de spécificité de la drogue. Avec ce design expérimental, il est donc possible de discriminer les effets de l'inhibition de *FGFR1* en fonction de la cellule d'origine.

Nous avons opté pour une inhibition pharmacologique au lieu d'une inhibition génétique de *FGFR1* pour un souci de temps. Comme vu lors de l'introduction, il n'existe pas d'inhibiteur spécifique de *FGFR1N546K* dont l'occurrence est très faible. Nous avons testé l'Erdafitinib, un pan-inhibiteur de *FGFR*, déjà présent dans les stocks de l'équipe ; et le Futibatiniib, pan-inhibiteur de *FGFR* irréversible. Nakamura *et al.* 2021 ont montré que le variant *FGFR1N546K* semblait plutôt résistant aux inhibiteurs de *FGFR*, avec des IC50 beaucoup plus élevée que pour les autres altérations de *FGFR* (*i.e.*, présentant des fusions de gène). Le futibatiniib présente l'IC50 parmi les moins élevées pour le variant *FGFR1N546K* exprimé dans des fibroblastes (Nakamura *et al.*, 2021). Une partie des tests de drogues a été réalisée par Clémentine Barry et Mélissa Diop, toutes deux techniciennes de laboratoire dans l'équipe.

Nous avons traité à l'Erdafitinib, avec une gamme de 200 à 10 000 nM. Cette évaluation a été réalisée sur deux modèles dérivés de DMG_K27 du sous-type H3.3 dont un H3.3K27M *FGFR1^{WT}* (NEM292) et un H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* (NEM582) afin de d'évaluer la spécificité de la drogue (*FGFR1^{WT} versus FGFR1^{MUT}*) et l'impact selon la cellule d'origine (NEM582 *versus* NEM576). Comme attendu, le modèle H3.3K27M *FGFR1^{WT}* (NEM292) s'est révélé peu sensible à la drogue avec une IC50 de 9,48 µM (Fig. R14). Les deux autres modèles H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* ont répondu à l'Erdafitinib avec respectivement des IC50 de 909 et 371 nM pour NEM582 et 576. Ainsi, nous avons observé que le modèle H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* sous-type MAPKa (NEM576) est deux fois plus sensible à l'inhibiteur que le modèle H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* sous-type H3.3 (NEM582) ce qui souligne possiblement une addiction oncogénique à la signalisation de *FGFR* plus importante pour le modèle du sous-type MAPK *versus* H3.3.

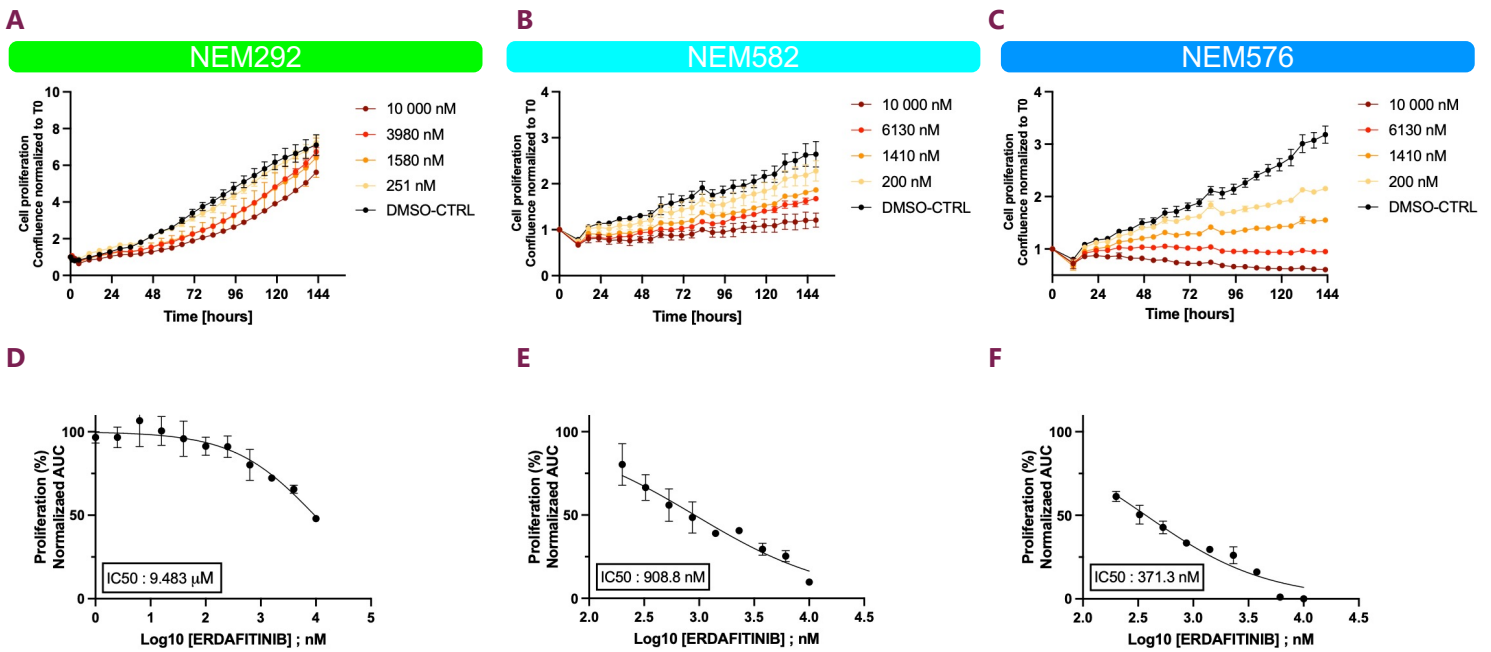
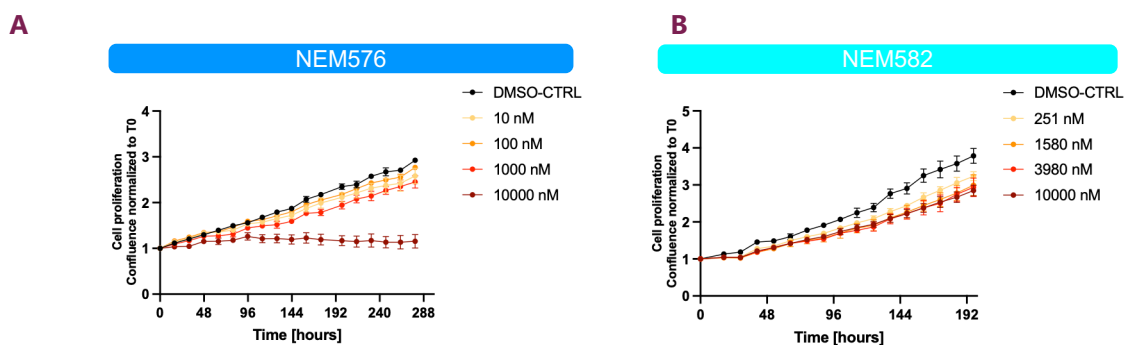


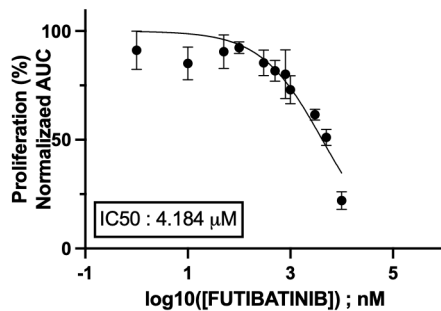
Figure R14 : Inhibition de FGFR1 à l'Erdafitinib sur différents modèles *in-vitro* de DMG K27 ou MAPKa

Courbes de prolifération de GSC H3.3K27M (NEM292) (A), H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} (NEM582) dérivées d'un gliome du sous-type H3.3 (B) et GSC H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} (NEM576) dérivées d'un gliome du sous-type MAPKa (C) traitées ou non à l'Erdafitinib. (D, E, F) Les GSC ont été traitées à l'Erdafitinib avec une gamme de 200 nM à 10 μ M. La gamme varie d'un modèle à l'autre. Les AUC normalisées sont représentées en fonction du logarithmique de la concentration de drogue afin de déterminer l'IC50.

Il sera indispensable de réaliser de nouveaux tests afin de confirmer ces observations préliminaires et d'affiner les IC50. Nous avons en parallèle testé un second inhibiteur de FGFR, le Futibatib, qui a la capacité d'inhiber irréversiblement les récepteurs FGFR1-4, lui aussi sans spécificité pour FGFR1. Nous avons inhibé selon une gamme de 10 ou 251 nM à 10 μ M pour les modèles NEM576 et 582, respectivement (Fig. R15). L'IC50 pour NEM576 a été évaluée à 4,18 μ M soit 10 fois plus élevée que l'Erdafitinib. La gamme n'a pas été assez large pour évaluer l'IC50 de NEM582 par l'absence de plateaux distincts minimaux et maximaux ce qui souligne une faible sensibilité de cette lignée à la drogue.



C



D

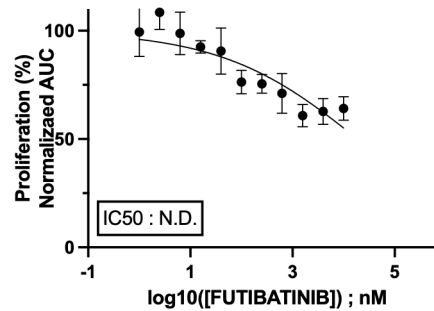


Figure R15 : Inhibition de FGFR1 au Futibatinib sur modèles *in-vitro* de DMG K27 ou MAPKa

Courbes de prolifération de GSC H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} (NEM582) dérivées d'un gliome du sous-type H3.3 (A) et GSC H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} (NEM576) dérivées d'un gliome du sous-type MAPKa (B) traitées ou non au Futibatinib. Les GSC ont été traitées au Futibatinib avec une gamme de 10 /251 à 10 000 nM. La gamme varie d'un modèle à l'autre. (B) Les AUC normalisées sont représentées en fonction du logarithmique de la concentration de drogue afin de déterminer l'IC50.

Nous avons observé la même tendance que précédemment avec l'Erdafitinib, avec le modèle NEM576 qui est plus sensible au Futibatinib que le modèle NEM582. Comme décrit précédemment, il sera indispensable de consolider ces évaluations d'IC50 avec des gammes plus larges. Il serait aussi envisageable de réaliser un CRISPR/Cas9 pour éliminer l'allèle muté *FGFR1* pour plus de spécificité par rapport à l'inhibition pharmacologique.

Pour résumer,

- 1) Le modèle de DMG H3.3K27M *BRAF*^{V600E} ne semble pas présenter d'addiction oncogénique à la mutation de *BRAF* dans une expérience d'inhibition pharmacologique de l'activité de *BRAF*. Ceci est à confirmer avec un duplicat expérimental.
- 2) Les modèles de DMG H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} dérivés de gliomes du sous-types H3.3 ou MAPKa semblent répondre à l'inhibiteur de FGFR Erdafitinib mais moins au Futibatinib. Il apparaît que le modèle *FGFR1*^{MUT} dérivé du sous-type MAPKa (NEM576) ait une addiction oncogénique à FGFR plus importante que le modèle *FGFR1*^{MUT} (NEM582) dérivé d'un gliome du sous-type H3.3.

2.2.C Expression de *BRAF*^{V600E} ou *FGFR1*^{MUT} dans des modèles de DMG_K27

Nous avons décidé d'exprimer *BRAF*^{V600E} et *FGFR1*^{N546K} dans des modèles de DMG_K27 dans le but d'étudier la modulation du programme oncogénique H3K27M. Afin de discriminer l'impact de l'expression de *BRAF*^{MUT} ou *FGFR1*^{MUT} de l'impact de la cellule d'origine, nous avons exprimé ces mutations au sein de trois modèles de DMG du sous-type H3.3 (NEM283, NEM445 et NEM290) et un modèle de DMG du sous-type MAPKa (NEM394). Pour rappel, NEM394 est dérivé d'un gliome H3.3K27M *BRAF*^{V600E}. Lors de l'établissement de la lignée, la population clonale H3.3K27M *BRAF*^{V600E} a disparu au

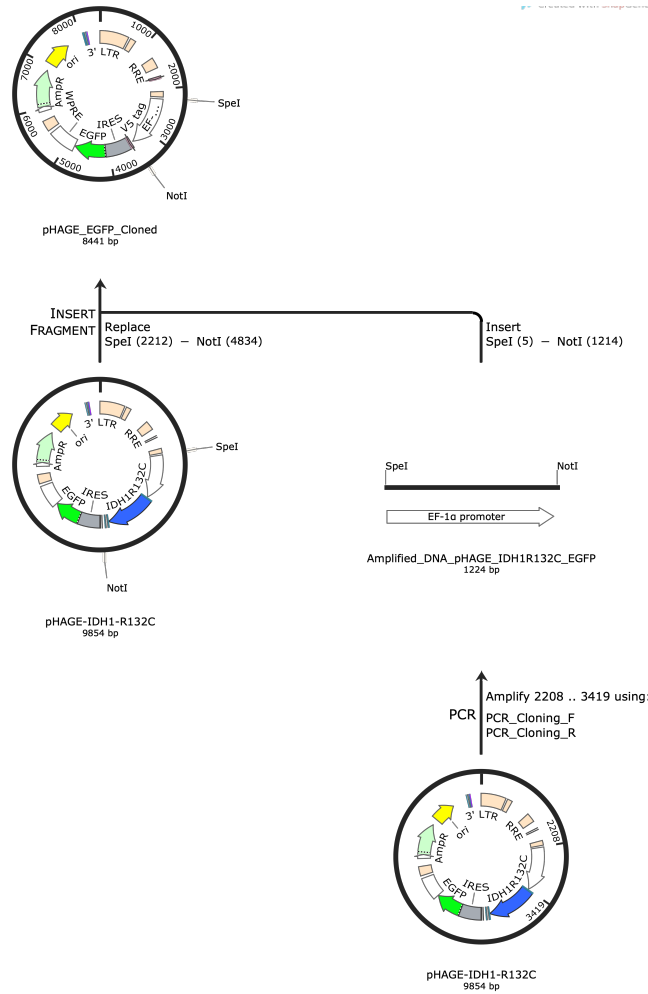
profit de l'expansion limitée d'un clone simple muté H3.3K27M jusque 20 divisions cellulaires. Cette stratégie permet de prendre en compte l'impact de la cellule d'origine dans la réponse à l'expression des mutations. Les données préliminaires sur l'oncogenèse des DMG MAPKa semblent aussi soutenir un rôle prépondérant de la voie p53 car (i) *TP53* est rarement retrouvé muté et seulement de manière sous-clonale (10%), (ii) il y a la présence d'une signature transcriptomique d'activation de la signalisation de TP53 et (iii) une accumulation de TP53 est observée par IHC dans les tumeurs primaires avec des marquages plus ou moins forts. En conséquence, nous avons décidé d'étudier l'impact de l'expression de *BRAF*^{V600E} et *FGFR1*^{N546K} dans des modèles de DMG H3.3K27M *TP53* sauvage ou muté afin de déchiffrer le rôle de TP53 dans le processus.

L'étude de l'expression de BRAFV600E au sein de deux modèles de DMG du sous-type H3.3 *TP53* sauvage (NEM283) ou muté (NEM290) a fait l'objet du stage de 2 mois de Marie Baylac, étudiante en 3^{ème} année de pharmacie à l'Université de Paris, que j'ai encadré.

Clonage et optimisation de la production virale

Nous avons décidé de surexprimer les protéines mutées en utilisant des lentivirus car le système lentiviral permet de transduire à la fois les cellules cyclantes et non-cyclantes et l'insertion stable d'un large transgène. Au cours de mes deux premières années de thèse, j'ai rencontré de multiples difficultés techniques de clonage ou d'expression avec ces plasmides. Finalement, j'ai réussi à cloner les trois plasmides comme décrit dans les différentes figures (Fig. R16, 17, 18).

A



B

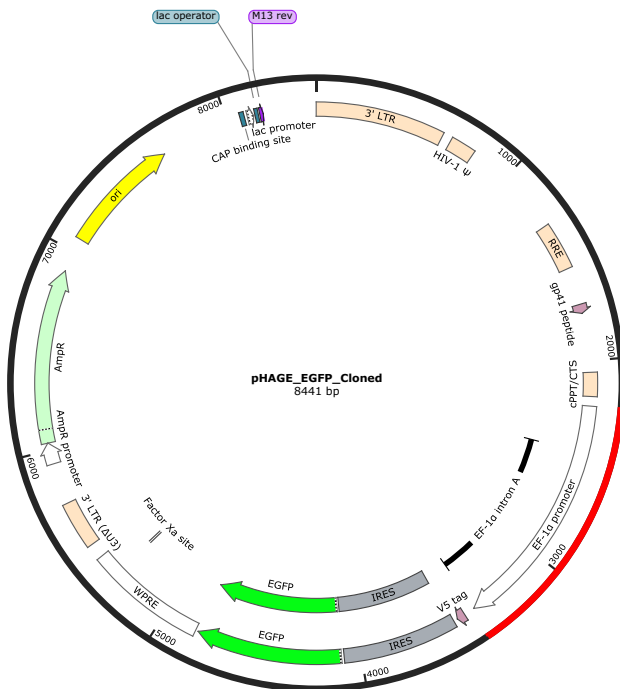


Figure R16 : Clonage du plasmide pHAGE_EGFP (GFP)

(A) Descriptif des différentes étapes du clonage du plasmide pHAGE_EGFP (GFP). Le but de ce plasmide est de coder un rapporteur fluorescent vert (GFP pour green fluorescent protein) sous le contrôle du promoteur EF-1α. (B) Carte du plasmide GFP.

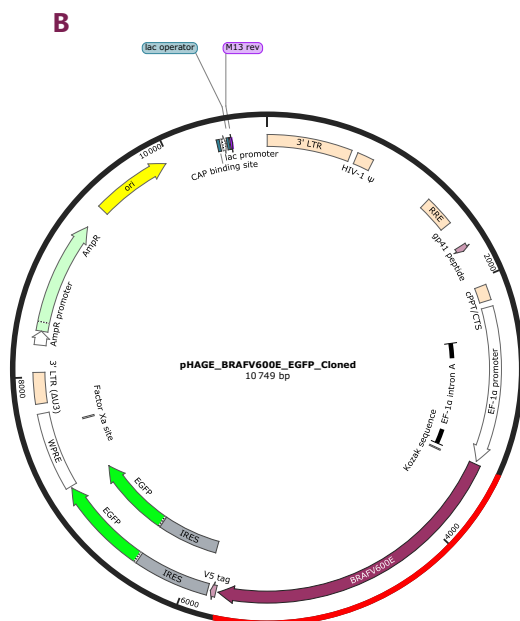
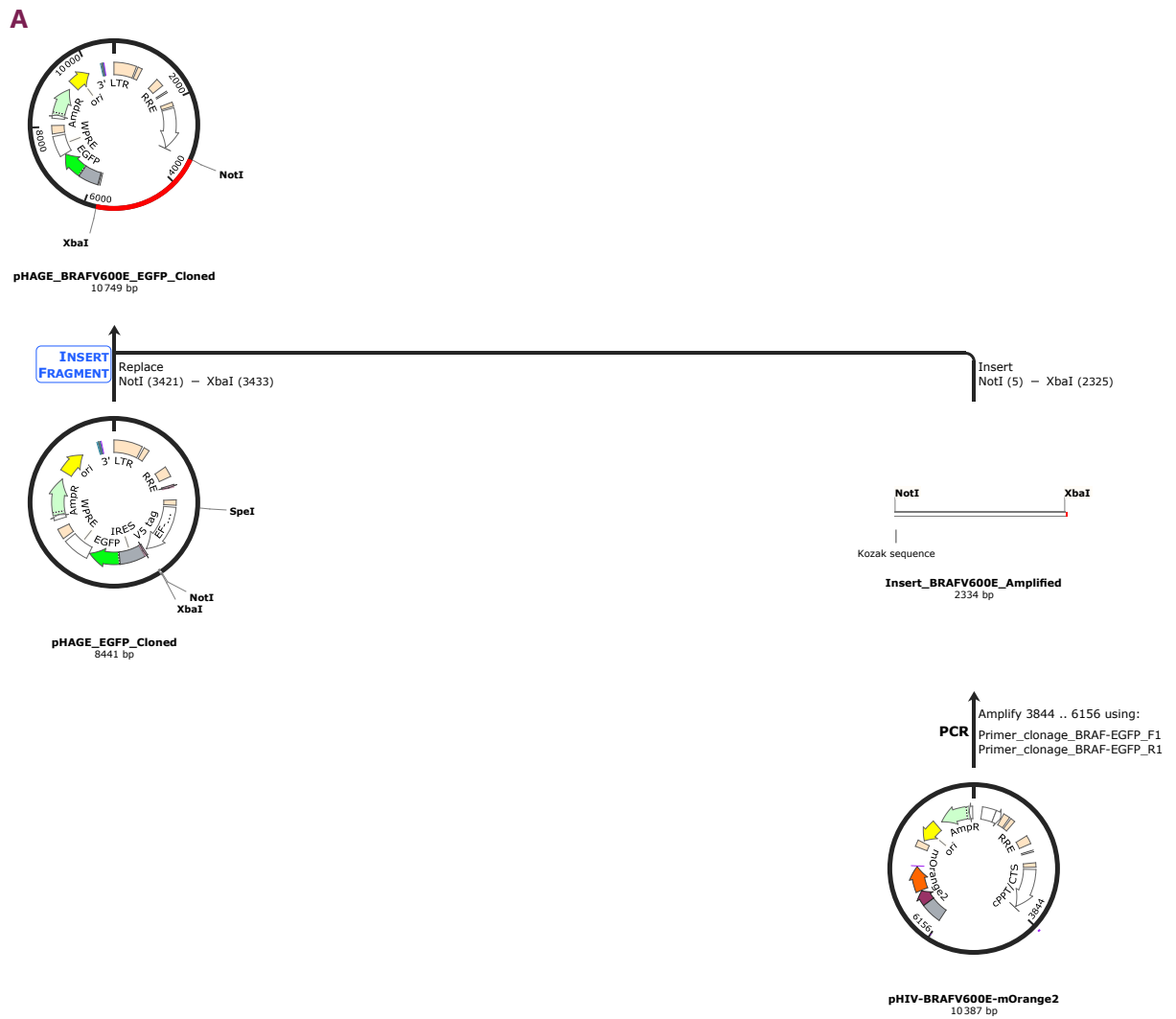


Figure R17 : Clonage du plasmide de surexpression de *BRAF^{V600E}*

(A) Descriptif des différentes étapes du clonage du plasmide pHAGE_BRAFV600E_EGFP (BRAFV600E). Le but de ce plasmide est de coder la protéine BRAF mutée V600E en équimolarité au rapporteur fluorescent GFP sous le contrôle du promoteur EF-1 α . (B) Carte du plasmide codant *BRAF^{V600E}*.

A

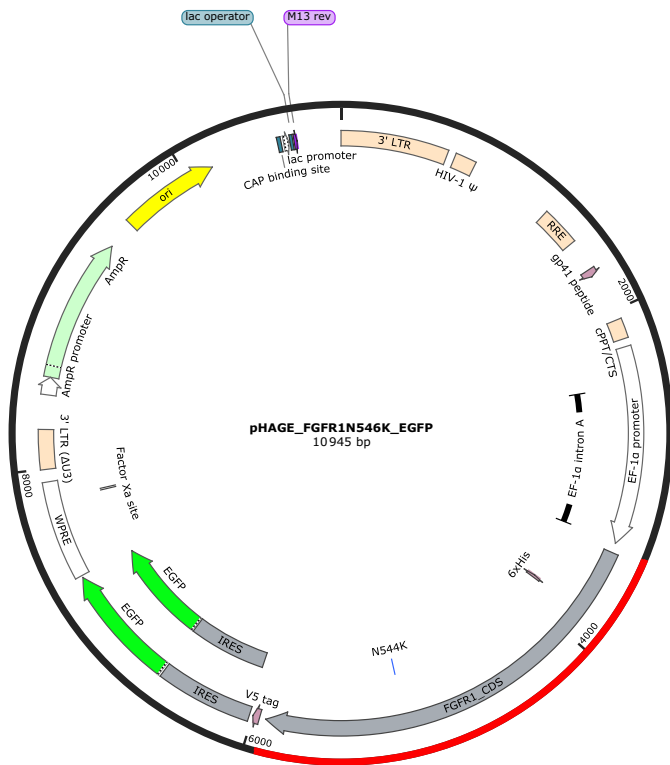
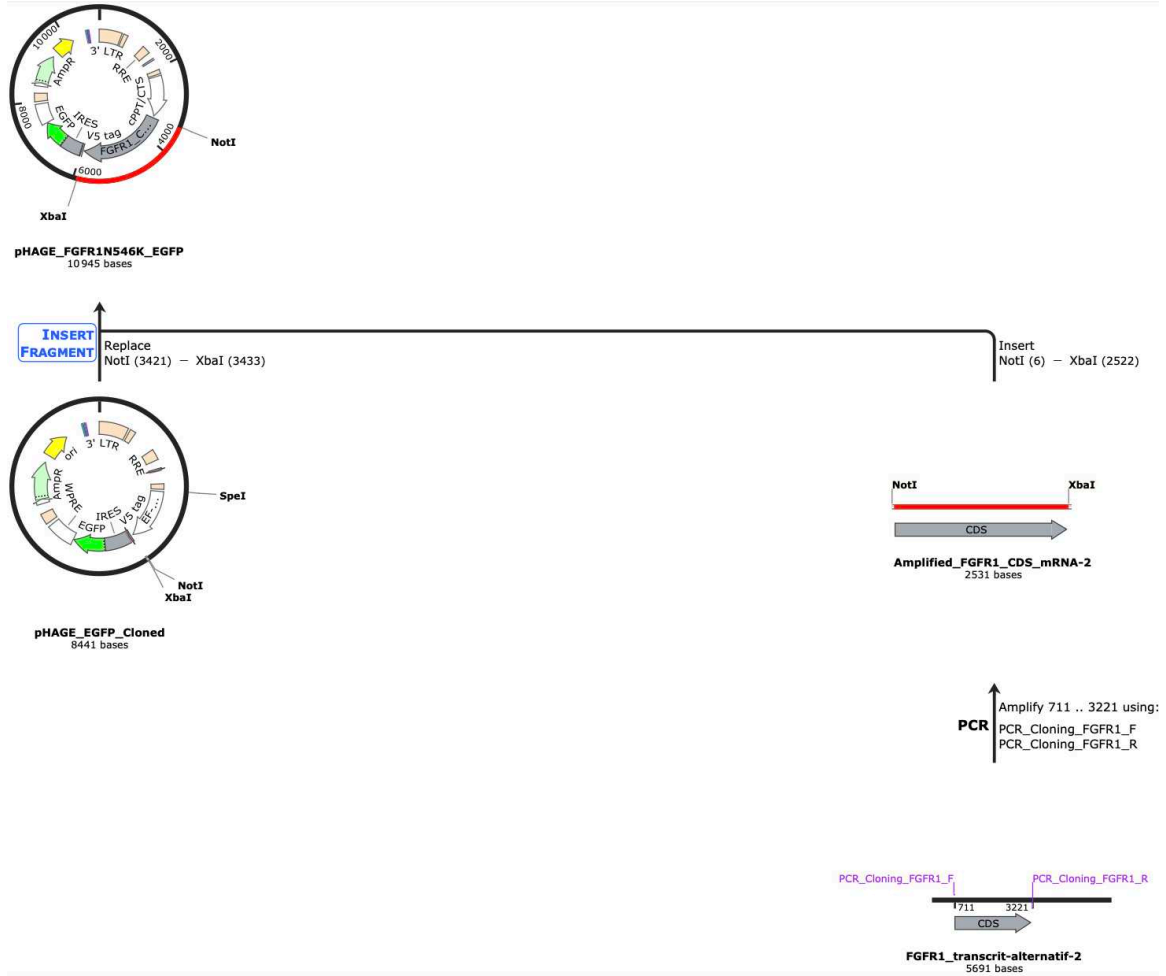


Figure R18: Clonage du plasmide de surexpression de *FGFR1^{N546K}*

(A) Descriptif des différentes étapes du clonage du plasmide pHAGE_FGFR1N546K_EGFP (FGFR1N546K). Le but de ce plasmide est de coder la protéine FGFR1 muté N546K en équimolarité au rapporteur fluorescent GFP sous le contrôle du promoteur heF-1 α . (B) Carte du plasmide codant *FGFR1^{N546K}*.

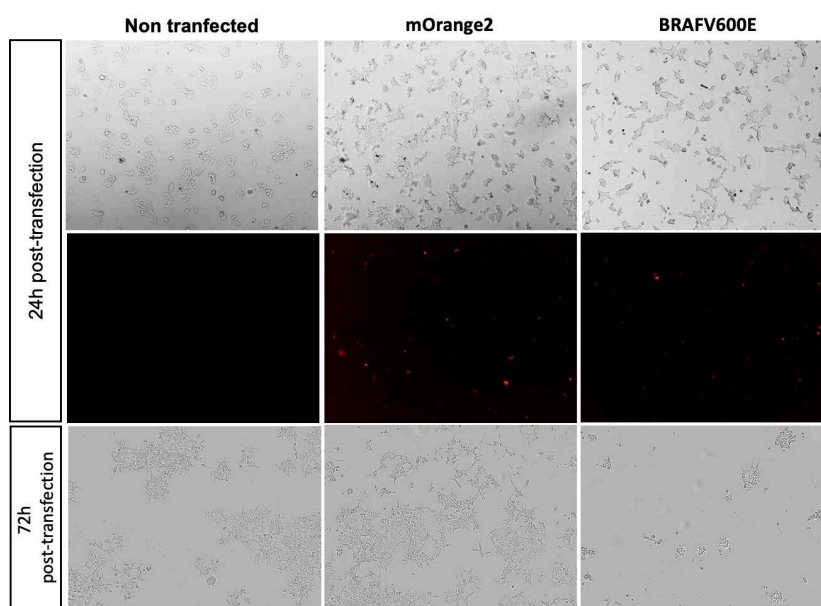


Figure R19 : Évaluation de la toxicité des plasmides par transfection sur HEK293T

Des cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide exprimant la protéine fluorescente mOrange2 (fluorescence rouge) ou BRAFV600E en équimolarité avec la protéine fluorescente orange (BRAFV600E). Les images ont été prises 24 et 72h post-transfection.

J'ai également rencontré des problèmes pour la production lentivirale spécifiquement avec les plasmides codant *BRAF^{V600E}* et *FGFR1^{N546K}*. En effet, il s'est avéré que l'expression de ces protéines mutées était toxique pour les cellules HEK293T productrices de lentivirus avec un détachement et une agrégation cellulaire totale 72h post-transfection qui impactait fortement les titres obtenus et la toxicité secondaire à la transduction (Fig. R19). J'ai optimisé le protocole de production virale avec un traitement des HEK293T avec un inhibiteur d'apoptose (anti-rock à 10 μ M) et une récolte des virus plus précoce à 24h au lieu de 48h post-transfection.

Validation de l'expression transgénique de *BRAF^{V600E}* ou *FGFR1^{N546K}*

Dans un premier temps, nous voulions vérifier que *BRAF^{V600E}* et *FGFR1^{N546K}* étaient exprimés dans les modèles de DMG H3.3K27M après transduction cellulaire. La fluorescence de la GFP est un premier indicateur mais n'est pas suffisant car il est possible que l'expression des transgènes soit réprimée lorsque celle-ci est délétère à la cellule. Premièrement, nous avons confirmé que les allèles mutés *BRAF* et *FGFR1* étaient exprimés par séquençage sanger après reverse-transcription de l'ARN et PCR (RT-PCR) dans les modèles de DMG H3.3K27M transduits avec les constructions BRAFV600E ou FGFR1N546K (Fig. R20A).

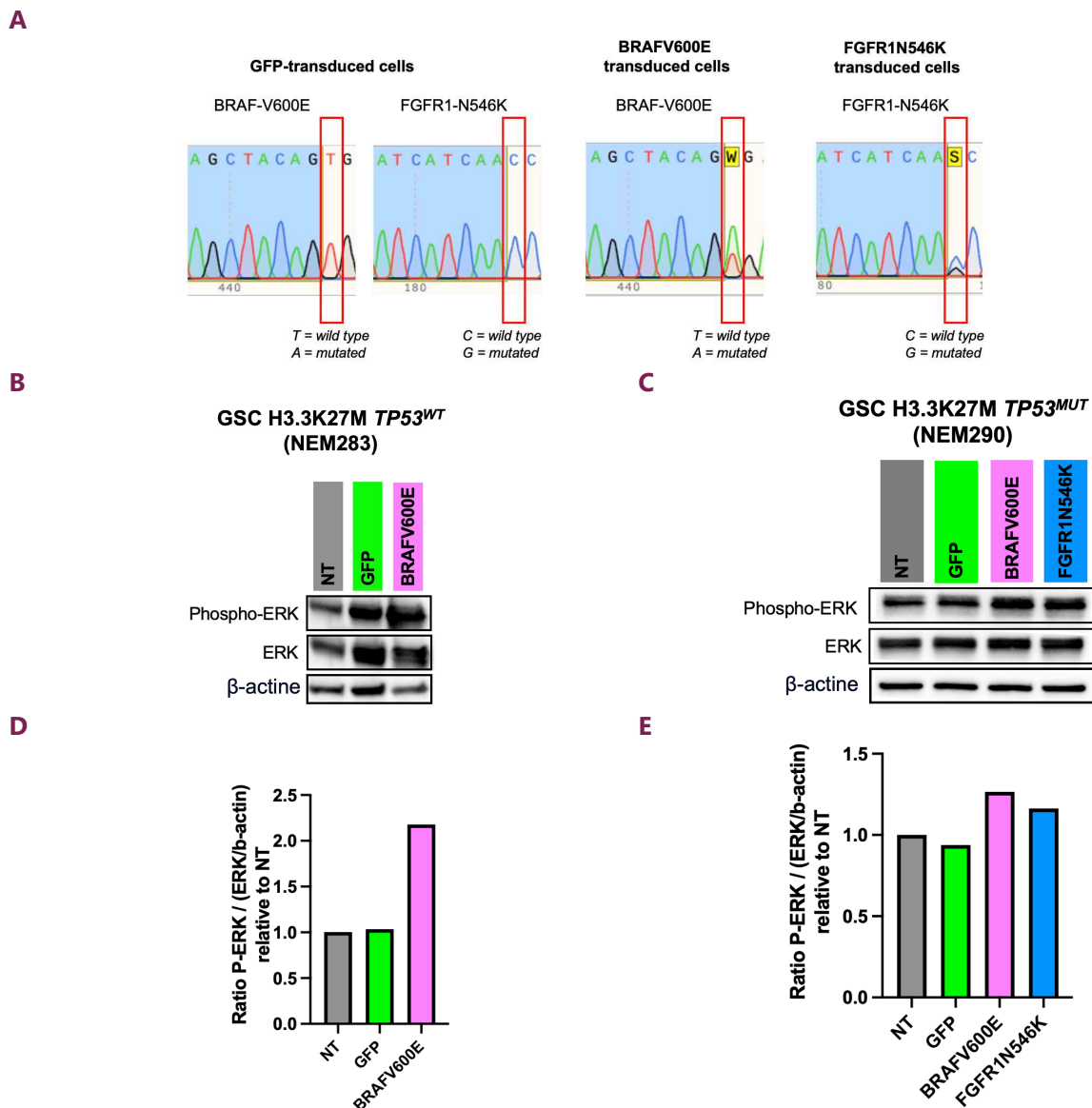


Figure R20 : Vérification de l'expression transgénique de BRAFV600E et FGFR1N546K

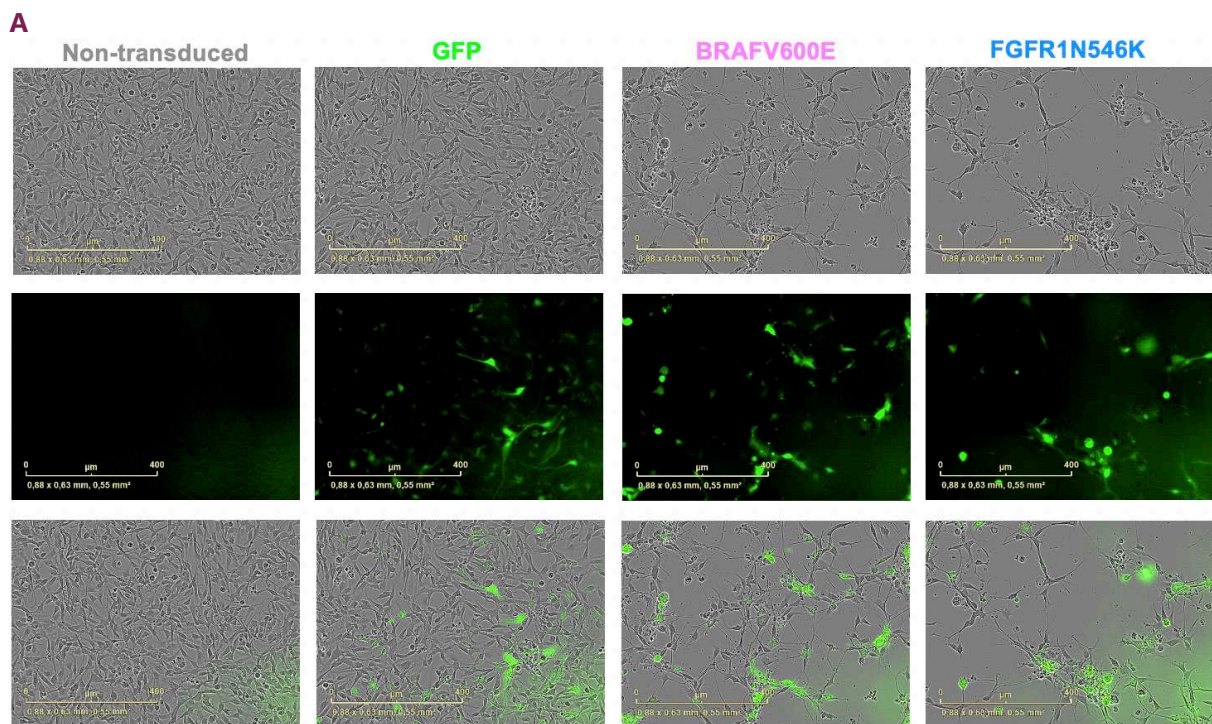
(A) Résultats de séquençage Sanger de *BRAF* et *FGFR1* de NEM290 non-transduits ou transduits pour exprimer la GFP, BRAFV600E ou FGFR1N546K. Niveau de phosphorylation /activation de ERK évalué par western blot dans un modèle de DMG H3.3K7M *TP53*^{WT} (NEM283) 15 jours post-transduction (B) ou *TP53*^{MUT} (NEM290) 7 jours post-transduction (C). Le contrôle de charge est évalué par la quantité protéique de β -actine. (B) Quantification relative du niveau d'activation de la voie MAPK via le ratio ERK phosphorylé (P-ERK) par rapport à ERK total normalisé par rapport à la beta-actine dans un modèle de DMG H3.3K7M *TP53*^{WT} (NEM283) (D) ou *TP53*^{MUT} (NEM290) (E).

Deuxièmement, nous avons contrôlé qu'il y avait une suractivation de la voie MAPK *via* le ratio de ERK phosphorylé (activé) sur ERK total, en réponse à l'expression des protéines mutantes. Nous avons observé un niveau d'activation de la voie MAPK faiblement plus élevée, respectivement de 27 et 16% dans le modèle de DMG H3.3K27M *TP53*^{MUT} (NEM290) transduit avec les constructions BRAFV600E ou FGFR1N546K par rapport aux conditions non-transduites ou transduites avec la construction GFP (Fig. R20B, D). Nous avons aussi noté une activité de la voie MAPK plus élevée d'un facteur 2 dans un modèle

de DMG H3.3K27M *TP53*^{WT} (NEM283) en réponse à l'expression de BRAFV600E par rapport à la condition contrôle exprimant la GFP (Fig. R20C, E). Le résultat n'est pas disponible pour l'expression de FGFR1N546K pour ce modèle. Ces résultats nécessitent d'être complétés vis-à-vis de l'expression de FGFR1N546K et validés par des western blots supplémentaires via l'activation de MEK, en aval de ERK. Comme attendu, l'expression de *BRAF*^{V600E} ou *FGFR1*^{N546K} dans les modèles *in-vitro* de DMG H3.3K27M semble induire une augmentation de la voie MAPK, équivalente à ce que l'on observe dans les modèles de H3.3K27M *BRAF*^{MUT} ou *FGFR1*^{MUT} dérivés des DMG K27-MAPKa.

Caractérisation des modèles *in-vitro* de DMG H3.3K27M *BRAF*^{MUT} ou *FGFR1*^{MUT}-induits

La seconde étape a consisté à caractériser les conséquences de l'expression de *BRAF*^{V600E} ou *FGFR1*^{N546K} dans des modèles *in-vitro* de DMG H3.3K27M formant des modèles de DMG H3.3K27M surexprimant *BRAF*^{V600E} ou *FGFR1*^{MUT}. Premièrement, nous avons observé un changement morphologique en réponse à l'expression de BRAFV600E et FGFR1N546K dans les modèles de DMG H3.3K27M *TP53*^{MUT} avec des agrégations cellulaires, l'apparition de longs bras cytoplasmiques et des débris cellulaires (Fig. R21A).



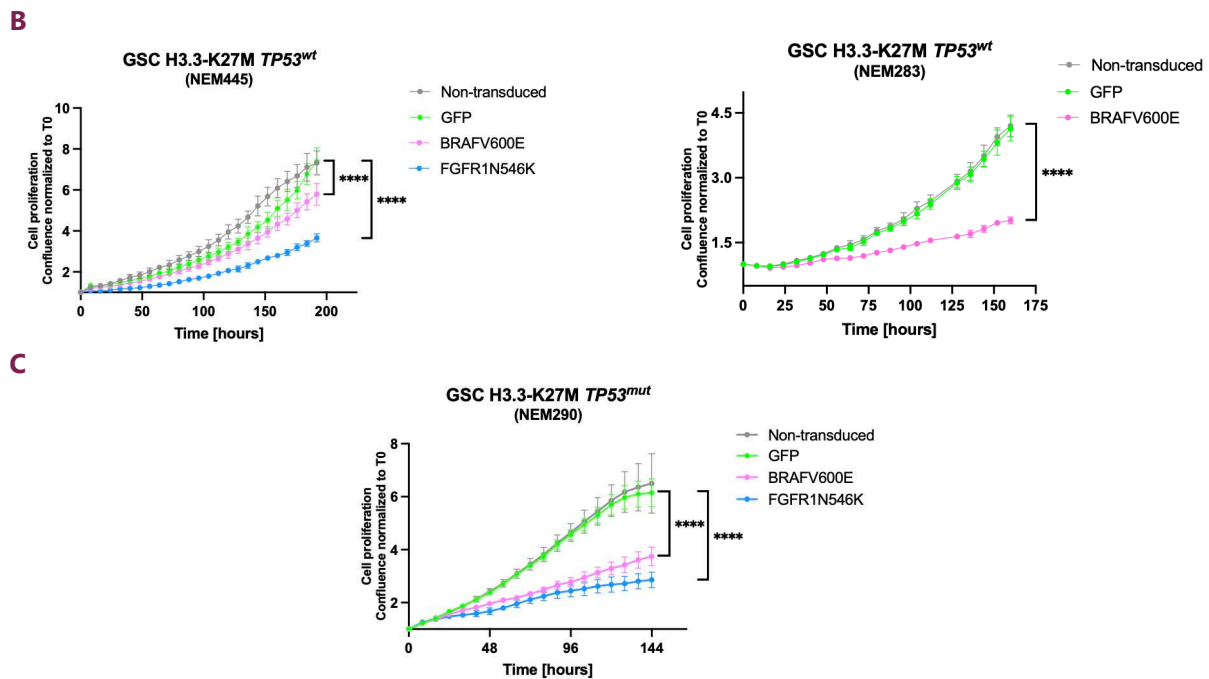


Figure R21 : Effets de l'expression de $BRAF^{V600E}$ et $FGFR^{N546K}$ sur la prolifération des GSC

(A) Images prises par vidéomicroscopie au grossissement 10X en temps réel à 120 heures post-initiation du suivi de prolifération, de GSC H3.3K27M $TP53^{MUT}$ non-transduites, transduites pour exprimer de la GFP ou BRAFV600E ou FGFR1N546K. (B) Suivis de prolifération par vidéomicroscopie en temps réel (Two way anova : **** p value <0.0001).

Deuxièmement, nous avons observé une diminution significative de la prolifération de modèles de DMG H3.3K27M $TP53^{WT}$ (NEM445 et 283) en réponse à l'expression de $BRAF^{V600E}$ ou $FGFR^{N546K}$ par rapport à l'expression de la GFP (two way anova, **** p value <0.0001). Le phénotype est aussi observé dans un troisième modèle de DMG H3.3K27M $TP53^{MUT}$ (NEM290) (two way anova, **** p value <0.0001). Le statut mutationnel de $TP53$ n'a cependant pas d'impact sur le phénotype de prolifération. Il faut noter que le suivi de prolifération des NEM283 et NEM445 a commencé 8 jours post-transduction et non 1 jour post-transduction comme pour les NEM290 car les modèles de DMG H3.3K27M $TP53^{WT}$ (NEM283 et 445) sont très sensibles à la transduction et nécessitent un temps de récupération plus longs post-transduction (données non montrées). Nous nous sommes ensuite demandés si cette diminution de la prolifération dans les modèles de DMG H3.K27M $BRAF^{V600E}$ ou $FGFR^{N546K}$ était due à une entrée en sénescence. En effet, il est reconnu que la sénescence peut être induite lors de l'activation d'un oncogène comme un mécanisme antitumoral (Raabe et al. 2011). Nous avons procédé de la même manière que lors de la caractérisation de la sénescence des modèles de DMG H3.3K27M FGFR1N546K dérivés de tumeurs. Premièrement, nous avons réalisé un test β -gal. L'expression de $BRAF^{V600E}$ ou $FGFR^{N546K}$ augmente significativement le pourcentage de cellules positives à la β -gal (bleues) respectivement d'un facteur 2 ou 3 par rapport à la condition contrôle exprimant la GFP dans des modèles de DMG H3.3K27M $TP53^{WT}$ (NEM445) ou $TP53^{MUT}$ (NEM290) (test t avec correction de Welch : **** p value <0,0001) (Fig. R22).

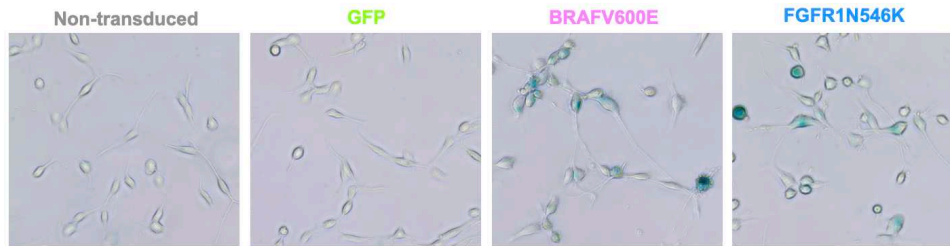
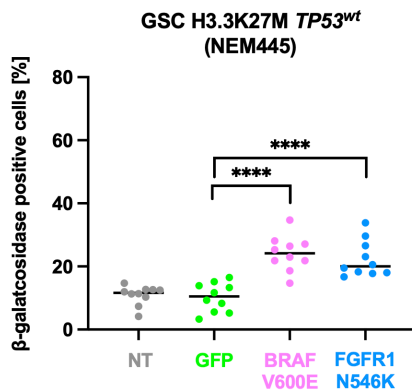
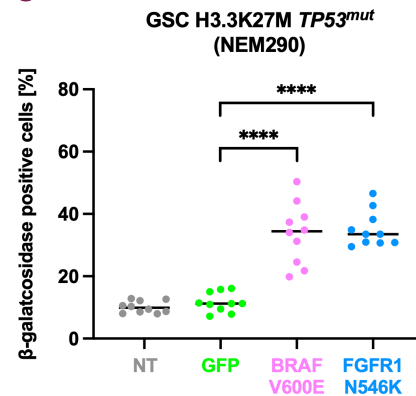
A**B****C**

Figure R22 : Effets de l'expression de BRAFV600E et FGFR1N546K sur l'activité de la β -galactosidase dans des modèles *in-vitro* de DMG H3.3K27M

(A) Images prises au microscope à contraste de phase au grossissement 40X de GSC H3.3K27M $TP53^{MUT}$ (NEM290) 7 jours post-transduction pour exprimer la GFP, BRAFV600E ou FGFR1N546K. Comparaison du pourcentage de cellules positives à la β -gal (bleues) selon le statut mutationnel dans un modèle de DMG H3.3K27M $TP53^{WT}$ (B) ou $TP53^{MUT}$ (C) (test t avec correction de Welch : **** p value <0,0001).

Deuxièmement, nous avons étudié le niveau d'expression du marqueur de sénescence P21 car les données préliminaires sur le phénotype de sénescence dans l'oncogenèse des DMG H3.3K27M $BRAF^{V600E}$ ou $FGFR^{N546K}$ passeraient par ce régulateur du cycle cellulaire. Au niveau transcriptionnel, nous avons noté une surexpression de $CDKN1A$ (codant P21) environ d'un facteur 2 en réponse à l'expression de $BRAF^{V600E}$ et $FGFR^{N546K}$ dans un modèle de DMG H3.3K27M $TP53^{MUT}$ (NEM290) par rapport à la condition contrôle d'expression de la GFP (Fig. R23A). Nous avons aussi retrouvé la surexpression de $CDKN1A$ d'un facteur 2,5 dans un modèle de DMG H3.3K27M $TP53^{WT}$ transduit $BRAF^{V600E}$ versus GFP (NEM283) (Fig. R23B). Le résultat n'est pas disponible pour la condition de surexpression de $FGFR^{N546K}$. L'augmentation de l'expression génique de $CDKN1A/P21$ était attendue à la vue de l'augmentation significative de l'activité β -gal retrouvée dans les modèles de DMG H3.3K27M exprimant $BRAF^{V600E}$ ou $FGFR^{N546K}$ indépendamment du statut $TP53$.

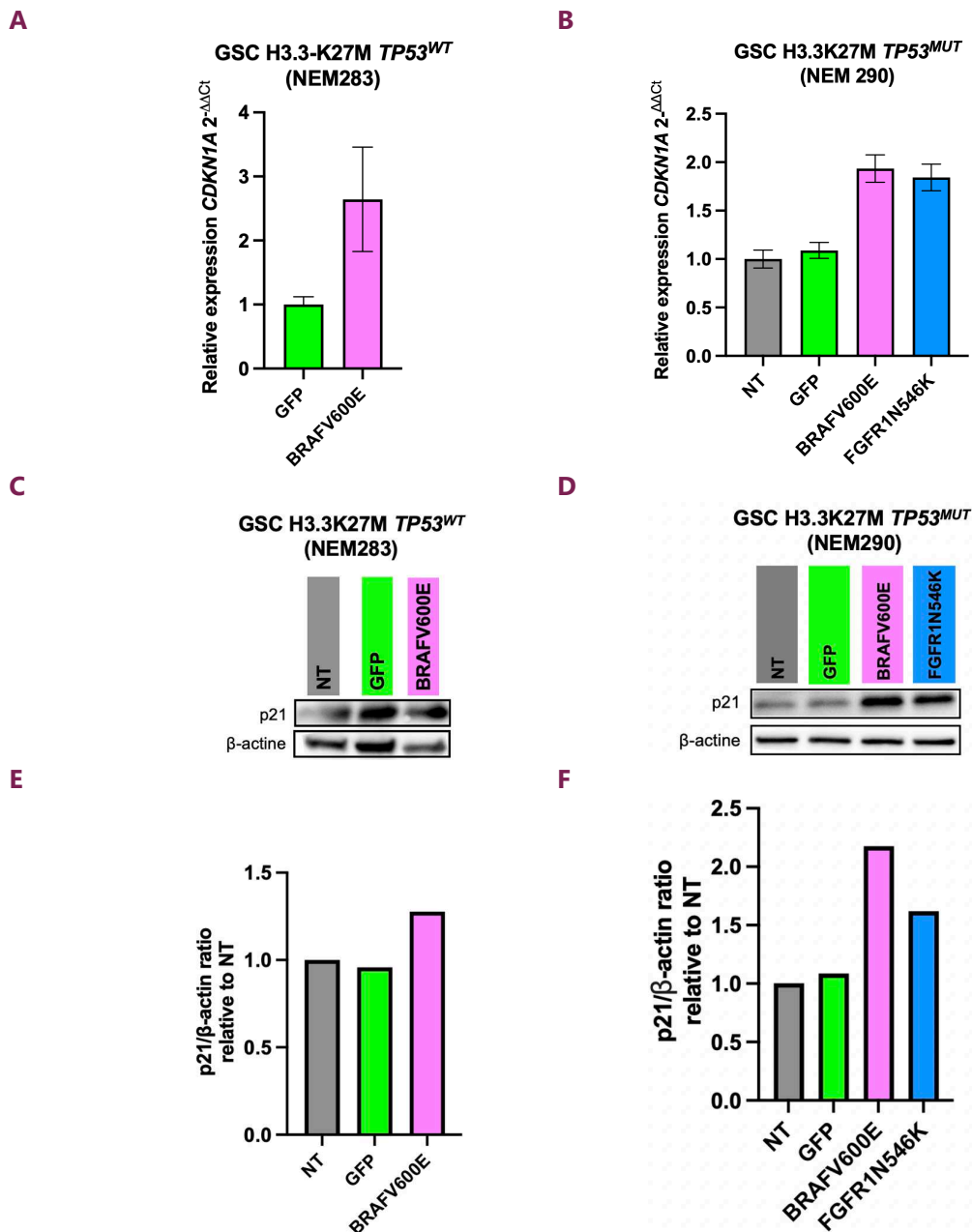


Figure R23 : Effets de l'expression de BRAFV600E et FGFR1N546K sur l'expression de p21 (*CDKN1A*) dans des modèles *in-vitro* de DMG H3.3K27M

Expression de *CDKN1A* évaluée par RT-qPCR dans des modèles de DMG H3.3K27M *TP53*^{WT} (NEM283) (A) ou *TP53*^{MUT} (NEM290) (B). Expression de p21 évaluée par western blot dans les différents modèles de DMG H3.3K27M *TP53*^{WT} (NEM283) (C) ou *TP53*^{MUT} (NEM290) (D). Quantification relative de p21 par rapport à la quantité de protéines contrôles de charge β-actine selon le statut *TP53* : sauvage (E) ou muté (F).

Au niveau protéique, nous avons aussi observé une expression plus élevée de p21 dans les modèles de DMG H3.3K27M *TP53*^{WT} *BRAF*^{V600E} versus GFP d'un facteur 1,3. L'information n'est pas disponible pour la condition *FGFR*^{N546K}. De même, nous avons noté une augmentation de l'expression de p21 dans les modèles de DMG H3.3K27M *BRAF*^{V600E} ou *FGFR*^{N546K} versus GFP d'un facteur, respectivement, de 2,2 et 1,6. Le statut *TP53* muté ne semble pas impacter l'activation de P21 en réponse à l'expression de

BRAF^{V600E} et *FGFR*^{N546K} dans les GSC. Ces résultats corrélerent avec l'augmentation transcriptionnelle de *CDKN1A* dans les mêmes conditions. L'augmentation de P21 dans les modèles de DMG *BRAF*^{V600E}/*FGFR1*^{MUT}-induits n'est pas très forte, ces résultats sont à compléter et valider par d'autres western blots.

Pour résumer, nous avons montré que l'expression de *BRAF*^{V600E} et *FGFR*^{N546K} dans des modèles de DMG H3.3K27M induit une diminution de la prolifération associée à une entrée en sénescence caractérisée par une augmentation de l'activité β-gal et une surexpression modérée du marqueur de sénescence P21 au niveau transcriptionnel et protéique. Le statut *TP53* sauvage ou muté ne semble pas impacter le phénotype.

Caractérisation de la réexpression de *BRAF*^{V600E} dans le clone ancestral H3.3K27M dérivé d'un DMG H3.3K27M BRAFV600E

Nous venons donc d'étudier l'impact de l'expression de *BRAF*^{V600E} et *FGFR*^{N546K} dans un fond génétique de DMG dérivés du sous-type H3.3. Il est maintenant légitime de se poser la question sur l'impact dans un modèle dont le fond génétique est dérivé d'un DMG du sous-type MAPKa en référence à la cellule d'origine distincte entre les deux sous-types. Pour cela, nous avons réexprimé *BRAF*^{V600E} ou alors exprimé *FGFR*^{N546K} dans des GSC H3.3K27M (NEM394) correspondant au clone ancestral H3.3K27M *BRAF*^{WT} dérivé d'un DMG H3.3K27M BRAFV600E. Avec ce design expérimental, nous pouvions à la fois évaluer l'effet de la cellule d'origine et du fond génétique et l'effet de la nature de l'altération MAPK (*i.e.*, *BRAF*^{MUT} versus *FGFR1*^{MUT}). Nous rappelons, dans un premier temps, que la caractérisation du modèle NEM394 a mis en lumière la présence de sénescence avec une morphologie cellulaire très aplatie et vésiculée associée à une forte activité β-gal (Fig. R24A). L'expression de *BRAF*^{V600E} ou *FGFR*^{N546K} versus la GFP dans NEM394 induit un changement morphologique avec un arrondissement des cellules associé possiblement à un détachement de la matrice de laminine, avec un phénotype plus marqué dans les cellules *BRAF*^{V600E} (Fig. R24A). Il semble qu'il y ait aussi un allongement des extrémités cytoplasmiques. Moins visible, nous avons aussi noté un aplatissement plus important des cellules transduites pour exprimer la GFP par rapport aux cellules non-transduites dénotant un possible stress plus élevé lié à transduction. Nous avons, en effet, observés une forte diminution de la prolifération des NEM394 GFP-transduites par rapport aux cellules non-transduites validant un stress lié à la transduction (Fig. R24B).

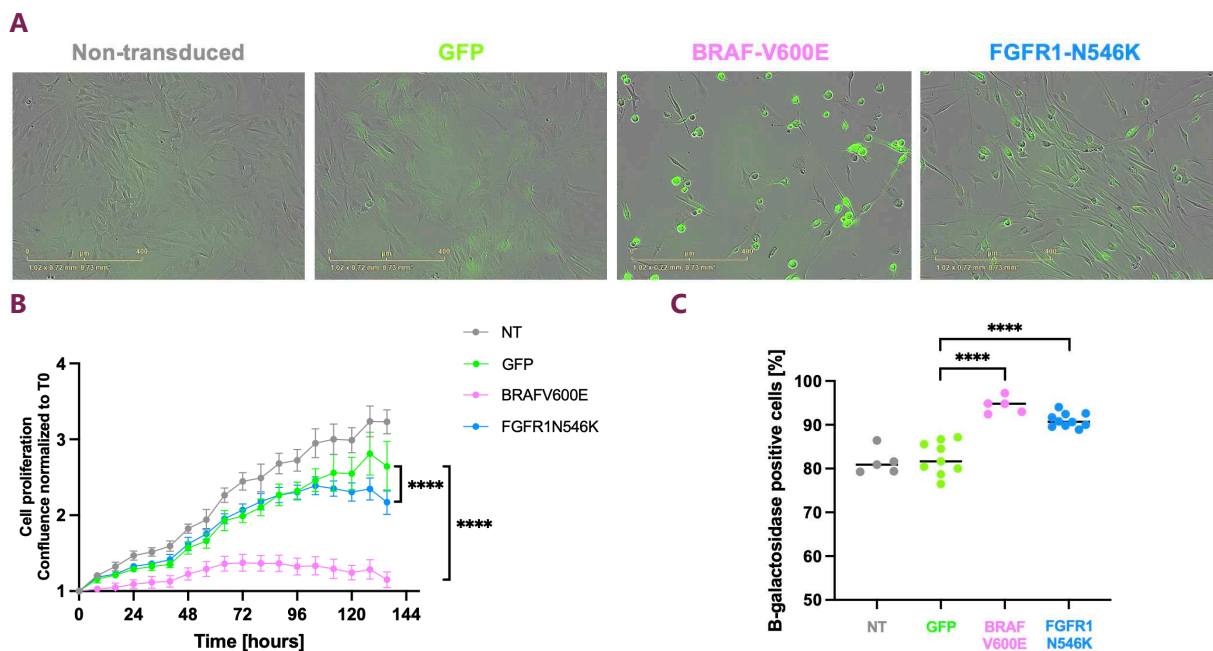


Figure R24 : Effets de l'expression de BRAFV600E ou FGFR1N546K dans le clone ancestral H3.3K27M dérivé d'un DMG H3.3K27M BRAFV600E

(A) Images prises par vidéomicroscopie en temps réel au grossissement 10X à 120h post-initiation du suivi de prolifération des NEM394 non-transduites ou transduites pour exprimer la GFP, BRAFV600E ou FGFR1N546K. (B) Courbes de prolifération des NEM394 dans les mêmes conditions que décrites dans (A). Le suivi a été initié 24h post-transduction (Two way anova : **** p value <0.0001). (C) Comparaison du pourcentage de cellules positives à la β -gal (bleues) de NEM394 dans les mêmes conditions que décrites dans (A) (test t avec correction de Welch : **** p value <0,0001).

Les NEM394 transduites surexprimant $BRAF^{V600E}$ présentent une diminution significative de la prolifération par rapport aux autres conditions NEM (transduites et non transduites) dès 24h post-transduction. Un second essai de prolifération est à réaliser pour confirmer cette observation. L'expression de $FGFR^{N546K}$ dans NEM394 induit aussi une diminution significative de la prolifération par rapport aux NEM394 contrôles transduites pour exprimer la GFP mais moins importante par rapport à la condition d'expression de $BRAF^{V600E}$ (Two way anova : **** p value <0.0001). Le phénotype semble prendre du temps pour se mettre en place avec un décrochement après 120h post-transduction (96h post-initiation du suivi de prolifération) mais cela est équivalent à ce que nous avons observé lors de l'expression des protéines mutantes dans les modèles de DMG H3.3K27M $TP53^{WT}$ (NEM283 et 445) et serait donc une conséquence du stress induit par la transduction. Nous ne pouvons pas non plus exclure que le retard du phénotype (*i.e.*, diminution de la prolifération) dans les modèles de DMG $TP53^{WT}$ par rapport au modèle $TP53^{MUT}$ (NEM290) soit uniquement lié au stress de la transduction, le statut $TP53$ pourrait aussi être un facteur modificateur. Pour terminer, nous avons réalisé un test β -gal afin de déterminer si l'expression de $BRAF^{V600E}$ ou $FGFR^{N546K}$ permet d'augmenter l'activité β -gal (Fig. R24C). Comme attendu, le pourcentage de cellules positives à la β -gal était déjà élevé dans les NEM394 non-

transduites avec un pourcentage médian de 81%. Le stress de la transduction ne semble pas impacter l'activité β -gal avec un pourcentage médian de 82% pour les NEM394 transduites pour exprimer la GFP. Nous avons en revanche observé une augmentation significative du pourcentage de cellules à activité β -gal avec un pourcentage médian de 95 et 90% dans les NEM394, respectivement en réponse à l'expression de $BRAF^{V600E}$ ou $FGFR^{N546K}$ par rapport aux NEM394 exprimant la GFP (82%). Pour résumer, l'expression de $BRAF^{V600E}$ ou $FGFR^{N546K}$ dans le clone ancestral H3.3K27M $BRAF^{WT}$ dérivé d'un gliome H3.3K27M BRAFV600E induit aussi une diminution significative de la prolifération en condition *in-vitro* associée à une augmentation du pourcentage de cellules avec activité β -gal. Ces résultats nécessitent d'être réitérés et confirmés par de nouvelles expériences.

DISCUSSIONS & PERSPECTIVES

Les gliomes diffus de la ligne médiane H3K27-altérés (DMG K27) sont, à ce jour, universellement incurables. Il est urgent d'identifier des solutions thérapeutiques pour essayer d'améliorer la survie et la qualité de vie des patients atteints de cette pathologie. Les DMG_K27 constituent une entité tumorale spécifique depuis 2016 et sont classifiés en 4 sous-types tumoraux caractérisés par une même altération moléculaire initiatrice (dysfonction d'EZH2 du complexe PRC2). Bien que les DMG_H3.3K27M constituent un sous-type identifié de ces gliomes diffus de la ligne médiane aux côtés des DMG_H3.1K27M, des DMG_EZH1P et des DMG_EGFR, une certaine hétérogénéité persiste, avec par exemple un phénotype clinique agressif observé chez les patients présentant les mutations H3.3K27M-*TP53*^{MUT}, tandis que les associations H3.3K27M-*BRAF*^{V600E} et/ou *FGFR1*^{MUT} semblent entraîner une évolution tumorale moins agressive selon certaines données préliminaires publiées (Schüller *et al.*, 2021; Vuong *et al.*, 2021). Après avoir expliqué le rôle des altérations de la signalisation P53 dans la résistance à la radiothérapie et l'aggravation du pronostic tumoral (Werbrouck *et al.*, 2019; Vuong *et al.*, 2021), nous nous sommes attelés à comprendre comment les mutations V600E de *BRAF* ainsi que celles de *FGFR1* modifiaient le programme oncogénique des DMG_H3.3K27M et à confirmer leur influence sur le pronostic des patients. En effet, la compréhension du/des mécanisme(s) biologique(s) des tumeurs de bon pronostic pourrai(en)t nous conduire à l'identification de vulnérabilités thérapeutiques et /ou donner lieu à des opportunités thérapeutiques pour les patients avec un mauvais pronostic. Les deux figures suivantes constituent un résumé pour faciliter la discussion des résultats de la thèse (Fig. D1, D2).

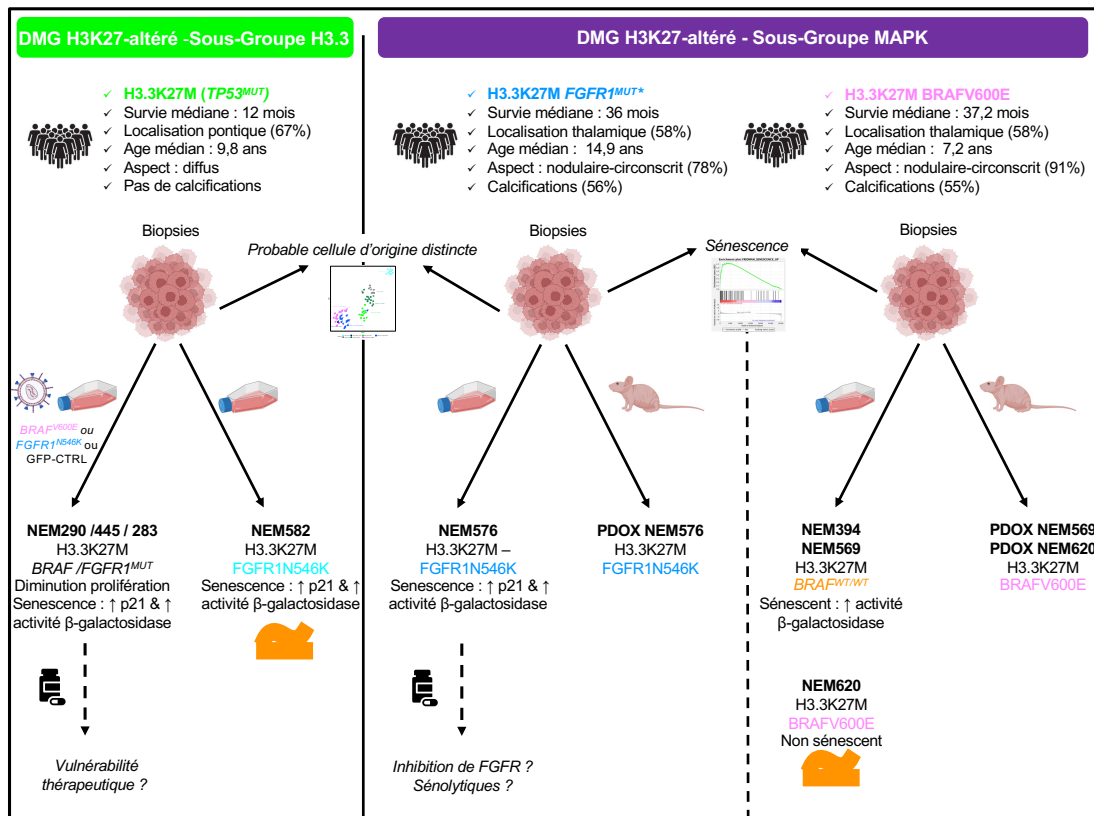


Figure D1 : Récapitulatif des découvertes réalisées dans l'étude des interactions des mutations oncogéniques secondaires avec la mutation initiatrice H3K27M dans les DMG K27

Cette étude a permis l'identification d'un cinquième sous-type de DMG_K27-MAPK-alterés associé à un profil clinique et moléculaire spécifique. Quelques modèles pré-cliniques *in-vitro* et *in-vivo* ont été développés avec succès. Les modèles PDOX *in-vivo* sont en cours de caractérisation. Le symbole d'approximation en orange indique que le modèle ne récapitule pas entièrement la tumeur dont il dérive. La suractivation de la voie MAPK dans les DMG_H3.3K27M pourrait constituer une nouvelle vulnérabilité thérapeutique.

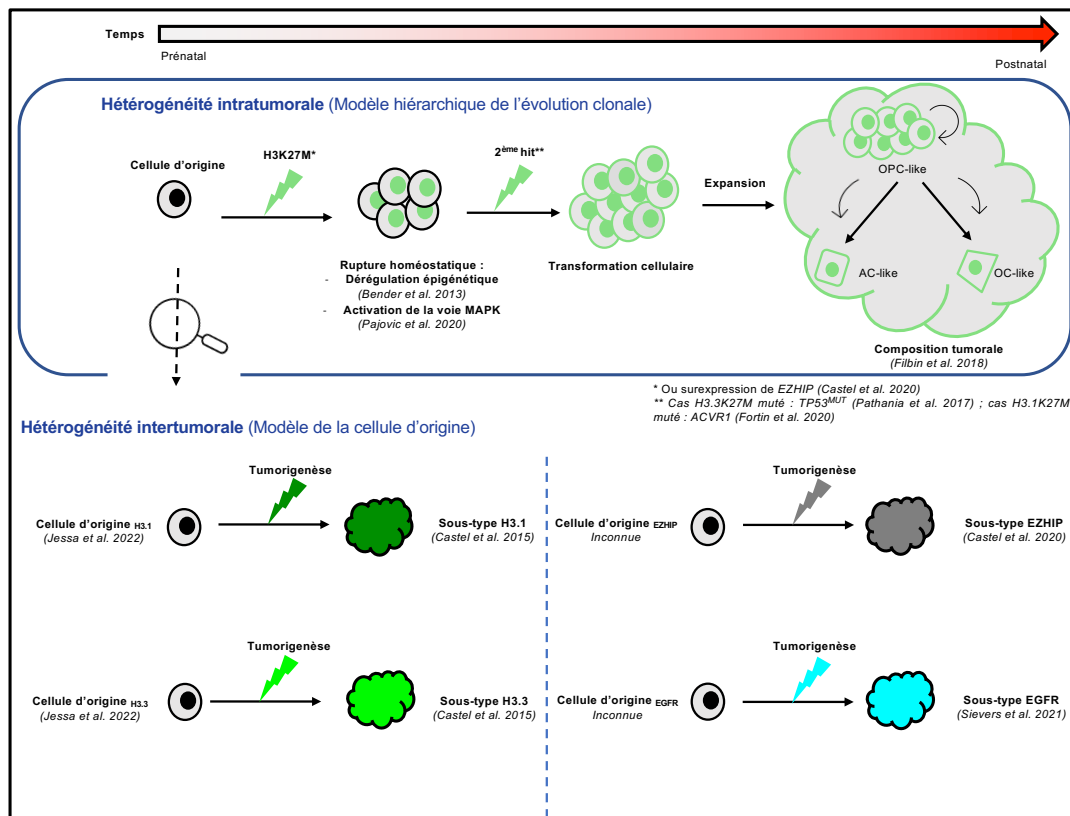


Figure D2 : Hétérogénéité inter- et intratumorale des DMG K27

L'hétérogénéité intratumorale des DMG_H3.3K27-altérés s'expliquerait par un modèle hiérarchique de l'évolution clonale où la diversité génétique proviendrait majoritairement de l'amplification du pool de cellules tumorales ressemblant à des progéniteurs oligodendrogliaux (OPC-like) et de la différenciation en cellules tumorales présentant des marqueurs communs aux astrocytes (AC-like) ou oligodendrocytes (OC-like). Il existe aussi de l'hétérogénéité intertumorale qui s'expliquerait par une différence de cellules d'origines.

Nous avons formé une cohorte d'étude composée de 62 patients diagnostiqués avec une tumeur de la ligne médiane K27-altérée porteuse d'une deuxième mutation oncogénique soit une mutation activatrice V600E de *BRAF* soit une mutation activatrice de *FGFR1* appariée à une cohorte de 304 patients diagnostiqués avec une tumeur K27-altérée sans mutation de *BRAF* ou de *FGFR1*. A ce jour, notre cohorte constitue la plus large cohorte regroupant des K27-altérés *BRAF*^{V600E} ou *FGFR1*^{MUT} faisant suite au travail préliminaire de l'équipe de Sainte-Anne (Pagès et al., 2018) sur l'association mutationnelle H3.3K27M *BRAF*V600E et la récente publication (Schüller et al., 2021) sur la co-occurrence des mutations de l'histone et *FGFR1*. Comme dans plusieurs publications précédentes, nous avons constitué une cohorte mixte pédiatrique et adulte (Solomon et al., 2016; Hoffman et al., 2018; Wang et al., 2018; Zheng et al., 2022). Nous avons réalisé un portrait intégratif des tumeurs K27-altérés *BRAF*^{MUT}/*FGFR1*^{MUT} regroupant

les caractéristiques cliniques, radiologiques, histologiques, génomiques, transcriptomiques et de méthylation de l'ADN.

Tous les DMG_K27 *BRAF*^{MUT} présentent une même substitution somatique induisant la modification suivante : valine en acide glutamique en position 600 de la protéine. Cette mutation est plutôt caractéristique des gliomes de bas grades pédiatriques (LGG) et est retrouvée dans presque 20% des cas (Ryall *et al.*, 2020) contre seulement 6% dans les gliomes de hauts grades (HGG) (Mackay *et al.*, 2017). Quant aux tumeurs *FGFR1*^{MUT}, elles présentaient toutes des substitutions de hotspot N546K/D et/ou K656E/M, plutôt spécifiques aux tumeurs du SNC. En effet, Nakamura *et al.* 2021, basé sur les données de COSMIC (catalogue des mutations somatiques dans les cancers), a montré que N546K ou K656E/M étaient les mutations de *FGFR1* les plus fréquentes et qu'elles apparaissaient le plus souvent dans les tumeurs du SNC et très rarement dans d'autres cancers : sein, rein et tissus mous (Nakamura *et al.*, 2021). Plusieurs études ont montré l'importance du rôle de *FGFR1* dans le système nerveux central (Klimaschewski and Claus, 2021; Zhang *et al.*, 2023). *FGFR1* est le récepteur retrouvé le plus abondamment dans le SNC et plus particulièrement dans les neurones, les astrocytes et la glie radiaire (Gonzalez *et al.*, 1995). *FGFR1*, tout comme *FGFR2*, sont essentiels au développement embryonnaire du cerveau (Turner *et al.*, 2016). La surexpression de *FGFR1* promeut la croissance des axones neuronaux (Hausott *et al.*, 2008). Pour terminer, *FGFR1* active plus fortement la signalisation ERK1/2 que *FGFR2* (Brewer, Mazot and Soriano, 2016). En conséquence, il n'est pas si surprenant d'observer les mutations activatrices N546K ou K656E/M de *FGFR1* dans les tumeurs pédiatriques du SNC. Il existe aussi des études qui lient *BRAF* plus ou moins directement au développement du SNC (Iroegbu *et al.*, 2021). Premièrement, il faut rappeler que *BRAF* est juste en aval de ERK dans la signalisation MAPK et la signalisation ERK est essentielle au développement physiologique du SNC (Pucilowska *et al.*, 2012). En 2013, la signalisation *BRAF* est identifiée comme clé dans l'astrogenèse au cours du développement du SNC (Tien *et al.*, 2012). En 2014, Li et ses collègues confirment ce résultat et montrent qu'en fonction du niveau d'activation de la signalisation RAS/ERK, cela induit des types cellulaires différents dont les neurones ou astrocytes et oligodendrocytes (Li *et al.*, 2014). On peut donc supposer que l'apparition d'une mutation activatrice de *FGFR1* ou *BRAF* dans une cellule durant l'oncogenèse doit apporter un vrai avantage prolifératif dans le SNC. L'ensemble des variants de *FGFR1* sont connus pour induire un gain de fonction à la protéine engendrant une activation aberrante de la voie MAPK à l'exception de *FGFR1*N546D. Ce dernier a déjà été rapporté dans une tumeur dysembryoplasique neuroépithéliale (DNT pour en anglais dysembryoplastic neuroepithelial tumor) mais n'a pas été évalué expérimentalement (Lucas *et al.*, 2020). Le variant N546D de *FGFR1* n'est pas connu de COSMIC mais le

programme bio-informatique SIFT (Sorting intolerant from tolerant) prédit que cette substitution d'acide aminé va induire un effet délétère à la protéine.

Nous avons évalué la prévalence des tumeurs H3.3K27M *BRAF*^{MUT} (8%) ou *FGFR1*^{MUT} (12%) à près de 20% des gliomes H3.3K27M ce qui représente une part non-négligeable de ces gliomes. Notre évaluation sur la prévalence des gliomes H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} est comparable à celle de *Schüller et al.* évaluée à 10,8% (*Schüller et al.*, 2021). En revanche, il y a une différence quant à la prévalence des tumeurs H3.3K27M *BRAF*^{MUT} qu'ils évaluent à 1,2% mais ceci pourrait s'expliquer par un plus grand nombre d'enfants dans notre cohorte comparée à celle de *Schüller et al.* En effet, nous montrons que les mutations V600E de *BRAF* se rencontrent plus souvent dans les DMG H3.3K27M pédiatriques. Nous avons formé une cohorte composite c'est-à-dire comprenant des cohortes de plusieurs horizons dont les critères d'inclusions des patients dans chaque cohorte peuvent varier d'une cohorte à l'autre. Avant la création de l'entité « DMG_H3K27M » en 2016 par l'Organisation Mondiale de la Santé, les gliomes H3K27M de la ligne médiane étaient séparés des gliomes infiltrants du tronc cérébral (DIPG). En conséquence, plusieurs études sont restrictives aux DIPGs. Cela peut être un biais dans l'évaluation de la prévalence des DMG K27-altérés *BRAF*^{MUT} et *FGFR1*^{MUT} car ils se développent préférentiellement dans le thalamus. Pour y pallier, nous avons supplémenté notre cohorte *BRAF*^{WT}/*FGFR1*^{WT} enrichie en DIPGs avec des patients diagnostiqués avec des DMG H3K27M thalamiques provenant de la même période que les patients DIPG de notre cohorte Necker/Gustave Roussy. Le biais reste possiblement présent notamment avec *Mackay et al.* (série pédiatrique) mais aussi avec *Schüller et al.* et *Picca et al.* comprenant des cas thalamiques surtout adultes. L'essai clinique BIOMEDE.2 en cours à Gustave Roussy sur les DMG K27-altérés sera une opportunité pour réévaluer la prévalence au sein d'une large cohorte comprenant un nombre conséquent de DMG K27-altérés de la ligne médiane (toutes localisations comprises) pédiatriques et adultes.

Depuis 2017, la classification des tumeurs du SNC selon le profil de méthylation de l'ADN est devenue un outil incontournable pour aider au diagnostic en routine lorsque la radiologie, l'histopathologie et le profil génétique ne sont pas assez indicatifs ou pour une identification /reclassification d'un type ou sous-type tumoral (*Capper et al.*, 2018). En effet, le méthylome d'une cellule tumorale consiste en la combinaison du profil de méthylation de la cellule d'origine au moment de la transformation et le profil de méthylation induit par les mutations somatiques (*Fernandez et al.*, 2012). La part de ces deux phénomènes étant très variable selon le type de tumeur. Nous avons montré que les gliomes H3.3K27M *BRAF*^{V600E} ou *FGFR1*^{MUT} ont un profil de méthylation spécifique, différent de chacun des 4 sous-types de DMG déjà identifiés (H3.1, H3.3, EZHIP et EGFR) et des gliomes de bas grades mutés BRAFV600E de la

ligne médiane tels que représentés par la distribution dans le t-SNE. Par notre étude, nous individualisons l'existence d'un cinquième et nouveau sous-type de DMG, que nous nommons « DMG K27-MAPKa », comprenant les gliomes K27-altérés $BRAF^{V600E}$ ou $FGFR1^{MUT}$.

On peut s'interroger si ces tumeurs sont des gliomes de bas grade initiés par la mutation de $BRAF$ ou de $FGFR1$ secondairement transformés par la mutation de l'histone H3 ou si ce sont des gliomes avec mutations H3K27M secondairement altérés par la mutation activatrice de la voie des MAPK. Nous apportons des arguments pour cette deuxième hypothèse. En effet, nous avons montré que c'est la mutation d'histone H3 qui est le premier évènement, suivie de $BRAF^{V600E}$ dans l'oncogenèse d'un cas de DMG H3.3K27M $BRAF^{V600E}$. Cette étude est malheureusement limitée à une tumeur $BRAF^{V600E}$ et il est nécessaire d'étendre à d'autres tumeurs $BRAF^{V600E}$ ou $FGFR1^{MUT}$. De manière intéressante, ce clone ancestral H3.3K27M $BRAF^{WT}$ mais dérivé d'un gliome H3.3K27M $BRAF^{V600E}$ présente le même profil de méthylation de l'ADN qu'un gliome H3.3K27M $BRAF^{V600E}$ ou $FGFR1^{MUT}$. Ce résultat supposerait que la différence de profil de méthylation de l'ADN entre les DMG H3.3K27M $BRAF^{V600E}$ et ceux $BRAF^{WT}$ (sous-type H3.3) n'est pas la conséquence de l'apparition de la mutation $BRAF^{V600E}$ mais pourrait provenir d'une identité cellulaire à l'origine distincte par rapport à la cellule d'origine des autres gliomes DMG K27-altérés. Par analyse t-SNE, du fait que les gliomes H3.3K27M $FGFR1^{MUT}$ appartiennent au même cluster que les gliomes H3.3K27M $BRAF^{MUT}$. Ceci implique que les profils de méthylation de l'ADN de ces deux entités sont proches, et plaident pour une cellule d'origine très similaire. Cependant, nous avons aussi observé une fine séparation des DMG H3.3K27M $BRAF^{V600E}$ ou $FGFR1^{MUT}$ selon le profil de méthylation de l'ADN au sein du cluster ce qui signifie que les gliomes H3.3K27M $BRAF^{V600E}$ ou $FGFR1^{MUT}$ ne sont pas totalement identiques et qu'il est fondamental de les étudier aussi indépendamment. Ceci souligne soit que leur cellule d'origine diffère légèrement, soit que le type de mutation activant la voie des MAPK peut influencer le profil de méthylation de l'ADN. D'autres expériences *in-vitro* pourraient être envisagées pour préciser ou infirmer ces hypothèses : on pourrait ainsi transformer le clone ancestral de la tumeur H3K27M/BRAFV600E décrit plus haut par une forme mutée de $FGFR1$ ou de $BRAF$ et regarder si le profil de méthylation de l'ADN change.

En 2021, Schüller *et al.* ont montré que $FGFR1$ est un marqueur de bon pronostic dans les DMG K27-altérés basé sur moins de 10 patients, dont 6 adultes et 1 enfant, H3.3K27M $FGFR1^{MUT}$ et sans prendre en compte un facteur confondant qui est le statut mutationnel de $TP53$. En effet, les chercheurs ont comparé, par analyse Kaplan-Meier, la survie de patients diagnostiqués avec des gliomes H3.3K27M $FGFR1^{MUT}$ ($n=7$) versus des gliomes H3.3K27M $FGFR1^{WT}$ ($n=56$) mais dont la condition $FGFR1^{WT}$ est significativement enrichie en patients $TP53^{MUT}$. En 2019, notre équipe avait montré qu'une mutation de

TP53 entraînait une radiorésistance primaire et aggravait la survie des DMG H3K27M (Werbrouck *et al.*, 2019). En utilisant uniquement les données cliniques de Schüller *et al.*, nous avons réitéré leur analyse en éliminant le biais introduit par *TP53* et il n'y avait plus d'augmentation significative de la survie selon le statut *FGFR1*. Avec notre cohorte composite, nous avons donc démontré de manière décisive que les mutations de *FGFR1* sont un marqueur de bon pronostic dans les DMG K27-altérés, par une analyse Kaplan-Meier et une analyse multivariée, sur une population pédiatrique-adulte plus large et en tenant compte du statut de *TP53*. Nous avons aussi, pour la première fois, identifié *BRAF*^{V600E} comme un marqueur de bon pronostic des DMG K27-altérés par une analyse Kaplan-Meier et une analyse multivariée, ce qui valide le travail préliminaire publié par l'équipe de l'hôpital Sainte-Anne (Pagès *et al.*, 2018). Dans notre étude, la médiane de survie des patients atteints de gliomes H3.3K27M *BRAF*^{V600E} ou *FGFR1*^{MUT} est supérieure à 36 mois, comparée à celle des patients avec DMG H3.3K27M qui est en dessous de 12 mois. Ainsi nos travaux rapportent un sous-type de DMG K27-altérés avec une survie significativement plus élevée, qui est à prendre en compte dans le design des prochains essais cliniques sur les DMG. Le statut mutationnel de *BRAF* et *FGFR1* pourrait être un nouveau facteur de stratification. En effet, la longue survie de ces patients dans un essai ne doit pas être associée à une réponse thérapeutique mais correspond plutôt à une caractéristique intrinsèque à ses DMG. Ces patients ont tous été traités par une irradiation associée à un traitement médical variable mais dont l'efficacité n'est le plus souvent pas démontrée.

La poursuite de l'analyse des caractéristiques cliniques, radiologiques, histologiques et biologiques en comparaison avec les gliomes diffus de la ligne médiane K27-altérés tout venant supporte leur distinction comme une entité biologique à part. Notre étude a ainsi montré des disparités au niveau de l'âge au diagnostic selon le statut mutationnel de *BRAF* ou *FGFR1*. En effet, l'âge médian au diagnostic des patients avec des gliomes H3.3K27M *BRAF*^{V600E} est de 7,2 ans et est équivalent à l'âge médian des patients diagnostiqués avec un DMG H3.3K27M dans une population dont l'âge est inférieur à 18 ans (pédiatrique). Cependant contrairement aux DMG H3.3K27M *BRAF*^{WT}, il n'existe à ce jour aucun patient de plus de 18 ans (adulte) qui a été diagnostiqué avec un DMG H3.3K27M *BRAF*^{V600E}. Cette observation laisse à supposer que cette pathologie se développe préférentiellement chez l'enfant et peu ou pas chez l'adulte. Le caractère sous-clonal de la mutation V600E de *BRAF* dans ces tumeurs, les observations cliniques de la disparition de *BRAF*^{V600E}, la disparition des clones avec cette mutation dans les conditions de cultures habituelles de ces tumeurs et l'absence de cas de ce type chez l'adulte peut laisser penser que cette mutation de *BRAF* n'est utile à l'oncogenèse qu'à un stade précoce /limité de l'évolution, peut-être dans une étape particulière du développement cérébral. Nous avons observé le phénotype opposé pour les DMG H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} où l'âge médian au diagnostic est plus élevé pour les patients

FGFR1^{MUT} par rapport à ceux *FGFR1* sauvage. L'âge médian au diagnostic des patients atteints de DMG H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* est de 14,8 ans dans une population mixte pédiatrique-adulte. Nous avons montré que cette différence d'âge au diagnostic n'est pas liée à la localisation tumorale, au contraire des DMG H3.3K27M classiques. En effet pour les DMG H3.3K27M classiques, l'âge au diagnostic est plus élevé lorsque la tumeur est thalamique plutôt que pontique (Solomon *et al.*, 2016; Mackay *et al.*, 2017). Une différence d'âge au diagnostic peut être le résultat d'une évolution tumorale spécifique plus lente ou alors d'une identité cellulaire à l'origine différente. Nous avons cependant montré que les profils de méthylation de l'ADN étaient similaires pour les DMG H3.3K27M thalamiques et pontiques (Castel *et al.*, 2018). Dans les deux cas, les différences d'âges au diagnostic démontrent de l'hétérogénéité à la fois entre les DMG K27-MAPKa *versus* ceux *BRAF^{WT}/FGFR1^{WT}* et entre les DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT}* *versus* *FGFR1^{MUT}*. Quant à la localisation tumorale, nous avons observé que les DMG *BRAF^{MUT}* ou *FGFR1^{MUT}* se développent majoritairement dans le thalamus comparé aux DMG H3.3K27M qui sont plutôt pontiques. Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre cette différence.

Nous avons aussi réussi à identifier des marqueurs /caractéristiques radiologiques et histopathologiques spécifiques à ces DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT} /FGFR1^{MUT}* ce qui constitue une aide précieuse pour un diagnostic présomptif. A ce jour, il est difficile de prédire si une tumeur diffuse de la ligne médiane est un DMG H3K27M ou une autre tumeur diffuse H3 sauvage, basé uniquement sur le profil radiologique (Kathrani *et al.*, 2022; Khalid *et al.*, 2023). La nécessité de la biopsie est maintenant largement admise (Aboian *et al.*, 2017). Ainsi pour la première fois, nous avons réussi à identifier des caractéristiques radiologiques spécifiques aux DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT} /FGFR1^{MUT}* (sous-type MAPKa) parmi les DMG K27. Ces tumeurs *BRAF^{MUT}* ou *FGFR1^{MUT}* apparaissent moins diffuses, dans respectivement 91 et 78% des cas, avec un aspect nodulaire-diffus à totalement circonscrit associé à des calcifications dans plus de 50% des cas. Nous ne sommes pas parvenus à identifier une explication biologique à la présence de calcifications au sein des DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT} /FGFR1^{MUT}*. Néanmoins, il n'est pas étonnant de voir des calcifications dans ces tumeurs car quelques études antérieures ont aussi rapporté des macro et /ou microcalcifications dans des gliomes de bas grades avec des mutations *BRAF^{V600E}* ou des altérations de *FGFR* (Bielle *et al.*, 2018; Johnson *et al.*, 2019; Bale, 2020). Nous avons observé une prise de contraste dans 100% des DMG K27-MAPKa contre 47% pour les DMG K27. Cela pourrait s'expliquer par un phénotype plus angiogénique dans les DMG K27-MAPKa, qui corrèle avec la présence des signatures transcriptomiques d'angiogenèse (HALLMARK_ANGIOGENESIS) et d'hypoxie (HALLMARK_HYPOXIA). Les résultats préliminaires (en cours de consolidation) sur la caractérisation histopathologique des DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT} /FGFR1^{MUT}*, en effet, confirme la présence de microcalcifications comme spécificité de ces gliomes. Ces premiers résultats ont aussi montré une hétérogénéité avec l'existence de trois

profils histopathologiques. Le premier profil correspond au profil classique d'un DMG (DMG-like) ($n=6$) à savoir avec une infiltration des cellules tumorales du parenchyme associée à des cellules tumorales positives pour des marqueurs gliaux tels que OLIG2 et GFAP. *OLIG2* (Oligodendrocyte transcription factor 2) est un gène codant pour le facteur de transcription oligodendrocyte 2 et qui marque donc les cellules du lignage oligodendrogial. *GFAP* (Glial Fibrillary Acidic Protein) code une protéine de filament intermédiaire qui est retrouvée dans les astrocytes. Le second correspond plutôt à un profil histologique de gangliogliomes (GG-like) ($n=11$) avec une composante tumorale mixte glio-neuronale. Le dernier profil est ressemblant à un profil de gliome de haut grade mais distinct d'un DMG (HGG-like) ($n=3$). Cette analyse est en cours donc plus de détails sur chaque profil étayeront ces découvertes à l'avenir. Ces résultats préliminaires sous-entendent que l'histogénèse et l'architecture tissulaire des DMG H3.3K27M *BRAF*^{MUT}/*FGFR1*^{MUT} n'est pas univoque pouvant donner lieu à des profils histologiques très divers.

Comprendre les mécanismes à l'origine de l'évolution tumorale plutôt favorable de ces DMG H3.3K27M *BRAF*^{MUT}/*FGFR1*^{MUT} était pour nous une opportunité unique d'identifier de nouvelles vulnérabilités thérapeutiques pour les DMG à bon pronostic mais aussi de découvrir de nouvelles opportunités thérapeutiques pour les patients atteints de DMG à mauvais pronostic. Dans cette optique notre première stratégie, à visée exploratoire, a été d'étudier les spécificités transcriptomiques de ces DMG. Nous avons réalisé deux analyses différentielles d'expression des gènes : (i) entre les DMG H3.3K27M *BRAF*^{MUT} versus *BRAF*^{WT}/*FGFR1*^{MUT} (contraste *BRAF*^{MUT}) et (ii) entre les DMG H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} versus *BRAF*^{WT}/*FGFR1*^{WT} (contraste *FGFR1*^{MUT}). Premièrement, nous avons observé qu'un nombre de gènes différentiellement exprimés (DEG, surexprimés ou sous-exprimés) beaucoup plus élevé dans le contraste *BRAF*^{MUT} versus H3.3K27M classique que dans le contraste *FGFR1*^{MUT} versus H3.3K27M classique avec respectivement 1309 et 502 DEGs. Nous supposons que cette différence de DEGs entre les deux contrastes est le fruit de l'hétérogénéité entre les gliomes *BRAF*^{MUT} et *FGFR1*^{MUT}, déjà visible avec le profil de méthylation de l'ADN et l'âge au diagnostic. En effet, moins de 50% des DEGs sont en communs entre les contrastes *BRAF*^{MUT} et *FGFR1*^{MUT}. La prochaine étape sera d'étudier les différences transcriptomiques entre les DMG *BRAF*^{MUT} et *FGFR1*^{MUT} via une analyse différentielle d'expression des gènes suivie d'analyses fonctionnelles (GO) et GSEA. Nous avons posé l'hypothèse que la longue survie des patients avec des DMG H3.3K27M *BRAF*^{MUT} ou *FGFR1*^{MUT} s'expliquerait par un mécanisme biologique commun, non présent dans les DMG H3.3K27M *BRAF*^{WT}/*FGFR1*^{WT}. Ainsi, nous avons étudié les signatures transcriptomiques communes présentes dans les contrastes *BRAF*^{MUT} et *FGFR1*^{MUT}. De cette façon, nous avons montré que les DMG H3.3K27M *BRAF*^{MUT}/*FGFR1*^{MUT} sont caractérisés par une signature transcriptomique d'activation de la voie MAPK (KRAS_SIGNALING_UP) en corrélation avec la présence

des mutations de *BRAF* et *FGFR1*. Nous avons aussi noté que plusieurs DMG H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* présentent un second hit dans la voie MAPK : principalement, mutations de *NF1* (42%) et de *PTPN11* (14%). L'ensemble de ses résultats souligne l'importance du rôle de la voie MAPK dans l'oncogenèse de ces DMG. Ceci fait écho aux travaux de *Koncar et al.* et *Pajovic et al.* sur les liens entre H3K27M et la signalisation MAPK (*Koncar et al.*, 2019; *Pajovic et al.*, 2020). *Pajovic* et ses collègues ont démontré que la mutation K27M de l'histone H3.3 induit précocement dans l'oncogenèse une activation épigénétique de l'axe RAS/MYC (MAPK) et qui est renforcé plus tardivement par l'apparition d'une altération génique activatrice de la voie MAPK (i.e. altération de *PDGFRA*). L'activation épigénétique de l'axe RAS/MYC n'est pas une spécificité de la mutation d'histone dans la cellule d'origine des DMG K27 puisque l'activation épigénétique de l'axe est aussi retrouvée dans les lymphomes H3K27M (*Pajovic et al.*, 2020). Nous pouvons donc supposer que le même schéma d'oncogenèse est applicable aux DMG K27-MAPKa malgré qu'ils ne présentent pas la même cellule d'origine que ceux du sous-type H3.3. Pour récapituler, la mutation K27M de l'histone H3 dans la cellule d'origine inconnue des DMG K27-MAPKa induit un remodelage épigénétique et transcriptomique, induisant probablement une activation de la voie MAPK. Cette activation de la voie MAPK serait ensuite renforcée par l'apparition secondaire de *BRAF* ou *FGFR1*. Les DMG K27-MAPKa montrent aussi une signature d'activation de la voie PI3K/AKT/MTOR ce qui était attendu puisque l'activation de la signalisation FGFR ou BRAF induit l'activation de la voie ERK1/2 et de la voie PI3K/AKT/MTOR (*Prabowo et al.*, 2014; *Babina and Turner*, 2017). De plus, les DMG H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* présentent dans 19% des cas un évènement oncogénique supplémentaire activateur dans la voie PI3K/AKT/MTOR (i.e., mutations *PIK3CA*, *PIK3R1*) ce qui souligne l'intérêt de l'activation de la voie dans l'oncogenèse de ces DMG. Nous avons noté aussi une signature transcriptomique de sénescence dans les DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT}/FGFR1^{MUT}*. La sénescence est un arrêt prolongé irréversible du cycle cellulaire en phase G1/S associé à une altération du métabolisme (*Leonardo et al.*, 1994; *Gorgoulis et al.*, 2019). Il est connu que la sénescence peut être induite par l'activation d'un oncogène (OIS) comme BRAFV600E ou autres dans les gliomes de bas grades (*Jacob et al.*, 2011; *Buhl et al.*, 2018). Lors de mes recherches bibliographiques, je n'ai pas trouvé de publications reliant directement une mutation hotspot de *FGFR1* et l'OIS au sein des LGGs. Cependant, plusieurs observations laissent à penser qu'un lien existe. Il est reconnu dans la communauté scientifique que des altérations de *FGFR3* ou *FGFR2*, suractivant la signalisation MAPK, induisent l'OIS (*Ota et al.*, 2009; *Krejci et al.*, 2010). Ainsi pour la première fois, nous soulignons un possible lien entre *FGFR1^{MUT}* et l'OIS. Cette sénescence semble être médiée par l'axe P53-P21. En effet, nous avons observé une surexpression de *CDKN1A* qui code P21, un régulateur du cycle cellulaire impliqué dans l'induction de la sénescence. Les DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT}/FGFR1^{MUT}* présentaient aussi une signature transcriptomique d'activation de la voie P53. En effet par IHC, nous avons observé un marquage de P53 faible à fort selon les tumeurs H3.3K27M *BRAF^{MUT}/FGFR1^{MUT}* alors

que *TP53* est sauvage ce qui valide au niveau protéique une activation de la voie P53. Nos données corrélient avec les données de *Jacob et al.* Les chercheurs ont montré que 7/52 astrocytomes pilocytiques, gliomes de bas grade avec une activation de la voie MAPK, présentent un marquage positif pour P53 et dont 2/2 sont positifs avec des astrocytomes mutés *BRAF^{V600E}* (*Jacob et al.*, 2011). Il semblerait qu'une protéine P53 fonctionnelle soit un acteur moléculaire clé dans l'oncogenèse des DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT}/FGFR1^{MUT}* et cela pourrait expliquer pourquoi *TP53* est rarement retrouvé muté (10% des cas) et le plus souvent avec des fréquences alléliques faibles alors que celui-ci est muté dans plus de 2/3 des DMG H3.3K27M *BRAF^{WT}/FGFR1^{WT}*. *CDKN2A* est aussi un gène suppresseur de tumeur codant P16, un autre régulateur du cycle cellulaire impliqué dans l'induction de la sénescence. Nous avons observé une surexpression de *CDKN2A* (mais moins élevée qu'avec *CDKN1A*) uniquement dans les DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT}* versus *BRAF^{WT}*. Dans les DMG K27 classiques, l'expression de P16 est réprimée par la présence de la marque épigénétique inhibitrice H3K27me3 en regard du gène (*Becher*, 2018) expliquant pourquoi contrairement à nombre de cancers on ne voit jamais de co-délétion de *CDKN2A*. Il y a donc probablement une perte de cette marque à cet endroit dans ces tumeurs avec activation de la voie des MAPK qu'il faudrait démontrer par une analyse de ChIPseq. De manière intéressante, la seule tumeur H3.3K27M *BRAF^{V600E} TP53^{MUT}* ne présente pas de surexpression de *CDKN1A* (P21) mais une surexpression de *CDKN2A* (P16). Il est possible que la mutation de *TP53* ne puisse pas induire l'expression de *CDKN1A* et donc la sénescence via l'axe P53-P21, l'axe P16/RB serait une alternative pour induire la sénescence. En effet, *Jacob et al.* ont montré que les astrocytomes pilocytiques (LGGs) présentent des altérations génétiques induisant une suractivation de la voie MAPK médiant la sénescence induite par un oncogène (OIS) via l'axe P16/RB sans intervention de P53 (*Jacob et al.*, 2011). En conséquence, il est légitime de se demander si la sénescence ne serait pas à l'origine de l'allongement de la survie observé chez les patients atteints de DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT}/FGFR1^{MUT}*. En complément, nous avons noté que les DMG H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* sont mutés *ATRX* dans plus de 50% des cas et ce, jamais en association avec *TP53^{MUT}*. Ceci est surprenant car *ATRX^{MUT}* est associée à une mutation de *TP53* dans plus de 70% des cas de DMG H3.3K27M (*Kergrohen et al.*, 2021). Nous n'avons pas d'explications ou d'hypothèses sur les associations de mutations : H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* et *ATRX^{MUT}*. Nous savons uniquement qu'au moins un autre type tumoral, les astrocytomes pilocytiques anaplasiques, présentent aussi les associations : altération de la voie MAPK, perte de fonction/expression de *ATRX*. Cela met en évidence une fonction biologique à cette association non restreinte aux DMG (*Reinhardt et al.*, 2018). *Kovatcheva et al.* ont montré que *ATRX* jouait un rôle dans l'induction de la sénescence et que les cellules tumorales *ATRX*-déficientes ne peuvent pas induire la sénescence (*Kovatcheva et al.*, 2017). Cette étude est donc en contradiction avec ce que nous observons dans les DMG K27-MAPKa : sénescence et déficience d'*ATRX*

(54%). En effet, nous n'avons pas observé de différence d'OS des patients avec gliomes H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* selon le statut mutationnel de *ATRX*.

Nos données préliminaires semblent montrer que l'évolution biologique entre les DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT}* et *FGFR1^{MUT}* est différente. En effet pour 2/3 patients diagnostiqués avec des gliomes H3.3K27M *BRAF^{V600E}*, il y a eu une disparition du clone H3.3K27M *BRAF^{V600E}* au profit d'un clone H3.3K27M *BRAF^{WT}* que l'on suppose être le clone ancestral. Ce n'est pas le cas pour les 2/2 patients diagnostiqués avec des gliomes H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* où le clone H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* est toujours présent à la rechute. Les résultats de clonalité de *BRAF^{MUT}* ou *FGFR1^{MUT}* par rapport à H3.3K27M ou *ACVR1^{MUT}* (cas de surexpression de *EZH1P*) semblent confirmer cette évolution tumorale différenciée. En effet, *BRAF^{V600E}* est clonale à la mutation d'histone seulement dans 33,3% (2/6) des tumeurs au diagnostic ce qui signifie que le clone H3.3K27M *BRAF^{V600E}* est majoritaire seulement dans 33% des cas et que le reste des cas, c'est le clone ancestral qui est majoritaire. Ceci suggère que le destin évolutif de ces tumeurs est la réémergence du clone ancestral sans mutation V600E de *BRAF* qui ne donnerait un avantage sur le plan évolutif que dans une période de développement donnée de la tumeur. Ce qui pourrait aussi expliquer qu'on ne rencontre pas cette forme de DMG chez les adultes. En analysant le méthylome de plus de tumeurs thalamiques de l'adulte, nous pourrions peut-être alimenter cette hypothèse en trouvant des DMG H3K27M qui clustérisent avec les DMG H3K27M *BRAF^{V600E}* pédiatriques. A l'opposé, *FGFR1^{MUT}* est clonale à H3.3K27M ou *ACVR1^{MUT}* dans 90% (9/10) des cas ce qui signifie que le clone H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* est majoritaire dans 90% des tumeurs au diagnostic et pour deux observations au moins, que cette situation perdure à la rechute. Il est possible donc que l'évolution tumorale des DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT}* se caractérisent par la disparition du clone portant les deux mutations au profit du clone ancestral H3.3K27M. A l'inverse, l'évolution tumorale d'un DMG H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* semble maintenir le clone H3.3K27M *FGFR1^{MUT}*.

Il est intéressant de garder en tête que l'évolution tumorale est différenciée entre les DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT}* et *FGFR1^{MUT}* pour discuter du développement des modèles *in-vitro* et *in-vivo* de ces DMG. Nous n'avons pas réussi à développer un modèle *in-vitro* de DMG H3.3K27M *BRAF^{V600E}* qui récapitule totalement les caractéristiques de la tumeur dont le modèle est dérivé en conservant la mutation V600E de *BRAF*. En effet, 2/3 modèles (NEM394, 569) ont présenté une disparition du clone H3.3K27M *BRAF^{V600E}* au profit d'un clone H3.3K27M *BRAF^{WT}* dont pour le modèle NEM394 nous avons montré qu'il s'agit du clone ancestral. Nous supposons qu'il s'agit aussi du clone ancestral pour NEM569. A notre surprise, ce clone ancestral pour les deux modèles s'est révélé être sénescence *in-vitro*, alors qu'il ne possède pas de mutation *BRAF^{V600E}*, et a arrêté de proliférer autour de 20 divisions cellulaires. Nous avons supposé que

les conditions de cultures en adhérence sur laminine (2D) avec du milieu de cellules souches neurales (NSC) en normoxie n'étaient pas optimales. En effet, nous faisons l'hypothèse que les cellules H3.3K27M *BRAF*^{V600E} étaient intrinsèquement sénescents donc stressés et que la charge supplémentaire de stress induite par les conditions de normoxie était trop élevée pour les cellules H3.3K27M *BRAF*^{V600E} donc elles n'étaient pas maintenues en culture. Nous avons donc testé les mêmes conditions de culture mais en hypoxie. Pour 1/1 modèle, le clone H3.3K27M *BRAF*^{V600E} n'a pas non plus été maintenu en culture hypoxie sur le long terme. Cette expérience sur NEM394 est à réitérer et peut être dupliquée sur NEM569. Si l'on regarde plus globalement, nous sommes moyennement surpris de la présence de sénescence dans ces modèles de DMG H3.3K27M *BRAF*^{WT} dérivés de gliomes H3.3K27M *BRAF*^{V600E} car la tumeur enrichie en clone ancestral H3.3K27M *BRAF*^{WT} présente aussi une signature transcriptomique de sénescence malgré l'absence de *BRAF*^{V600E} ($n=1$ uniquement). Pour NEM569, nous avons réussi à développer un modèle *in-vivo* de xénogreffe orthotopique dérivé du patient (PDOX) et celui-ci est muté H3.3K27M *BRAF*^{V600E}. Cela signifie que la disparition *in-vitro* du clone H3.3K27M *BRAF*^{V600E} n'est pas dû à un problème lors du transport entre la chirurgie et la mise en culture de la biopsie mais à des conditions de cultures non-appropriées. Le troisième et dernier modèle confirme à nouveau cette observation. Pour le modèle *in-vitro* (NEM620) dérivé d'un gliome H3.3K27M *BRAF*^{V600E}, le clone H3.3K27M *BRAF*^{V600E} a été maintenu mais il s'est révélé être non-sénescents donc non-récapitulatif de la tumeur primaire sénescents dont il dérive pour ce point. En effet, NEM620 ne présente pas d'augmentation de l'activité β -galactosidase, pas d'expression de P21 au niveau génique et protéique, et a un temps de doublement cellulaire très bas. Alors que, la tumeur dont le modèle est dérivé présente un score de sénescence élevé par analyse d'enrichissement en gène sur échantillon unique (ssGSEA) et une surexpression de *CDKN1A* (P21). Cette différence phénotypique pourrait s'expliquer par la sélection d'un clone avec une extinction de *CDKN1A* (P21) procurant un avantage prolifératif au cours de l'établissement du modèle cellulaire. Il n'est pas possible de déterminer si le clone était déjà présent dans la tumeur et s'il a été amplifié ou alors si le clone est apparu *ex-vivo*. En effet, nous avons vu que le temps de doublement sur les premiers passages après mise en culture de la biopsie étaient plutôt longs puis le temps de doublement a diminué à mesure des passages. Nous avons aussi réussi à développer un modèle *in-vivo* PDOX de NEM620 et il serait intéressant de voir si la tumeur de ce modèle est enrichie en cellules H3.3K27M *BRAF*^{V600E} sénescents ou non sénescents afin de déterminer d'où viendrait le clone H3.3K27M *BRAF*^{V600E} non-sénescents qui a été amplifié en culture. Effectivement, il semble que la disparition du clone H3.3K27M *BRAF*^{V600E} soit une étape clé de l'évolution tumorale, nous pouvons imaginer que la répression de P21 au sein du clone pourrait être un mécanisme alternatif mimant la disparition du clone H3.3K27M *BRAF*^{V600E}.

Ainsi pour 3/3 modèles, le clone H3.3K27M *BRAF*^{V600E} n'est pas maintenu *in-vitro* et nous avons démontré que le problème venait des conditions de culture. Cela indique que le clone H3.3K27M *BRAF*^{V600E} semble être dépendant d'un ou plusieurs éléments présents dans le microenvironnement car il prolifère *in-vivo* mais pas *in-vitro*. L'absence de développement de modèles *in-vitro* de DMG H3.3K27M *BRAF*^{V600E} avec maintien du phénotype de sénescence n'est pas étonnant. Actuellement, il n'existe pas de modèles canoniques (i.e. sans modification génique et entièrement récapitulatif de la tumeur primaire) de LGGs pédiatriques, caractérisés aussi par une suractivation de la voie MAPK et un phénotype de sénescence, qui récapitulent ces mêmes caractéristiques *in-vitro*. D'après la communauté scientifique, le caractère de bas grade de ses gliomes pourrait s'expliquer par la présence de la sénescence induite par l'OIS qui modulerait l'évolution tumorale comme dans les naevus mélanocytaires (Michaloglou *et al.*, 2005; Raabe *et al.*, 2011). La perte de cet état de sénescence via la délétion génétique de *CDKN2A* (P16) serait d'ailleurs le mécanisme à l'origine de la transformation maligne des gliomes de bas grades pédiatriques *BRAF*^{V600E} (Raabe *et al.*, 2011; Mistry *et al.*, 2015). La prochaine étape consistera donc à mettre en place un protocole de culture cellulaire pour le développement de modèles *in-vitro* de DMG H3.3K27M *BRAF*^{MUT} récapitulant les caractéristiques de la tumeur dérivée (i.e., statut mutationnel H3.3K27M *BRAF*^{V600E} et sénescence). Récemment, Abdullah *et al.* ont mis au point un nouveau protocole pour établir des organoïdes de LGGs pédiatriques à partir de la mise en culture direct de morceaux de biopsies tumorales en hypoxie (5% d'oxygène) (Abdullah *et al.*, 2022). Au vu de notre expérience préliminaire en hypoxie et de ce protocole, il semble que l'hypoxie soit un facteur important. Pour les prochaines biopsies de gliomes thalamiques, peu diffus /calcifiés, il serait intéressant de tester ce protocole, et /ou essayer de la culture en organoïde à partir de cellules dissociées à 5% d'oxygène. En contraste de l'absence de modèles *in-vitro*, nous avons réussi à développer deux modèles pré-cliniques de PDOX de DMG H3.3K27M *BRAF*^{MUT} qui pourront, peut-être à l'avenir, faire l'objet d'une évaluation de drogue. Au préalable, il est nécessaire de terminer la caractérisation des modèles et vérifier que les cellules H3.3K27M *BRAF*^{V600E} *in-vivo* présentent bien le phénotype de sénescence, caractéristique majeure des DMG H3.3K27M *BRAF*^{V600E}. Pour cela, il est possible d'évaluer le niveau d'expression de *CDKN1A* (P21) par RT-qPCR et /ou d'étudier au niveau protéique l'expression de P21 par western blot.

A l'opposé que pour les DMG H3.3K27M *BRAF*^{V600E}, nous avons réussi à établir 2/3 modèles *in-vitro* dérivés de DMG H3.3K27M *FGFR1*^{MUT}. NEM499, dérivé de la rechute d'un gliome H3.3K27M *FGFR1*^{MUT}, n'a pas été établi *in-vitro* contrairement aux deux autres modèles. Cela pourrait être la conséquence d'un problème technique lié à une mauvaise conservation lors du transport ou à une spécificité intrinsèque aux cellules. Nous avons ensuite réussi à établir sur le long terme le modèle *in-vitro* NEM576 dérivé d'un DMG H3.3K27M *FGFR1*^{N546K} appartenant au nouveau sous-type de DMG que nous avons

découvert. Nous avons commencé à caractériser ce modèle et montré qu'il est muté H3.3K27M *FGFR1*^{N546K}, qu'il présente une activation de la voie MAPK et un phénotype de sénescence : augmentation de l'activité β -galactosidase, augmentation de l'expression génique et protéique de P21. Il reste à valider ces résultats par duplication des expériences mais ces premiers résultats semblent très encourageants. Il s'agit du premier modèle *in-vitro* du cinquième sous-type de DMG K27-MAPKa. Nous n'avons pas trouvé d'explication pourquoi le clone H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} prolifère dans ces conditions de cultures et pas le clone H3.3K27M *BRAF*^{V600E}, tout comme pourquoi le clone H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} est maintenu lors de l'évolution tumorale et pas le clone H3.3K27M *BRAF*^{V600E}. Il serait intéressant de continuer la caractérisation du modèle afin de vérifier que celui-ci ne présente pas un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) et des foci d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF). En effet, il n'y a pas de signature transcriptomique de SASP et SAHF dans les DMG H3.3K27M *FGFR1*^{MUT}. Nous sommes parvenus à établir un modèle *in-vivo* PDOX de NEM576 qui est en fin de caractérisation. Il manque à valider en IHC la mutation H3K27M et la perte de triméthylation. Il serait aussi intéressant de voir si les caractéristiques histologiques comme le statut de calcification et le type d'infiltration de la tumeur primaire sont retrouvées dans la tumeur du modèle murin dérivé. En parallèle, nous avons aussi réussi à établir un dernier modèle *in-vitro* H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} (NEM582) mais dérivé du seul DMG H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} appartenant au sous-type H3.3K27M et non au nouveau sous-type MAPK-activé. C'est le seul patient sur 14 DMG H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} classé comme un DMG du sous-type H3.3 d'après le profil de méthylation de l'ADN. Pour rappel, nous avons démontré que la différence de profil de méthylation de l'ADN des DMG du sous-type H3.3 et du nouveau sous-type serait à l'origine d'une identité de la cellule d'origine différente. Cela signifie que la mutation *FGFR1*^{MUT} est apparue dans l'oncogenèse d'un DMG H3.3K27M du sous-type H3.3 et donc dans la cellule d'origine de ces DMG classiques. NEM582 présente une diminution de H3K27me3 et une activation de la voie MAPK ce qui était plutôt attendu en conséquence de la présence des mutations H3.3K27M et *FGFR1*^{N546K}. Cependant, il n'était pas attendu que NEM582 présente un phénotype sénescence : activité β -galactosidase élevée, expression génique et protéique de P21 puisque la tumeur dérivée ne présente aucune surexpression de *CDKN1A* (P21) et *CDKN2A* (P16) et avec un score de signature de sénescence équivalente à un DMG H3.3K27M classique. Nous avons aussi observé une modification de la vitesse de prolifération au cours du temps laissant à penser qu'une sélection clonale a eu lieu comme pour NEM620 (modèle H3.3K27M *BRAF*^{V600E} non représentatif à 100% de la tumeur primaire). En effet, pendant les 50 premiers jours post-mises en culture de la biopsie (passages 1 à 3), le temps moyen de doublement est très long, avec une division en 12,5 jours alors que cela diminue à 3,2 jours entre les passages 4 et 23. Cela n'a pas été observé pour NEM576, dérivé d'un DMG H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} du nouveau sous-type MAPK. Cependant, il est difficile d'imaginer que la sélection clonale ait amplifié un clone H3.3K27M

FGFR1^{MUT} sésescent alors même que dans la tumeur il n'y a pas de sénescence. A ce stade de notre caractérisation, nous pouvons dire que NEM582, modèle *in-vitro* d'un DMG H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* (sous-type H3.3), ne récapitule pas complètement la tumeur primaire vis-à-vis de la sénescence. Le modèle *in-vivo* PDOX NEM582 a réussi à être développé, il présente les deux mutations H3.3K27M *FGFR1^{MUT}*. Il serait intéressant d'étudier aussi le niveau d'expression de *CDKN1A* dans la tumeur murine afin de noter s'il y a une absence d'expression comme dans la tumeur du patient ou alors si *CDKN1A* est très exprimé comme dans le modèle *in-vitro*.

Toujours dans le but de comprendre le /les mécanisme(s) à l'origine de l'évolution tumorale plutôt favorable de ces DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT} /FGFR1^{MUT}* en comparaison aux DMG K27, notre seconde stratégie, plus fonctionnelle, a été de moduler (inhibition /expression) les altérations oncogéniques *BRAF* ou *FGFR1* au sein de modèles *in-vitro* de DMG. Au travers de ces expériences, nous souhaitons étayer notre hypothèse sur la sénescence comme mécanisme à l'origine de la plus lente évolution tumorale.

Une des deux stratégies a été d'exprimer *BRAFV600E* ou *FGFR1N546K* dans des modèles de DMG H3.3K27M. Nous avons à notre disposition à la fois des modèles de DMG H3.3K27M du sous-type H3.3 *TP53^{WT}* (NEM445 et 283) ou *TP53^{MUT}* (NEM290) et deux modèles de DMG H3.3K27M *BRAF^{WT}* (NEM394 et 569 - clone ancestral sans mutation de *BRAF*) du nouveau sous-type MAPK-activé. Ce design expérimental nous a permis d'évaluer à la fois l'impact de l'expression de *BRAF^{V600E}* et *FGFR1^{N546K}* mais aussi le rôle de P53 dans le phénotype et pour terminer le rôle de la cellule d'origine du sous-type : MAPKa *versus* H3.3. Par soucis de temps, je n'ai malheureusement pas pu réaliser une caractérisation complète de l'expression de *BRAF^{V600E}* ou *FGFR1^{N546K}* dans tous les différents modèles et de dupliquer *a minima* ces expériences pour validation. Il serait ensuite nécessaire d'étendre sur un nouveau modèle H3.3K27M *TP53^{MUT}* (sous-type H3.3K27M) et le second modèle de DMG H3.3K27M *BRAF^{WT}* – nouveau sous-type NEM569. En effet, j'ai pris du temps à (i) réaliser les différents clonages pour former les trois plasmides : pHAGE_EGFP, pHAGE_*BRAFV600E*_EGFP et pHAGE_*FGFR1N546K* et (ii) optimiser le protocole de la production virale de ses plasmides lentiviraux. Basé sur nos données préliminaires, nous avons fait l'hypothèse que l'OIS serait à l'origine de la plus lente évolution tumorale manifestée par une plus longue survie observée chez les patients atteints de DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT} /FGFR1^{MUT}* par rapport à ceux *BRAF^{WT} /FGFR1^{WT}*. En conséquence, nous nous attendions à observer une diminution de la prolifération associée à un phénotype de sénescence en réponse à l'expression de *BRAFV600E* ou *FGFR1N546K* dans les modèles de DMG H3.3K27M (sous-type H3.3). Comme attendu, nous avons en effet observé une diminution de la prolifération en réponse à l'expression de *BRAFV600E* et *FGFR1N546K* dans les modèles de DMG H3.3K27M et ce indépendamment du statut *TP53*. Ce phénotype, aussi indépendant du statut

TP53, est accompagné d'un phénotype de sénescence : aplatissement et vacuolisation des cellules, augmentation de l'activité β -gal et surexpression du marqueur de sénescence p21 au niveau génique et protéique. Nous avons ensuite décidé d'étudier le niveau d'expression de p16 au niveau génique (RT-qPCR) et protéique (western blot) au sein des différents modèles et spécifiquement dans la condition d'expression de BRAFV600E. En effet, les DMG H3.3K27M BRAFV600E montrent une surexpression de *CDKN2A* (P16), mais pas les DMG H3.3K27M *FGFR1^{MUT}*, par rapport aux DMG H3.3K27M *BRAF^{WT}/FGFR1^{WT}*. L'expression de BRAFV600E ou FGFR1N546K induit de l'OIS dans les modèles de DMG H3.3K27M – sous-type H3.3. Cette expérience souligne une possible nouvelle vulnérabilité chez les DMG H3.3K27M et fait écho aux travaux de Matheus Henrique Dias et René Bernards. Ces deux chercheurs proposent un concept de thérapie antitumorale innovante basée sur l'activation supplémentaire d'une voie de signalisation oncogénique déjà activée afin de rompre l'homéostasie des cellules tumorales et augmenter leur sensibilité à une drogue en combinaison (Dias and Bernards, 2021). Les auteurs ont appelé ce type d'action thérapeutique « intervention paradoxale ». En effet, plusieurs études expérimentales soutiennent ce concept notamment dans les tumeurs avec une altération activatrice d'un membre de la voie MAPK (Unni *et al.*, 2015; Nieto *et al.*, 2017). Par exemple, Nieto *et al.* ont montré que l'ablation de l'allèle *BRAF* sauvage dans un modèle *in-vivo* d'adénocarcinome du poumon avec une mutation activatrice de KRAS et une mutation inactivatrice de *BRAF* (D631A - domaine kinase inactif) conduit à un développement tumoral limité suggérant une toxicité cellulaire causée par un niveau trop élevé de la voie MAPK (Nieto *et al.*, 2017). En résumé, la suractivation de la voie MAPK dans les DMG H3.3K27M pourraient être une opportunité thérapeutique. Il serait intéressant de voir si les DMG H3.1K27M présentent aussi cette vulnérabilité par l'expression de BRAFV600E ou FGFR1N546K dans un modèle de DMG H3.1K27M. Le point critique est de suractiver la voie MAPK uniquement dans les cellules tumorales car une suractivation modérée dans des cellules normales peut se révéler protumorale comme l'a aussi démontré Nieto *et al.* Le développement d'une technologie comme celle-ci pourrait être applicable, non pas seulement aux DMG, mais à un large panel de cancers qui présentent déjà une suractivation de la voie MAPK.

Nous avons aussi observé que l'expression de BRAFV600E ou FGFR1N546K dans NEM394, clone ancestral H3.3K27M *BRAF^{WT}* induit aussi une diminution significative de la prolifération mais plus forte avec BRAFV600E. Ceci diffère par rapport à l'expression BRAFV600E ou FGFR1N546K dans les modèles de DMG K27 où la diminution de la prolifération est plus importante dans la condition d'expression FGFR1N546K *versus* BRAFV600E (n=2). La diminution de la prolifération est accompagnée d'une augmentation significative de l'activité β -gal en réponse à l'expression de BRAFV600E ou FGFR1N546K dans le clone ancestral H3.3K27M (NEM394). La différence de pourcentage de cellules positives à

l'activité β -gal est significative mais pas très importante, (i) parce que NEM394 arborait déjà de la sénescence dont une activité β -gal assez élevée et (ii) il semble que les cellules exprimant BRAFV600E ou FGFR1N546K s'arrondissent et se décollent de la matrice de laminine de la flasque. Pour interpréter la signification biologique de ce résultat dans l'oncogenèse des DMG K27-MAPKa, il est nécessaire de recontextualiser l'expérience. Le clone ancestral H3.3K27M *BRAF^{WT}* (NEM394 ou NEM569) est sélectionné au détriment du clone H3.3K27M BRAFV600E lors de l'établissement du modèle *in-vitro* de gliome H3.3K27M BRAFV600E. Nous faisons l'hypothèse que les conditions de cultures ne sont pas adaptées pour la maintenance et prolifération du clone H3.3K27M BRAFV600E. Ainsi il serait logique d'observer une disparition à nouveau des NEM394 transduites pour exprimer BRAFV600E dans ces mêmes conditions de culture. Cette hypothèse semble se valider d'après notre première expérience d'expression de BRAFV600E dans NEM394. Il y a une fine séparation entre les DMG K27-MAPKa *BRAF^{MUT}* versus *FGFR1^{MUT}* selon le profil de méthylation de l'ADN qui pourrait être le résultat de la différence de la nature du membre de la voie MAPK muté ou d'une subtile différence d'identité de la cellule d'origine. En conséquence, il serait intéressant d'étudier le profil de méthylation de l'ADN de NEM394, clone H3.3K27M *BRAF^{WT}* (dérivé d'un gliome H3.3K27M BRAFV600E) transduit pour exprimer FGFR1N546K afin de mieux comprendre la fine séparation entre les DMG K27-MAPKa *BRAF^{MUT}* versus *FGFR1^{MUT}* selon le profil de méthylation de l'ADN.

La seconde stratégie a été d'inhiber pharmacologiquement BRAFV600E au Vemurafenib dans le modèle H3.3K27M BRAFV600E (NEM620). La lignée n'est pas sensible à la drogue ce qui souligne que NEM620 ne présente pas d'addiction oncogénique à BRAFV600E. Ce résultat est à prendre avec précaution car nous avons montré que NEM620 n'est pas complètement récapitulatif de la tumeur primaire vis-à-vis de la sénescence. Nous avons aussi inhibé la signalisation FGFR dans les deux modèles de DMG H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* dont le modèle NEM576 (nouveau sous-type de DMG) et le modèle NEM582 (sous-type H3.3). Nous avons tout de même décidé de réaliser cette expérience sur NEM582 car même si le modèle ne récapitule pas complètement la tumeur dérivée par rapport au phénotype de sénescence, cela reste un modèle exprimant *FGFR1^{MUT}* avec une activation de la voie MAPK et nous sommes plutôt limités en termes de nombre de modèles pour le moment. Nous avons testé deux inhibiteurs de FGFR différents : (i) l'erdafitinib, pan-inhibiteur de FGFR c'est-à-dire qui inhibe l'ensemble des récepteurs aux FGF (FGFR1-4), il n'est donc pas spécifique de FGFR1 et (ii) le Futibatiniib, pan-inhibiteur de FGFR aussi mais irréversible. Comme attendu, nous avons observé une très faible sensibilité à la drogue pour NEM292 dont le statut *FGFR1* est sauvage. Avant de commencer le projet et d'avoir les résultats préliminaires, nous nous attendions à observer une augmentation de l'agressivité du phénotype (i.e. augmentation de la prolifération et diminution de la sénescence) des DMG K27-MAPKa en réponse à

l'inhibition du programme oncogénique d'OIS induit par BRAFV600E ou FGFR1N546K. Cependant, l'évolution tumorale des DMG H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* sans disparition du clone H3.3K27M *FGFR1^{MUT}*, différente des DMG BRAFV600E, souligne plutôt une dépendance à la signalisation FGFR. Les deux modèles de DMG H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* (NEM576, 582) semblent plus sensibles à l'Erdafitinib ce qui pourrait souligner une addiction de la signalisation de FGFR pour les deux modèles. De plus, le modèle de DMG H3.3K27M *FGFR1^{MUT}*(NEM576), dérivé d'un gliome du sous-type de DMG MAPKa, est plus sensible à l'Erdafitinib avec une IC50 de 371 nM *versus* 909 nM pour NEM582, modèle de DMG H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* dérivé d'un gliome du sous-type de DMG H3.3. Il est nécessaire de réitérer les tests pour affiner les IC50. Cela pourrait souligner une addiction oncogénique plus importante de la signalisation FGFR dans les DMG du sous-type MAPKa *versus* H3.3 ($n=1$). Cette observation est aussi confirmée avec le second inhibiteur de FGFR, le Futibatiniib, mais la réponse est 10 fois plus faible. Il est possible de confirmer l'addiction oncogénique pour *FGFR1^{N546K}* dans les modèles de DMG K27-MAPKa plus spécifiquement, avec une élimination de l'allèle muté *FGFR1^{N546K}* par CRISPR/Cas9. Il serait intéressant de trouver et tester d'autres inhibiteurs de FGFR. Le E7090 a présenté une IC50 de 41,85 nM avec la méthode MANO pour le variant *FGFR1^{N546K}* contre 78,51 nM pour le Futibatiniib (Nakamura *et al.*, 2021). Le E7090 pourrait être aussi testé.

Nous avons démontré que les DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT}/FGFR1^{MUT}* présentent une signature transcriptomique de sénescence (OIS) possiblement induite par l'apparition des mutations activatrices de *BRAF* et *FGFR1*. Il existe des drogues qui ciblent spécifiquement les cellules sénescents par induction de l'apoptose, appelée sénolytiques. Nous faisons l'hypothèse que les sénolytiques pourraient être une opportunité thérapeutique dans le traitement des DMG K27-alterés avec une mutation de *FGFR1* mais pas de *BRAF*. En effet, nous avons observé que l'évolution tumorale des DMG H3.3K27M *BRAF^{MUT}* ou *FGFR1^{MUT}* pouvait différer. Pour les DMG BRAFV600E, la perte du clone H3.3K27M BRAFV600E sénescents semble être une étape importante dans l'évolution de ces gliomes. Ainsi, utiliser des sénolytiques et cibler spécifiquement les cellules sénescents, le clone H3.3K27M *BRAF^{V600E}*, pourrait peut-être se révéler accélérateur /délétère pour le patient car cela pourrait amener à l'amplification du clone ancestral H3.3K27M comme observé lors de deux rechutes tumorales. En revanche pour les DMG H3.3K27M *FGFR1^{MUT}*, le clone H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* est toujours maintenu lors de la progression tumorale. Nous nous sommes naturellement tournés vers l'Obatoclax, mimétique de BH3, qui a été proposé dans une combinaison thérapeutique pour les DMG par Balakrishnan *et al.* 2020. Balakrishnan *et al.* ont souligné une synergie thérapeutique *in-vitro* et *in-vivo* de l'association (i) d'un inhibiteur de BMI1 pour induire la sénescence spécifiquement dans les cellules de DMG H3.3K27M dépendantes de l'activité de BMI1 (ii) à l'Obatoclax pour induire l'apoptose spécifiquement dans ces cellules sénescents (Balakrishnan *et al.*,

2020). Nous supposons que nous n'avons pas besoin de la combinaison thérapeutique et plus particulièrement de l'inhibiteur de BMI1 car (i) les DMG K27-MAPKa sont déjà sénescents et (ii) ils présentent déjà une signature transcriptomique de répression de BMI1 (BMI1_DN.V1_UP). Nous avons donc traité à l'Obatoclast trois modèles de DMG : 1 modèle de DMG H3.3K27M (sous-type H3.3) non sénescents (contrôle négatif) et 2 modèles de DMG H3.3K27M *FGFR1^{MUT}* sénescents. A notre grande surprise, nous avons observé une absence de spécificité de la drogue selon l'importance des cellules sénescents dans les cultures. Nous n'avons pas testé sur des contrôles positifs (sénescents) autres que dans les DMG. Les IC50 sont très faibles de l'ordre du nanomolaire et équivalentes entre le modèle de DMG non-sénescents (*BRAF /FGFR1^{WT} TP53^{MUT}*) et les deux autres modèles sénescents. Il est possible de traiter à l'Obatoclast NEM290, modèle de DMG H3.3K27M *BRAF /FGFR1^{WT} TP53^{MUT}*, négatif pour l'activité β -galactosidase et faible /absence d'expression de p21, comme seconde validation. Nous avons regardé plus attentivement la publication : il n'y avait pas d'IC50 mentionnées sur leurs différents modèles sénescents et non-sénescents et la combinaison des drogues qu'ils ont indiqué comme synergique est la conséquence d'une augmentation de quelques pourcents de cellules apoptotiques par rapport à la condition seule de l'Obatoclast (pas de sénescence dans les modèles de DMG du fait de l'absence de l'inhibiteur de BMI1).

En 2022, *Madhavan et ses collègues* ont montré que la combinaison du Venetoclast (ABT-199 dérivé du Navitoclast) et de la radiothérapie ralentie la croissance des DMG H3K27M *in-vitro* et *in-vivo* (*Madhavan et al., 2022*). En parallèle, *Selt et al.* ont démontré que les mimétiques BH3 ciblant les BCL-XL dont le Navitoclast (ABT-263) est efficace *in-vitro* dans des modèles de d'Astrocystomes Pilocytiques avec OIS (*Selt et al., 2023*). Ils ont identifié une signature transcriptomique de résistance au Navitoclast. Nous avons réalisé un GSEA et les DMG H3.3K27M *BRAF^{V600E}* ou *FGFR1^{MUT}* ne présentent pas cette signature. Il est donc possible que les DMG H3.3K27M *BRAF^{V600E}* ou *FGFR1^{MUT}* soient sensibles au Navitoclast ou Venetoclast (avec ou sans radiothérapie). Il existe d'autres types de sénolytiques comme les inhibiteurs autophagiques. L'autophagie est un mécanisme lysosomal de dégradation des composants cytoplasmiques dont l'activité est augmentée en réponse à un stress et à la sénescence (*Rajendran et al., 2019; González-Gualda et al., 2021*). En 2014, *Levy et ses collègues* ont démontré que l'inhibition génétique ou pharmacologique de l'autophagie (chloroquine) associée à une inhibition de BRAFV600E (vemurafenib) avait un effet synergique de mort cellulaire dans des modèles *in-vitro* d'astrocytomes BRAFV600E (*Levy et al., 2014*). Nous avons observé une signature transcriptomique d'activité lysosomale (KEGG_LYSOSOME) dans les DMG H3.3K27M *BRAF^{V600E}* mais pas dans les DMG H3.3K27M *FGFR1^{MUT}*. Ce type de thérapie ne pourrait pas être utilisé dans les DMG H3.3K27M *BRAF^{V600E}* pour les mêmes raisons que pour les sénolytiques et l'inhibition de BRAFV600E en monothérapie. En effet, cela pourrait être

délétère avec une précipitation de la disparition du clone H3.3K27M *BRAF*^{V600E} au profit du clone ancestral H3.3K27M.

Très récemment en avril 2023, McNicholas et ses collègues ont publié leurs travaux sur l'impact de la combinaison d'altérations géniques dans l'oncogenèse des HGGs *in-vivo* (McNicholas *et al.*, 2023). En effet, ils ont électroporé *in-utero* spécifiquement les niches de cellules souches neurales d'embryons de souris femelles immunocompétentes dans le but d'exprimer différentes combinaisons mutationnelles. Une des conditions nous a particulièrement intéressé : H3.3K27M_FGFR1N546K_NF1-perte. Premièrement, ils ont montré que la pénétrance avec H3.3K27M_FGFR1N546K_NF1-perte est de 100%, ce qui confirme la capacité de transformation des cellules par des mutations de *FGFR1* /*NF1*. Deuxièmement, ils ont montré que la survie des souris portant des tumeurs H3.3K27M_FGFR1N546K_NF1-perte avec une médiane de survie de 28 jours était plus ou moins équivalente à la survie des souris portant la combinaison génique H3.3K27M_*TP53*^{MUT}_PDGFRA-altéré. Cela signifie que les souris H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} *NF1*^{MUT} ont une survie équivalente aux souris H3.3K27M *TP53*^{MUT} PDGFRA-altérés or ce n'est pas ce que l'on observe chez les patients atteints de DMG K27-MAPKa *FGFR1*^{MUT} versus H3.3K27M *FGFR1*^{WT} à l'exception d'un patient diagnostiqué avec un gliome H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} appartenant au sous-type H3.3 d'après la classification selon le profil de méthylation de l'ADN. En effet, ce patient possède la survie la plus courte (7 mois) parmi ceux *FGFR1*^{MUT} mais fait aussi partie des survies les plus courtes des patients avec DMG H3.3K27M (sous-type H3.3) dont la médiane de survie est de 11 mois. La survie de ce seul patient est en corrélation avec les résultats de McNicholas *et al.* 2023. Ce patient diffère des autres patients avec gliomes *FGFR1*^{MUT} par la cellule d'origine et l'absence de sénescence malgré la présence de *FGFR1*^{MUT} dans la tumeur. En effet, la tumeur H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} (sous-type H3.3) du patient ne présente pas de phénotype sénescence à l'opposé des DMG K27-MAPKa *FGFR1*^{MUT} ce qui pourrait en partie expliquer cette courte survie car la sénescence ne serait pas présente pour moduler la progression tumorale. Nous avons, en effet, confirmé *in-vitro* que l'expression de FGFR1N546K dans les modèles de DMG H3.3K27M induisait l'OIS mais cela n'explique pas pourquoi la tumeur H3.3K27M *FGFR1*^{MUT} (sous-type H3.3) ne présente pas de sénescence. Nous avons monitoré l'expression de FGFR1N546K dans un DMG H3.3K27M sur une période restreinte (environ 150 heures). Nous ne savons pas l'impact de l'expression de FGFR1N546K sur le long terme, un mécanisme comme la répression de p21 ou autres pourraient être à l'origine d'un échappement à la sénescence et donc d'une augmentation de l'agressivité tumorale. Un tel mécanisme n'est pas observé lors de la progression tumorale des DMG K27-MAPKa *FGFR1*^{MUT} et nous avons souligné que ces DMG semblent présenter une addiction oncogénique à la signalisation FGFR plus élevée. Ceci justifierait plutôt l'inhibition de FGFR1 comme approche thérapeutique dans les DMG K27-MAPKa *FGFR1*^{MUT}. La différence

de cellule d'origine entre les DMG sous-type MAPKa *versus* H3.3 pourrait être responsable de l'évolution avec ou sans échappement à la sénescence et donc de l'agressivité tumorale. L'impact de l'expression de mutations peut être très contexte /cellule-dépendant. Par exemple, BRAFV600E est plutôt associé à des mélanomes malins alors que dans un autre contexte cellulaire, BRAFV600E est plutôt associée à des gliomes de bas grades. Les tumeurs des souris H3.3K27M *FGFR1^{MUT} NF1^{MUT}* de McNicholas *et al.* 2023 présentent un enrichissement en OPC-like avec une surexpression de *FOXP2*, *SOX2* et *SOX10* basée sur des RNA-seq sur cellules uniques. Aucun de ces mêmes gènes n'est retrouvé surexprimé dans les DMG H3.3K27-MAPKa *versus* DMG H3.3K27M (sous-type H3.3) en RNA-seq total. Il serait intéressant de réaliser un RNAseq sur cellules uniques pour vérifier le niveau d'expression de ces mêmes gènes dans les différents clones.

Pour conclure, les découvertes du projet ont mené à :

- 1) L'identification d'un cinquième et nouveau sous-type de DMG avec des altérations activatrices de la voie MAPK (i.e. BRAFV600E et *FGFR1^{MUT}*), appelé DMG K27-MAPKa. Les patients atteints de ces DMG présentent un meilleur pronostic (médiane de survie supérieure à trois ans) et cela est à prendre en compte pour la stratification des patients dans les essais cliniques. Pour terminer, ces DMG comprennent un profil radiologique et histologique spécifique qui pourrait permettre un diagnostic plus rapide.
- 2) Une hypothèse à l'origine de la plus longue survie observée chez les patients atteints de DMG K27-MAPKa par rapport aux autres sous-type de DMG : la combinaison de la cellule d'origine et l'OIS
- 3) Le développement des premiers modèles *in-vitro* et *in-vivo* de DMG K27-MAPKa. Plus particulièrement, un modèle *in-vitro* de DMG H3.3K27M *FGFR1N546K* et trois modèles *in-vivo* PDOX dont deux de DMG H3.3K27M BRAFV600E et un de DMG H3.3K27M *FGFR1N546K*. Le développement de modèles pré-cliniques est une opportunité unique pour de la recherche fondamentale et l'évaluation de drogues
- 4) Le décèlement de nouvelles opportunités thérapeutiques pour les DMG K27-MAPKa *FGFR1^{MUT}* : l'inhibition de FGFR et les sénolytiques
- 5) La découverte d'une possible nouvelle vulnérabilité dans les DMG du sous-type H3.3 de mauvais pronostic : suractivation de la voie MAPK.

Et il reste à :

- 1) Éclaircir les parts de la cellule d'origine et des mutations de *BRAF* et *FGFR1* dans l'oncogenèse des DMG K27-MAPKa

- 2) Élucider le(s) mécanisme(s) à l'origine de l'évolution tumorale différente entre les DMG $BRAF^{MUT}$ et $FGFR1^{MUT}$ au sein des DMG K27-MAPKa
- 3) Développer un nouveau protocole pour l'établissement de modèles *in-vitro* de DMG K27-MAPKa BRAFV600E qui récapitulent l'ensemble des caractéristiques des tumeurs dérivées
- 4) Déterminer si d'autres DMG avec des altérations de la voie MAPK différentes de $BRAF^{MUT}$ et $FGFR1^{MUT}$ (i.e. *NF1*) appartiennent aux DMG K27-MAPKa
- 5) Valider les pistes thérapeutiques sur les modèles *in-vitro* et *in-vivo*.

MATERIEL & METHODES

Culture de cellules

À partir des biopsies stéréotaxiques de DMG H3K27M reçues au laboratoire, les cellules souches de gliome humain (GSC) sont dérivées et cultivées comme précédemment publiées (*Evangelista et al. 2019*). La culture en hypoxie a été réalisée dans une hotte à hypoxie avec 5% d'oxygène. Les HEK293T (utilisées pour la production de lentivirus) et les SK-MEL-28 (mélanome BRAFV600E) ont été cultivées différemment, en milieu DMEM (Gibco) additionné de 10% de sérum bovin fœtal et 1% de Pénicilline/Streptomycine (Life technologies). Les cellules sont incubées à 37°C et 5% de CO₂.

Clonage de plasmides

Le plasmide pHAGE-IDH1R132C_EGFP provient de chez Addgène (addgene #166410). Le plasmide de transduction contrôle pHAGE_EGFP (GFP) a été cloné à partir de pHAGE-IDH1R132C_EGFP avec l'élimination de la séquence d'ADN codant pour IDH1R132C (ADNc). Plus précisément, pHAGE_IDH1R132C a été linéarisé aux niveaux des sites de restrictions SpeI et NotI (New England Biolabs) pour l'élimination du promoteur EF1 α et de la séquence codante pour IDH1R132C. Il n'y avait pas de sites de restriction entre le promoteur et la séquence codante pour IDH1R132C d'où l'élimination du promoteur. La séquence d'ADN de EF1 α a été amplifiée par PCR à l'aide d'une polymérase avec haute-fidélité (Q5 high fidelity, New England Biolabs) associé à l'ajout des sites de restrictions SpeI et NotI. Pour terminer, le backbone linéarisé pHAGE_IDH1R132C a été ligué à l'insert aux niveaux des sites SpeI et NotI avec le kit Quick Ligation™ (New England Biolabs) selon les recommandations du fournisseur. Au préalable, une étape de déphosphorylation du squelette pHAGE_EGFP linéarisé avait été réalisé avec le kit QUICK CIP (New England Biolabs) selon les recommandations du fournisseur. Pour le deuxième plasmide pHAGE-BRAFV600E-EGFP (BRAFV600E), la séquence d'ADNc de BRAFV600E amplifiée à partir de pHIV-BRAFV600E-mOrange2 (addgene #110732) a été clonée dans le vecteur lentiviral pHAGE-EGFP aux niveaux des sites de restrictions XbaI et NotI (New England Biolabs). Pour le dernier plasmide pHAGE-FGFR1N546K-EGFP (FGFR1N546K), la séquence d'ADNc FGFR1N546K amplifiée à partir de l'ADNc tumoral d'un patient avec DMG FGFR1N546K (transcrit NM_015850.4) et les sites de restrictions XbaI et NotI ont été ajoutés. L'insert d'ADNc FGFR1N546K linéarisé a été cloné dans le squelette lentiviral pHAGE_EGFP, au préalable, aussi linéarisé XbaI et NotI. Tous les inserts clonés d'ADNc des différents plasmides ont été vérifiés par séquençage sanger (Eurofins).

Amorces	Sens	Antisens
pHAGE-EGFP	5'-TTGGACTAGTCGTGAGGCTCCGGTGC-3'	5'- GGAAGCGGCCGCGATATCTGCAGGGCCGCTTCACGACACCT G-3'
pHAGE-BRAFV600E-EGFP	5'- GGAAGCGGCCGCCCATGGCGGCGGCTAGGATCCG CCCCTC-3'	5'-TATATCTAGATTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'
pHAGE-FGFR1N546K-EGFP	5'-TTGGGCGGCCGCTGTACCAACCTCT-3'	5'-GGATTCTAGAGCGTGTGGGTGGCAGT-3'

Production et transduction de lentivirus

Les particules virales ont été produites par transfection HEK293T (jetPRIME Polyplus) de plasmides d'emballage de deuxième génération (psPax2 - addgene #12260 et pMD2.g - addgene #12259). Un traitement au Rock Inhibiteur à 10 μ M a été réalisé 4h post-transfection pendant 14h, jusqu'au moment de la récolte lentivirale pour la production des virus pHAGE-BRAFV600E et pHAGE-FGFR1N546K. Les titres viraux ont été évalués sur la base de la fluorescence par cytomètre en flux (CytoFLEX). Pour toutes les expériences et différents virus pHAGE-GFP, pHAGE-BRAFV600E et pHAGE-FGFR1N546K, les GSC ont été transduites à la multiplicité d'infection (MOI) 1 ou 3.

Test de prolifération sur court et long terme

Pour les tests de prolifération sur court terme, les GSC ont étéensemencées à une densité de 10 000 cellules/cm² et transduites 24 heures après l'ensemencement (n = 5 à 6 répétitions par condition). Le test de prolifération a commencé entre 24h et 7 jours après la transduction en fonction de la sensibilité des modèles GSC à la transduction. La croissance cellulaire a été suivie par vidéomicroscopie optique en temps réel (Incucyte S3, Sartorius) jusqu'à la confluence des cellules non transduites. L'analyse de prolifération est basée sur le pourcentage de confluence en fonction du temps normalisé par le pourcentage de confluence de la première acquisition, déterminé par le logiciel du vidéomicroscope. La croissance de plusieurs lignées de GSC a été suivie sur le long terme selon la procédure suivante. Les cellules sontensemencées à 10 ou 12 000 cellules/cm² et sont passées d'une flasque à l'autre à 80% de confluence. A chaque passage les cellules sont comptées afin de suivre le nombre de divisions cellulaires au cours du temps.

Extraction de protéines et western blot

Les protéines totales ont été extraites dans un tampon RIPA 1X (Cell signaling Technology) additionné d'inhibiteurs de protéases (Roche) et de phosphatases (Roche), PMSF 1 mM, orthovanadate et naf 1mM. Plus précisément, les cellules ont été remises en suspension dans le tampon RIPA 1X supplémenté, lysées

sur glace pendant 20 minutes et vortexées toutes les 5 minutes. Ensuite, les cellules du lysat ont été centrifugées à 11 000g (force centrifuge relative) pendant 30 minutes à 4°C pour recueillir les surnageants protéiques. Les protéines histones ont été extraites avec le kit d'extraction d'histones (Abcam) selon le protocole fourni par le fournisseur. Trois fois une minute de sonication ont été réalisés pendant l'étape de lyse sur glace afin d'augmenter l'efficacité de l'extraction. Le kit d'analyse de protéines Pierce™ BCA (ThermoFischer Scientific) a été utilisé pour quantifier les protéines par spectrophotométrie. Les protéines ont été séparées sur un gel de polyacrylamide 4% à 20% (Biorad) et transférées sur membrane PVDF (Biorad) avec un système Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). Les membranes ont été, d'abord saturées avec solution de blocage avec 5% de sérum de veau foetal, ensuite incubées pendant une nuit à 4°C avec un anticorps primaire puis incubées ou non avec un anticorps secondaire lié à la peroxydase de raifort pendant 1 heure à 20°C (Anti-rabbit IgG #7074 Cell Signaling Technology) sous agitation à 20 tours par minutes. Enfin, les protéines ont été révélées par un kit de chimiluminescence (Biorad) avec le système d'imagerie ChemiDoc (Biorad).

Anticorps	Fournisseur	Type anticorps
Phospho-ERK	9101 - Cell Signaling Technology	Primaire
ERK	9102 - Cell Signaling Technology	Primaire
p21	2947 - Cell Signaling Technology	Primaire
β-actine	51255 - Cell Signaling Technology	Couplé
Anti-lapin	7074 - Cell Signaling Technology	Secondaire

Test de sénescence β-galactosidase

Les GSC ont été ensemencées à une densité de 10 000 à 20 000 cellules/cm² en duplicat par condition. 24h après, le test de sénescence β-galactosidase (Cell Signaling Technology) a été réalisé selon le protocole du fournisseur.

RT-qPCR

500 ng d'ARN ont été reverse transcrits (RT) en ADNc en utilisant la reverse transcriptase (RevertAid, Thermo- Scientific) dans un mix contenant : Readymade™ Random Hexamere (50ng/μL, IDT, #51-01-18-01), Anchored Oligo-dT (50ng/μL, IDT, #51-01-15-08) et dNTP (3,3 mM, Sigma aldrich, #04738420001). La PCR quantitative (qPCR) a été réalisée en triplicat par condition dans un mix de Power SybrGreen (Thermo-Scientific) sur un thermocycleur Step-One Plus (Applied Biosystems) avec les amorces décrites ci-dessous. Le niveau d'expression de *CDKN1A* a été normalisé par l'expression du gène de ménage *TBP* et évalué à partir de la méthode des $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Amorces	Sens	Antisens
<i>CDKN1A</i>	5'- GGCAGACCAGCATGACCAGATTC-3'	5'-GATGTAGAGCGGGCGTTTGAG- 3'
<i>TBP</i>	5'-CACGAACCACGGCACTGATT-3'	5'-TTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC-3'

PCR & séquençage

La concentration totale d'ADN a été déterminée par spectrophotométrie à l'aide d'un Nanodrop (Thermoscientific). L'amplification des différents locus a été réalisée par PCR (Polymerase Chain Reaction) dans un mix avec 2 Unités FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics), 0,2 mM de dNTPs (Roche Diagnostics), 0,2 uM d'amorces sens et antisens dans un tampon 1X (Roche Diagnostics) à l'aide d'un thermocycleur (Applied Biosystems). Le programme était le suivant : 3 min de dénaturation initiale à 94°C, 35 cycles (30 s de dénaturation à 94°C ; 30 s d'hybridation à 56°C et 1 min d'extension à 72°C) et enfin 3 min d'extension finale à 72°C. Ensuite, les amplicons d'ADN ont été envoyés à la plateforme de séquençage (Eurofins) pour un séquençage Sanger en utilisant les amorces sens. Les résultats de séquençage ont été analysés par le logiciel SnapGene. Dans le cas du génotypage des allèles *BRAF* ou *FGFR1* exprimés, une reverse transcription a été réalisée au préalable comme décrit dans la section RT-qPCR.

Amorces	Sens	Antisens
<i>H3F3A</i>	5'-TCAATGCTGGTAGGTAAGTAAGGA-3'	5'-GGTTTCTTCACCCCTCCAGT-3'
<i>BRAF</i>	5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3'	TCCACAAAATGGATCCAGAC
<i>FGFR1</i>	5'-GACACATACCCCACTCCCTT-3'	5'-CAGCCTGAGCGCTCTTAGA-3'
BRAF_ADNc	5'AGACGGGACTCGAGTGATGA-3'	GACTTCTGGTGCCATCCACA
FGFR1_ADNc	5'-GGACAGACTGGTCTTAGGCAA-3'	5'-GGTGTATGCACTTCTTGGAGG-3'

Tests de drogues

Les cellules sontensemencées à 10 000 cellules /cm² en triplicat ou quintuplicat par condition selon les expériences. Puis 24h post-ensemencement, la confluence est évaluée par vidéomicroscopie en temps réel avec l'Incucyte S3 (Sartorius) formant la référence (point #0). Les cellules sont ensuite traitées avec une drogue selon une gamme comprise entre 0,0001 et 45 micromolaires, variable selon la drogue. Le pourcentage de DMSO a été normalisé dans l'ensemble des conditions en fonction de la plus grande concentration en drogue de la gamme. Le traitement est réalisé par un robot distributeur de drogue (Tecan D300e). Pendant 6 /11 jours, la confluence est monitorée par vidéomicroscopie en temps réel

avec l'Incucyte S3 (Sartorius). Les IC50 sont calculées à partir des ratios des concentrations logarithmiques de la drogue sur les aires sous les courbes obtenues. Pour seulement le test du Vemurafenib sur SK-MEL-28, l'évaluation de l'IC50 a été réalisée en point final, 72h post-traitement, avec un test de viabilité cellulaire (Promega). Le test a été réalisé selon les instructions du fournisseur. Les résultats ont été normalisés selon la prolifération des cellules non traitées dans des conditions de culture en milieu DMSO. Ensuite, la prolifération de la lignée cellulaire a été rapportée à la concentration de drogue dans un graphique. Les concentrations ont été transformées en LOG(10) et enfin, il y a eu une interpolarisation sigmoïdale de la courbe standard pour obtenir l'IC50. Tous les résultats ont été analysés par Prism 9.

Drogues	Fournisseur
Obatoclax (GX15-070)	S6709 - Selleckchem
Erdafitinib (JNJ-42756493)	S8401 - Selleckchem
Futibatinib (TAS-120)	S8848 - Selleckchem
Vemurafenib	PLX4032 - Selleckchem

Développement de modèles *in-vivo*

Les modèles PDOX ont été développés comme décrit dans *Plessier et al. 2017*.

Autres

Pour le matériel et méthodes des autres points, il faut se référencer au matériel et méthodes de l'article qui est en cours d'écriture pour soumission *Auffret et al. 2023* : extraction et séquençage d'ADN/ARN, PCR digitale en gouttelettes (ddPCR), analyses du méthylome, du transcriptome, GSEA, radiologique, histologique, immunohistochimique, des survies univariées et multivariées.

PRESENTATIONS ORALES /PUBLICATIONS

PRESENTATIONS ORALES

- > **Journée Annuelle de l'École Doctorale 582**

23 novembre 2021, Gustave Roussy, France

Interaction between epigenome and oncogenic mutations in diffuse midline gliomas with H3K27M mutation

Lucie Auffret, Yassine Ajlil, Thomas Kergrohen, Arnault Tauziède-Espariat, Chloé Puisseux, Laurent Riffaud, Alberto Picca, Medhi Touat, Marc Sanson, Kévin Beccaria, Thomas Blauwblomme, Volodia Dangouloff-Ros, Nathalie Boddaert, Pascale Varlet, Marie-Anne Debily, Jacques Grill, David Castel

- > **Association des Jeunes Chercheurs de Gustave Roussy (AJC)**

13 avril 2022, Gustave Roussy, France

Interaction between epigenome and oncogenic mutations in diffuse midline gliomas with H3K27M mutation

Lucie Auffret, Yassine Ajlil, Thomas Kergrohen, Arnault Tauziède-Espariat, Chloé Puisseux, Laurent Riffaud, Alberto Picca, Medhi Touat, Marc Sanson, Kévin Beccaria, Thomas Blauwblomme, Volodia Dangouloff-Ros, Nathalie Boddaert, Pascale Varlet, Marie-Anne Debily, Jacques Grill, David Castel

POSTER

- > **The SNO 7th Biennial Pediatric Neuro-Oncology Research Conference (SNOped 2023)**

22-24 juin 2023, Washington DC, USA

Clinical and molecular characteristic of a new subtype of DMG, H3K27-altered with MAPK-activating co-driver mutations

Lucie Auffret, Yassine Ajlil, Thomas Kergrohen, Arnault Tauziède-Espariat, Chloé Puisseux, Laurent Riffaud, Alberto Picca, Medhi Touat, Marc Sanson, Kévin Beccaria, Thomas Blauwblomme, Volodia Dangouloff-Ros, Nathalie Boddaert, Pascale Varlet, Marie-Anne Debily, Jacques Grill, David Castel

PUBLICATIONS

- > ***A new subtype of DMG, H3K27-altered with MAPK-activating co-driver mutations: clinical and molecular characterization***

Lucie Auffret, Yassine Ajlil, Thomas Kergrohen, Arnault Tauziède-Espariat, Chloé Puisseux, Laurent Riffaud, Alberto Picca, Medhi Touat, Marc Sanson, Kévin Beccaria, Thomas Blauwblomme, Volodia Dangouloff-Ros, Nathalie Boddaert, Pascale Varlet, Marie-Anne Debily, Jacques Grill, David Castel

Acta Neuropathologica (en cours de soumission)

- > ***VRK3 depletion induces cell cycle arrest and metabolic reprogramming of Pontine Diffuse Midline Glioma (DMG)-K27 altered cells***

Virginie Menez, Thomas Kergrohen, Tal Shasha, Claudia Silva-Evangelista, Ludivine Ledret, Lucie Auffret, Chloé Subecz, Manon Lancien, Kévin Beccaria, Thomas Blauwblomme, Estelle Oberlin, Jacques Grill, David Castel & Marie-Anne Debily

BioRxiv

BIBLIOGRAPHIE

Abdullah, K.G. *et al.* (2022) 'Establishment of patient-derived organoid models of lower-grade glioma', *Neuro-Oncology*, 24(4), pp. 612–623. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab273>.

Aboian, M.S. *et al.* (2017) 'Imaging Characteristics of Pediatric Diffuse Midline Gliomas with Histone H3 K27M Mutation', *American Journal of Neuroradiology*, 38(4), pp. 795–800. Available at: <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5076>.

Acosta, J.C. *et al.* (2013) 'A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence', *Nature Cell Biology*, 15(8), pp. 978–990. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb2784>.

Ahmad, K. and Henikoff, S. (2002) 'The Histone Variant H3.3 Marks Active Chromatin by Replication-Independent Nucleosome Assembly', *Molecular Cell*, 9(6), pp. 1191–1200. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00542-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00542-7).

Ajuyah, P. *et al.* (2023) 'OPEN Histone H3-wild type diffuse', *Scientific Reports* [Preprint].

Alcorta, D.A. *et al.* (1996) 'Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), pp. 13742–13747. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13742>.

Anderson, J. (1998) 'Apert syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for FGF ligand', *Human Molecular Genetics*, 7(9), pp. 1475–1483. Available at: <https://doi.org/10.1093/hmg/7.9.1475>.

Angel, A. *et al.* (2011) 'A Polycomb-based switch underlying quantitative epigenetic memory', *Nature*, 476(7358), pp. 105–108. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature10241>.

Ascierto, P.A. *et al.* (2012) 'The role of BRAF V600 mutation in melanoma', *Journal of Translational Medicine*, 10(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-85>.

Ascierto, P.A. *et al.* (2020) 'Update on tolerability and overall survival in COLUMBUS: landmark analysis of a randomised phase 3 trial of encorafenib plus binimetinib vs vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF V600-mutant melanoma', *European Journal of Cancer*, 126, pp. 33–44. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.11.016>.

Azuara, V. *et al.* (2006) 'Chromatin signatures of pluripotent cell lines', *Nature Cell Biology*, 8(5), pp. 532–538. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb1403>.

Babina, I.S. and Turner, N.C. (2017) 'Advances and challenges in targeting FGFR signalling in cancer', *Nature Reviews Cancer*, 17(5), pp. 318–332. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.8>.

Balakrishnan, I. *et al.* (2020) 'Senescence Induced by BMI1 Inhibition Is a Therapeutic Vulnerability in H3K27M-Mutant DIPG', *Cell Reports*, 33(3), p. 108286. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108286>.

Bale, T.A. (2020) 'FGFR- gene family alterations in low-grade neuroepithelial tumors', *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1), p. 21. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00898-6>.

Beccaria, K. *et al.* (2020) 'Ultrasound-induced blood-brain barrier disruption for the treatment of gliomas and other primary CNS tumors', *Cancer Letters*, 479, pp. 13–22. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.02.013>.

Becher, O.J. (2018) 'CDK4/6 and PDGFRA Signaling as Therapeutic Targets in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma', *Frontiers in Oncology*, 8, p. 6.

Bender, S. *et al.* (2013) 'Reduced H3K27me3 and DNA Hypomethylation Are Major Drivers of Gene Expression in K27M Mutant Pediatric High-Grade Gliomas', *Cancer Cell*, 24(5), pp. 660–672. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.10.006>.

Berry, S. and Dean, C. (2015) 'Environmental perception and epigenetic memory: mechanistic insight through *FLC*', *The Plant Journal*, 83(1), pp. 133–148. Available at: <https://doi.org/10.1111/tpj.12869>.

Bielle, F. *et al.* (2018) 'Diffuse gliomas with *FGFR3-TACC3* fusion have characteristic histopathological and molecular features', *Brain Pathology*, 28(5), pp. 674–683. Available at: <https://doi.org/10.1111/bpa.12563>.

Bigenwald, C. *et al.* (2021) 'BRAFV600E-induced senescence drives Langerhans cell histiocytosis pathophysiology', *Nature Medicine*, 27(5), pp. 851–861. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01304-x>.

Blackledge, N.P. *et al.* (2020) 'PRC1 Catalytic Activity Is Central to Polycomb System Function', *Molecular Cell*, 77(4), pp. 857–874.e9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.001>.

Braunstein, S. *et al.* (2017) 'Pediatric high-grade glioma: current molecular landscape and therapeutic approaches', *Journal of Neuro-Oncology*, 134(3), pp. 541–549. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2393-0>.

Brewer, J.R., Mazot, P. and Soriano, P. (2016) 'Genetic insights into the mechanisms of Fgf signaling', *Genes & Development*, 30(7), pp. 751–771. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.277137.115>.

Broekman, M.L. *et al.* (2018) 'Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma', *Nature Reviews Neurology*, 14(8), pp. 482–495. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0025-8>.

Buhl, J.L. *et al.* (2018) 'Mediates Oncogene-induced Senescence in Pediatric Pilocytic Astrocytoma', *Clinical Cancer Research*, p. 17.

Byron, S.A. *et al.* (2013) 'The N550K/H Mutations in FGFR2 Confer Differential Resistance to PD173074, Dovitinib, and Ponatinib ATP-Competitive Inhibitors', *Neoplasia*, 15(8), pp. 975–IN30.

Available at: <https://doi.org/10.1593/neo.121106>.

Capone, S. *et al.* (2022) 'Activity of Pemigatinib in Pilocytic Astrocytoma and *FGFR1*^{N546K} Mutation', *JCO Precision Oncology*, (6), p. e2100371. Available at: <https://doi.org/10.1200/PO.21.00371>.

Capper, D. *et al.* (2018) 'DNA methylation-based classification of central nervous system tumours', *Nature*, 555(7697), pp. 469–474. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature26000>.

Cargnello, M. and Roux, P.P. (2011) 'Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), pp. 50–83. Available at: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>.

de Carné Trécesson, S. *et al.* (2011) 'Escape from p21-mediated Oncogene-induced Senescence Leads to Cell Dedifferentiation and Dependence on Anti-apoptotic Bcl-xL and MCL1 Proteins', *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), pp. 12825–12838. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.186437>.

Carreau, A. *et al.* (2011) 'Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(6), pp. 1239–1253. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x>.

Castel, D. *et al.* (2015) 'Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes', *Acta Neuropathologica*, 130(6), pp. 815–827. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1478-0>.

Castel, D. *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 Neuropathologica Communications*, 6(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0614-1>.

Castel, D. *et al.* (2020) 'Histone H3 wild-type DIPG/DMG overexpressing EZHIP extend the spectrum diffuse midline gliomas with PRC2 inhibition beyond H3-K27M mutation', *Acta Neuropathologica*, 139(6), pp. 1109–1113. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02142-w>.

Castro-Giner, F., Ratcliffe, P. and Tomlinson, I. (2015) 'The mini-driver model of polygenic cancer evolution', *Nature Reviews Cancer*, 15(11), pp. 680–685. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc3999>.

Chalmers, Z.R. *et al.* (2017) 'Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden', *Genome Medicine*, 9(1), p. 34. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0424-2>.

Chan, K.-M. *et al.* (2013) 'The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression', *Genes & Development*, 27(9), pp. 985–990. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.217778.113>.

Chapman, P.B. *et al.* (2011) 'Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E

Mutation', *New England Journal of Medicine*, 364(26), pp. 2507–2516. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782>.

Chen, D. *et al.* (2014) 'BRAFV600E Mutation and Its Association with Clinicopathological Features of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis', *PLoS ONE*. Edited by H. Kim, 9(3), p. e90607. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090607>.

Chen, H. *et al.* (2007) 'A Molecular Brake in the Kinase Hinge Region Regulates the Activity of Receptor Tyrosine Kinases', *Molecular Cell*, 27(5), pp. 717–730. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.028>.

Cho, Y.-W. *et al.* (2007) 'PTIP Associates with MLL3- and MLL4-containing Histone H3 Lysine 4 Methyltransferase Complex', *Journal of Biological Chemistry*, 282(28), pp. 20395–20406. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M701574200>.

Choi, W.H. and Cho, J. (2016) 'Evolving Clinical Cancer Radiotherapy: Concerns Regarding Normal Tissue Protection and Quality Assurance', *Journal of Korean Medical Science*, 31(Suppl 1), pp. S75–S87. Available at: <https://doi.org/10.3346/jkms.2016.31.S1.S75>.

Chung, C. *et al.* (2020) 'Integrated Metabolic and Epigenomic Reprogramming by H3K27M Mutations in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas', *Cancer Cell*, 38(3), pp. 334–349.e9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.07.008>.

Cimmino, F. *et al.* (2022) 'FGFR1 is a potential therapeutic target in neuroblastoma', *Cancer Cell International*, 22(1), p. 174. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02587-x>.

Cohen, K.J., Jabado, N. and Grill, J. (2017) 'Diffuse intrinsic pontine gliomas-current management and new biologic insights. Is there a glimmer of hope?', *Neuro-Oncology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox021>.

Collado, M. *et al.* (2005) 'Senescence in premalignant tumours', *Nature*, 436(7051), pp. 642–642. Available at: <https://doi.org/10.1038/436642a>.

Coppé, J.-P. *et al.* (2011) 'Tumor Suppressor and Aging Biomarker p16INK4a Induces Cellular Senescence without the Associated Inflammatory Secretory Phenotype', *Journal of Biological Chemistry*, 286(42), pp. 36396–36403. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257071>.

Corazzari, M. *et al.* (2015) 'Oncogenic BRAF induces chronic ER stress condition resulting in increased basal autophagy and apoptotic resistance of cutaneous melanoma', *Cell Death & Differentiation*, 22(6), pp. 946–958. Available at: <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.183>.

Courtois-Cox, S., Jones, S.L. and Cichowski, K. (2008) 'Many roads lead to oncogene-induced senescence', *Oncogene*, 27(20), pp. 2801–2809. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210950>.

Coutel, Y. (1959) '[Infiltrating glioblastoma of the brain stem in an 8-year-old child; normalization of the pneumoencephalogram after radiotherapy]', *Revue D'oto-Neuro-Ophthalmologie*, 31, pp. 119–123.

Cree, I.A. and Charlton, P. (2017) 'Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance', *BMC Cancer*, 17(1), p. 10. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2999-1>.

Datta, J. *et al.* (2022) 'Distinct mechanisms of innate and adaptive immune regulation underlie poor oncologic outcomes associated with KRAS-TP53 co-alteration in pancreatic cancer', *Oncogene*, 41(28), pp. 3640–3654. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02368-w>.

De Luca, A. *et al.* (2020) 'FGFR Fusions in Cancer: From Diagnostic Approaches to Therapeutic Intervention', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), p. 6856. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21186856>.

Dhomen, N. *et al.* (2009) 'Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice', *Cancer Cell*, 15(4), pp. 294–303. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.02.022>.

Dias, M.H. and Bernardes, R. (2021) 'Playing cancer at its own game: activating mitogenic signaling as a paradoxical intervention', *Molecular Oncology*, 15(8), pp. 1975–1985. Available at: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12979>.

Dillon, M. *et al.* (2021) 'Progress on Ras/MAPK Signaling Research and Targeting in Blood and Solid Cancers', *Cancers*, 13(20), p. 5059. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers13205059>.

Ding, L. *et al.* (2018) 'Perspective on Oncogenic Processes at the End of the Beginning of Cancer Genomics', *Cell*, 173(2), pp. 305–320.e10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.033>.

Dominski, Z. and Marzluff, W.F. (2007) 'Formation of the 3' end of histone mRNA: Getting closer to the end', *Gene*, 396(2), pp. 373–390. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.04.021>.

Dono, A. *et al.* (2020) 'Adult diffuse midline gliomas: Clinical, radiological, and genetic characteristics', *Journal of Clinical Neuroscience*, 82, pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2020.10.005>.

Dufour, C. *et al.* (2009) 'Astrocytes Reverted to a Neural Progenitor-like State with Transforming Growth Factor Alpha Are Sensitized to Cancerous Transformation', *Stem Cells*, 27(10), pp. 2373–2382. Available at: <https://doi.org/10.1002/stem.155>.

Dupont, C., Armant, D. and Brenner, C. (2009) 'Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective', *Seminars in Reproductive Medicine*, 27(05), pp. 351–357. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0029-1237423>.

Durrant, D.E. and Morrison, D.K. (2018) 'Targeting the Raf kinases in human cancer: the Raf dimer dilemma', *British Journal of Cancer*, 118(1), pp. 3–8. Available at: <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.399>.

Ebrahimi, A. *et al.* (2019) 'High frequency of H3 K27M mutations in adult midline gliomas', *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145(4), pp. 839–850. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00432-018-02836-5>.

Edlundh-Rose, E. *et al.* (2006) 'NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical

characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing.', *Melanoma research*, 16(6), pp. 471–478. Available at: <https://doi.org/10.1097/01.cmr.0000232300.22032.86>.

Eichmüller, O.L. *et al.* (2022) 'Amplification of human interneuron progenitors promotes brain tumors and neurological defects', *Science*, 375(6579), p. eabf5546. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.abf5546>.

El Tekle, G. *et al.* (2021) 'Co-occurrence and mutual exclusivity: what cross-cancer mutation patterns can tell us', *Trends in Cancer*, 7(9), pp. 823–836. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.04.009>.

Faget, D.V., Ren, Q. and Stewart, S.A. (2019) 'Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer', *Nature Reviews Cancer*, 19(8), pp. 439–453. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0156-2>.

Farooqi, A.A. and Siddik, Z.H. (2015) 'Platelet-derived growth factor (PDGF) signalling in cancer: rapidly emerging signalling landscape: PDGF-induced Signalling Cascades', *Cell Biochemistry and Function*, 33(5), pp. 257–265. Available at: <https://doi.org/10.1002/cbf.3120>.

Feinberg, A.P. (2018) 'The Key Role of Epigenetics in Human Disease Prevention and Mitigation', *New England Journal of Medicine*. Edited by D.L. Longo, 378(14), pp. 1323–1334. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1402513>.

Fernandez, A.F. *et al.* (2012) 'A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples', *Genome Research*, 22(2), pp. 407–419. Available at: <https://doi.org/10.1101/gr.119867.110>.

Ferone, G. *et al.* (2020) 'Cells of origin of lung cancers: lessons from mouse studies', *Genes & Development*, 34(15–16), pp. 1017–1032. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.338228.120>.

Filbin, M.G. *et al.* (2018) 'Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq', *Science*, 360(6386), pp. 331–335. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aao4750>.

Filbin, M.G. *et al.* (2019) 'Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq', p. 11.

Fortin, J. *et al.* (2020) 'Mutant ACVR1 Arrests Glial Cell Differentiation to Drive Tumorigenesis in Pediatric Gliomas', *Cancer Cell*, 37(3), pp. 308–323.e12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.02.002>.

Frank, D. and Sela-Donenfeld, D. (2019) 'Hindbrain induction and patterning during early vertebrate development', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(5), pp. 941–960. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2974-x>.

Funato, K. *et al.* (2014) 'Use of human embryonic stem cells to model pediatric gliomas with H3.3K27M histone mutation', *Science (New York, N.Y.)*, 346(6216), pp. 1529–1533. Available at:

<https://doi.org/10.1126/science.1253799>.

Gardiner-Garden, M. and Frommer, M. (1987) 'CpG Islands in vertebrate genomes', *Journal of Molecular Biology*, 196(2), pp. 261–282.

Gavine, P.R. *et al.* (2012) 'AZD4547: An Orally Bioavailable, Potent, and Selective Inhibitor of the Fibroblast Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Family', *Cancer Research*, 72(8), pp. 2045–2056. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3034>.

Gewirtz, D.A., Holt, S.E. and Elmore, L.W. (2008) 'Accelerated senescence: An emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation', *Biochemical Pharmacology*, 76(8), pp. 947–957. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.06.024>.

Goel, V.K. *et al.* (2009) 'Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice', *Oncogene*, 28(23), pp. 2289–2298. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2009.95>.

Gonzalez, A.M. *et al.* (1995) 'A comprehensive analysis of the distribution of FGF-2 and FGFR1 in the rat brain', *Brain Research*, 701(1–2), pp. 201–226. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01002-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01002-X).

González-Gualda, E. *et al.* (2021) 'A guide to assessing cellular senescence *in vitro* and *in vivo*', *The FEBS Journal*, 288(1), pp. 56–80. Available at: <https://doi.org/10.1111/febs.15570>.

Gorgoulis, V. *et al.* (2019) 'Cellular Senescence: Defining a Path Forward', *Cell*, 179(4), pp. 813–827. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>.

Grasso, C.S. *et al.* (2015) 'Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma', *Nature Medicine*, 21(6), pp. 555–559. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.3855>.

Grethe, S. and Pörn-Ares, M.I. (2006) 'p38 MAPK regulates phosphorylation of Bad via PP2A-dependent suppression of the MEK1/2-ERK1/2 survival pathway in TNF- α induced endothelial apoptosis', *Cellular Signalling*, 18(4), pp. 531–540. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.05.023>.

Grove, G.W. and Zweidler, A. (1984) 'Regulation of nucleosomal core histone variant levels in differentiating murine erythroleukemia cells', *Biochemistry*, 23(19), pp. 4436–4443. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi00314a030>.

Guagnano, V. *et al.* (2011) 'Discovery of 3-(2,6-Dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), A Potent and Selective Inhibitor of the Fibroblast Growth Factor Receptor Family of Receptor Tyrosine Kinase', *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(20), pp. 7066–7083. Available at: <https://doi.org/10.1021/jm2006222>.

Guillemot, F. and Zimmer, C. (2011) 'From Cradle to Grave: The Multiple Roles of Fibroblast Growth Factors in Neural Development', *Neuron*, 71(4), pp. 574–588. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.002>.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) 'Hallmarks of Cancer: The Next Generation', *Cell*, 144(5), pp. 646–674. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Harpaz, N. *et al.* (2022) 'Single-cell epigenetic analysis reveals principles of chromatin states in H3.3-K27M gliomas', *Molecular Cell*, 82(14), pp. 2696–2713.e9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.023>.

Harutyunyan, A.S. *et al.* (2019) 'H3K27M induces defective chromatin spread of PRC2-mediated repressive H3K27me2/me3 and is essential for glioma tumorigenesis', *Nature Communications*, 10(1), p. 1262. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09140-x>.

Hausott, B. *et al.* (2008) 'Promotion of neurite outgrowth by fibroblast growth factor receptor 1 overexpression and lysosomal inhibition of receptor degradation in pheochromocytoma cells and adult sensory neurons', *Neuroscience*, 153(2), pp. 461–473. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.083>.

Hayflick, L. and Moorhead, P.S. (1961) 'The serial cultivation of human diploid cell strains.', *Experimental cell research*, 25, pp. 585–621. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6).

Hidai, C. (2003) 'FGF-1 enhanced cardiogenesis in differentiating embryonal carcinoma cell cultures, which was opposite to the effect of FGF-2', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35(4), pp. 421–425. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(03\)00019-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(03)00019-1).

Hoffman, L.M. *et al.* (2018) 'Clinical, Radiologic, Pathologic, and Molecular Characteristics of Long-Term Survivors of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG): A Collaborative Report From the International and European Society for Pediatric Oncology DIPG Registries', *Journal of Clinical Oncology*, 36(19), pp. 1963–1972. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.9308>.

Holland, E.C. *et al.* (2000) 'Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice', *Nature Genetics*, 25(1), p. 55. Available at: <https://doi.org/10.1038/75596>.

Holliday, R. and Pugh, J.E. (1975) 'DNA Modification Mechanisms and Gene Activity During Development: Developmental clocks may depend on the enzymic modification of specific bases in repeated DNA sequences.', *Science*, 187(4173), pp. 226–232. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.187.4173.226>.

Hong, L. *et al.* (1993) 'Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA.', *Journal of Biological Chemistry*, 268(1), pp. 305–314. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54150-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54150-8).

Hong, S.-W. *et al.* (2012) 'Ring Finger Protein 149 Is an E3 Ubiquitin Ligase Active on Wild-type v-

Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1 (BRAF)', *Journal of Biological Chemistry*, 287(28), pp. 24017–24025. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.319822>.

Hübner, J.-M. *et al.* (2019) 'EZHIP/CXorf67 mimics K27M mutated oncohistones and functions as an intrinsic inhibitor of PRC2 function in aggressive posterior fossa ependymoma', *Neuro-Oncology*, 21(7), pp. 878–889. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz058>.

Huillard, E. *et al.* (2012) 'Cooperative interactions of BRAF^{V600E} kinase and CDKN2A locus deficiency in pediatric malignant astrocytoma as a basis for rational therapy', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22), pp. 8710–8715. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1117255109>.

Hütt-Cabezas, M. *et al.* (2013) 'Activation of mTORC1/mTORC2 signaling in pediatric low-grade glioma and pilocytic astrocytoma reveals mTOR as a therapeutic target', *Neuro-Oncology*, 15(12), pp. 1604–1614. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/not132>.

ICGC PedBrain-Seq Project *et al.* (2018) 'The landscape of genomic alterations across childhood cancers', *Nature*, 555(7696), pp. 321–327. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature25480>.

Iroegbu, J.D. *et al.* (2021) 'ERK/MAPK signalling in the developing brain: Perturbations and consequences', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 131, pp. 792–805. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.10.009>.

Ishizawa, K. *et al.* (2010) 'Tumor-Initiating Cells Are Rare in Many Human Tumors', *Cell Stem Cell*, 7(3), pp. 279–282. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.009>.

Jacob, F. *et al.* (2020) 'A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity', *Cell*, 180(1), pp. 188–204.e22. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.036>.

Jacob, K. *et al.* (2011) 'Genetic Aberrations Leading to MAPK Pathway Activation Mediate Oncogene-Induced Senescence in Sporadic Pilocytic Astrocytomas', *Clinical Cancer Research*, 17(14), pp. 4650–4660. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0127>.

Jagannathan, L., Cuddapah, S. and Costa, M. (2016) 'Oxidative Stress Under Ambient and Physiological Oxygen Tension in Tissue Culture', *Current Pharmacology Reports*, 2(2), pp. 64–72. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40495-016-0050-5>.

Jain, S.U. *et al.* (2019) 'PFA ependymoma-associated protein EZHIP inhibits PRC2 activity through a H3 K27M-like mechanism', *Nature Communications*, 10(1), p. 2146. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09981-6>.

Jessa, S. *et al.* (2019) 'Stalled developmental programs at the root of pediatric brain tumors', *Nature Genetics*, 51(12), pp. 1702–1713. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0531-7>.

Jessa, S. *et al.* (2022) 'K27M in canonical and noncanonical H3 variants occurs in distinct oligodendroglial cell lineages in brain midline gliomas', *Nature Genetics*, 54(12), pp. 1865–1880. Available

at: <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01205-w>.

Johnson, D.R. *et al.* (2019) 'Plenty of calcification: imaging characterization of polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young', *Neuroradiology*, 61(11), pp. 1327–1332. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00234-019-02269-y>.

Jones, P.A. (2001) 'The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics', *Science*, 293(5532), pp. 1068–1070. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1063852>.

Joyon, N. *et al.* (2016) 'K27M mutation in H3F3A in ganglioglioma grade I with spontaneous malignant transformation extends the histopathological spectrum of the histone H3 oncogenic pathway', *Neuropathology and Applied Neurobiology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1111/nan.12329>.

Jung, S.H. *et al.* (2016) 'Heparan sulfation is essential for the prevention of cellular senescence', *Cell Death & Differentiation*, 23(3), pp. 417–429. Available at: <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.107>.

Kathrani, N. *et al.* (2022) 'Diffusion and perfusion imaging biomarkers of H3 K27M mutation status in diffuse midline gliomas', *Neuroradiology*, 64(8), pp. 1519–1528. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00234-021-02857-x>.

Katoh, M. (2019) 'Fibroblast growth factor receptors as treatment targets in clinical oncology', *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(2), pp. 105–122. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0115-y>.

Katz, M., Amit, I. and Yarden, Y. (2007) 'Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(8), pp. 1161–1176. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.01.002>.

Kebebew, E. *et al.* (2007) 'The Prevalence and Prognostic Value of BRAF Mutation in Thyroid Cancer', *Annals of Surgery*, 246(3), pp. 466–471. Available at: <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318148563d>.

de Keizer, P.L.J. *et al.* (2010) 'Activation of Forkhead Box O Transcription Factors by Oncogenic BRAF Promotes p21cip1-Dependent Senescence', *Cancer Research*, 70(21), pp. 8526–8536. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1563>.

Kelley, K.W. and Paşca, S.P. (2022) 'Human brain organogenesis: Toward a cellular understanding of development and disease', *Cell*, 185(1), pp. 42–61. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.003>.

Keppler, B.R. and Archer, T.K. (2008) 'Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets – Part 1', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 12(10), pp. 1301–1312. Available at: <https://doi.org/10.1517/14728222.12.10.1301>.

Kergrohen, T. *et al.* (2021) *Copy-number alterations reshape the classification of diffuse intrinsic pontine gliomas. First exome sequencing results of the BIOMEDE trial.* preprint. Oncology. Available at: <https://doi.org/10.1101/2021.04.29.21256183>.

Kessarlis, N. *et al.* (2006) 'Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage', *Nature Neuroscience*, 9(2), pp. 173–179. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn1620>.

Khalid, F. *et al.* (2023) 'Multimodal MRI radiomic models to predict genomic mutations in diffuse intrinsic pontine glioma with missing imaging modalities', *Frontiers in Medicine*, 10, p. 1071447. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1071447>.

Klimaschewski, L. and Claus, P. (2021) 'Fibroblast Growth Factor Signalling in the Diseased Nervous System', *Molecular Neurobiology*, 58(8), pp. 3884–3902. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02367-0>.

Koncar, R.F. *et al.* (2019) 'Identification of novel RAS signaling therapeutic vulnerabilities in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas', *Cancer Research*, p. canres.3521.2018. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3521>.

Kornberg, R.D. (1974) 'Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA: Chromatin structure is based on a repeating unit of eight histone molecules and about 200 DNA base pairs.', *Science*, 184(4139), pp. 868–871. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.184.4139.868>.

Kosar, M. *et al.* (2011) 'Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16^{ink4a}', *Cell Cycle*, 10(3), pp. 457–468. Available at: <https://doi.org/10.4161/cc.10.3.14707>.

Kovatcheva, M. *et al.* (2017) 'ATRAX is a regulator of therapy induced senescence in human cells', *Nature Communications*, 8(1), p. 386. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00540-5>.

Krejci, P. *et al.* (2010) 'FGFR3 signaling induces a reversible senescence phenotype in chondrocytes similar to oncogene-induced premature senescence', *Bone*, 47(1), pp. 102–110. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.03.021>.

Kreso, A. and Dick, J.E. (2014) 'Evolution of the Cancer Stem Cell Model', *Cell Stem Cell*, 14(3), pp. 275–291. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.006>.

Krivtsov, A.V. *et al.* (2013) 'Cell of origin determines clinically relevant subtypes of MLL-rearranged AML', *Leukemia*, 27(4), pp. 852–860. Available at: <https://doi.org/10.1038/leu.2012.363>.

Krook, M.A. *et al.* (2021) 'Fibroblast growth factor receptors in cancer: genetic alterations, diagnostics, therapeutic targets and mechanisms of resistance', *British Journal of Cancer*, 124(5), pp. 880–892. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01157-0>.

Kuilman, T. *et al.* (2010) 'The essence of senescence', *Genes & Development*, 24(22), pp. 2463–2479. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1971610>.

Kumar, S. *et al.* (2020) 'Passenger Mutations in More Than 2,500 Cancer Genomes: Overall Molecular Functional Impact and Consequences', *Cell*, 180(5), pp. 915–927.e16. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.032>.

Kumari, R. and Jat, P. (2021) 'Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, p. 645593. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>.

Lapidot, T. *et al.* (1994) 'A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice', *Nature*, 367(6464), pp. 645–648. Available at: <https://doi.org/10.1038/367645a0>.

Larson, J.D. *et al.* (2019) 'Histone H3.3 K27M Accelerates Spontaneous Brainstem Glioma and Drives Restricted Changes in Bivalent Gene Expression', *Cancer Cell*, 35(1), pp. 140-155.e7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.11.015>.

Lathia, J.D. *et al.* (2011) 'Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions', *Cell Death & Disease*, 2(9), pp. e200–e200. Available at: <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.80>.

Lazo De La Vega, L. *et al.* (2022) 'Rare FGFR Oncogenic Alterations in Sequenced Pediatric Solid and Brain Tumors Suggest FGFR Is a Relevant Molecular Target in Childhood Cancer', *JCO Precision Oncology*, (6), p. e2200390. Available at: <https://doi.org/10.1200/PO.22.00390>.

Ledur, P.F. *et al.* (2017) 'Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries?', *Oncotarget*, 8(40), pp. 69185–69197. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20193>.

Lee, J. *et al.* (2006) 'Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines', *Cancer Cell*, 9(5), pp. 391–403. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.030>.

Leonardo, A.D. *et al.* (1994) 'DNA damage triggers a prolonged p53- dependent G¹ arrest and long-term induction of Cipl in normal human fibroblasts'.

Levy, J.M.M. *et al.* (2014) 'Autophagy Inhibition Improves Chemosensitivity in BRAF^{V600E} Brain Tumors', *Cancer Discovery*, 4(7), pp. 773–780. Available at: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0049>.

Lewis, P.W. *et al.* (2013) 'Inhibition of PRC2 Activity by a Gain-of-Function H3 Mutation Found in Pediatric Glioblastoma', *Science*, 340(6134), pp. 857–861. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1232245>.

Li, S. *et al.* (2014) 'RAS/ERK Signaling Controls Proneural Genetic Programs in Cortical Development and Gliomagenesis', *The Journal of Neuroscience*, 34(6), pp. 2169–2190. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4077-13.2014>.

Lin, A.W. *et al.* (1998) 'Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling', *Genes & Development*, 12(19), pp. 3008–3019. Available at:

<https://doi.org/10.1101/gad.12.19.3008>.

Linkous, A. *et al.* (2019) 'Modeling Patient-Derived Glioblastoma with Cerebral Organoids', *Cell Reports*, 26(12), pp. 3203–3211.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.063>.

Liu, F. *et al.* (2018) 'Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy', *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(4), pp. 552–562. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.008>.

Liu, Q. and Hofmann, P.A. (2004) 'Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 286(6), pp. H2204–H2212. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01050.2003>.

Long, G.V. *et al.* (2014) 'Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma', *New England Journal of Medicine*, 371(20), pp. 1877–1888. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1406037>.

Louis, D.N. *et al.* (2016) 'The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary', *Acta Neuropathologica*, 131(6), pp. 803–820. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.

Louis, D.N. *et al.* (2021) 'The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary', *Neuro-Oncology*, p. noab106. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>.

Lucas, C.-H.G. *et al.* (2020) 'Comprehensive analysis of diverse low-grade neuroepithelial tumors with FGFR1 alterations reveals a distinct molecular signature of rosette-forming glioneuronal tumor', *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1), p. 151. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01027-z>.

Luebker, S.A. and Koepsell, S.A. (2019) 'Diverse Mechanisms of BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma Identified in Clinical and Preclinical Studies', *Frontiers in Oncology*, 9, p. 268. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00268>.

Mackay, A. *et al.* (2017) 'Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma', *Cancer Cell*, 32(4), pp. 520–537.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.08.017>.

Madhavan, K. *et al.* (2022) 'Venetoclax Cooperates with Ionizing Radiation to Attenuate Diffuse Midline Glioma Tumor Growth', *Clinical Cancer Research*, 28(11), pp. 2409–2424. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-4002>.

Maloney, R.C. *et al.* (2021) 'The mechanism of activation of monomeric B-Raf V600E', *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, pp. 3349–3363. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.06.007>.

Marcotte, R. and Wang, E. (2002) 'Replicative Senescence Revisited', *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 57(7), pp. B257–B269. Available at:

<https://doi.org/10.1093/gerona/57.7.B257>.

Mariet, C. *et al.* (2022) 'Posterior fossa ependymoma H3 K27-mutant: an integrated radiological and histomolecular tumor analysis', *Acta Neuropathologica Communications*, 10(1), p. 137. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01442-4>.

Massagué, J. (2008) 'TGF β in Cancer', *Cell*, 134(2), pp. 215–230. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>.

McArthur, G.A. *et al.* (2014) 'Safety and efficacy of vemurafenib in BRAFV600E and BRAFV600K mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study', *The Lancet Oncology*, 15(3), pp. 323–332. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70012-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70012-9).

McFarland, C.D. *et al.* (2017) 'The Damaging Effect of Passenger Mutations on Cancer Progression', *Cancer Research*, 77(18), pp. 4763–4772. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3283-T>.

McGranahan, N. and Swanton, C. (2017) 'Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future', *Cell*, 168(4), pp. 613–628. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.018>.

McNicholas, M. *et al.* (2023) 'A Compendium of Syngeneic, Transplantable Pediatric High-Grade Glioma Models Reveals Subtype-Specific Therapeutic Vulnerabilities', *Cancer Discovery*, p. CD-23-0004. Available at: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-23-0004>.

Métais, A. *et al.* (2023) 'Clinico-pathological and epigenetic heterogeneity of diffuse gliomas with FGFR3::TACC3 fusion', *Acta Neuropathologica Communications*, 11(1), p. 14. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40478-023-01506-z>.

Michaloglou, C. *et al.* (2005) 'BRAFV600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi', *Nature*, 436(7051), pp. 720–724. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature03890>.

Miller, K.D. *et al.* (2021) 'Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(5), pp. 381–406. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21693>.

Mistry, M. *et al.* (2015) 'BRAF Mutation and CDKN2A Deletion Define a Clinically Distinct Subgroup of Childhood Secondary High-Grade Glioma', *Journal of Clinical Oncology*, 33(9), pp. 1015–1022. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.3922>.

Miyano, S.W. *et al.* (2016) 'E7090, a Novel Selective Inhibitor of Fibroblast Growth Factor Receptors, Displays Potent Antitumor Activity and Prolongs Survival in Preclinical Models', *Molecular Cancer Therapeutics* [Preprint].

Mohammad, F. *et al.* (2017) 'EZH2 is a potential therapeutic target for H3K27M-mutant pediatric gliomas', *Nature Medicine*, 23(4), p. 483. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.4293>.

Mondal, G. *et al.* (2020) 'Pediatric bithalamic gliomas have a distinct epigenetic signature and frequent EGFR exon 20 insertions resulting in potential sensitivity to targeted kinase inhibition', *Acta*

Neuropathologica, 139(6), pp. 1071–1088. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02155-5>.

Moore (2015) 'The Developing Human: Clinically Oriented Embryology, 10th Edition', *ProtoView*, 1 July. Available at: <http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=edsgao&AN=edsgcl.421007743&lang=fr&site=eds-live>.

Muñoz-Espín, D. and Serrano, M. (2014) 'Cellular senescence: from physiology to pathology', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(7), pp. 482–496. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm3823>.

Nacev, B.A. *et al.* (2019) 'The expanding landscape of "oncohistone" mutations in human cancers', *Nature*, 567(7749), pp. 473–478. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1038-1>.

Nakamura, I.T. *et al.* (2021) 'Comprehensive functional evaluation of variants of fibroblast growth factor receptor genes in cancer', *npj Precision Oncology*, 5(1), p. 66. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41698-021-00204-0>.

Nieto, P. *et al.* (2017) 'A Braf kinase-inactive mutant induces lung adenocarcinoma', *Nature*, 548(7666), pp. 239–243. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature23297>.

Nowell, P.C. (1976) 'The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations: Acquired genetic lability permits stepwise selection of variant sublines and underlies tumor progression.', *Science*, 194(4260), pp. 23–28. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.959840>.

Oddo, D. *et al.* (2016) 'Molecular Landscape of Acquired Resistance to Targeted Therapy Combinations in *BRAF* -Mutant Colorectal Cancer', *Cancer Research*, 76(15), pp. 4504–4515. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0396>.

Olivier, M., Hollstein, M. and Hainaut, P. (2010) 'TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(1). Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001008>.

Oren, M. and Rotter, V. (2010) 'Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(2), pp. a001107–a001107. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001107>.

Ornitz, D.M. and Itoh, N. (2015) 'The Fibroblast Growth Factor signaling pathway', *WIREs Developmental Biology*, 4(3), pp. 215–266. Available at: <https://doi.org/10.1002/wdev.176>.

Osley, M.A. (1991) 'The regulation of histone synthesis in the cell cycle.', *Annual review of biochemistry*, 60, pp. 827–861. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.004143>.

Ostrom, Q.T. *et al.* (2018) 'CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015', *Neuro-Oncology*, 20(suppl_4), pp. iv1–iv86. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy131>.

Osuka, S. and Van Meir, E.G. (2017) 'Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way

forward', *Journal of Clinical Investigation*, 127(2), pp. 415–426. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI89587>.

Ota, S. *et al.* (2009) 'The role of senescence and prosurvival signaling in controlling the oncogenic activity of FGFR2 mutants associated with cancer and birth defects', *Human Molecular Genetics*, 18(14), pp. 2609–2621. Available at: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp195>.

Özcan, S. *et al.* (2016) 'Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses', *Aging*, 8(7), pp. 1316–1329. Available at: <https://doi.org/10.18632/aging.100971>.

Pagès, M. *et al.* (2018) 'Co-occurrence of histone H3 K27M and BRAF V600E mutations in paediatric midline grade I ganglioglioma: Histone H3 K27M and BRAF V600E mutations in GG', *Brain Pathology*, 28(1), pp. 103–111. Available at: <https://doi.org/10.1111/bpa.12473>.

Pajovic, S. *et al.* (2020) 'Epigenetic activation of a RAS/MYC axis in H3.3K27M-driven cancer', *Nature Communications*, 11(1), p. 6216. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19972-7>.

Pajtler, K.W. *et al.* (2018) 'Molecular heterogeneity and CXorf67 alterations in posterior fossa group A (PFA) ependymomas', *Acta Neuropathologica*, 136(2), pp. 211–226. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1877-0>.

Pandey, N.B. *et al.* (1990) 'Introns in histone genes alter the distribution of 3' ends', *Nucleic Acids Research*, 18(11), pp. 3161–3170. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/18.11.3161>.

Park, E. *et al.* (2019) 'Architecture of autoinhibited and active BRAF–MEK1–14-3-3 complexes', *Nature*, 575(7783), pp. 545–550. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1660-y>.

Park, J.B. *et al.* (2012) 'Phospholipase signalling networks in cancer', *Nature Reviews Cancer*, 12(11), pp. 782–792. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc3379>.

Parsons, B.L. (2018) 'Multiclonal tumor origin: Evidence and implications', *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 777, pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.05.001>.

Pasqualini, C. *et al.* (2020) 'Modeling the Interaction between the Microenvironment and Tumor Cells in Brain Tumors', *Neuron*, p. S0896627320307182. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.09.018>.

Pathania, M. *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(5), pp. 684–700.e9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.09.014>.

Patton, E.E. *et al.* (2005) 'BRAF Mutations Are Sufficient to Promote Nevi Formation and Cooperate with p53 in the Genesis of Melanoma', *Current Biology*, 15(3), pp. 249–254. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.031>.

Paugh, B.S. *et al.* (2010) 'Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas

reveals key differences with the adult disease', *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(18), pp. 3061–3068. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.7252>.

Paugh, B.S. *et al.* (2013) 'Novel Oncogenic PDGFRA Mutations in Pediatric High-Grade Gliomas', *Cancer Research*, 73(20), pp. 6219–6229. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1491>.

Pearson, M. and Pelicci, P.G. (2001) 'PML interaction with p53 and its role in apoptosis and replicative senescence', *Oncogene*, 20(49), pp. 7250–7256. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204856>.

Pereira, S.S. *et al.* (2018) 'MECHANISMS OF ENDOCRINOLOGY: Cell cycle regulation in adrenocortical carcinoma', *European Journal of Endocrinology*, 179(2), pp. R95–R110. Available at: <https://doi.org/10.1530/EJE-17-0976>.

Phillips, R.E., Soshnev, A.A. and Allis, C.D. (2020) 'Epigenomic Reprogramming as a Driver of Malignant Glioma', *Cancer Cell*, 38(5), pp. 647–660. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.08.008>.

Picca, A. *et al.* (2018) 'FGFR1 actionable mutations, molecular specificities, and outcome of adult midline gliomas', p. 10.

Piunti, A. *et al.* (2017) 'Therapeutic targeting of polycomb and BET bromodomain proteins in diffuse intrinsic pontine gliomas', *Nature Medicine*, 23(4), pp. 493–500. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.4296>.

Plessier, A. *et al.* (2017) 'New *in vivo* avatars of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) from stereotactic biopsies performed at diagnosis', *Oncotarget*, 8(32). Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15002>.

Plotnikov, A. *et al.* (2011) 'The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(9), pp. 1619–1633. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.012>.

Porta, C., Paglino, C. and Mosca, A. (2014) 'Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer', *Frontiers in Oncology*, 4. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00064>.

Prabowo, A.S. *et al.* (2014) 'BRAF V600E Mutation Is Associated with mTOR Signaling Activation in Glioneuronal Tumors: BRAF and mTOR in Glioneuronal Tumors', *Brain Pathology*, 24(1), pp. 52–66. Available at: <https://doi.org/10.1111/bpa.12081>.

Pucilowska, J. *et al.* (2012) 'Disrupted ERK Signaling during Cortical Development Leads to Abnormal Progenitor Proliferation, Neuronal and Network Excitability and Behavior, Modeling Human Neuro-Cardio-Facial-Cutaneous and Related Syndromes', *Journal of Neuroscience*, 32(25), pp. 8663–8677. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1107-12.2012>.

Puget, S. *et al.* (2012) 'Mesenchymal Transition and PDGFRA Amplification/Mutation Are Key Distinct

Oncogenic Events in Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas', *PLoS ONE*. Edited by M.S. Lesniak, 7(2), p. e30313. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030313>.

Puget, S. *et al.* (2015) 'Biopsy in a series of 130 pediatric diffuse intrinsic Pontine gliomas', *Child's Nervous System*, 31(10), pp. 1773–1780. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00381-015-2832-1>.

Qaddoumi, I. *et al.* (2016) 'Genetic alterations in uncommon low-grade neuroepithelial tumors: BRAF, FGFR1, and MYB mutations occur at high frequency and align with morphology', *Acta Neuropathologica*, 131(6), pp. 833–845. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1539-z>.

Raabe, E.H. *et al.* (2011) 'BRAF Activation Induces Transformation and Then Senescence in Human Neural Stem Cells: A Pilocytic Astrocytoma Model', *Clinical Cancer Research*, 17(11), pp. 3590–3599. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3349>.

Rad, R. *et al.* (2013) 'A Genetic Progression Model of BrafV600E-Induced Intestinal Tumorigenesis Reveals Targets for Therapeutic Intervention', *Cancer Cell*, 24(1), pp. 15–29. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.014>.

Rajendran, P. *et al.* (2019) 'Autophagy and senescence: A new insight in selected human diseases', *Journal of Cellular Physiology*, 234(12), pp. 21485–21492. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.28895>.

Rasmussen, B.K. *et al.* (2017) 'Epidemiology of glioma: clinical characteristics, symptoms, and predictors of glioma patients grade I–IV in the the Danish Neuro-Oncology Registry', *Journal of Neuro-Oncology*, 135(3), pp. 571–579. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2607-5>.

Rayess, H., Wang, M.B. and Srivatsan, E.S. (2012) 'Cellular senescence and tumor suppressor gene p16', *International Journal of Cancer*, 130(8), pp. 1715–1725. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.27316>.

Razin, A. and Riggs, A.D. (1980) 'DNA Methylation and Gene Function', *Science*, 210(4470), pp. 604–610. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.6254144>.

Reddington, J.P. *et al.* (2013) 'Redistribution of H3K27me3 upon DNA hypomethylation results in de-repression of Polycomb target genes', *Genome Biology*, 14(3), p. R25. Available at: <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-3-r25>.

Reinhardt, A. *et al.* (2018) 'Anaplastic astrocytoma with piloid features, a novel molecular class of IDH wildtype glioma with recurrent MAPK pathway, CDKN2A/B and ATRX alterations', *Acta Neuropathologica*, 136(2), pp. 273–291. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1837-8>.

Riedel, N.C. *et al.* (2022) 'Three-Dimensional Cell Culture Systems in Pediatric and Adult Brain Tumor Precision Medicine', *Cancers*, 14(23), p. 5972. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers14235972>.

Robert, C. *et al.* (2015) 'Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib', *New England Journal of Medicine*, 372(1), pp. 30–39. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412690>.

Roche-Lestienne, C. *et al.* (2002) 'Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment', *Blood*, 100(3), pp. 1014–1018. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood.V100.3.1014>.

Roujeau, T. *et al.* (2007) 'Stereotactic biopsy of diffuse pontine lesions in children', *Journal of Neurosurgery*, 107(1 Suppl), pp. 1–4. Available at: <https://doi.org/10.3171/PED-07/07/001>.

Roux, A. *et al.* (2020) 'High-grade gliomas in adolescents and young adults highlight histomolecular differences from their adult and pediatric counterparts', *Neuro-Oncology*, 22(8), pp. 1190–1202. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa024>.

Roux, P.P. and Blenis, J. (2004) 'ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), pp. 320–344. Available at: <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004>.

Rucki, A.A. *et al.* (2017) 'Heterogeneous Stromal Signaling within the Tumor Microenvironment Controls the Metastasis of Pancreatic Cancer', *Cancer Research*, 77(1), pp. 41–52. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1383>.

Ryall, S. *et al.* (2020) 'Integrated Molecular and Clinical Analysis of 1,000 Pediatric Low-Grade Gliomas', *Cancer Cell*, 37(4), pp. 569–583.e5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.011>.

Ryall, S., Tabori, U. and Hawkins, C. (2020) 'Pediatric low-grade glioma in the era of molecular diagnostics', *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1), p. 30. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00902-z>.

Rycaj, K. and Tang, D.G. (2015) 'Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations', *Cancer Research*, 75(19), pp. 4003–4011. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0798>.

Sanchez-Vega, F. *et al.* (2018) 'Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas', *Cell*, 173(2), pp. 321–337.e10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.035>.

Sarabipour, S. and Hristova, K. (2016) 'Mechanism of FGF receptor dimerization and activation', *Nature Communications*, 7(1), p. 10262. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms10262>.

Schüller, U. *et al.* (2021) 'Mutations within FGFR1 are associated with superior outcome in a series of 83 diffuse midline gliomas with H3F3A K27M mutations', *Acta Neuropathologica*, 141(2), pp. 323–325. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02259-y>.

Schulte, J.D. *et al.* (2020) 'Clinical, radiologic, and genetic characteristics of histone H3 K27M-mutant diffuse midline gliomas in adults', *Neuro-Oncology Advances*, 2(1), p. vdaa142. Available at: <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdaa142>.

Schwartzentruber, J. *et al.* (2012) 'Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma', *Nature*, 482(7384), pp. 226–231. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature11082>.

<https://doi.org/10.1038/nature10833>.

Selt, F. *et al.* (2017) 'Establishment and application of a novel patient-derived KIAA1549:BRAF-driven pediatric pilocytic astrocytoma model for preclinical drug testing', *Oncotarget*, 8(7), pp. 11460–11479. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14004>.

Selt, F. *et al.* (2023) 'BH3 mimetics targeting BCL-XL impact the senescent compartment of pilocytic astrocytoma', *Neuro-Oncology*, 25(4), pp. 735–747. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac199>.

Serrano, M. *et al.* (1997) 'Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a', *Cell*, 88(5), pp. 593–602. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81902-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81902-9).

Severino, V. *et al.* (2013) 'Insulin-like growth factor binding proteins 4 and 7 released by senescent cells promote premature senescence in mesenchymal stem cells', *Cell Death & Disease*, 4(11), pp. e911–e911. Available at: <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.445>.

Sidoryk-Wegrzynowicz, M. *et al.* (2011) 'Role of Astrocytes in Brain Function and Disease', *Toxicologic Pathology*, 39(1), pp. 115–123. Available at: <https://doi.org/10.1177/0192623310385254>.

Sievers, P. *et al.* (2019) 'Rosette-forming glioneuronal tumors share a distinct DNA methylation profile and mutations in FGFR1, with recurrent co-mutation of PIK3CA and NF1', *Acta Neuropathologica*, 138(3), pp. 497–504. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02038-4>.

Sievers, P. *et al.* (2021) 'A subset of pediatric-type thalamic gliomas share a distinct DNA methylation profile, H3K27me3 loss and frequent alteration of EGFR', *Neuro-Oncology*, 23(1), pp. 34–43. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa251>.

Silbereis, J.C. *et al.* (2016) 'The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System', *Neuron*, 89(2), pp. 248–268. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.008>.

Singh, D. *et al.* (2012) 'Transforming Fusions of FGFR and TACC Genes in Human Glioblastoma', *Science*, 337(6099), pp. 1231–1235. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1220834>.

Sitbon, D. *et al.* (2017) 'Shaping Chromatin in the Nucleus: The Bricks and the Architects', *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1101/sqb.2017.82.033753>.

Skoulidis, F. *et al.* (2015) 'Co-occurring Genomic Alterations Define Major Subsets of KRAS -Mutant Lung Adenocarcinoma with Distinct Biology, Immune Profiles, and Therapeutic Vulnerabilities', *Cancer Discovery*, 5(8), pp. 860–877. Available at: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1236>.

Śmiech, M. *et al.* (2020) 'Emerging BRAF Mutations in Cancer Progression and Their Possible Effects on Transcriptional Networks', *Genes*, 11(11), p. 1342. Available at: <https://doi.org/10.3390/genes11111342>.

Solomon, D.A. *et al.* (2016) 'Diffuse Midline Gliomas with Histone H3-K27M Mutation: A Series of 47 Cases Assessing the Spectrum of Morphologic Variation and Associated Genetic Alterations: Diffuse midline gliomas with histone H3-K27M mutation', *Brain Pathology*, 26(5), pp. 569–580. Available at: <https://doi.org/10.1111/bpa.12336>.

Sootome, H. *et al.* (2020) 'Futibatinib Is a Novel Irreversible FGFR 1–4 Inhibitor That Shows Selective Antitumor Activity against FGFR-Deregulated Tumors', *Cancer Research*, 80(22), pp. 4986–4997. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2568>.

Soto-Gamez, A., Quax, W.J. and Demaria, M. (2019) 'Regulation of Survival Networks in Senescent Cells: From Mechanisms to Interventions', *Journal of Molecular Biology*, 431(15), pp. 2629–2643. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.036>.

Soussi, T. *et al.* (2006) 'Locus-specific mutation databases: pitfalls and good practice based on the p53 experience', *Nature Reviews Cancer*, 6(1), p. 83. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc1783>.

Stachowiak, M.K. *et al.* (1996) 'Nuclear accumulation of fibroblast growth factor receptors is regulated by multiple signals in adrenal medullary cells.', *Molecular Biology of the Cell*, 7(8), pp. 1299–1317. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.7.8.1299>.

Stachowiak, M.K. *et al.* (2003) 'Integrative nuclear FGFR1 signaling (INFS) as a part of a universal feed-forward-and-gate signaling module that controls cell growth and differentiation', *Journal of Cellular Biochemistry*, 90(4), pp. 662–691. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcb.10606>.

Stafford, J.M. *et al.* (2018) 'Multiple modes of PRC2 inhibition elicit global chromatin alterations in H3K27M pediatric glioma', *Science Advances*, 4(10), p. eaau5935. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau5935>.

Storer, M. *et al.* (2013) 'Senescence Is a Developmental Mechanism that Contributes to Embryonic Growth and Patterning', *Cell*, 155(5), pp. 1119–1130. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.041>.

Stratton, M.R., Campbell, P.J. and Futreal, P.A. (2009) 'The cancer genome', *Nature*, 458(7239), pp. 719–724. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature07943>.

Strichman-Almashanu, L.Z. *et al.* (2002) 'A Genome-Wide Screen for Normally Methylated Human CpG Islands That Can Identify Novel Imprinted Genes'.

Subbiah, V. *et al.* (2022) 'FIGHT-101, a first-in-human study of potent and selective FGFR 1-3 inhibitor pemigatinib in pan-cancer patients with FGF/FGFR alterations and advanced malignancies', *Annals of Oncology*, 33(5), pp. 522–533. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.02.001>.

Subramanian, A. *et al.* (2005) 'Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43), pp. 15545–15550. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>.

Sun, C. *et al.* (2014) 'Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma', *Nature*, 508(7494), pp. 118–122. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature13121>.

Sun, X.-J. *et al.* (2005) 'Identification and Characterization of a Novel Human Histone H3 Lysine 36-specific Methyltransferase', *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), pp. 35261–35271. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M504012200>.

Sunayama, J. *et al.* (2010) 'Crosstalk Between the PI3K/mTOR and MEK/ERK Pathways Involved in the Maintenance of Self-Renewal and Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-Like Cells', *Stem Cells*, 28(11), pp. 1930–1939. Available at: <https://doi.org/10.1002/stem.521>.

Sykes, E., Mactier, S. and Christopherson, R. (2016) 'Melanoma and the Unfolded Protein Response', *Cancers*, 8(3), p. 30. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers8030030>.

Szenker, E., Ray-Gallet, D. and Almouzni, G. (2011) 'The double face of the histone variant H3.3', *Cell Research*, 21(3), pp. 421–434. Available at: <https://doi.org/10.1038/cr.2011.14>.

Talukdar, S. *et al.* (2019) 'Dormancy and cancer stem cells: An enigma for cancer therapeutic targeting', in *Advances in Cancer Research*. Elsevier, pp. 43–84. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.12.002>.

Taylor, K.R. *et al.* (2014) 'Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma', *Nature Genetics*, 46(5), pp. 457–461. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng.2925>.

the ICGC Prostate Group *et al.* (2015) 'Analysis of the genetic phylogeny of multifocal prostate cancer identifies multiple independent clonal expansions in neoplastic and morphologically normal prostate tissue', *Nature Genetics*, 47(4), pp. 367–372. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng.3221>.

the International Cancer Genome Consortium PedBrain Tumor Project *et al.* (2013) 'Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma', *Nature Genetics*, 45(8), pp. 927–932. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng.2682>.

Tien, A.-C. *et al.* (2012) 'Regulated temporal-spatial astrocyte precursor cell proliferation involves BRAF signalling in mammalian spinal cord', *Development*, 139(14), pp. 2477–2487. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.077214>.

van Tilborg, E. *et al.* (2018) 'Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury', *Glia*, 66(2), pp. 221–238. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.23256>.

Tlsty, T.D. and Coussens, L.M. (2006) 'TUMOR STROMA AND REGULATION OF CANCER DEVELOPMENT', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1(1), pp. 119–150. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100224>.

Tomczak, K., Czerwińska, P. and Wiznerowicz, M. (2015) 'Review The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge', *Współczesna Onkologia*, 1A, pp. 68–77. Available at:

<https://doi.org/10.5114/wo.2014.47136>.

Turner, C.A. *et al.* (2016) 'Dysregulated fibroblast growth factor (FGF) signaling in neurological and psychiatric disorders', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 53, pp. 136–143. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.10.003>.

Unni, A.M. *et al.* (2015) 'Evidence that synthetic lethality underlies the mutual exclusivity of oncogenic KRAS and EGFR mutations in lung adenocarcinoma', *eLife*, 4, p. e06907. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.06907>.

Valer *et al.* (2019) 'ACVR1 Function in Health and Disease', *Cells*, 8(11), p. 1366. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8111366>.

Vinci, M. *et al.* (2018) 'Functional diversity and cooperativity between subclonal populations of pediatric glioblastoma and diffuse intrinsic pontine glioma cells', *Nature Medicine*, 24(8), pp. 1204–1215. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0086-7>.

Vissers, J.H.A., van Lohuizen, M. and Citterio, E. (2012) 'The emerging role of Polycomb repressors in the response to DNA damage', *Journal of Cell Science*, 125(17), pp. 3939–3948. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.107375>.

Visvader, J.E. (2011) 'Cells of origin in cancer', *Nature*, 469(7330), pp. 314–322. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature09781>.

Visvader, J.E. and Lindeman, G.J. (2012) 'Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities', *Cell Stem Cell*, 10(6), pp. 717–728. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.007>.

Vuong, H.G. *et al.* (2021) *H3K27M-mutant Diffuse Midline Gliomas should be Further Molecularly Stratified: An Integrated Analysis of 669 Patients*. preprint. In Review. Available at: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-949930/v1>.

Wajapeyee, N. *et al.* (2008) 'Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7', *Cell*, 132(3), pp. 363–374. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.032>.

Wang, L. *et al.* (2018) 'H3 K27M-mutant diffuse midline gliomas in different anatomical locations', *Human Pathology*, 78, pp. 89–96. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.04.015>.

Wang, Z. *et al.* (2008) 'Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome', *Nature Genetics*, 40(7), pp. 897–903. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng.154>.

Werbrouck, C. *et al.* (2019) 'TP53 Pathway Alterations Drive Radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG)', *Clinical Cancer Research*, 25(22), pp. 6788–6800. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0126>.

White, K.E. *et al.* (2005) 'Mutations that Cause Osteoglophonic Dysplasia Define Novel Roles for

FGFR1 in Bone Elongation', *The American Journal of Human Genetics*, 76(2), pp. 361–367. Available at: <https://doi.org/10.1086/427956>.

Wiley, C.D. *et al.* (2017) 'Analysis of individual cells identifies cell-to-cell variability following induction of cellular senescence', *Aging Cell*, 16(5), pp. 1043–1050. Available at: <https://doi.org/10.1111/accel.12632>.

Wu, G. *et al.* (2012) 'Somatic Histone H3 Alterations in Paediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas and Non-Brainstem Glioblastomas', *Nature genetics*, 44(3), pp. 251–253. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng.1102>.

Xia, Z. *et al.* (1995) 'Opposing Effects of ERK and JNK-p38 MAP Kinases on Apoptosis', *Science*, 270(5240), pp. 1326–1331. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.270.5240.1326>.

Xiao, J. *et al.* (2018) 'Differential expression of ABCB5 in BRAF inhibitor-resistant melanoma cell lines', *BMC Cancer*, 18(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4583-3>.

Xie, Y. *et al.* (2020) 'FGF/FGFR signaling in health and disease', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), p. 181. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00222-7>.

Xu, Y. *et al.* (2014) 'Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence', *Trends in Biochemical Sciences*, 39(6), pp. 268–276. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.04.004>.

Yang, I. *et al.* (2011) 'Immune cell infiltrate differences in pilocytic astrocytoma and glioblastoma: evidence of distinct immunological microenvironments that reflect tumor biology: Laboratory investigation', *Journal of Neurosurgery*, 115(3), pp. 505–511. Available at: <https://doi.org/10.3171/2011.4.JNS101172>.

Yao, Z. *et al.* (2015) 'BRAF Mutants Evade ERK-Dependent Feedback by Different Mechanisms that Determine Their Sensitivity to Pharmacologic Inhibition', *Cancer Cell*, 28(3), pp. 370–383. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.08.001>.

Yao, Z. *et al.* (2017) 'Tumours with class 3 BRAF mutants are sensitive to the inhibition of activated RAS', *Nature*, 548(7666), pp. 234–238. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature23291>.

Yoza, K. *et al.* (2016) 'Biophysical characterization of drug-resistant mutants of fibroblast growth factor receptor 1', *Genes to Cells*, 21(10), pp. 1049–1058. Available at: <https://doi.org/10.1111/gtc.12405>.

Yu, J.S.L. and Cui, W. (2016) 'Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination', *Development*, 143(17), pp. 3050–3060. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.137075>.

Yu, L. *et al.* (2022) 'Co-occurrence of *BAP1* and *SF3B1* mutations in uveal melanoma induces cellular senescence', *Molecular Oncology*, 16(3), pp. 607–629. Available at: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13128>.

Yuan, M. *et al.* (2021) 'Conditional reprogramming culture conditions facilitate growth of lower-grade glioma models', *Neuro-Oncology*, 23(5), pp. 770–782. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa263>.

Zanotti, S. *et al.* (2022) 'Cellular senescence in neuroblastoma', *British Journal of Cancer*, 126(11), pp. 1529–1538. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01755-0>.

Zhang, Q. *et al.* (2023) 'FGF/FGFR system in the central nervous system demyelinating disease: Recent progress and implications for multiple sclerosis', *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 29(6), pp. 1497–1511. Available at: <https://doi.org/10.1111/cns.14176>.

Zhang, R., Chen, W. and Adams, P.D. (2007) 'Molecular Dissection of Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci', *Molecular and Cellular Biology*, 27(6), pp. 2343–2358. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.02019-06>.

Zheng, L. *et al.* (2022) 'Diffuse Midline Gliomas With Histone H3 K27M Mutation in Adults and Children: A Retrospective Series of 164 Cases', *American Journal of Surgical Pathology*, 46(6), pp. 863–871. Available at: <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001897>.

Zhu, J. *et al.* (1998) 'Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf', *Genes & Development*, 12(19), pp. 2997–3007. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.12.19.2997>.

Zong, H., Parada, L.F. and Baker, S.J. (2015) 'Cell of Origin for Malignant Gliomas and Its Implication in Therapeutic Development', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(5), p. a020610. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020610>.

Titre : Interactions des mutations oncogéniques secondaires avec la mutation initiatrice H3K27M dans les gliomes diffus de la ligne médiane : description d'un nouveau sous-type tumoral

Mots clés : Gliome de haut grade pédiatrique ; Gliome adulte ; BRAF-V600E ; FGFR1 ; Méthylation de l'ADN

Résumé : Les gliomes diffus de la ligne médiane (DMG), pédiatriques ou adultes, sont des tumeurs incurables et représentent un défi en neuro-oncologie. Les DMG comprennent actuellement 4 sous-types tumoraux dont chacun est caractérisé par un programme oncogénique particulier. Le sous-type présentant une mutation somatique K27M dans le variant d'histone H3.3 est hétérogène avec la présence de patients de bons et mauvais pronostics. L'objectif de ce projet était de caractériser cette hétérogénéité. Ce travail nous a permis de découvrir un cinquième sous-type de DMG H3.3K27M présentant des altérations activatrices de la signalisation des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) : BRAF-V600E et FGFR1-N546K /K656E (DMG H3K27-MAPK-altérés). En effet, notre caractérisation à plusieurs échelles moléculaires et cliniques a montré des différences avec les autres sous-types de DMG, notamment un profil de méthylation de l'ADN spécifique, une signature transcriptomique de sénescence, une meilleure survie globale avec une médiane autour de 36 mois, un âge au diagnostic plus avancé, et des présentations histo-radiologiques spécifiques avec des calcifications ou des tumeurs plus circonscrites. Nous avons aussi réussi à développer les premiers modèles *in-vitro* et *in-vivo* de ce nouveau sous-type et nos premiers résultats suggèrent de nouvelles opportunités thérapeutiques pour les DMG.

Title: Interactions of secondary oncogenic mutations with H3K27M driver mutation in diffuse midline gliomas: description of a new tumor subtype

Keywords: Pediatric high-grade glioma ; Adult glioma ; BRAF-V600E ; FGFR1; DNA methylation profiling

Abstract: Diffuse midline gliomas (DMG), in pediatric or adult patients, are incurable tumors and remain a major challenge in neuro-oncology. Currently, DMG comprise four tumor subtypes, each characterized by particular oncogenic programs. The subtype presenting somatic K27M mutation in the H3.3 histone variant, exhibits heterogeneity with patients of both good and poor prognosis. The goal of this project was to characterize this heterogeneity. Our work allowed the discovery of a fifth subtype of DMG with activating alterations in mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling proteins: BRAF-V600E and FGFR1-N546K/K656E (DMG H3K27-MAPK-altered). Our multi-level characterization revealed distinct differences with the other DMG subtypes, including a specific DNA methylation profile, senescence transcriptomic signature, a better overall survival with a median around 36 months, older age at diagnosis, and specific histo-radiological presentations with calcifications or more circumscribed tumors. We also successfully developed the first *in vitro* and *in vivo* models of this new subtype, and our initial results suggest new therapeutic opportunities for DMG.