



HAL
open science

Rôle et ciblage de HIF-2a dans les gliomes de haut-grade pédiatrique de la ligne médiane

Quentin Fuchs

► To cite this version:

Quentin Fuchs. Rôle et ciblage de HIF-2a dans les gliomes de haut-grade pédiatrique de la ligne médiane. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT : 2022STRAJ060 . tel-04416421

HAL Id: tel-04416421

<https://theses.hal.science/tel-04416421>

Submitted on 25 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.

UNIVERSITE DE STRASBOURG

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
Faculté de Pharmacie, CNRS UMR 7021

Equipe de recherche :
Signalisation tumorale et cibles thérapeutiques

THÈSE

présentée par

Quentin FUCHS

soutenue le 10 octobre 2022

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**
Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Rôle et ciblage de HIF-2 α dans les gliomes de haut-grade pédiatriques de la ligne médiane

Thèse dirigée par :

Mme Natacha ENTZ-WERLE

Pr, CHU de Strasbourg

Rapporteurs :

Mr Jacques GRILL

Dr, Institut Gustave Roussy, Paris

Mme Marie CASTETS

Dr, Centre Léon Berard, Lyon

Examineur interne

Mme Françoise DANTZER

Dr, ESBS, Illkirch

Examineur externe

Mr Eddy PASQUIER

Dr, CRCM, Marseille

À mes parents,

À mon frère,

À ma famille

À mes amis,

À ma Choupi,

Vous êtes mon bonheur, ma force, mon inspiration au quotidien, je vous aime...

Peu importe ce qu'on pourra vous dire, les mots et les idées peuvent changer le monde.

Robin Williams, « *Le cercle des poètes disparus* » de Peter Weir (1989)

« Prenez le temps de chanter, de rire, de vous amuser. Tout le monde sait bien qu'après tout la vie est souvent jolie quand on la prend du bon côté »

Charles Trénet

Remerciements



Une pensée sincère et tout mon soutien à tous les patients et les familles affectés par un gliome de haut-grade pédiatrique. Merci infiniment pour leur contribution à ce travail et leur courage.

Avant d'exposer l'aboutissement de ces trois années de thèse, je souhaiterais remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à l'accomplissement de ce travail et ont partagé avec moi les hauts et les bas tout au long de ce parcours.

Tout d'abord, ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans le soutien financier de l'association « Enfants, Cancers et Santé », de la Société Française de la lutte contre les Cancers et les leucémies de l'Enfant et de l'adolescent (SFCE) et de la Fondation Université de Strasbourg. Un immense merci pour votre implication sans relâche et votre confiance tout au long de ce projet.

Merci également à la Ligue contre le Cancer, à l'Institut National du Cancer ainsi qu'aux associations « Rotary », « Life Pink », « Franck Un rayon de soleil », « Mimi pour la vie » et « Semeurs d'étoiles ».

Je tiens à remercier Dr. Marie Castets, Dr. Françoise Dantzer, Dr. Jacques Grill et Dr Eddy Pasquier pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour le temps que vous avez consacré à l'évaluation de mon travail. Merci également à Véronique Bruban pour avoir supervisé l'avancement de mon travail de mi-thèse, mais aussi pour ton aide au laboratoire.

Merci au Pr. Natacha Entz-Werlé pour votre confiance et pour l'autonomie dont j'ai pu bénéficier tout au long de ce projet, qui m'ont permis de découvrir et de développer une grande variété d'approches expérimentales. Merci également pour votre aide précieuse dans la rédaction des publications et de ce manuscrit.

Merci au Dr Monique Dontenwill pour ton accueil dans ton équipe, pour ton écoute et ton dynamisme. Tu as toujours été présente et disponible pour me conseiller, me rassurer et me motiver autour de notre dizaine de cafés quotidiens (j'exagère à peine). Merci pour ces délicates attentions de Noël et de Pâques, avec nos petits chocolats qui nous attendaient sur le bureau.

Un grand merci également au Dr Sophie Martin, qui m'aura entendu râler, la faute à des murs bien trop fins, lors de mises au point laborieuses de protocoles... Mes entrées de ninja dans ton bureau auront fait trépider ton rythme cardiaque plus d'une fois, mais elle tient bon la Sophie ! Merci pour tes encouragements constants et ta bienveillance. Je n'oublierai pas non plus nos fous rires nerveux, mais aussi nos cernes suite aux accidents pipi-popo nocturnes de nos jeunes toutous, que nous avons accueillis à la même période.

Merci beaucoup à Stéphanie Le Gras pour toutes tes superbes analyses, ta patience, ta réactivité et le temps que tu as consacré à mon travail. Merci à Carole Mura et au Dr Hélène Burckel pour votre aide précieuse dans les irradiations de nos lignées, votre disponibilité et vos encouragements constants tout au long de ma thèse. Un grand merci également au Pr Georges Noël, au Dr Erika Cosset, au Dr Izzie Namer, au Dr Benoit Lhermitte, et à toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer tout au long de cette thèse et qui auront grandement contribué à ce travail.

Merci à toi Hassiba, pour ton aide précieuse dans les analyses métabolomiques et le temps que tu m'as consacré malgré la charge de travail que tu supportes déjà... J'espère que tu pourras enfin te consacrer davantage à tes travaux de thèse.

Merci à Mélanie Gleyzes et à Thibault Honegger pour leur précieux conseils dans la mise en culture de nos neurones quelque peu capricieux. Notre collaboration a été très enrichissante et m'a permis de renouer avec mes racines de master en neurosciences cellulaires.

Merci à Romain Vauchelles, que je n'ai cessé d'embêter avec tous ces casse-têtes sur ImageJ ! La pertinence et l'efficacité de tes macros ont grandement contribué aux résultats de ce projet et m'ont fait gagner un temps précieux.

Merci à Andreas Reichert et Baylar Zarbaliyev pour votre disponibilité et votre réactivité dans vos « livraisons » de nanoparticules ! Merci pour vos conseils et votre aide dans la mise au point de nos expériences.

Merci à Marlyse (et bonne retraite !), Ingrid et Anne pour votre disponibilité face à nos innombrables demandes de commandes en dernière minute. Merci également pour votre écoute et votre soutien tout au long de ma thèse.

Merci à Maria, Marie-Claude, Agathe, Vincent et à tou(te)s les étudiant(e)s que j'ai pu encadrer pendant ces heures de monitorat où la convivialité et la bonne humeur étaient omniprésentes malgré les semaines de TP chargées.

Merci à Anne et à toutes les jeunes graines de science de la classe de CE2/CM1 de l'école de Lispheim pour votre curiosité et pour ces moments de convivialité scientifique, de réflexion et de partage autour de nos volcans rouges et volcans gris. J'espère que vous aurez finalement réussi à ramasser toute la semoule dans les salles de classe et que la peinture part au lavage...

Merci à Sophie F, Mélissa, Omblin, Jérôme, Alexis, Tania et tous les membres de notre équipe pour votre bonne humeur, votre aide et votre soutien quotidien, toujours soucieux de savoir si « je survivais » ! Bon courage pour la fin de ta thèse Mélissa. Accroche-toi et comme tu dirais si bien : « Ça vaaaaaaaa » ! Ton tour viendra à toi aussi et tu pourras aller hurler au sommet du Silver Star, sans te faire juger !

Mille et un mercis à ma chère partenaire de galère et désormais docteure, Marina Pierrevelcin. Sans doute ma plus belle rencontre au cours de cette thèse et la preuve, si l'en fallait une, que les valeurs humaines font les plus belles forces dans la collaboration professionnelle et scientifique. Merci pour ton amitié, pour tous ces délires inexplicables, ces fous rires, ces instants ronchons mutuels (oui, je tenais à rectifier que je n'étais pas le seul à râler !). Tellement douée et bien trop modeste, j'espère que l'avenir saura te donner confiance en toi. Les collègues comme toi sont rares et précieux. Je te souhaite une vie pleine de bonheur et de réussite, tu le mérites amplement. Merci pour tout Nanaaa.

Une pensée particulière et non sans émotion pour le Dr. Isabelle Lelong-Rebel, qui nous a quitté beaucoup trop tôt. Vous incarnerez éternellement à mes yeux une scientifique passionnée, pleine de curiosité et de bienveillance. Une femme tellement riche de connaissances, qu'elle se faisait un plaisir de partager en toute humilité autour d'un bon café ou d'un chocolat chaud. J'aurais tellement aimé partager et fêter avec vous la concrétisation de mon travail de thèse, mais je suis sûr que vous continuez d'observer et d'étudier ces mystérieuses cellules quelque part là-haut. Merci pour tout ce que vous m'avez enseigné, Mamie culture.

Un merci inconditionnel à mes vieux « darons » (je sais que vous apprécierez particulièrement ce surnom...), Panpa et Mamoune, pour tous vos sacrifices et votre soutien (tant moral que financier !) au cours de ces longues années d'études qui arrivent enfin à leur terme. Tout ceci a été possible avant tout grâce à vous. Merci de m'avoir appris à grandir, de m'avoir transmis des valeurs humaines et morales, mais aussi votre goût de l'effort, votre rigueur et votre aspiration au travail bien fait. Je n'ai jamais manqué de rien et je vous en serai éternellement et infiniment reconnaissant. Vous resterez mes modèles et guiderez mes décisions tout au long de ma vie. Sans oublier bien sûr mon cher petit frère, dont je suis tellement fier. Ton soutien et nos petits moments de complicité et d'évasion devant un bon match, un bon film ou simplement à discuter de tout et de rien, ont été tellement précieux. Nous aurons enfin à nouveau du temps pour partager nos passions communes !

Merci du fond du cœur à toute ma famille, belle-famille, à mes oncles, à mes tantes et à mes chers et innombrables cousins et cousines. Vous constituez des piliers inébranlables de ma vie et je vous dois tellement à vous aussi. 2022 aura été une année particulièrement riche en mariages et en fêtes de famille. Des instants de folie et de rire précieux, entouré de vous tous, et une bouffée d'oxygène inestimable pour moi dans ces périodes de stress et de doutes.

Un profond merci à mes amis et tout particulièrement aux membres de notre « Meute ». Tout a commencé dans le bac à sable de notre école maternelle, sous la surveillance rapprochée de Régine et Madeleine... 26 ans plus tard et après des centaines de 180, de sonne-tailles, d'excursions nocturnes en forêt, de constructions de cabanes, de combats Magic, de chutes à vélo, de soirées cinéma, Halloween, jeux de société et j'en passe, nous voilà encore et toujours réunis avec autant de plaisir à l'idée de nous retrouver. Merci d'avoir toujours été là, je ne serais rien sans vous. Je vous dois énormément et je me réjouis déjà de nos prochaines aventures.

Et bien évidemment... un immense merci rempli d'amour à ma Choupi avec qui je partage ma vie depuis bientôt 5 ans. Tu as été d'un soutien inconditionnel et tu auras sans doute supporté et encaissé autant que moi mon stress et mes doutes tout au long de cette thèse. Merci pour ta patience, pour ton calme, pour tous les efforts que tu as fait pour me rendre la vie un peu plus facile lors de ce parcours tumultueux, au cours duquel j'aurais été trop souvent absent. J'espère qu'il portera ses fruits et puisse nous mener vers un avenir plus serein et rempli de belles surprises. Une nouvelle vie commence à présent pour nous deux et notre Woody, vers l'infini et au-delà...

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES.....	17
LISTE DES TABLEAUX	21
AVANT-PROPOS	23
INTRODUCTION	
I. ANATOMIE GENERALE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL (SNC).....	29
I.1. ANATOMIE GENERALE DE L'ENCEPHALE.....	29
I.1.1. Les hémisphères cérébraux	30
I.1.2. Les structures de la ligne médiane.....	31
I.2. ORGANISATION MORPHOLOGIQUE ET FONCTIONNELLE DU TISSU NERVEUX	33
I.2.1. Les neurones.....	33
I.2.2. Le microenvironnement cellulaire glial.....	38
I.2.3. La barrière hémato-encéphalique	41
I.2.4. La matrice extracellulaire cérébrale.....	43
I.3. ORIGINE DEVELOPPEMENTALE DU TISSU CEREBRAL DU SNC.....	43
I.3.1. Histogenèse pré-natale	43
I.3.2. Neurogenèse et maturation neuronale post-natales	44
II. LES GLIOMES DE HAUT-GRADE PEDIATRIQUES.....	46
II.1. GENERALITES SUR LES GLIOMES DE HAUT-GRADE PEDIATRIQUES	46
II.1.1. Définitions.....	46
II.1.2. Epidémiologie.....	47
II.1.3. Facteurs de risques.....	48
II.2. DIAGNOSTIC DES GHG PEDIATRIQUES	50
II.2.1. Symptomatologie.....	50
II.2.2. Diagnostic radiologique.....	51
II.2.3. Diagnostic anatomopathologique intégré.....	53
II.3. CLASSIFICATION DES GHG PEDIATRIQUES.....	53
II.3.1. La classification des tumeurs du SNC de l'OMS.....	54
II.3.2. Caractéristiques histologiques.....	57
II.3.3. Analyse histomoléculaire	58
II.3.4. Classification histo-moléculaire avancée des GHG pédiatriques.....	61
II.4. BIOLOGIE MOLECULAIRE DES GHG PEDIATRIQUES.....	65
II.4.1. Les mutations <i>drivers</i>	66
II.4.2. Anomalies moléculaires associées.....	70
II.4.3. Théorie de la gliomagenèse en pédiatrie.....	78
II.5. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES GHG PEDIATRIQUES	80
II.5.1. L'acte chirurgical.....	81
II.5.2. La radiothérapie.....	82
II.5.3. La chimiothérapie	83
II.5.4. Les thérapies ciblées	85
III. LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL HYPOXIQUE	89
III.1. NOTIONS DE NORMOXIE, DE PHYSIOXIE ET D'HYPOXIE	89
III.1.1. La normoxie	89
III.1.2. La physioxie cérébrale	89
III.1.3. L'hypoxie	90

III.2. ASPECTS MACROSCOPIQUES ET MICROSCOPIQUES DE L'HYPOXIE TUMORALE DANS LES GHG	91
III.2.1. L'hypoxie tumorale en imagerie	91
III.2.2. Aspects histologiques de l'hypoxie tumorale.....	93
III.3. LE ROLE DES FACTEURS HIF	95
III.3.1. Facteurs HIFs : les clés de l'adaptation tumorale à l'hypoxie	96
III.3.2. Régulation des HIFs relative à la pO ₂	98
III.3.3. Régulation indépendante de la pO ₂	102
III.4. CONSEQUENCES PRO-TUMORALES DE L'ACTIVATION DES FACTEURS HIF	109
III.4.1. La néoangiogénèse et la sécrétion de VEGF.....	109
III.4.2. Facteurs HIF et survie/apoptose des cellules tumorales	111
III.4.3. Les facteurs HIF et le renouvellement des cellules souches cancéreuses.....	114
III.5. IMPLICATIONS PRONOSTIQUES ET THERAPEUTIQUES DE L'HYPOXIE ET DES FACTEURS HIF DANS LES GHG PEDIATRIQUES.....	116
III.5.1. Rôles connus des facteurs HIF dans les GHG pédiatriques.....	116
III.5.2. Impact pronostic des facteurs HIF.....	117
III.5.3. Implications thérapeutiques des facteurs HIF	118
III.5.4. Ciblage moléculaire des facteurs HIF.....	120
IV. LES MODELES D'ETUDES IN-VITRO DES GHG.....	125
IV.1. LES LIGNEES DE CELLULES CANCEREUSES EN CULTURE 2D.....	125
IV.2. LES MODELES 3D DE TYPE SPHEROÏDE	127
IV.2.1. Les neurosphères	127
IV.2.2. Les sphéroïdes tumoraux multicellulaires (MCTS).....	127
IV.2.3. Les modèles 3D avec matrice extracellulaire.....	127
IV.2. LES ORGANOÏDES CEREBRAUX	128
IV.3. LES DISPOSITIFS MICROFLUIDIQUES.....	131
IV.3.1. Les dispositifs de type « <i>neurons-on-a-chip</i> »	131
IV.3.2. Les dispositifs multicellulaires stratifiés.....	131
IV.3.3. Les modèles microfluidiques 3D.....	132
OBJECTIFS DE LA THESE	135
MATERIEL ET METHODES	
I. CULTURE CELLULAIRE.....	139
I.1. DEVELOPPEMENT DE LIGNEES DE GHG DERIVEES DE PATIENTS.....	139
I.2. ENTRETIEN DES PDCLS.....	141
I.2.1. Repiquage des cellules en monocouches	141
I.2.2. Repiquage des cellules en neurosphères	142
I.2.3. Réensemencement des lignées	143
I.2.4. Congélation et stockage des PDCLS.....	143
I.3. RECONSTITUTION IN-VITRO DES CONDITIONS HYPOXIQUES	144
I.4. SUIVI DE LA PROLIFERATION DES PDCLS	144
I.5. PREPARATION DES COMPOSES.....	146
II. ETUDE DES CAPACITES MIGRATOIRES DES PDCLS.....	146
II.1. DEVELOPPEMENT DE SPHEROÏDES EN GOUTTES SUSPENDUES.....	146
II.2. SUIVI DE LA MIGRATION	147
II.3. MARQUAGE DES SPHEROÏDES.....	148
II.4. ANALYSE DES TESTS DE MIGRATION CELLULAIRE	148
III. DEVELOPPEMENT DE COCULTURES DE PDCLS ET DE NEURONES GLUTAMATERGIQUES	149

III.1. DIFFERENCIATION DES NEURONES GLUTAMATERGIQUES A PARTIR DES iPSCs	149
III.2. MARQUAGE DES CELLULES AVEC LES NANOPARTICULES.....	149
III.2.1. Marquage des lignées PDCLs	150
III.2.2. Marquage des neurones glutamatergiques	151
III.3. SUIVI DES COCULTURES A L'INCUCYTE® ZOOM	151
IV. ETUDE DES EXPRESSIONS PROTEIQUES DES MARQUEURS DE L'HYPOXIE PAR WESTERN-BLOT (WB)	151
IV.1. EXTRACTIONS PROTEIQUES DES PDCLs	151
IV.2. MIGRATION SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE ET TRANSFERT A SEC	152
IV.3. IMMUNODETECTION DES PROTEINES	153
V. ETUDE DE LA LOCALISATION ET DES NIVEAUX D'EXPRESSION DES FACTEURS HIF DANS LES PDCLs.....	153
V.1. IMMUNOMARQUAGE DES PDCLs CULTIVEES EN 2D.....	153
V.2. OBSERVATION DES LAMES AU MICROSCOPE CONFOCAL	154
V.3. ETUDE DE LA LOCALISATION DES FACTEURS HIF EN IF.....	155
VI. ETUDE DES EXPRESSIONS EN ARN DES FACTEURS HIF ET DES GENES CIBLES PAR RTQPCR.....	156
VI.1. EXTRACTION D'ARN DES PDCLs.....	156
VI.1.1. Lyse des PDCLs	156
VI.1.2. Extraction et purification de l'ARN des PDCLs	157
VI.1.3. Dosage et évaluation de la pureté des échantillons d'ARN au spectrophotomètre.....	157
VI.2. TRANSCRIPTION INVERSE DE L'ARN EN ADNC	158
VI.3. RTQPCR.....	158
VI.3.1. Lancement de la RTqPCR.....	158
VI.4. ANALYSE DES RESULTATS.....	159
VII. IDENTIFICATION DES GENES CIBLES DE HIF-2A PAR CUT&RUN SUR LES PDCLs.....	160
VII.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS ET SEQUENÇAGE	160
VII.2. SEQUENÇAGE ET ALIGNEMENT DES DONNEES	161
VII.3. PEAK CALLING	162
VII.4. ENRICHISSEMENT.....	162
VII.5. ANALYSE DES ENRICHISSEMENTS ASSOCIES AUX VOIES DE SIGNALISATION	162
VIII..... ANALYSES METABOLOMIQUES DE PDCLs DE GHG PEDIATRIQUES	164
VIII.1. CULTURE ET FIXATION DES PDCLs.....	164
VIII.2. QUANTIFICATION DES METABOLITES	164
IX. ETUDE DE LA RADIOSENSIBILITE DES PDCLs	164
IX.1. TESTS DE PROLIFERATION APRES IRRADIATIONS DES PDCLs	164
IX.2. EVALUATION DE LA RADIOSENSIBILITE DES PDCLs PAR DES TESTS γ H2AX.....	165
IX.2.1. Culture des PDCLs en Lab-teks™	165
IX.2.2. Quantification des foci H2AX en IF.....	166
X. ANALYSES STATISTIQUES	166

RESULTATS

REVUE SCIENTIFIQUE, PUBLIEE DANS CANCERS	171
Hypoxia Inducible Factors' Signaling in Pediatric High-Grade Gliomas: Role, Modelization and Innovative Targeted Approaches.....	171
ARTICLE N°1, SOUMIS AU JOURNAL CANCER DISCOVERY	187
HIF-2A OVEREXPRESSION DICTATES AGGRESSIVENESS ADDITIONALLY TO TP53 MUTATIONS IN H3.3K27M PEDIATRIC HIGH-GRADE GLIOMAS THROUGH RAS-MAPK AND WNT/βCATENIN PATHWAYS.....	187
<input type="checkbox"/> Introduction de ce travail	187
<input type="checkbox"/> Objectifs	187
<input type="checkbox"/> Méthodologie.....	188
<input type="checkbox"/> Discussion/Perspectives	235
ARTICLE N°2, SOUMIS AU JOURNAL CANCER RESEARCH	237
HIF-1α AND HIF-2α COMBINATORIAL TARGETING OR HOW TO REVERSE THEIR BALANCED ONCOGENIC IMPACT	237
<input type="checkbox"/> Introduction de ce travail	237
<input type="checkbox"/> Objectifs	237
<input type="checkbox"/> Méthodologie.....	238
<input type="checkbox"/> Discussion et perspectives.....	263
ARTICLE N°3, PUBLIÉ DANS JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS (JOVE).....	265
CO-CULTURE OF GLUTAMATERGIC NEURONS AND PEDIATRIC HIGH-GRADE GLIOMA CELLS INTO MICROFLUIDIC DEVICES TO ASSESS ELECTRICAL INTERACTIONS.....	265
<input type="checkbox"/> Introduction de ce travail	265
<input type="checkbox"/> Objectifs	265
<input type="checkbox"/> Méthodologie.....	266
Données complémentaires	283
<input type="checkbox"/> Discussion et perspectives.....	287
CONCLUSION GENERALE	289
BIBLIOGRAPHIE	293
ANNEXE 1	323
Hypoxic Environment and Paired Hierarchical 3D and 2D Models of Pediatric H3.3-Mutated Gliomas Recreate the Patient Tumor Complexity.....	323
ANNEXE 2	347
A DNA Repair and Cell Cycle Gene Expression Signature in Pediatric High-Grade Gliomas: Prognostic and Therapeutic Value.....	347
ANNEXE 3	365
Focus on Hypoxia-Related Pathways in Pediatric Osteosarcomas and Their Druggability.....	365
ANNEXE 4	383
Biological relevance of RGD-integrin subtype-specific ligands in cancer	383
RESUME.....	409

Liste des abréviations

2D : 2 dimensions
3D : 3 dimensions
ACVR1 : Activin A receptor, type I
ADC: Apparent diffusion coefficient
ADN : Acide désoxyribonucléique
ALK2 : Activin receptor-like kinase-2
ALT : Alternative Lengthening of Telomeres
AMP : Adénosine monophosphate
APOE : Apolipoprotéine E
ARN : Acide ribonucléique
ARNT : Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP : Adenosine triphosphate
ATRX : alpha-thalassémie/retard mental lié à l'X
BER: Base excision repair
BHE: Barrière hématoencéphalique
bHLH: basic helix-loop-helix
BRAF : v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BSA: Bovine Serum Albumin
CAT: Catalase
CDKN2A: cyclin dependent kinase inhibitor 2A
Chol: Choline
CIRC: Centre international de recherche sur le cancer
CO2: Dioxyde de carbone
Cr : Créatine
CSC : Cellule souche cancéreuse
CUT&RUN: Cleavage Under Target & Release Using Nuclease
D2O : Oxyde de deutérium ou eau deutérée
DAB : diaminobenzidine
DAPI: 4',6-diamidino-2-phénylindole
DAXX : Death domain-associated protein 6
DDR : DNA Damage Response
DIPG : Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas
DMG : Diffuse Midline Glioma
DMSO: Diméthylsulfoxyde
DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EAAT: excitatory amino acid transporter
EED: Embryonic Ectoderm Development
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
EPAS1: Endothelial PAS domain-containing protein 1
ESCs: Endothelial stem cells
EZH2 : Enhancer of zeste homolog 2
FGFR : Fibroblast growth factor receptors
FLAIR : Fluid Attenuated Inversion Recovery
FOP : Fybrodysplasie ossifiante progressive
G34R : Mutation GGG → AGG, glycine → arginine en position 34
GABA : gamma-aminobutyric acid
GFP : Green Fluorescent Protein
GHG: Gliome de haut-grade

GLUT : Glucose transporter
H1-4 : Histones 1-4
H2O2: peroxyde d'hydrogène
H3 : Histone 3
H3F3A : Gène H3 histone, family 3A
H3K27M : Mutation de l'histone 3 AAG → ATG, lysine → méthionine en position 27
H3K27me3: triméthylation de la lysine en position 27 de l'histone 3
HIF: Hypoxia Inducible Factor
HIST1H3B/C :
HRE : Hypoxia Responsive Element
IDH1 : Isocitrate dehydrogenase 1
IF: Immunofluorescence
IGR : Institut Gustave Roussy
IHC : Immunohistochimie
INCA : Institut National du Cancer
iPC : induced pluripotent cell
iPSC : induced pluripotent stem cell
IR : Irradiation
IRM : Imagerie par résonance magnétique
JARID2 : jumonji, AT rich interactive domain 2
K36 : Lysine en position 36
KDM: Histone lysine demethylase
LAT : L-type / large neutral amino acid transporter 1
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LCS : Liquide cérébrospinal
LDHA: Lactate dehydrogenase A
LZIP : C-terminal leucine zipper
MCT: monocarboxylate transporters
MCTS: Multicellular Tumour Spheroid
MLH1/2 : MutL Homolog 1/2
mmHg : millimètres de Mercure
MMR : Mismatch repair
MNL : Monolayer = monocouche
MSH6 : mutS homologue 6
MSI : Microsatellite Instability
MYC/MYCN: MYC Proto-Oncogene, du nom Myelocytomatosis
N2 : Azote
NAD/NADH : Nicotinamide adenine dinucleotide/forme oxydée
NEAA : Non essential amino acids
NF1 : Neurofibromatose 1
NGC : noyaux gris centraux
nIPC : neural induced pluripotent cell
NS : Neurosphère
NSC : Neural stem cells
N-TAD: N-terminal transactivation domain
NTRK : neurotrophic tyrosine receptor kinase
O2 : Oxygène
ODD : oxygen-dependent degradation domain
OH: Radical hydroxyde
OMS : Organisation Mondiale de la Santé

oPC : oligodendroglial pluripotent cell
oPIC : oligodendrocyte intermediate progenitor cells
OXPHOS : Phosphorylation oxydative
PA : Potentiel d'action
PARP1 : Poly [ADP-ribose] polymerase 1
PAS : Per-Arnt-Sim
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDCL: Patient Derived Cell Line
PDFGRA: platelet-derived growth factor receptor A
PDGF : platelet-derived growth factor
PDH1: Pyruvate dehydrogenase 1
PDK1: Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 1
PFA : Paraformaldéhyde
PFK: 6-phosphofructo-1-kinase
PHD : prolyl hydroxylase domain
PI3 : Phosphoinositide 3
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol-2-phosphate
PIP3 : phosphatidylinositol-3-phosphate
PIQ : Plate-forme d'imagerie quantitative
PMS2 : Postmeiotic Segregation Increased 2
pO2 : Pression partielle en oxygène
PRC2 : Polycomb Repressive Complex 2
PtiO2 : Pression partielle tissulaire en oxygène
RAS : Rat sarcoma virus
RBAP : RetinoBlastoma-Binding Protein
ROS : Reactive oxygen species
RT : Reverse Transcriptase
RTK : Récepteur à activité tyrosine-kinase
SETD2 : SET domain containing
SNC : Système nerveux central
SNP : Système nerveux périphérique
SUZ1 : SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
SVZ : Subventricular zone
TBS: TRIS Buffered Saline
TC : Tumeur cérébrale
TCA : tricarboxylic acid cycle
TCGA : The Cancer Genome Atlas
TERT : telomerase reverse-transcriptase
TP53 : tumor protein 53
TrkB : tyrosine receptor kinase B
UBB : Ubiquitin B
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VEGFR : Vascular endothelial growth factor receptor
VGLUT : vesicular glutamate transporter
VHL : Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor
WT : Wild-type
XRCC1 : X-Ray Repair Cross Complementing 1

Liste des figures

Figure 1: Incidence des cancers pédiatriques selon la localisation cancéreuse (2007 à 2011)	23
Figure 2: Représentations schématiques de l'anatomie générale du cerveau humain.....	29
Figure 3 : Représentation schématique des aires fonctionnelles du cortex cérébral chez l'Homme et des fonctions cognitives associées.....	30
Figure 4 : Systématisation des nerfs crâniens du tronc cérébral	32
Figure 5: Représentation schématique des structures de la ligne médiane du cerveau humain.....	32
Figure 6 : Représentation schématique des populations cellulaires constituant le tissu cérébral	33
Figure 7 : Morphologie générale d'un neurone	34
Figure 8: Représentation des différents types de neurones distingués selon leur morphologie.....	35
Figure 9 : Représentation d'une synapse hypothétique illustrant la coopération des neurones glutamatergiques et GABAergiques dans la régulation fonctionnelle de la transmission synaptique.	37
Figure 10: Représentation schématique de la synapse tripartite.....	39
Figure 11 : Représentations schématiques et microscopiques des états enveloppé et « déroulé » (image conceptuelle) des oligodendrocytes myélinisants.	40
Figure 12: Organisations morphologique et fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique.....	42
Figure 13: Processus de développement pré- et post- natale du cerveau.....	45
Figure 14: Représentation schématique des facteurs intrinsèques et extrinsèques impliqués dans la différenciation oligodendrogliale et la myélinisation axonale.	46
Figure 15: Incidence annuelle moyenne des tumeurs du SNC par âge et par degré de malignité.	47
Figure 16 : Distribution des tumeurs du SNC selon les types histologiques chez l'enfant de 0 à 14 ans.	48
Figure 17: IRM de gliomes de haut-grade pédiatriques.....	52
Figure 18 : Critères microscopiques de caractérisations et de grading des gliomes	57
Figure 19 : Chromatogrammes de séquençage Sanger représentant des mutations driver de type K27M et G34R affectant les gènes H3F3A et/ou HIST1H3B dans des GHG pédiatriques comparé à un ADN normal correspondant.	59
Figure 20: Profil immunohistochimique d'un GHG pédiatrique de la ligne médiane avec mutation H3.3K27M. 60	
Figure 21 : Sous-groupes de GHG pédiatriques définis selon la mutation driver associée à l'ensemble de leurs proximités biologiques et cliniques.....	64
Figure 22 : Profils moléculaires et caractéristiques cliniques associées des sous-groupes de GHG pédiatriques. 65	
Figure 23: Représentation schématique de l'assemblage de la chromatine et de sa régulation par les histones. ...	66

Figure 24 : Conséquences des mutations H3K27M sur le fonctionnement du complexe PRC2 et la méthylation des histones.	68
Figure 25: Modèle représentatif des conséquences fonctionnelles de la mutation H3G34R.....	69
Figure 26 : Rôle suppresseur de tumeur de p53 en réponse au stress cellulaire.	71
Figure 27 : Mécanismes de maintenance / élongation télomériques dans les GHG.....	73
Figure 28 : Conséquences fonctionnelles de la mutation R206H sur le fonctionnement du récepteur ACVR1....	75
Figure 29 : Principales voies de signalisation médiées par les RTKs et conséquences sur le phénotype tumoral	76
Figure 30: Hypothèse de l'implication des NSC dans la gliomagenèse	79
Figure 31 : Protocole Stupp combinant radiothérapie et chimiothérapie pour le traitement des glioblastomes. ...	84
Figure 32: Taux de réponses objectives des gliomes de haut-grade adultes et pédiatriques aux chimiothérapies conventionnelles.	85
Figure 33 : Schématisation des différentes approches de thérapies ciblant les voies de signalisation altérées dans les GHG pédiatriques.....	86
Figure 34 : Régulation des cellules souches par le microenvironnement hypoxique.....	91
Figure 35 : Visualisation des zones hypoxiques/nécrotiques de GHG en IRM.	92
Figure 36 : Structures en pseudopallissades observées dans des coupes de GBM.....	93
Figure 37 : Mécanismes potentiels de formation des pseudopallissades (.....)	94
Figure 38 : Marquages immunohistochimiques des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α en dans des GHG pédiatriques..	95
Figure 39 : Structures des différentes isoformes de la sous-unité HIF- α	97
Figure 40 : Régulation des facteurs HIF- α dépendante de la pO ₂	99
Figure 41 : Dynamiques des stabilisations protéiques de HIF-1 α et HIF-2 α en fonction des concentrations en O ₂ et de la durée de l'exposition à l'hypoxie.....	100
Figure 42 : Régulations différentielles de HIF-1 α et HIF-2 α en fonction de la durée de l'hypoxie	100
Figure 43 : Comparaison des voies métaboliques associées à la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et la glycolyse aérobie.	103
Figure 44 : Schéma récapitulatif des principales voies métaboliques impliquées dans les cellules tumorales en prolifération et modulées par les facteurs HIF.....	105
Figure 45 : Production des différentes espèces réactives à l'O ₂ (ROS).....	106
Figure 46 : Interactions entre les facteurs HIF et les ROS en conditions hypoxiques	107
Figure 47: Récapitulatif des voies de signalisation intervenant dans la régulation des facteurs HIF et dans la tumorigénèse.	108

Figure 48 : Dépendance de l'expression de HIF-2 α à l'axe PI3K/mTORC2 dans les lignées issues de neuroblastomes SK-N-BE(2)c et KCN-69n.....	109
Figure 49 : Régulation de la signalisation de p53 par l'hypoxie.....	112
Figure 50 : Modèle conceptuel de rétrorégulation entre HIF-1 α et p53.....	113
Figure 51 : Modèles conceptuels d'interaction entre les facteurs HIF et la voie MYC/MYCN.....	114
Figure 52 : Le rôle central de l'hypoxie et des facteurs HIF dans différents processus oncogéniques.....	115
Figure 53 : Mode d'action des inhibiteurs des HIF- α à différentes étapes de la voie de régulation hypoxique..	121
Figure 54 : Structure moléculaire du complexe hétérodimérique HIF-2 α /HIF-1 β et site de liaison des molécules de PT2385.....	123
Figure 55: Progression du développement d'un organoïde cérébral à partir de cellules souches pluripotentes humaines.....	129
Figure 56 : Principes de développement de différents organoïdes de gliomes.....	130
Figure 57 : Principales techniques de dispositifs microfluidiques cérébraux de type « brain-on-a-chip ».	133
Figure 58 : Représentation schématique des étapes de dérivation de lignées de GHG pédiatriques à partir de biopsies de patients (PDCLs).....	139
Figure 59 : Exemple de suivi de la confluence (haut) ou de la taille des sphères (bas) à l'Incucyte® ZOOM. ..	145
Figure 60 : Procédure de l'obtention de sphéroïdes en gouttes suspendues	147
Figure 61 : Exemple de sélection manuelle du sphéroïde (gauche) et détection des cellules migrantes par la macro « Dispersion sphères 2D 1.7 » (droite).	148
Figure 62 : Protocole global de marquage des cellules aux nanoparticules et mise en coculture des PDCLs avec les neurones glutamatergiques	150
Figure 63: Schéma récapitulatif des étapes de purification sur colonnes de l'ARN des PDCLs (QIAGEN RNEasy Plus Mini Kit Handbook).....	157
Figure 64 : Représentation conceptuelle du principe de la technique de séquençage de CUT&RUN (ArtWork réalisé par Mannan369, Wikipédia)	163
Figure 65 : Protocole expérimental des irradiations des PDCLs avec pré-traitement ou non au PT2385 (antagoniste de HIF-2 α).....	166
Figure 66 : Marquages de PDCLs (BT68) avec des nanoparticules polymériques fluorescentes émettant dans le vert ou dans le rouge.....	285
Figure 67 : Développement de nouveaux modèles de PDCLs à partir de biopsies de patients atteints de GHG pédiatriques.....	286

Liste des tableaux

Tableau 1: Extrait de la 5ème révision de la classification des tumeurs du SNC selon l’OMS.....	56
Tableau 2: Tableau issu de la classification de l’OMS de 2021 définissant les critères de stratification des GHG	60
Tableau 3 Etudes et essais cliniques récents utilisant des biopsies chirurgicales et dans la prise en charge des patients atteints de GHG de la ligne médiane mutés pour H3K27M.	82
Tableau 4 : Taux d’oxygénations physiologiques de différents organes et de leurs tumeurs respectives.....	90
Tableau 5: Stabilisation et activation des HIF- α en hypoxies aiguë et chronique dans différentes lignées cellulaires in vitro.....	101
Tableau 6 : Corrélations observées entre les expressions des HIF- α et l’aggravation du pronostic dans différents cancers	117
Tableau 7: Caractéristiques cliniques des GHG pédiatriques mutés H3.3K27M et utilisés pour la dérivation des PDCLs de cette thèse.....	126
Tableau 8: Composition des milieux de culture des PDCLs : volumes correspondants pour la préparation de 50mL de milieu.	141
Tableau 9 : Densités d’ensemencement pour l’amplification des différentes PDCLs selon la taille de la flasque utilisée.....	143
Tableau 10 : Densités d’ensemencement des PDCLs dans les différentes plaques de culture cellulaire selon le type d’expérimentation	145
Tableau 11 : Récapitulatif des concentrations utilisées pour les différentes drogues par type d’expérience	146
Tableau 12 : Liste des anticorps et dilutions utilisés en WB et en IF.....	155
Tableau 13: Réglages des paramètres du microscope confocal pour l’acquisition des images en immunofluorescence.....	155
Tableau 14 : Conditions de culture des échantillons et normalisations utilisées dans chaque lignée pour l’étude de la modulation des gènes cibles des HIFs en RTqPCR	156
Tableau 15 : Composition du milieu réactionnel pour la RTqPCR.....	158
Tableaux 16: Caractéristiques des primers utilisés pour la RTqPCR.....	159
Tableau 17 : Nombre de cellules utilisées pour les différents échantillons dans le cadre du CUT&RUN.....	160
Tableau 18 : Caractéristiques des données issues du CUT&RUN et analysées dans ce projet : nombre de lectures alignées sur le génome d’Homo sapiens.....	161
Tableau 19 : Nombre de cellules ensemencées par puits dans les lab-teks™ 8 puits pour les tests d’irradiations	165

Avant-propos

Chaque année en France, près de 2500 cas de cancers sont diagnostiqués chez les enfants, adolescents et jeunes adultes. Les nombreux progrès de la médecine et de la recherche ont permis d’aboutir aujourd’hui à une guérison de près de 80% des patients.

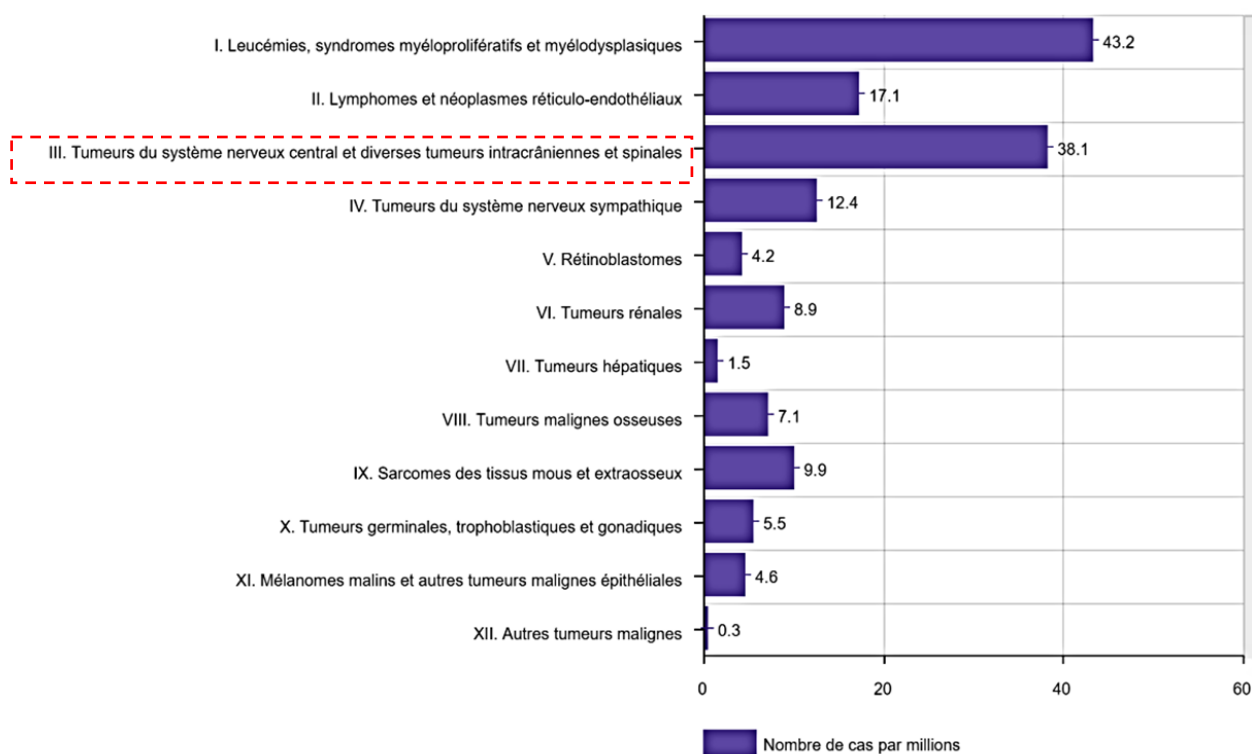


Figure 1: Incidence des cancers pédiatriques selon la localisation cancéreuse (2007 à 2011)

Jusqu’en 2010, étaient répertoriés les enfants de moins de 15 ans résidant en France métropolitaine. Depuis 2011, l’enregistrement a été étendu aux adolescents de moins de 18 ans et aux Départements d’Outre-Mer (Martinique, Guadeloupe, Guyane, Réunion). (Registre National des tumeurs solides de l’enfant (RNTSE), 2017)

Parmi ces tumeurs solides de l’enfant et de l’adolescent, les tumeurs du système nerveux central (SNC) et plus particulièrement les tumeurs cérébrales (TC), sont les plus fréquentes. Elles sont à l’origine de près de 25% de cancers pédiatriques, ce qui en fait la seconde cause de cancer chez l’enfant après les leucémies (Figure 1) (INCA, 2017). On estime que chaque année, près de 500 cas de tumeurs cérébrales sont diagnostiqués chez l’enfant en France et jusqu’à 3000 en Europe (INCA, 2017). Dans près de 70% des cas, ces tumeurs cérébrales dérivent des cellules gliales qui constituent le tissu cérébral. La plupart de ces gliomes pédiatriques sont dits de bas-grade et sont de plutôt bon pronostic, mais 15 à 20% sont des gliomes de haut-grade (GHG). Ces tumeurs montrent une importante hétérogénéité intra- et inter- tumorales et se

distinguent notamment par une prolifération rapide, associée à une infiltration des tissus cérébraux sains. Ces différents critères les rendent particulièrement agressives et résistantes à la plupart des approches thérapeutiques actuelles. Malgré l'intensification des recherches et des essais cliniques au cours des dernières décennies, les médecins sont toujours en quête d'un arsenal thérapeutique efficace pour lutter contre ces GHG, qui représentent aujourd'hui la première cause de mortalité liée au cancer chez l'enfant (Darlix et al., 2017; Sung et al., 2021).

Cet objectif s'est inscrit dans un contexte de développement de nouveaux outils de séquençages génomiques et d'analyses moléculaires, génétiques et épigénétiques. Ces approches ont fait entrer la recherche contre le cancer dans une nouvelle ère, visant à caractériser les propriétés intrinsèques des tumeurs. Elles ont permis d'identifier différents gènes impliqués dans divers processus oncogéniques d'une grande variété de cancers. Ils permettent de mieux caractériser ces tumeurs, ouvrant la voie vers la médecine personnalisée. Dans le cadre des GHG, l'identification de mutations clés associées aux histones a notamment permis de distinguer, sur le plan moléculaire, des entités anatomo-pathologiques de la ligne médiane spécifiques chez l'enfant, soulignant une origine tumorale différente de celle chez l'adulte. Cette constante évolution s'est illustrée par une révision régulière de la classification des tumeurs du SNC selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) au cours des dernières années.

Cette introduction visera à présenter et décrire les caractéristiques intrinsèques des gliomes malins et plus particulièrement des GHG pédiatriques. Elle soulignera notamment la complexité et l'hétérogénéité de ces tumeurs, dans leurs aspects histologiques, génétiques et moléculaires. Cette hétérogénéité implique une classification spécifique des GHG et nous permet d'approcher de façon partielle les résistances intrinsèques des cellules malignes aux traitements actuels.

Cependant, la complexité et l'hétérogénéité de ces tumeurs ne se limitent pas à leurs propriétés intrinsèques. En effet, celles-ci se développent au sein d'un microenvironnement cellulaire complexe avec lequel elles sont en constante interaction. Les GHG évoluent au sein du tissu nerveux, siège d'une multitude d'interactions biochimiques et bioélectriques à travers les réseaux des cellules nerveuses et des cellules gliales. De même, la prolifération rapide et anarchique des GHG reconstitue un microenvironnement tumoral hypoxique dans des localisations spécifiques du cerveau, qui favorisent le développement des cellules souches sous la gouverne de facteurs de transcription induits par l'hypoxie (HIF). La seconde partie de cette introduction se penchera sur l'activation de ces facteurs par le microenvironnement hypoxique

de ces tumeurs et leurs rôles dans le développement et l'évolution des tumeurs et des GHG pédiatriques. Enfin, une dernière partie consistera à présenter différents modèles d'études pré-cliniques in-vitro qui permettent aujourd'hui de combiner les facteurs intrinsèques des GHG et ceux associés au microenvironnement tumoral. Certaines de ces approches ont notamment été développées et optimisées au cours de ce travail de thèse.

INTRODUCTION

I. ANATOMIE GENERALE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL (SNC)

Le SNC est composé de l'encéphale et de la moëlle épinière. Il constitue un centre de traitement chargé d'intégrer les informations sensorielles en provenance du système nerveux périphérique (SNP) (ganglions et réseaux des nerfs de la tête, du tronc et des membres), de coordonner les réponses motrices et de réguler le fonctionnement des autres organes du corps. La plupart de ces fonctions sont sous le contrôle de l'encéphale, qui relaie les informations à travers la moëlle épinière. Le SNC et le SNP sont associés à un système nerveux végétatif (ou autonome) qui assure l'innervation des vaisseaux, des viscères et des glandes.

I.1. Anatomie générale de l'encéphale

Anatomiquement, l'encéphale peut être régionalisé en distinguant les structures médianes et les structures hémisphériques, ou les zones sus- et sous-tentorielles en fonction de leur position par rapport à la tente du cervelet (Figure 2).

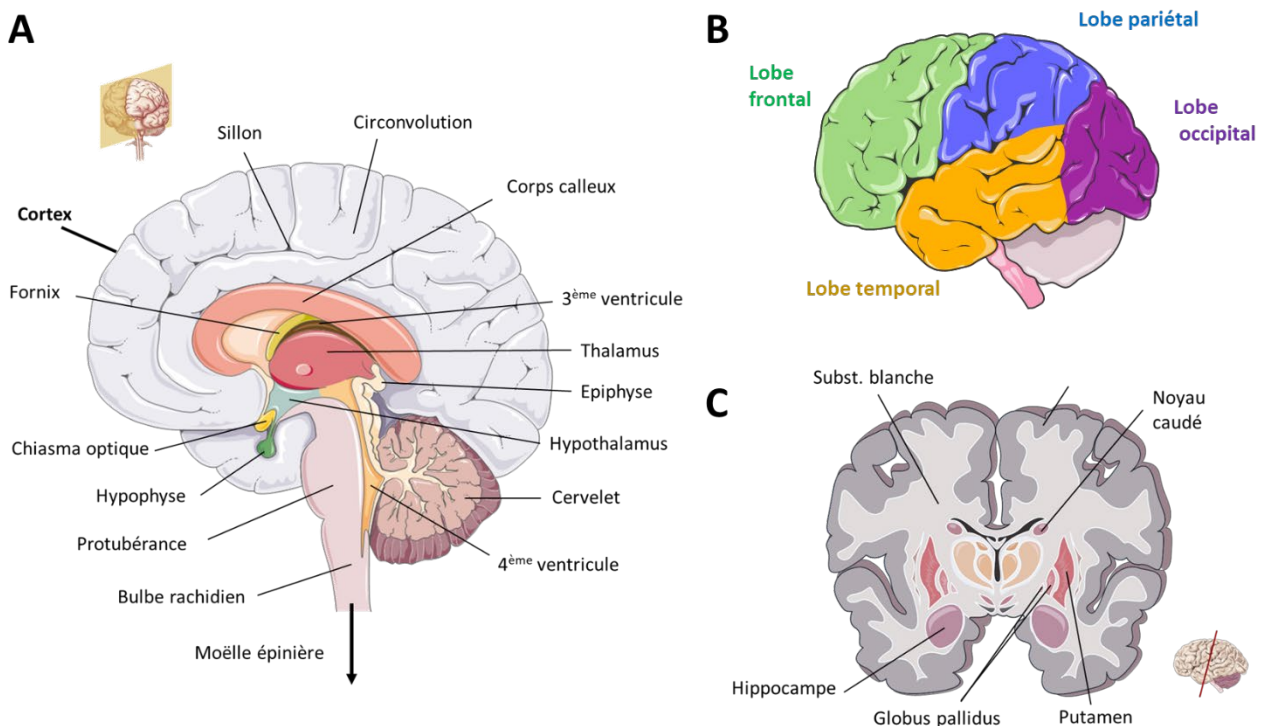


Figure 2: Représentations schématiques de l'anatomie générale du cerveau humain. (A) Coupe sagittale médiane du cerveau (B) Organisation des lobes du cortex cérébral. (C) Coupe frontale médiane. (Modifiés à partir de Medical Art, Servier).

I.1.1. Les hémisphères cérébraux

Les hémisphères cérébraux forment une structure bilatérale appelée télencéphale, qui recouvre le diencéphale et le tronc cérébral. Leur surface constitue le cortex cérébral, parcouru par des circonvolutions et des sillons qui délimitent quatre lobes hémisphériques : frontal, pariétal, temporal et occipital. Ce cortex est constitué de la substance grise, qui regroupe l'essentiel des corps cellulaires des neurones et peut être subdivisée en différentes aires fonctionnelles qui sous-tendent les fonctions cognitives supérieures (Figures 2 et 3). Les fibres axonales myélinisées de ces neurones se projettent en faisceaux vers les régions médianes et y forment la substance blanche. Elles permettent la communication du cortex avec les autres aires corticales et sous-corticales. Au centre de cette substance blanche se trouvent des noyaux gris centraux (NGC) (ou ganglions de la base), constitués du striatum (noyau caudé et putamen), du globus pallidus, des noyaux sous-thalamiques et du noyau accumbens. Ils reçoivent la majorité de leurs signaux afférents en provenance du cortex et interviennent dans la régulation de la motricité volontaire. Ils jouent le rôle de médiateurs avec les centres moteurs situés dans les structures médianes.

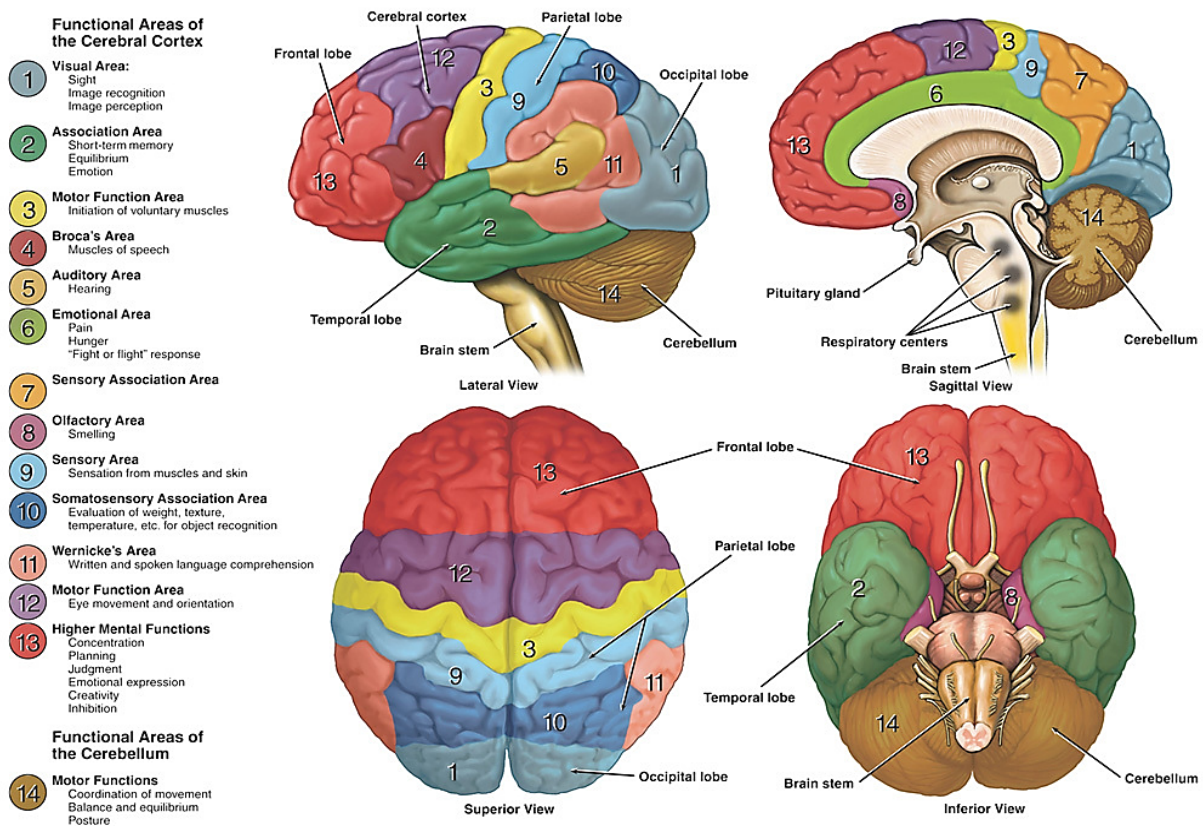


Figure 3 : Représentation schématique des aires fonctionnelles du cortex cérébral chez l'Homme et des fonctions cognitives associées. (Neuroanatomy, Dana Foundation)

I.1.2. Les structures de la ligne médiane

Les structures médianes peuvent être subdivisées en trois zones : le diencephale, le tronc cérébral et le cervelet (Figure 4).

- Le **diencephale** est situé à la jonction entre les hémisphères cérébraux et contient le thalamus, l'hypothalamus et l'épithalamus. Le thalamus est un centre d'intégration et de relais des informations sensorielles et des efférences motrices qu'il transmet au cortex. L'hypothalamus a une fonction régulatrice essentielle du système nerveux autonome et du système endocrinien par son étroite relation avec l'hypophyse. L'épithalamus gère la sécrétion de mélatonine et contribue au contrôle du sommeil et de fonctions végétatives comme la faim ou la soif.

- Le **tronc cérébral** se situe sous le diencephale et se prolonge par la moëlle épinière. Il peut se subdiviser en trois zones : le bulbe rachidien, le pont (ou protubérance) et le mésencéphale. Le tronc cérébral contient des amas de substance grise, principalement représentés par les noyaux gris des nerfs crâniens (Figure 5). Il constitue un centre régulateur de nombreuses fonctions vitales et autonomes, notamment cardiaques, respiratoires ou vasomotrices. L'essentiel du corps du tronc cérébral est constitué de la substance blanche. On distingue globalement les voies segmentaires (nerfs crâniens), les voies intersegmentaires (= voies « courtes ») et les voies suprasegmentaires (voies de projection ou voies « longues »). Les voies suprasegmentaires font le lien entre le cortex et la moëlle épinière à travers entre les faisceaux ascendants sensoriels et les faisceaux descendant moteurs. On y retrouve par exemple la voie corticospinale où les neurones du cortex moteur (lobe frontal) projettent leurs axones vers la moëlle épinière pour activer les motoneurones et les interneurones de la corne antérieure (Smith and DeMyer, 2003).

- Le **cervelet** se subdivise lui-même en une structure médiane appelée vermis et un cortex cérébelleux contenant les noyaux cérébelleux. Il joue un rôle majeur dans la coordination et la synchronisation motrices ; il intègre une multitude d'informations sensorielles en provenance de l'aire motrice, des noyaux du tronc cérébral, des récepteurs sensoriels proprioceptifs et des centres visuels et relaie ces informations aux centres moteurs corticaux et sous-corticaux.

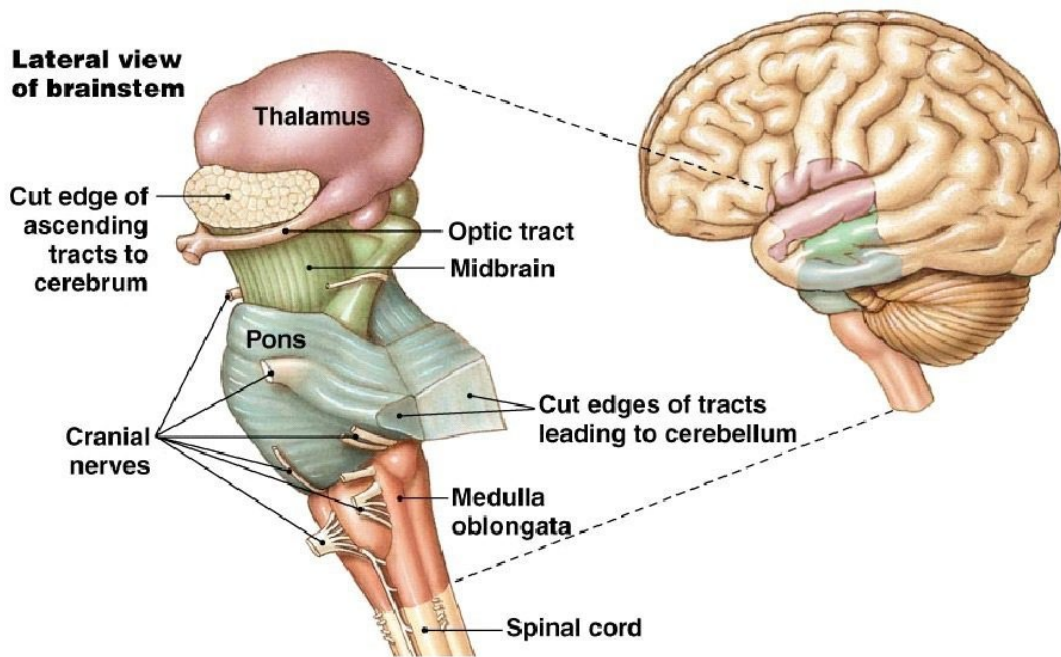


Figure 5: Représentation schématique des structures de la ligne médiane du cerveau humain. Vue latérale du tronc cérébral (Pearson Education, 2004)

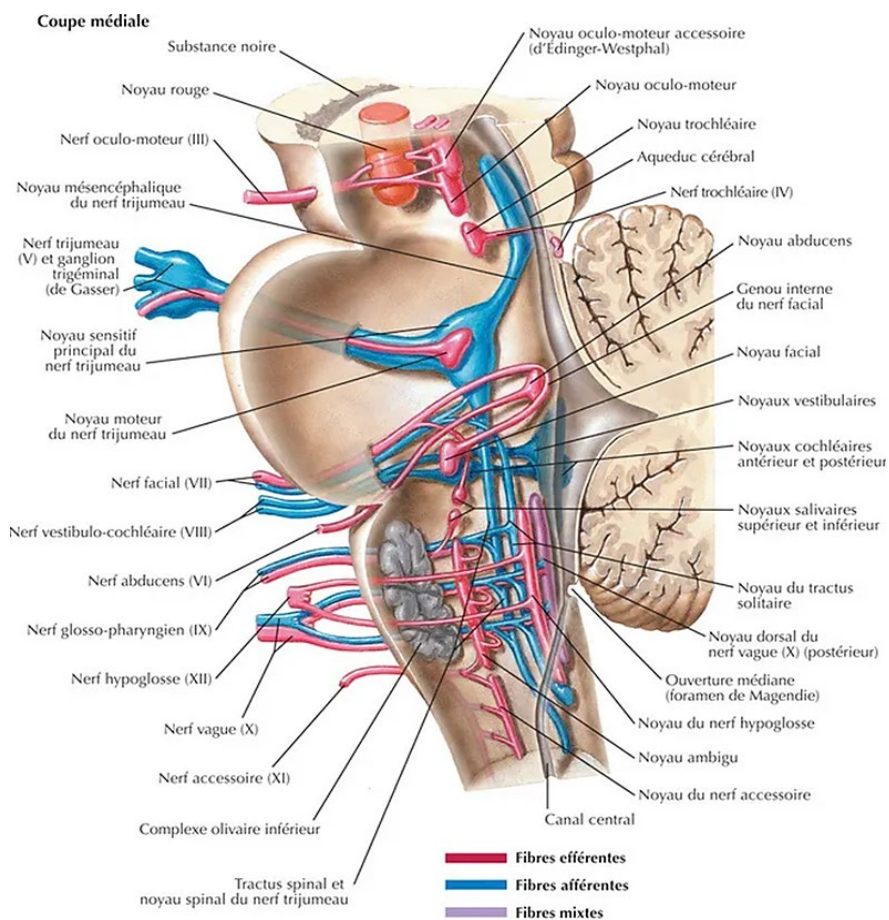


Figure 4 : Systématisation des nerfs crâniens du tronc cérébral (coupe médiale) (MedicineKey)

I.2. Organisation morphologique et fonctionnelle du tissu nerveux

Le tissu cérébral est constitué de deux principaux types de populations cellulaires (Figure 6) :

- Les **neurones** : l'unité fonctionnelle du SNC
- Les **cellules gliales**, également appelées « névroglie » ou « glie », comprenant les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules épendymaires et la microglie

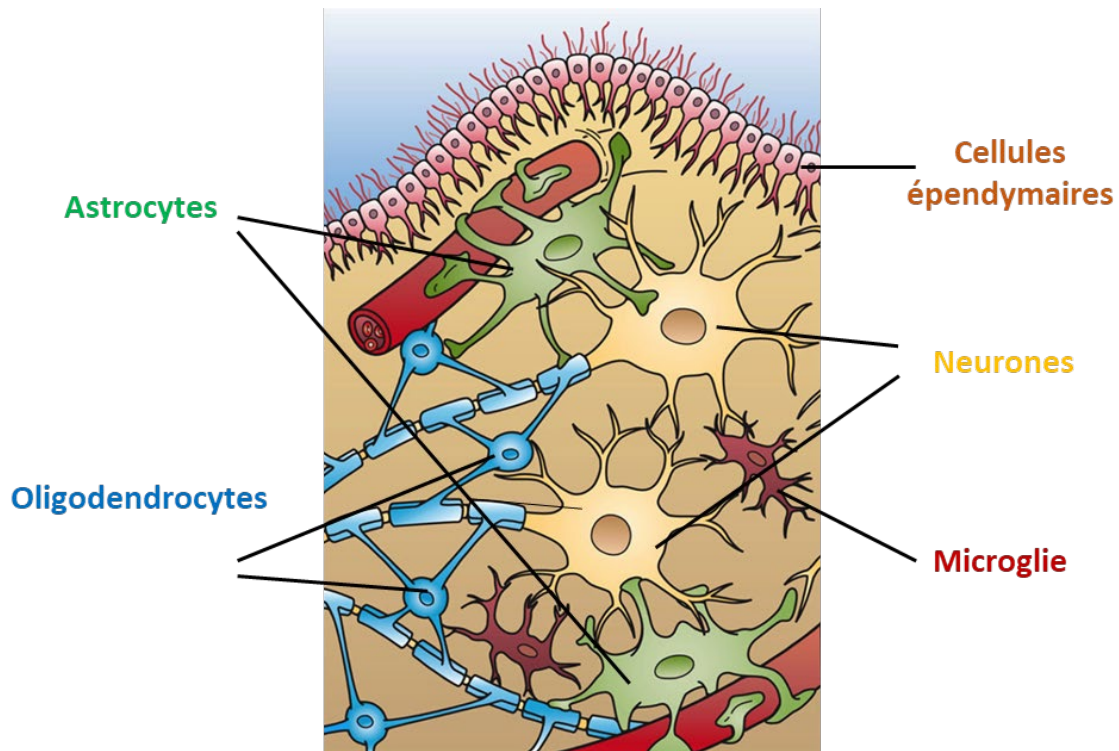


Figure 6 : Représentation schématique des populations cellulaires constituant le tissu cérébral (Holly Fischer, CNS slide 4)

I.2.1. Les neurones

Les neurones constituent l'unité structurale et fonctionnelle du système nerveux et sont estimés à près de 100 milliards dans le cerveau humain adulte. Ces cellules hautement spécialisées et interconnectées sont capables de réceptionner et d'intégrer des signaux bioélectriques et de les transmettre à des cellules cibles (neurones, muscles, glandes).

La transmission de ce message nerveux implique deux propriétés physiologiques fondamentales :

- L'**excitabilité** ; la capacité à réagir à une stimulation électrique et à y répondre en la convertissant en impulsions nerveuses

- La **conductivité** ; la capacité à conduire l'influx électrique et le transmettre à la cellule suivante

La grande majorité des neurones sont des cellules post-mitotiques, qui ne se renouvellent pas en cas de mort cellulaire. En revanche, ils font preuve d'une importante plasticité, ce qui leur confère une grande longévité.

I.2.1.1. Organisations structurale et fonctionnelle du neurone

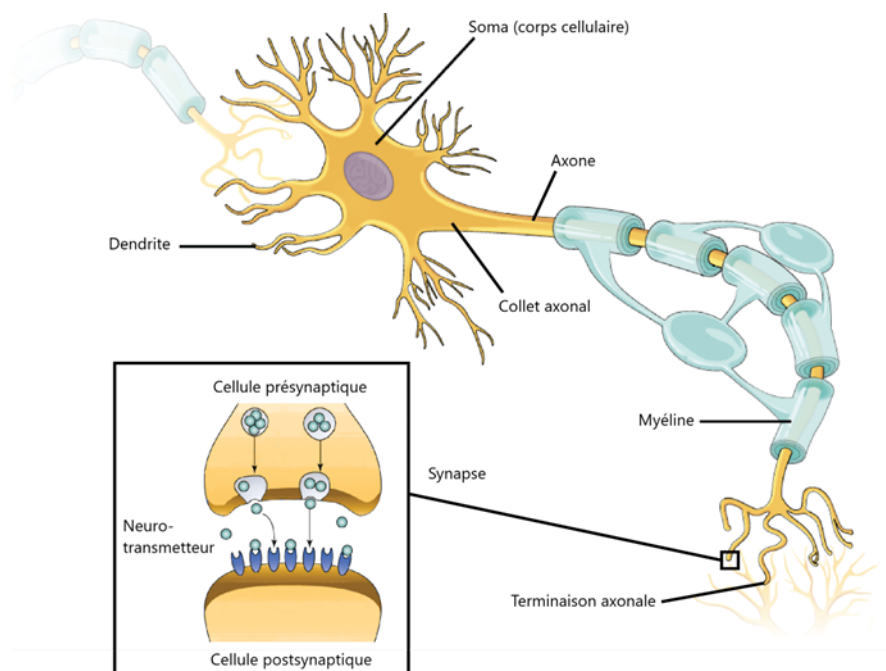


Figure 7 : Morphologie générale d'un neurone (Biology 2nd edition, OpenStax 2020)

Les fonctions neuronales se reflètent dans l'anatomie singulière du neurone (Figure 7). Il présente un corps cellulaire volumineux appelé soma ou péricaryon, qui renferme les différentes organelles conventionnelles d'une cellule animale ; un noyau cloisonné par une membrane nucléaire et entouré d'un réticulum endoplasmique, d'un appareil de Golgi, de mitochondries et de ribosomes. Les corps cellulaires des neurones se concentrent dans les zones de substance grises décrites précédemment. A partir du soma se forment deux types de prolongements : les dendrites et un axone unique. Les dendrites plus ou moins ramifiées forment une arborescence autour du corps cellulaire. Elles sont chargées de réceptionner l'influx nerveux en provenance de l'élément présynaptique. L'axone conduit le message nerveux sous forme de potentiel d'action jusqu'à la terminaison nerveuse, pour le transmettre à

l'élément post-synaptique ». Ces axones sont entourés d'une gaine de myéline et forment les fibres nerveuses qui s'organisent en faisceaux et constituent la substance blanche. Les neurones peuvent être distingués selon trois classes selon leur fonction, à laquelle s'associe une morphologie particulière (Figure 8) :

- les **neurones sensoriels** (ou sensitifs) : ce sont des neurones pseudo-unipolaires ; leur court prolongement se subdivise en deux, l'un formant les dendrites qui réceptionnent le stimulus en provenance des récepteurs sensoriels, l'autre formant l'axone qui transmet ce message au SNC. Les neurones sensoriels sont chargés de capter le message nerveux en provenance des récepteurs sensoriels et le relaient au SNC.
- les **motoneurones** : ces neurones multipolaires présentent de courtes dendrites et un axone long. Leurs corps cellulaires sont localisés dans la corne antérieure grise de la moelle épinière ou dans les noyaux moteurs des nerfs crâniens du tronc cérébral. Ils innervent les fibres musculaires squelettiques avec lesquelles ils forment l'unité motrice et sont chargés de conduire les commandes motrices du cortex à la moelle épinière ou de la moelle épinière aux muscles.
- les **interneurones** : ces neurones multipolaires présentent deux prolongements de longueurs équivalentes et s'intercalent entre d'autres neurones pour réguler leur excitabilité et jouent un rôle majeur dans la modulation des circuits neuronaux. La plupart des interneurones sont des neurones inhibiteurs GABAergiques (voir 2.1.2).

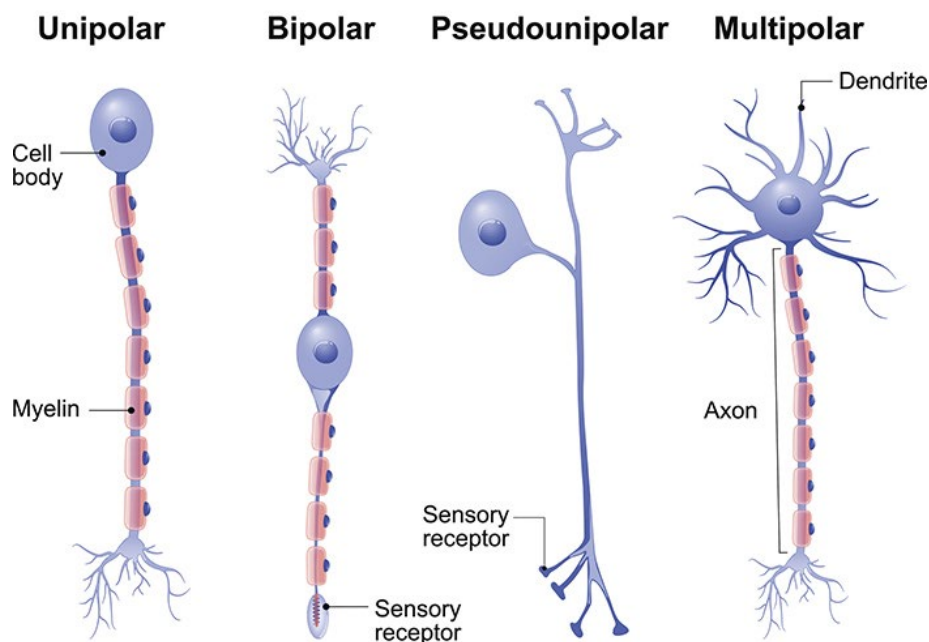


Figure 8: Représentation des différents types de neurones distingués selon leur morphologie (Brain anatomy, University of Queensland)

I.2.1.2. La transmission de l'information nerveuse

La transmission des impulsions nerveuses répond à la loi du « tout-ou-rien ». Elle est générée et se propage sous la forme d'un potentiel d'action (PA) stéréotypé, qui se déclenche systématiquement lorsque l'amplitude du stimulus dépasse le seuil d'excitation du neurone. Ce PA est renouvelé tout le long de l'axone par une conduction saltatoire au niveau des nœuds de Ranvier jusqu'à atteindre la terminaison pré-synaptique. L'arrivée du PA provoque une fusion de vésicules avec la membrane cellulaire qui libèrent les neurotransmetteurs qu'elles contiennent. Ces neurotransmetteurs diffusent dans la fente synaptique et sont recaptés par des récepteurs membranaires de l'élément post-synaptique, propageant l'influx nerveux à la cellule post-synaptique (Figure 9). Les neurotransmetteurs majoritaires du SNC sont le glutamate, neurotransmetteur excitateur ubiquitaire du cerveau, et l'acide γ -acidobutyrique (GABA), principal neurotransmetteur inhibiteur dont le rôle consiste à inhiber le potentiel d'action membranaire en induisant une légère hyperpolarisation (Petroff, 2002; Platt, 2007).

Leur concomitance est fondamentale pour réguler les quelques 10^{15} connexions synaptiques du cerveau humain. Un fonctionnement optimal du SNC nécessite à la fois des entrées excitatrices et inhibitrices régulées et passe par un équilibre entre les activités de ces deux neurotransmetteurs (Sears and Hewett, 2021). Une dérégulation de cet équilibre exciteur/inhibiteur s'observe dans des troubles/maladies neurologiques (crises d'épilepsie, accidents vasculaires cérébraux, maladie d'Alzheimer) et des troubles du développement (schizophrénie, autisme). Cette interface synaptique électrique-chimique augmente considérablement les possibilités de modulation de la transmission du message nerveux. Celle-ci est également sous l'influence des cellules gliales avec lesquelles les neurones sont en constante interaction.

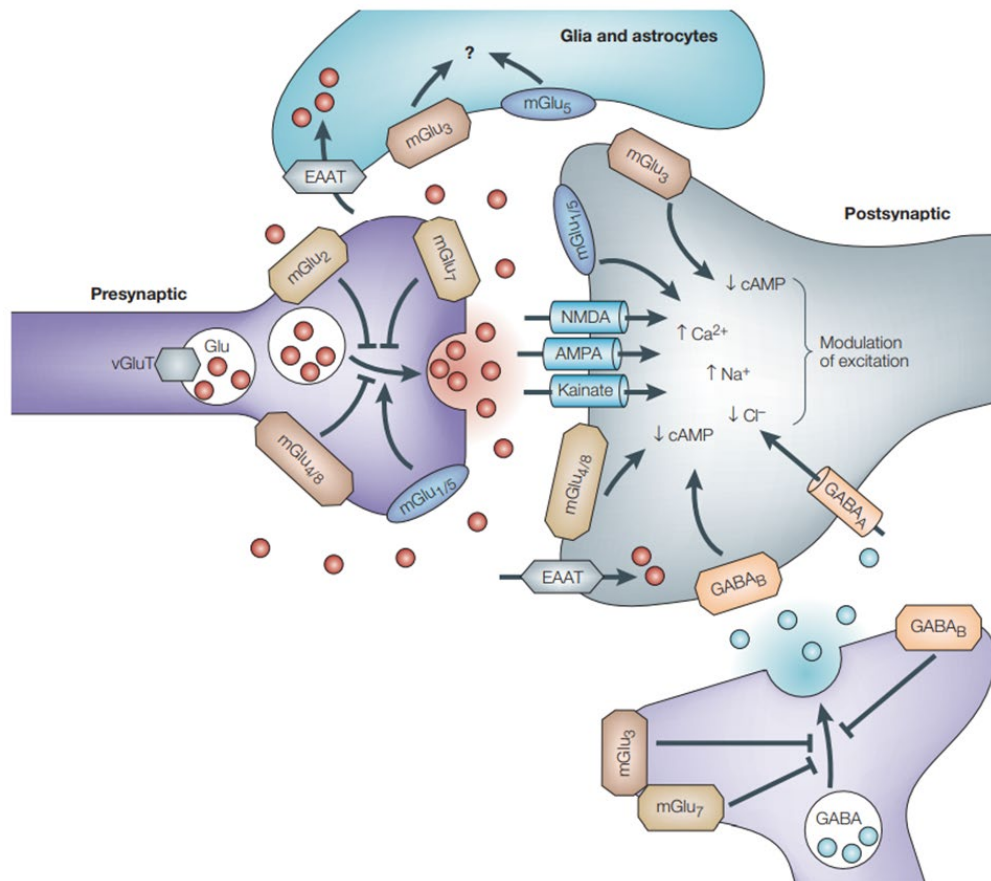


Figure 9 : Représentation d'une synapse hypothétique illustrant la coopération des neurones glutamatergiques et GABAergiques dans la régulation fonctionnelle de la transmission synaptique. Les récepteurs ionotropes du glutamate N-méthyl-D-aspartate (NMDA), kaïnate et acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl4-isoxazolepropionique (AMPA) médient la transmission synaptique excitatrice rapide en induisant une dépolarisation membranaire liée à l'entrée d'ions Na^+ et Ca^{2+} . Les transporteurs vésiculaires du glutamate (vGlut1 et vGlut2) chargent le glutamate dans les vésicules présynaptiques. Les récepteurs métabotropes du glutamate (mGlu) sont couplés à des protéines G. Ils sont répartis à la fois sur les membranes pré- et post- synaptiques des neurones et des cellules gliales pour moduler la libération des neurotransmetteurs et l'excitabilité post-synaptique. Ils répondent à des expositions prolongées au glutamate. D'autres transporteurs plasmiques d'acides aminés excitateurs (EAAT = Excitatory amino acid transporters) et des transporteurs vésiculaires (VGLUT = vesicular glutamate transporter) localisés sur l'élément post-synaptique et/ou les cellules gliales permettent de recapter le glutamate excédant et d'éviter une surexcitabilité toxique pour la cellule nerveuse. Les récepteurs GABA_A et GABA_B diminuent les courants calciques (Cl^-) et les taux d'AMP (adénosine 3',5'monophosphate) cyclique et inhibent l'excitabilité postsynaptique (Swanson et al, 2005).

I.2.2. Le microenvironnement cellulaire glial

Les cellules gliales ou névrogliales représentent les cellules de soutien du tissu nerveux. Leur proportion dans le tissu nerveux a fait l'objet de nombreuses controverses ; une théorie populaire continue d'affirmer qu'elles sont jusqu'à 50 fois plus nombreuses que les neurones dans le tissu nerveux mais des études plus récentes ont obtenu des ratios bien plus équilibrés, de l'ordre du « un-pour-un » (von Bartheld et al., 2016; Herculano-Houzel, 2014). La fonction des cellules gliales a longtemps été restreinte à un rôle de maintien structural du tissu nerveux, auquel elles doivent initialement leur nom (le radical grec « glia » signifie « colle »). Leur découverte est attribuée à Rudolf Virchow en 1846, qui décrit alors le « tissu connectique » des cellules nerveuses. Depuis, leur rôle s'est largement complexifié et il est aujourd'hui clairement démontré qu'elles interviennent dans des processus de régulation fine de la transmission nerveuse (Webster and Aström, 2009). On distingue deux composantes majeures des cellules gliales, la microglie et la macroglie :

- **La microglie** désigne un ensemble de cellules de petite taille, essentiellement constitué des macrophages qui résident dans le parenchyme du SNC et y forment le principal système de défense immunitaire active. Ces derniers sont chargés de protéger le cerveau contre les pathogènes infectieux et d'en nettoyer les lésions, grâce à leur activité phagocytaire. La microglie fait donc partie intégrante du système immunitaire et dérive de cellules d'origine mésenchymateuse qui ont migré vers le SNC dans des stades avancés du développement fœtal.
- **La macroglie** possède la même origine neuroectoblastique que les neurones et se distingue ainsi de la microglie par son origine embryonnaire, mais également par ses fonctions. Elle regroupe principalement les **astrocytes**, les **oligodendrocytes** et les **cellules épendymaires**.

I.2.2.1. Les astrocytes

Les astrocytes constituent la population cellulaire majoritaire dans le cerveau des mammifères et représentent de 20 à 40% des cellules du tissu cérébral (Herculano-Houzel, 2014b). Ils présentent une morphologie caractéristique avec une forme étoilée, plus ou moins ramifiée et occupent la majeure partie de l'espace inter-neuronal. Leur rôle va bien au-delà d'un simple support structural pour les neurones. Ils contribuent à la cicatrisation des lésions du SNC, maintiennent l'intégrité de la barrière hématoencéphalique (BHE) et contribuent au métabolisme neuronal à travers la libération de lactate issu de la glycolyse du glucose en

provenance de la circulation sanguine. Ils régulent la synthèse et la libération du glutamate par des apports de glutamine et la sécrétion de l'apolipoprotéine E (APOE) et protègent le neurone d'une surexcitation toxique en recaptant le glutamate excédant dans la fente synaptique à travers leurs récepteurs EAAT et VGLUT (Gee and Keller, 2005) (Figures 9 et 10). Ces nombreux rôles font de l'astrocyte un partenaire clé du neurone, contribuant à la plasticité de la communication nerveuse à travers le modèle de la synapse tripartite (Araque et al., 1999; Panatier and Robitaille, 2012; Zhou et al., 2019).

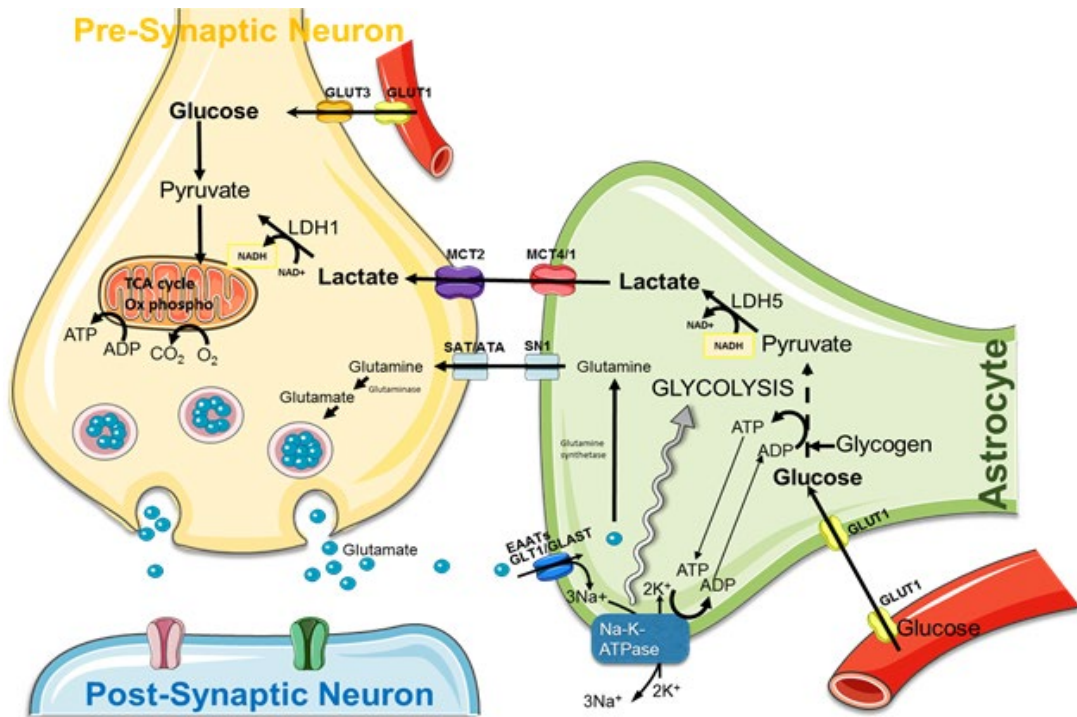


Figure 10: Représentation schématique de la synapse tripartite. (Jordy et al, 2018)

I.2.2.2. Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont des cellules volumineuses présentes aussi bien dans la substance grise que dans la substance blanche. Elles présentent de grandes extensions de leur membrane plasmique qui s'enroulent autour de l'axone des neurones et forment la gaine de myéline qui contribue à optimiser la conduction du message nerveux. Par sa composition particulièrement riche en lipides (70 à 80% de sa masse totale contre 30 à 40% pour les membranes conventionnelles), la myéline forme un manchon multilamellaire isolant discontinu autour de l'axone formé d'une alternance de segments séparés les nœuds de Ranvier (0,2 à 2 millimètres) (Figure 11) (Barateiro et al., 2016; Lubetzki et al., 2020). Dans ces zones dépourvues de myéline, des canaux ioniques assurent la conduction saltatoire du potentiel d'action le long de l'axone. La présence de cette gaine de myéline accélère la conduction de

l'influx nerveux qui peut atteindre 75m/s contre 0,5m/s dans un axone non myélinisé. Les nœuds de Ranvier sont également des zones d'interactions entre les neurones et d'autres cellules gliales, notamment les astrocytes et les cellules microgliales (Barateiro et al., 2016). Les oligodendrocytes sont métaboliquement actifs et connectés à l'axone sous-jacent ; ils délivrent des produits de la glycolyse (pyruvate, lactate) au neurone via des transporteurs monocarboxylate (MCT1 et MCT2) et sont couplés aux astrocytes par des jonctions lacunaires, ce qui leur donne accès indirectement à la BHE (Emery, 2010; Simons and Nave, 2016).

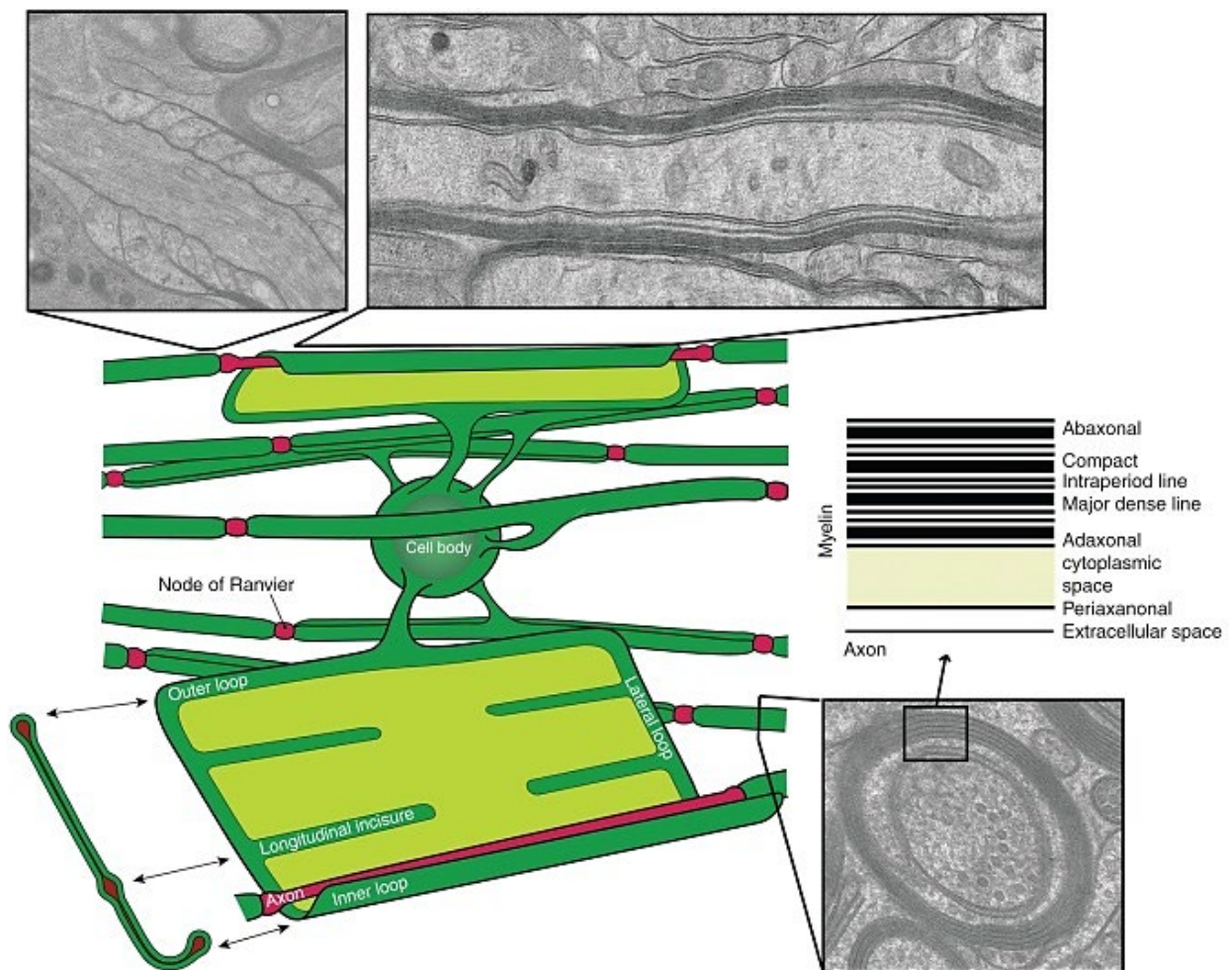


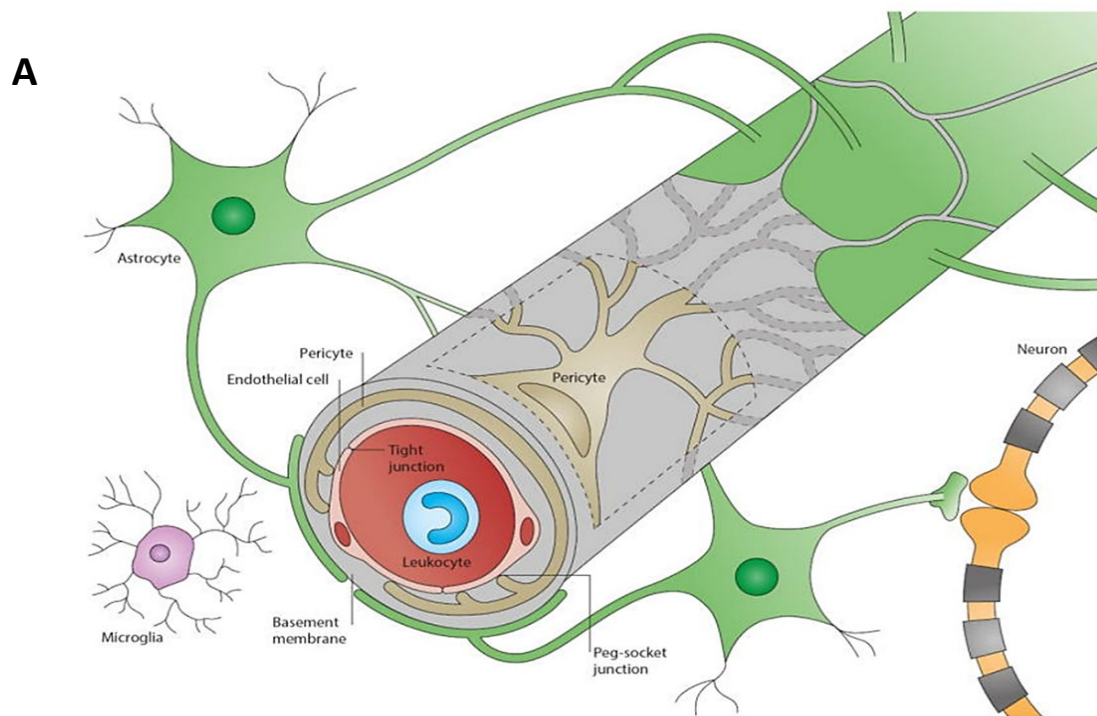
Figure 11 : Représentations schématiques et microscopiques des états enveloppé et « déroulé » (image conceptuelle) des oligodendrocytes myélinisants. Les images en microscopie électronique montrent des boucles paranodales (à gauche), une vue longitudinale (droite) et une vue en coupe de la myéline (bas).

I.2.2.3. Les cellules épendymaires

Également appelées épendymocytes, ces cellules sont chargées de synthétiser et de faire circuler le liquide cébrospinal (LCS) (ou liquide céphalo-rachidien (LCR)) dans les ventricules grâce aux mouvements de leurs cils vibratiles. Elles bordent les cavités du système nerveux (canal de l'épendyme, ventricules cérébraux) et y assurent le rôle d'interface fonctionnelle entre le parenchyme cérébral et le LCS.

I.2.3. La barrière hémato-encéphalique

La barrière hématoencéphalique (BHE) est une barrière physique et métabolique, localisée dans les cellules endothéliales cérébrales et dont la principale fonction est de réguler strictement l'infiltration dans le cerveau de cellules et de substances solubles en provenance du sang. La régulation de la perméabilité endothéliale est fondamentale pour préserver l'homéostasie cérébrale et met en jeu une architecture spécifique. Les capillaires du SNC sont tapissés de cellules endothéliales scellées entre elles par des jonctions serrées (Figure 12). La surface abluminale de l'endothélium est recouverte d'une membrane basale dans laquelle sont enchâssés les péricytes, dont la fonction contractile contribue à réguler l'étanchéité de la BHE. La BHE est imperméable aux molécules de haut poids moléculaire. Les petites molécules lipophiles traversent la BHE par une diffusion passive mais le transport de la plupart des molécules endogènes au métabolisme cérébral s'effectue via des récepteurs spécifiques situés sur les cellules endothéliales. Elles présentent des transporteurs membranaires impliqués dans le transport du glucose (GLUT1, GLUT3) et des acides aminés (LAT1, CAT1) et assure les apports métaboliques nécessaires aux neurones (Golden and Pollack, 2003). La présence de pompes à efflux facilite l'évacuation de substances potentiellement délétères. Les astrocytes périvasculaires contribuent au maintien structural de la BHE à travers leurs pieds terminaux qui entourent presque intégralement l'endothélium (Obermeier et al., 2013).



B

Diffusion passive transcellulaire

Via un récepteur

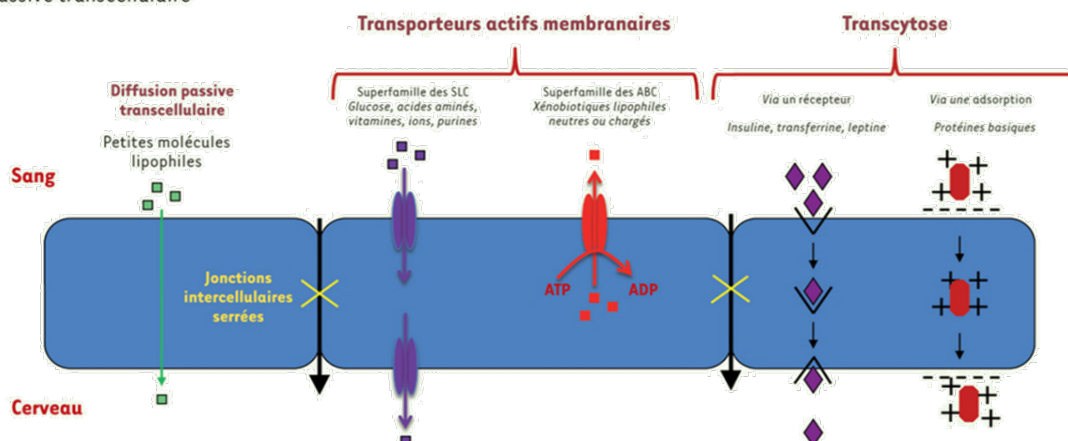


Figure 12: Organisations morphologique et fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique. **A**, Représentation schématique des interactions cellulaires au sein de la BHE (Obermeier et al, 2013). **B**, Principaux mécanismes de transports moléculaires à travers la BHE (Lafaye et al, 2019).

Le franchissement de la BHE constitue une étape critique dans les approches thérapeutiques ciblant le SNC. Pour contourner cet obstacle, certains composés peuvent être administrés par voie intrathécale en les injectant directement dans le liquide cébrospinal qui les diffuse ensuite dans le cerveau. D'autres alternatives consistent à adapter les propriétés chimiques des médicaments aux propriétés physico-chimiques de la BHE et/ou aux mécanismes

de transport de leurs cellules endothéliales (lipophilisation, vectorisation, cationisation, modulation des jonctions serrées par exemple) (Lafaye et al., 2019).

I.2.4. La matrice extracellulaire cérébrale

La matrice extracellulaire cérébrale (MEC) est synthétisée par les neurones et les cellules gliales. Elle forme un réseau macromoléculaire qui comble les espaces intercellulaires et représente près de 20% du volume cérébral total chez l'adulte. Elle est majoritairement constituée de glycosaminoglycanes (hyaluronane), de protéoglycanes (par exemple, neurocan, brevican, versican), de glycoprotéines (ténascine-R) et de protéines fibreuses (collagène, fibronectine). La MEC constitue une barrière physique naturelle qui évite la dispersion des molécules solubles et associés à la neurotransmission, la membrane et la migration cellulaires. Elle joue également un rôle majeur dans le développement des neurones et des cellules gliales et intervient dans la formation et la stabilisation des synapses, la croissance des neurites et les réparations des lésions (Burnside and Bradbury, 2014; Lam et al., 2019; Song and Dityatev, 2018).

I.3. Origine développementale du tissu cérébral du SNC

L'étroite interconnectivité entre les neurones et les cellules gliales s'observe dès le développement embryonnaire. Ces deux populations cellulaires ont une origine commune et dérivent de cellules souches neuroépithéliales. Leur développement met en jeu différentes phases mêlant prolifération, division, migration et différenciation cellulaires qui démarrent au stade embryonnaire et se poursuivent jusqu'à l'âge adulte.

I.3.1. Histogenèse prénatale

Les cellules souches neuroépithéliales constituent l'épithélium du tube neural et sont considérées comme les cellules souches précurseurs du SNC. Au fur et à mesure du développement prénatal, ces cellules souches se divisent selon un mode symétrique puis asymétrique pour s'auto-renouveler et donner naissance aux progéniteurs neuronaux (nPC) et aux cellules gliales radiales (RG), qui se divisent à leur tour pour former directement des neurones ou des progéniteurs intermédiaires (IPC), à destinée neuronale (nIPC) ou oligodendrogliale (oIPC). La plupart de ces progéniteurs sont produits dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) et migrent vers le manteau pour s'y différencier et former le néocortex. Les neurones empruntent la glie radiale, qui s'allonge au fur et à mesure de l'augmentation en épaisseur du cerveau et finit par contacter les méninges, la lame basale et les vaisseaux sanguins. La plupart des cellules de la glie radiale finissent par se détacher du côté apical et se

différencient en astrocytes. D'autres maintiennent leur ancrage apical et leurs caractéristiques souches pour perpétuer la synthèse de nouveaux neurones et d'IPC's jusqu'à l'âge adulte (Figure 13 B).

I.3.2. Neurogenèse et maturation neuronale post-natales

A la naissance, la majorité des 100 milliards de neurones constituant le cerveau humain est déjà formée, mais l'essentiel de la maturation et de la complexification des réseaux neuronaux s'effectue pendant les trois premières années de la vie de l'enfant (Figure 13). La synaptogenèse et la croissance axonale sont particulièrement actives durant la première année post-natale, au cours de laquelle le volume cérébral augmente de 101%, en particulier dans les régions sous-corticales (+149%) et le cervelet (+240%) (Knickmeyer et al., 2008). Des précurseurs neuroblastiques continuent de proliférer dans la SVZ et migrent vers le tronc cérébral au cours d'une fenêtre spatio-temporelle spécifique autour de 5 à 9 ans (Monje et al., 2011). En parallèle, des précurseurs gliaux et en particulier des OPC prolifèrent sous la modulation du PDGF (Platelet Derived Growth Factor) et se différencient en oligodendrocytes, permettant la myélinisation axonale (Figures 11, 13 et 14) (Barateiro et al., 2016; Monje et al., 2011; Simons and Nave, 2016). Cette différenciation oligodendrogliale et leur fonction myélinisante peuvent être modulées par une multitude de facteurs, parmi lesquels l'activité neuronale et la sécrétion de glutamate ont un impact prépondérant. Initialement, le glutamate a un rôle inhibiteur sur la différenciation des OPCs. Les sécrétions de neuréguline et de BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) induisent un basculement vers une myélinisation dépendante des potentiels d'action neuronaux et de l'activation des récepteurs NMDA par le glutamate (Figure 14) (Bergles and Richardson, 2015; Gibson et al., 2014; Lundgaard et al., 2013).

Toutes ces étapes de maturation post-natales des réseaux neuronaux sous-tendent les phases d'apprentissage de l'enfant et le développement progressif des facultés sensorimotrices et des fonctions exécutives (Figure 13A). Elles donnent lieu à un contexte d'hyperstimulation cérébrale qui affine et mûrit les faisceaux neuronaux. L'élagage synaptique, une forme de tri fonctionnel, élimine les synapses les moins stimulées (quasiment la moitié) et se débarrasse des neurones obsolètes et/ou déficients (Monje, 2020). Le même type de processus s'effectue sur les oligodendrocytes. Tout au long de ces étapes, le SNC subit un remodelage intense qui met en jeu des précurseurs neuronaux et gliaux et une régulation fine de leur auto-renouvellement et/ou de leurs différenciations neuronales et gliales. Cet environnement est particulièrement propice à la tumorigenèse et à la formation de gliomes.

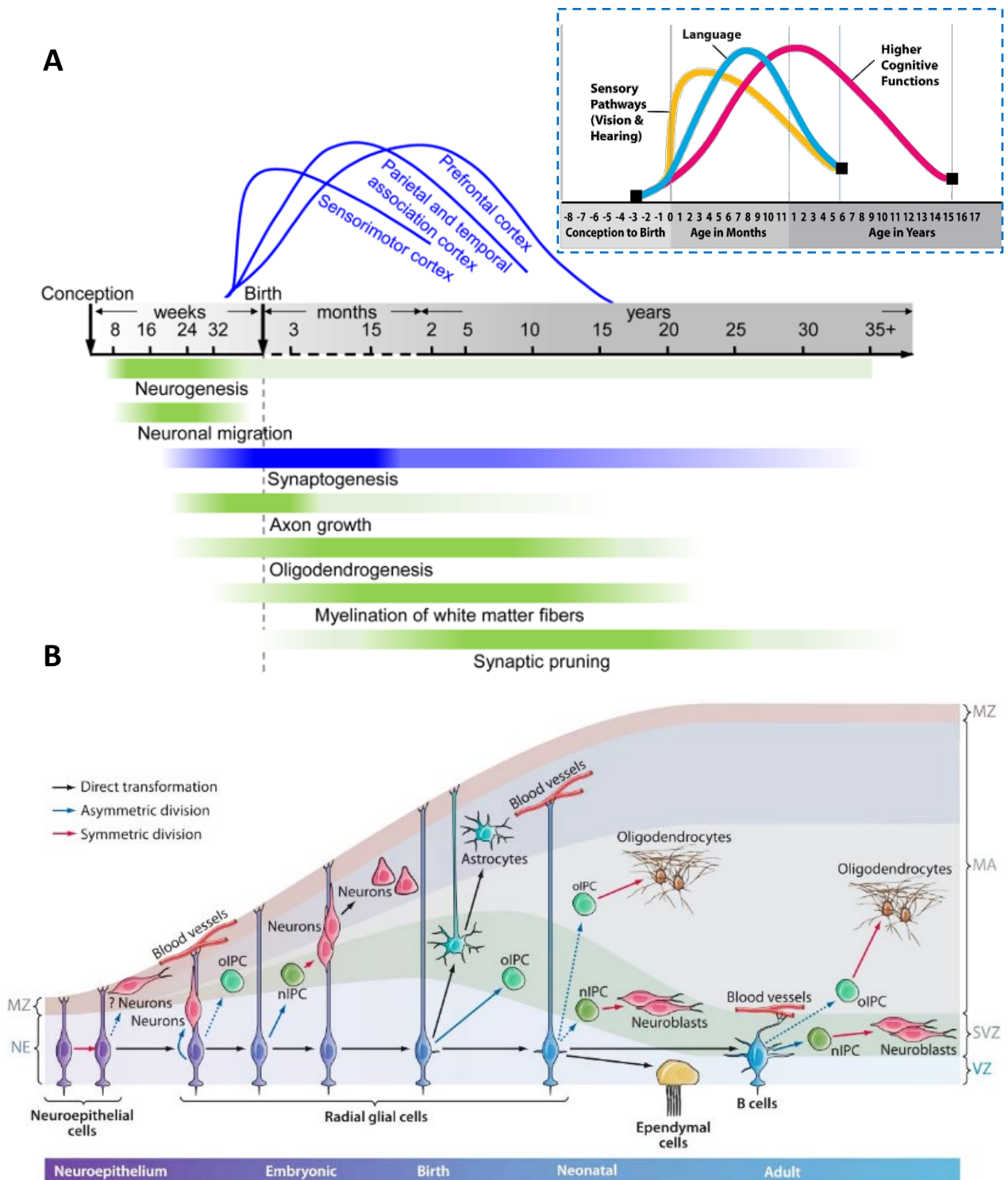


Figure 13: Processus de développement pré- et post-natal du cerveau. (A) Chronologie des processus de maturation spatio-temporels du cerveau associés aux structures cérébrales et aux fonctions cognitives impliquées (Ouyang et al, 2020) (B) Mécanismes cellulaires sous-jacents et rôle des NSC. IPC, intermediate progenitor cell; MA, mantle; MZ, marginal zone; NE, neuroepithelium; nIPC, neurogenic progenitor cell; oIPC, oligodendrocytic progenitor cell; RG, radial glia; SVZ, subventricular zone; VZ, ventricular zone (Kriegstein et Alvarez Buylla, 2009).

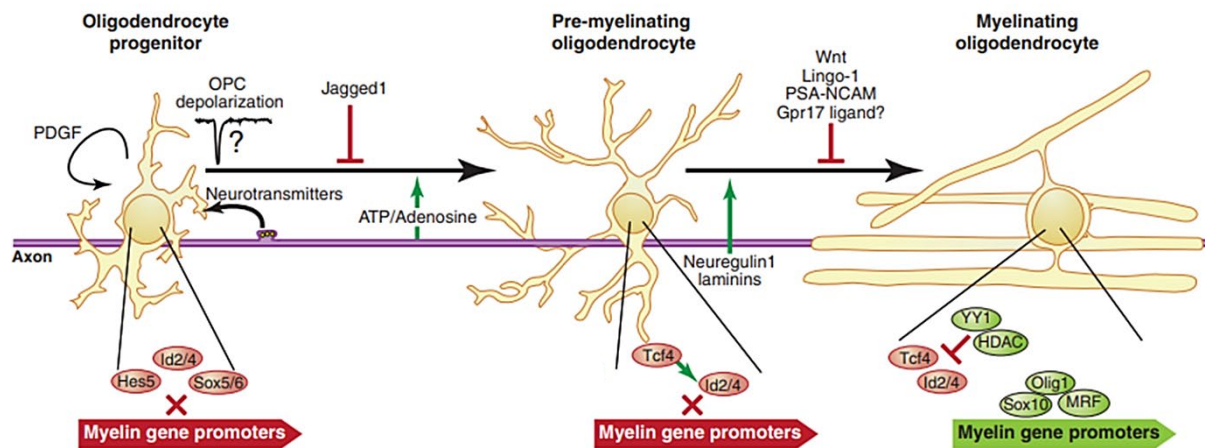


Figure 14: Représentation schématique des facteurs intrinsèques et extrinsèques impliqués dans la différenciation oligodendrogliale et la myélinisation axonale. La différenciation des OPCs en oligodendrocytes s'effectue en réponse à de multiples signaux extracellulaires et à travers la coordination et l'interconnexion de différentes voies de signalisations. PDGF et les facteurs de transcription Id2, Id4, He5 et Sox6 maintiennent les OPCs dans une forme indifférenciée et s'opposent à la myélinisation axonale. Leur différenciation pourrait être initiée par l'activité électrique de neurones environnants non myélinisés, dont les sécrétions de glutamate dépolarisent la membrane des OPCs. Elle nécessite notamment l'induction de facteurs de transcription tels que Olig1, Sox10, MRF, YY1. Elle serait également régulée à travers des remodelages de la chromatine induits par l'activité des histone-désacétylases (HDAC). Ces HDAC agissent en coopération avec YY1 pour inhiber des voies de signalisation et des facteurs de croissance qui s'opposent à la différenciation des OPCs (voie Wnt/ β -caténine, Id2/4). (Ben Emery, 2010)

II. LES GLIOMES DE HAUT-GRADE PÉDIATRIQUES

II.1. Généralités sur les gliomes de haut-grade pédiatriques

II.1.1. Définitions

Le gliome est un terme générique qui désigne une tumeur primitive du SNC. Il englobe des catégories très hétérogènes de tumeurs qui prennent naissance dans le parenchyme cérébral et dérivent des cellules gliales qui le constituent, en particulier des astrocytes (astrocytomes) et des oligodendrocytes (oligodendrogliomes). Les épépendymomes font également partie nosologiquement des gliomes, mais leurs caractéristiques biologiques et histologiques ainsi que leur prise en charge diffèrent. Ainsi, ils ne seront pas développés davantage dans ce travail. Le terme « haut-grade » désigne des gliomes malins très agressifs et à croissance rapide. Ils sont

catégorisés de grade 3 ou 4 selon le grading de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et s'opposent aux gliomes de bas-grade (1 et 2) (voir II.3.) (Louis et al., 2021).

Les GHG pédiatriques regroupent communément les GHG affectant les enfants et les jeunes adolescents âgés de 0 à 14 ans et peuvent être étendus à une classe d'âge de 0 à 19 ans. Ils comprennent une grande diversité d'entités tumorales qui se distinguent notamment par leur localisation cérébrale. Biologiquement, on distingue les GHG hémisphériques et les GHG de la ligne médiane (DMG). Parmi ces DMG, les gliomes diffus du tronc cérébral (DIPG) forment une entité à part. Toutes ces entités se distinguent en outre par des caractéristiques phénotypiques, histologiques et moléculaires qui seront présentées tout au long de cette seconde partie introductive.

II.1.2. Epidémiologie

Le taux d'incidence annuelle mondiale des tumeurs cérébrales malignes primaires est de 3,5 pour 100 000 habitants par an. Ces taux sont bien plus élevés dans les pays à revenus élevés (7,25 pour 100 000) que dans les pays à revenus moyens inférieur (2,2 pour 100 000) ou à faibles revenus (1,8 pour 100 000) (Sung et al., 2021). Chez l'enfant, les adolescents et les jeunes adultes de 0 à 19 ans, l'incidence des tumeurs cérébrales malignes est de 3,39 pour 100 000 habitants (Figure 15) (Ostrom et al., 2014). La majorité des tumeurs du SNC sont des gliomes ; ils représentent 50 à 60% des tumeurs du SNC chez les 0-14 ans et 40 à 50% chez les 0-19 ans (Figure 16). Au total, 15 à 20% de ces gliomes pédiatriques sont de haut-grade et l'incidence des GHG augmente avec l'avancée en âge des sujets (Bauchet et al., 2007).

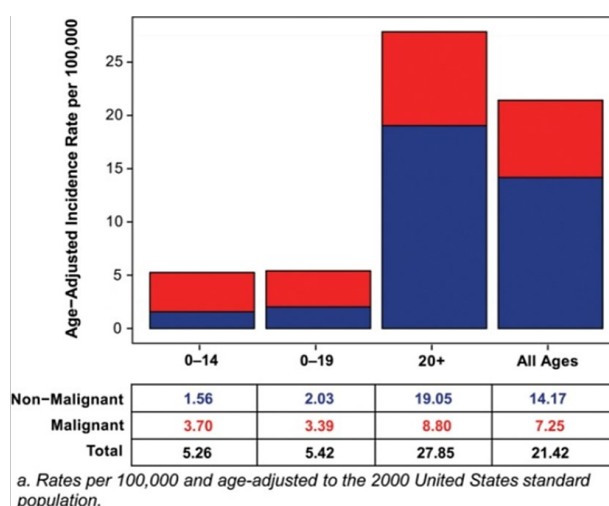


Figure 15: Incidence annuelle moyenne des tumeurs du SNC par âge et par degré de malignité. Données issues du rapport CBTRUS, évaluées sur la période 2007-2011. (Ostrom et al., 2014)

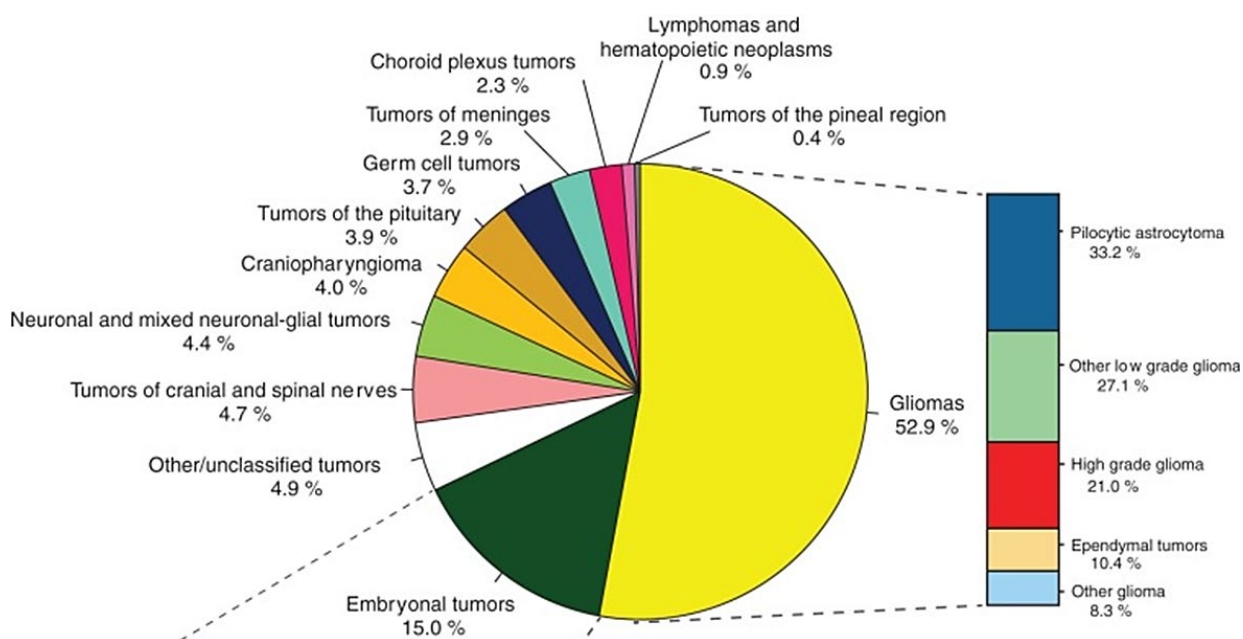


Figure 16 : Distribution des tumeurs du SNC selon les types histologiques chez l'enfant de 0 à 14 ans. N= 16 044, données CBTRUS évaluées sur la période 2007-2011 (Ostrom et al., 2014)

II.1.3. Facteurs de risques

L'étiologie précise des gliomes pédiatriques n'est pas clairement définie à ce jour mais la grande majorité des GHG pédiatriques semble sporadique. Ce sont des cancers multifactoriels, conséquences d'une multitude d'anomalies génétiques et épigénétiques voire liées à l'environnement. Des facteurs prédisposants héréditaires ont également pu être identifiés dans les GHG sus-tentoriels (Sourty and Rousseau, 2020).

II.1.3.1. Pathologies héréditaires prédisposantes aux tumeurs cérébrales

- *La neurofibromatose de type 1*

Cette maladie est liée à la mutation du gène NF1 qui code pour la neurofibromine, une protéine qui possède un rôle suppresseur de tumeurs en inhibant la protéine RAS. Cette mutation semble entraîner une hyperactivité de la protéine RAS, ce qui contribuerait à une prolifération cellulaire aberrante et pourrait prédisposer au développement de tumeurs affectant notamment le SNC. Néanmoins, la plupart sont relativement bénignes. La neurofibromatose est une maladie autosomique dominante, dont la moitié des cas résultent d'une transmission héréditaire du parent à l'enfant (Wolkenstein, 2001).

- *Le syndrome de Li-Fraumeni*

Dans la grande majorité des cas, cette pathologie héréditaire est causée par des mutations d'un autre gène suppresseur de tumeurs appelé TP53, codant pour la protéine p53 et impliqué dans de multiples processus cellulaires régulant des mécanismes de réparation de l'ADN, de croissance cellulaire et d'apoptose. Cette altération génétique prédispose les patients à différents cancers, en particulier les cancers du sein, les ostéosarcomes et les tumeurs cérébrales (Gargallo et al., 2020).

- *Le syndrome CMMR-D (Constitutional Mismatch Repair Deficiency)*

Ce syndrome rare de prédisposition héréditaire récessive aux cancers est associé au développement de tumeurs cérébrales au cours de l'enfance et de l'adolescence. Il est dû à une mutation bi-allélique homozygote ou hétérozygote de gènes impliqués dans les systèmes de réparation des mésappariements de l'ADN (système MMR, Mismatch-Repair). Ces gènes sont notamment associés au syndrome de Lynch : PMS2 ou MSH6 sont les plus touchés, plus rarement MLH1 et MLH2. Ces mutations inactivent les systèmes de réparation MMR et entraînent une instabilité génomique propice à la tumorigenèse. Elles caractérisent un phénotype tumoral appelé MSI (Microsatellite Instability). (Collura et al., 2019 ; Pecina-Šlaus et al., 2020).

Globalement, ces différentes pathologies héréditaires ne concernent que très peu des tumeurs de l'enfant et de l'adolescent et donc une proportion encore plus limitée spécifique aux GHG pédiatriques. Néanmoins, leur mise en évidence dans des familles à risques permet des diagnostics plus précoces.

II.1.3.2. Facteurs de risques liés à l'environnement

- *Les rayonnements ionisants*

Les rayonnements ionisants apparaissent aujourd'hui comme les seuls facteurs environnementaux clairement établis comme un cancérigène certain pour l'Homme. Ils ont été classés cancérigène de catégorie 1 par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC). Chez l'adulte, différentes études ont pu démontrer la relation entre des expositions externes aux rayonnements ionisants et une augmentation du risque de tumeurs cérébrales, notamment des suites de bombardements atomiques (Nagasaki, Hiroshima) (Preston et al., 2002).

Chez l'enfant, les données sont plus limitées. L'étude de « Oxford Survey of Childhood » a mesuré l'association entre le risque de cancer chez l'enfant et leur exposition

foetale à des rayons ionisants, à l'occasion d'examen radiologiques pratiqués sur la mère au cours de la grossesse. Des expositions *in-utero* entraînaient une augmentation de 42% des tumeurs du SNC chez l'enfant (Doll and Wakeford, 1997; Yang et al., 2017). D'autres études plus récentes soulignent un impact plus modeste mais suggèrent tout de même un risque accru au cours des périodes prénatale et post-natale précoce (Pasqual et al., 2020).

Dans certains cas, des tumeurs cérébrales secondaires peuvent survenir à la suite de la radiothérapie. Une récente étude a montré que sur 143 patients ayant subi des radiothérapies crâniennes, 6% ont développé des tumeurs secondaires du SNC dans les 10 années et 20% dans les 20 ans qui ont suivi les traitements (Fujii et al., 2020).

- *Autres facteurs environnementaux*

D'autres facteurs environnementaux sont à l'étude pour déterminer s'ils peuvent être à l'origine du développement de tumeurs du SNC et en particulier de gliomes. On peut notamment citer les rayonnements non-ionisants : champs électromagnétiques et radiofréquences émises par les téléphones portables et certains appareils électroménagers (étude MOBI-Kids) ou les champs de basses fréquences émis par les lignes électriques à haute-tension (Carles et al., 2020; Castaño-Vinyals et al., 2022; Pasqual et al., 2020).

Cependant, ces facteurs restent fortement débattus et aucune donnée à ce jour ne permet de les associer clairement à un risque accru de tumeurs du SNC (Hardell and Moskowitz, 2022).

II.2. Diagnostic des GHG pédiatriques

II.2.1. Symptomatologie

Aucun symptôme n'est caractéristique des GHG pédiatriques. Les signes cliniques dépendent davantage de la localisation tumorale et apparaissent rapidement en cas de croissance tumorale rapide. L'effet de masse peut être à l'origine d'une hypertension intracrânienne qui se manifeste par des céphalées, parfois accompagnés de nausées, de vomissements et/ou de troubles visuels. Les patients peuvent également développer différents déficits neurologiques en fonction de la zone cérébrale affectée.

Les GHG de la ligne médiane, majoritaires chez l'enfant, affectent des centres de régulation de nombreuses fonctions vitales, où convergent les faisceaux de fibres neuronales et d'où partent les nerfs crâniens (cf partie I). Une croissance tumorale dans la partie postérieure du tronc cérébral peut induire des troubles moteurs qui se manifestent par des difficultés à la marche, une hémiparésie des membres ou de l'hémicorps. Lorsque la partie antérieure est touchée, les troubles sont plutôt de nature sensitive. Une atteinte des nerfs crâniens peut

entraîner des paralysies faciales, des troubles visuels (strabisme, mouvements oculaires incontrôlés) et/ou des problèmes de dysphagie. Les patients peuvent également montrer des signes d'atteintes cérébelleuses (ataxie, dysmétrie) (Srikanthan et al., 2021a).

En cas de GHG sus-tentoriels, les symptômes dépendent plutôt des régions corticales et des aires fonctionnelles concernées (Figures 2 et 3). Le jeune patient peut développer des troubles du langage, des troubles auditifs, des modifications du comportement et des difficultés d'apprentissage, qui peuvent se traduire par une baisse du rendement scolaire.

Certains enfants sont sujets à des crises d'épilepsie. Elles se présentent généralement sous la forme d'une ou plusieurs crises répétées focales, associées ou non à une perte de connaissance, mais peuvent également se manifester sous la forme de crises généralisées tonico-cloniques avec une perte de connaissance et des contractions musculaires (Blionas et al., 2018; Fangusaro, 2012).

Ces symptômes très variés peuvent être délicats à déceler chez un enfant, certains pouvant être assimilés à un retard de développement. Néanmoins, une accumulation de ces signes et leur persistance et/ou aggravation dans le temps donneront lieu à une consultation médicale en vue d'un diagnostic. Ils seront explorés lors de l'examen neurologique pathologique, qui pourra être complété par un diagnostic radiologique et des analyses histomoléculaires.

II.2.2. Diagnostic radiologique

Après l'examen neurologique pathologique, l'imagerie cérébrale permet de confirmer le diagnostic de tumeur et de déterminer sa localisation (Figure 17).

Une IRM (imagerie par résonance magnétique) cérébrale ± médullaire est effectuée en première ligne sans et avec injection d'un produit de contraste. Elle est réalisée avec les séquences suivantes :

- T1 et T2 sans et avec injection
- T2-FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery) avec injection
- Diffusion avec cartographie ADC (coefficient de diffusion apparent)

Les DIPG se présentent sous la forme d'une tumeur infiltrant globalement le tronc cérébral avec un aspect hypointense en séquence T1 non injectée et hyperintense en T2-FLAIR. Des zones nécrotiques peuvent être présentes, en particulier sur les imageries en diffusion. Le coefficient ADC est inversement corrélé à l'agressivité tumorale ; un score ADC faible est le témoin d'une cellularité élevée, avec un turn-over cellulaire important. Après injection, les

aspects de rehaussement en T1 peuvent être localisés ou diffus. Ce rehaussement peut également être absent, du fait d'une vascularisation intratumorale minimale dans certains DIPG.

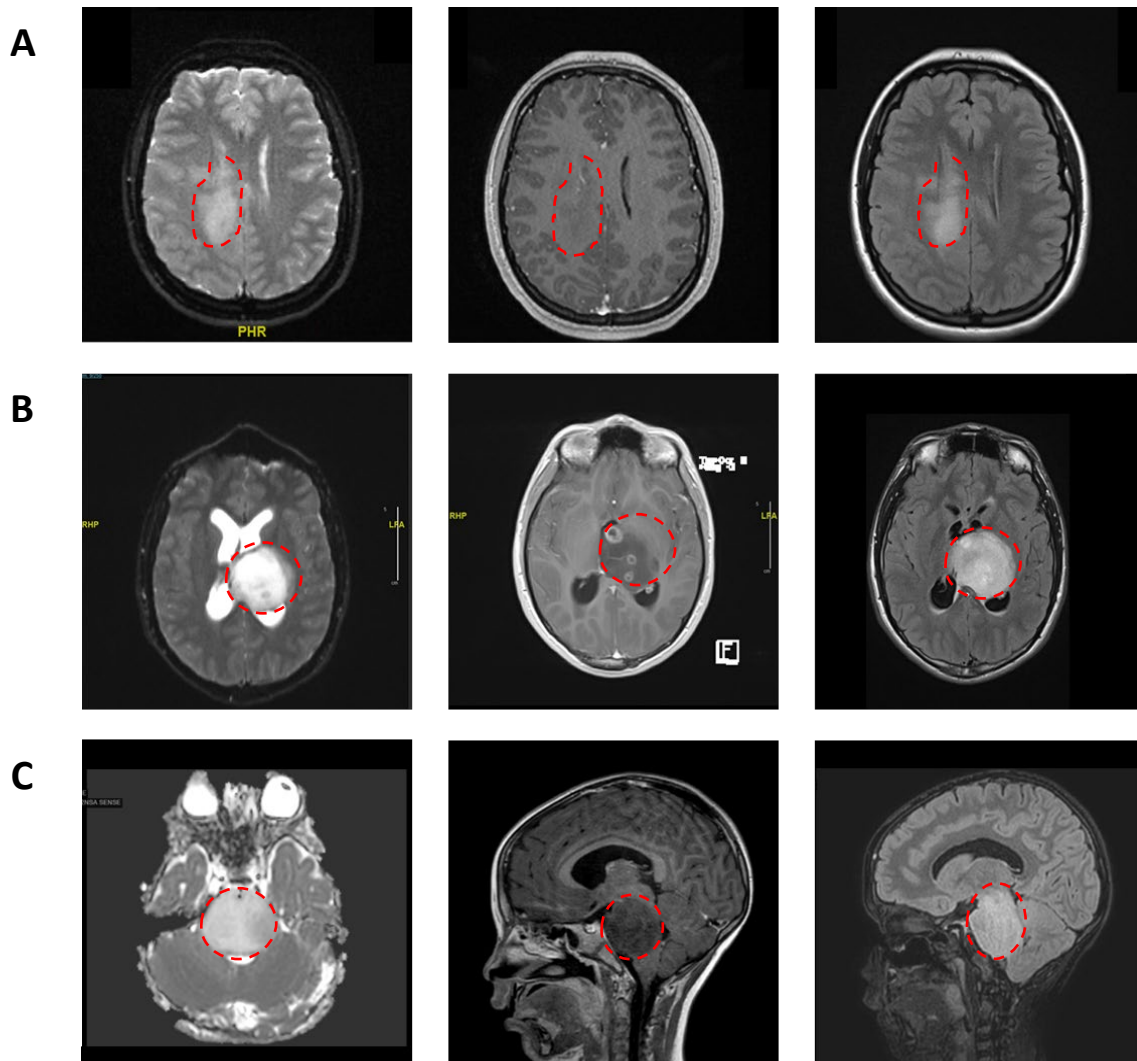


Figure 17: IRM de gliomes de haut-grade pédiatriques. (A) GHG sustentoriel de la région pariétale, séquence en diffusion (gauche), séquence T1 avec injection (milieu), séquence T2 FLAIR avec injection (droit). (B) GHG thalamique, séquence en diffusion (gauche), séquence T1 avec injection (milieu), séquence T2 FLAIR (droite). (C) DIPG, séquence en diffusion (gauche), séquence en T1 avec injection (milieu), séquence T2 FLAIR avec injection (droite) L'encadré rouge localise la tumeur. (CHU Hautepierre de Strasbourg).

Pour les GHG thalamiques et sus-tentorielles, en plus de l'ensemble de ces critères, les signes d'infiltration et la présence d'œdèmes péri-tumoraux peuvent être observés sur les séquences avec injection et de diffusion/perfusion. La spectroscopie avec une évaluation des rapports NAA/Cr (N-acétyl-aspartate/créatine), Chol/Cr (Choline/créatine) et Cho/NAA peuvent également apporter des informations complémentaires sur l'agressivité tumorale.

Celle-ci est d'autant plus importante que les rapports Chol/Cr et Cho/NAA augmentent et que le rapport NAA/Cho diminue.

II.2.3. Diagnostic anatomopathologique intégré

Un examen histomoléculaire est indispensable pour établir le diagnostic définitif de la tumeur identifiée lors de l'imagerie médicale. Il est effectué à partir d'un prélèvement tumoral obtenu à l'issue d'une intervention chirurgicale.

Dans les GHG sus-tentoriels, la résection chirurgicale débute systématiquement le protocole de prise en charge des patients et montre à la fois un intérêt thérapeutique et diagnostique (cf II 5.). L'échantillon tumoral soumis à l'analyse histomoléculaire peut être directement prélevé sur le produit issu de l'exérèse chirurgicale.

Dans les GHG de la ligne médiane, cette exérèse chirurgicale est très rarement envisageable en raison de la morbidité qu'elle peut susciter en endommageant des régions vitales du cerveau (cf I). Néanmoins, les progrès en matière de neurochirurgie stéréotaxique ont permis de démocratiser les biopsies exploratoires et d'obtenir des quantités de matériels suffisantes pour des analyses histomoléculaires, immunohistochimiques, des extractions d'ADN et d'ARN et une mise en culture. (Puget et al., 2012a, 2015). A défaut de retirer la tumeur, ces biopsies exploratoires permettent un rendement diagnostique proche des 100% sans induire de morbidité supplémentaire. Leur intérêt dans un contexte diagnostique est aujourd'hui indéniable (Hankinson et al., 2011; Puget et al., 2015; Rajshekhar and Moorthy, 2010; Sufit et al., 2012).

Les examens histomoléculaires visent à préciser la nature exacte de la tumeur et d'anticiper son évolution et son pronostic, dans le but d'établir un diagnostic intégré des tumeurs. Ces analyses se basent aujourd'hui sur un ensemble de critères histologiques et moléculaires intégrés dans la classification des tumeurs du SNC selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

II.3. Classification des GHG pédiatriques

La classification des tumeurs du SNC selon l'OMS distingue notamment les gliomes selon leur origine cellulaire et y associe une évolution prédictive, distinguant les tumeurs les moins agressives (non malignes) aux plus agressives (malignes) à travers quatre grades notés 1 à 4 : bas-grade (1 et 2) ou de haut-grade (3 et 4). Cette classification a connu une évolution considérable depuis sa création, en particulier depuis l'apparition des technologies de séquençage génomique et de cartographie moléculaire des tumeurs. Il existe d'autres classifications des gliomes, notamment celle de Sainte-Anne, également appelée classification

de Daumas-Duport (Daumas-Duport et al., 2005). Néanmoins, celle de l’OMS est à ce jour la plus communément admise au sein de la communauté scientifique internationale.

II.3.1. La classification des tumeurs du SNC de l’OMS

II.3.1.1. Les origines de la classification de l’OMS

Les prémices de la classification des gliomes sont nées avec les travaux de deux neurochirurgiens américains ; Percival Bailey et Harvey Cushing, qui dès 1926, tentèrent d’associer un pronostic à des critères histologiques de la tumeur en y observant les différents types cellulaires qui la constituent (Ferguson and Lesniak, 2005; MacKenzie, 1926). Leur classification se basait alors sur une théorie « histo-embryo-génétique », selon laquelle les cellules tumorales naissent de la dérivation maligne de cellules neurales embryonnaires qui auraient acquis un potentiel tumoral à la suite de mutations spécifiques.

En 1938 puis 1949, Kernohan y incorpora une voie différente avec le concept d’anaplasie. Selon sa théorie, les cellules tumorales ne dériveraient pas des cellules embryonnaires mais seraient issues d’une anaplasie, à savoir une dédifférenciation des cellules gliales normales. Pour la première fois, Kernohan établit un système de grades de malignité croissante (notés 1 à 4) en fonction du taux d’anaplasie de la tumeur (Kernohan and Mabon, 1949).

II.3.1.2. Les premières classifications histologiques

La première classification des tumeurs cérébrales selon l’OMS apparaît finalement en 1979. Elle s’apparente alors à une forme de consensus entre la classification établie par Bailey et Cushing et celle de Kernohan et évalue les gliomes selon des critères essentiellement histogénétique, basée sur le typage cellulaire. Les gliomes y sont catégorisés selon leur proximité microscopique avec les cellules du tissu nerveux : astrocytes, oligodendrocytes ou épendymocytes. Ils sont ensuite subdivisés en grades de malignité croissante selon leur degré de différenciation, associé à d’autres critères tels que la diffusion, l’activité mitotique, le taux d’anaplasie, la capacité de prolifération microvasculaire et la nécrose (Figure 18). La classification des gliomes selon l’OMS a connu plusieurs révisions en 1993, 2000 puis 2007, mais les critères de classification y demeurent globalement inchangés et essentiellement basés sur des aspects histologiques.

II.3.1.3. L’émergence de la classification intégrée de l’OMS

Il faut attendre la quatrième révision en 2016 pour assister à une évolution majeure de cette classification des tumeurs du SNC selon l’OMS. La généralisation progressive des biopsies chirurgicales, associée aux progrès des analyses génétiques et génomiques ont permis

l'élaboration de cartographies moléculaires des tumeurs. Pour la première fois, la classification de l'OMS intègre des paramètres moléculaires avec des mutations dites « *driver* » et les associe aux critères histologiques usuels, aboutissant à un diagnostic intégré des gliomes (Tableau 1). Il en résulte notamment des sous-types de gliomes mutés pour IDH1, H3K27 ou H3G34.

Les GHG adultes et pédiatriques constituent finalement deux groupes tumoraux bien distincts depuis la 5^{ème} révision de la classification parue en 2021, chacun subdivisés en sous-groupe selon leurs caractéristiques moléculaires (Tableau 1). Cette nouvelle révision ajoute un degré de complexité et de caractérisation supplémentaire en incorporant des paramètres épigénétiques liés aux analyses du méthylome de l'ADN tumoral. Elle permet d'affiner encore davantage le typage des gliomes avec une précision diagnostique supplémentaire (Louis et al., 2021). Des études montrent d'ailleurs que la classification moléculaire est bien mieux corrélée avec l'évolution clinique des gliomes que la classification histologique (Reuss et al., 2015a, 2015b).

World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System, fifth edition
Gliomas, glioneuronal tumors, and neuronal tumors
Adult-type diffuse gliomas
Astrocytoma, IDH-mutant
Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q-codeleted
Glioblastoma, IDH-wildtype
Pediatric-type diffuse low-grade gliomas
Diffuse astrocytoma, <i>MYB</i> - or <i>MYBL1</i> -altered
Angiocentric glioma
Polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young
Diffuse low-grade glioma, MAPK pathway-altered
Pediatric-type diffuse high-grade gliomas
Diffuse midline glioma, H3 K27-altered
Diffuse hemispheric glioma, H3 G34-mutant
Diffuse pediatric-type high-grade glioma, H3-wildtype and IDH-wildtype
Infant-type hemispheric glioma
Circumscribed astrocytic gliomas
Pilocytic astrocytoma
High-grade astrocytoma with piloid features
Pleomorphic xanthoastrocytoma
Subependymal giant cell astrocytoma
Chordoid glioma
Astroblastoma, <i>MN1</i> -altered
Glioneuronal and neuronal tumors
Ganglioglioma
Desmoplastic infantile ganglioglioma / desmoplastic infantile astrocytoma
Dysembryoplastic neuroepithelial tumor
<i>Diffuse glioneuronal tumor with oligodendroglioma-like features and nuclear clusters</i>
Papillary glioneuronal tumor
Rosette-forming glioneuronal tumor
Myxoid glioneuronal tumor
Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor
Gangliocytoma
Multinodular and vacuolating neuronal tumor
Dysplastic cerebellar gangliocytoma (Lhermitte-Duclos disease)
Central neurocytoma
Extraventricular neurocytoma
Cerebellar liponeurocytoma

Tableau 1: Extrait de la 5ème révision de la classification des tumeurs du SNC selon l’OMS. L’encadré rouge indique le groupe spécifique des GHG pédiatriques (Louis et al., 2021)

La classification des tumeurs du SNC selon l’OMS est donc en constante évolution, au rythme de celle des techniques d’étude cytologique, histologique et moléculaires, révélant progressivement les caractéristiques intrinsèques des tumeurs du SNC et des gliomes de haut-grade. L’OMS la réactualise de façon fréquente avec le programme c-IMPACT NOW (Louis et al., 2020).

La suite de ce travail consistera à présenter les différentes caractéristiques histologiques et moléculaires et leurs implications dans le diagnostic des GHG pédiatriques.

II.3.2. Caractéristiques histologiques

Cette évaluation microscopique s'effectue principalement par des techniques de coloration standard à l'Hématoxyline-Eosine (HE), complétées par des études immunohistochimiques (IHC) de protéines spécifiques aux différents types cellulaires. L'activité mitotique est notamment évaluée par des marqueurs de prolifération tels que Ki67/MIB-1. La détermination du sous-type histologique des GHG est basée sur le phénotype cellulaire prédominant. L'immunomarquage de la protéine gliofibrillaire acide (GFAP) ou du facteur de transcription OLIG2 permettent de distinguer des lignées astrocytaires (GFAP) et oligodendrogiales (OLIG2). Ces approches permettent un certain typage cellulaire des gliomes mais ne sont pour autant des critères pathognomoniques d'un sous-type histologique (Figure 18).

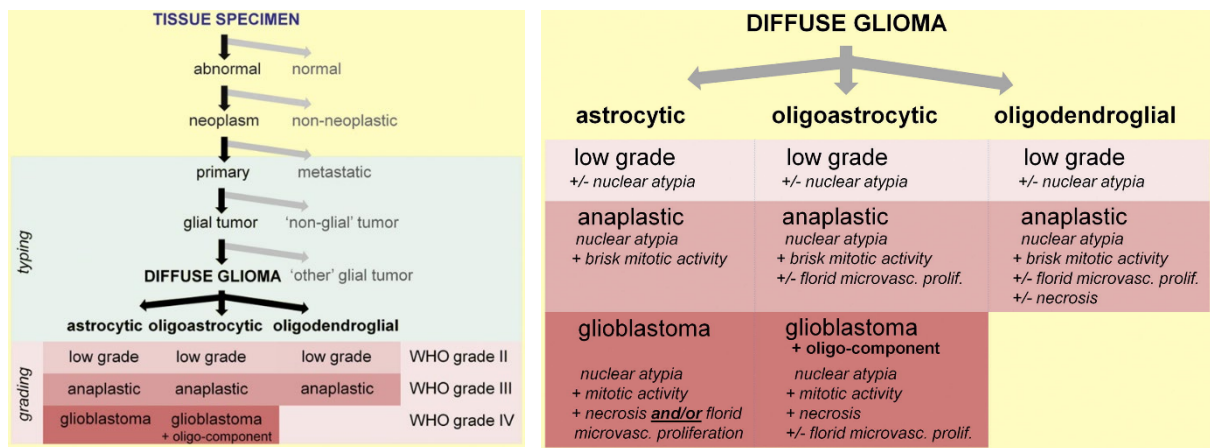


Figure 18 : Critères microscopiques de caractérisations et de grading des gliomes (Wesseling et al, 2011)

II.3.2.1. Les astrocytomes de haut-grade

Les astrocytomes sont des tumeurs au phénotype très varié. Chez l'enfant, la plupart (environ 75%) sont des astrocytomes de bas-grade, majoritairement représentés par l'astrocytome pilocytique. Les astrocytomes de haut-grade (grade 3 et 4) présentent des critères histologiques similaires à ceux de l'adulte, chez qui ils sont majoritaires (Gerges et al., 2013). Ils montrent notamment une importante cellularité associée à une capacité de diffusion accrue, des critères que l'on retrouve déjà chez les astrocytomes diffus de grade 2, mais de manière plus modérée. La catégorisation en grade 3 inclue également une activité mitotique de plus en plus anarchique de cellules qui présentent des atypies nucléaires de plus en plus marquées et un fort degré d'anaplasie, plus ou moins diffuse. Les astrocytomes de grade 3 regroupent finalement tous les astrocytomes dits « anaplasiques ».

Lorsque tous ces critères sont associés à une importante nécrose tumorale et à une prolifération vasculaire, la tumeur entre dans une catégorie de gliome malin extrêmement agressif de grade 4, plus communément appelé glioblastome et plus rare en pédiatrie. La nécrose de ces tumeurs fait suite à une prolifération cellulaire toujours plus aberrante, créant une importante hétérogénéité cellulaire de plus en plus compacte, qui a pour conséquences de limiter drastiquement la diffusion de l'oxygène au sein de la tumeur. Les zones nécrotiques sont généralement délimitées par des cellules qui prennent une forme enguirlandée et s'organisent en structures appelées pseudo-palissades (Rong et al., 2006a). La prolifération vasculaire prend alors la forme d'une néo-angiogenèse tumorale qui vise à remédier à cette absence d'oxygène. (Li et al., 2009a).

II.3.2.2. Les oligodendrogliomes

Les oligodendrogliomes regroupent des gliomes de grades 2 et 3. Ils sont rares chez l'enfant et représentent moins de 1% de tumeurs cérébrales chez les patients âgés de 0 à 14 ans. Les oligodendrogliomes de haut-grade se démarquent de leurs homologues de grade 2 par l'apparition d'une anaplasie plus ou moins diffuse, associée à une accentuation de l'activité mitotique. Ils peuvent également présenter des traces de prolifération vasculaire et/ou des zones nécrotiques. La densité cellulaire et les atypies nucléaires sont quant à elles moins caractéristiques selon les grades que pour les astrocytomes.

II.3.3. Analyse histomoléculaire

II.3.3.1. L'examen histomoléculaire

L'examen histomoléculaire est effectué en parallèle des examens histologiques classiques, la plupart du temps à partir du même prélèvement de tissu tumoral (issu de la biopsie ou de la résection chirurgicale décrites plus haut). Il est basé sur des techniques d'immunohistochimie, d'hybridation in-situ et/ou de séquençages de l'ADN et de l'ARN tumoral. Il vise à détecter la présence d'anomalies moléculaires permettant de préciser un sous-type tumoral plus spécifique afin de compléter le diagnostic clinico-radio-histologique. Cela s'effectue notamment à travers la mise en évidence de biomarqueurs prédictifs et d'altérations génétiques clés communément nommées mutations « *driver* » (Métais and Rousseau, 2021).

II.3.3.2. Les mutations drivers

Les mutations *driver* peuvent être définies comme des mutations « conductrices », qui déterminent le développement de la tumeur et seraient à l'origine de la dérive maligne initiale de la cellule. Elles sont sélectives, récurrentes, mutuellement exclusives et peuvent être

corrélées à des localisations cérébrales et des classes d'âge spécifiques. Associés aux caractéristiques anatomocliniques décrites plus haut, elles permettent d'affiner la classification de l'OMS à travers des sous-groupes tumoraux plus homogènes (Tableau 1).

Chez l'enfant, la découverte clé qui illustre le mieux la singularité des GHG pédiatriques est l'identification des mutations somatiques des gènes codant pour les variants d'histone H3.3 (H3F3A) et H3.1 (HIST1H3B, HIST1H3C) (Figure 19). Ces mutations entraînent des substitutions d'acides aminés au niveau de deux résidus clés situés sur la queue de l'histone et peuvent être décelées en IHC (Figure 20). La mutation H3K27M est la plus courante et caractérise des GHG pédiatriques de la ligne médiane. Elle entraîne notamment une perte de la triméthylation de K27M. La mutation de type H3G34 caractérise des GHG hémisphériques ; la glycine est remplacée par une arginine ou une valine en position 34 (G34V ou G34R respectivement) (Bjerke et al., 2013; Schwartzenruber et al., 2012a; Wu et al., 2012). Hormis des variantes similaires retrouvées dans de rares tumeurs osseuses chez l'enfant, ces mutations n'ont pas été décelées dans d'autres types de cancer (Behjati et al., 2013).

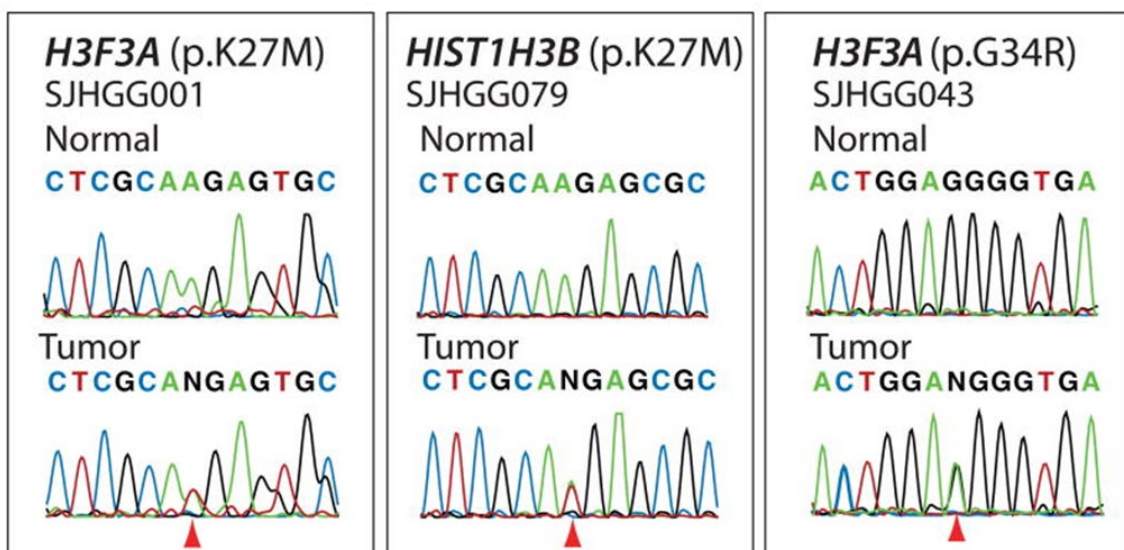


Figure 19 : Chromatogrammes de séquençage Sanger représentant des mutations driver de type K27M et G34R affectant les gènes H3F3A et/ou HIST1H3B dans des GHG pédiatriques comparé à un ADN normal correspondant. La mutation K27M affecte le gène H3F3A (gauche) ou le gène HIST1H3B (droite). La mutation G34R affecte le gène H3F3A (droite). La flèche rouge indique la position de la mutation (Wu et al, 2012).

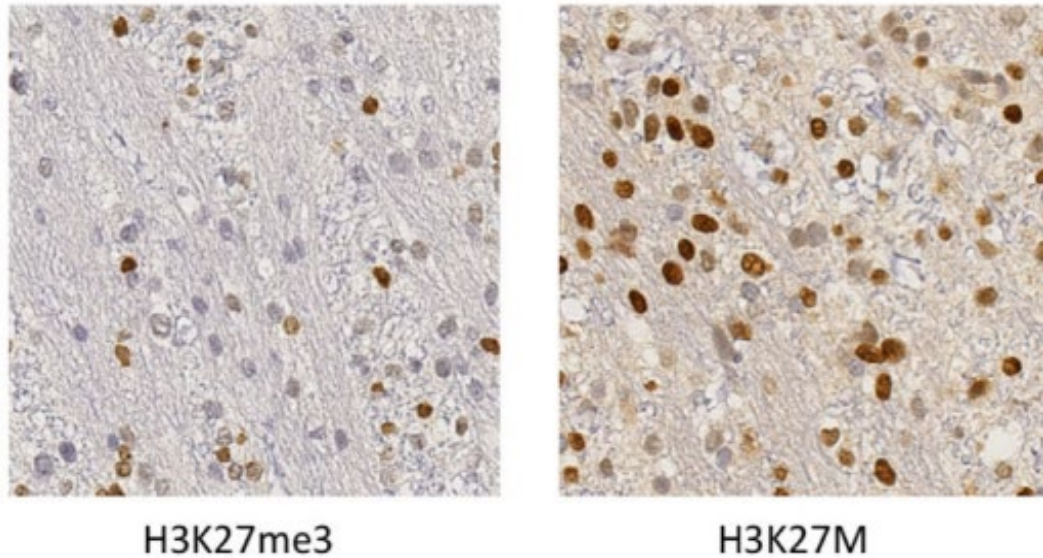


Figure 20: Profil immunohistochimique d'un GHG pédiatrique de la ligne médiane avec mutation H3.3K27M. L'histologie montre une perte de la triméthylation en K27M avec une absence de marquage nucléaire des cellules tumorales en comparaison avec des témoins internes positifs (cellules endothéliales et/ou cellules gliales résiduelles) (gauche) et une expression nucléaire de la protéine mutée H3K7M (droite). Révélation par diaminobenzidine (DAB), Grossissement x400. (Métais et Rousseau, 2021).

De manière générale, la classification actuelle de l'OMS émet une première distinction entre les GHG pédiatriques de la ligne médiane mutés H3K27M et les GHG pédiatriques hémisphériques mutés H3G34V/R. Néanmoins, cette même classification appelle à stratifier davantage ces sous-groupes tumoraux à travers des altérations génétiques et moléculaires complémentaires (Tableau 2) (Louis et al., 2021).

Table 4 Layered Report Structure

Integrated diagnosis (combined tissue-based histological and molecular diagnosis)
Histological diagnosis
CNS WHO grade
Molecular information (listed)

Tableau 2: Tableau issu de la classification de l'OMS de 2021 définissant les critères de stratification des GHG (Louis et al, 2021)

Parmi ces altérations, la mutation V600E de BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) montre une récurrence particulière dans les gliomes pédiatriques. Elle caractérise majoritairement des gliomes de bas-grade mais peut également définir des GHG hémisphériques, en particulier lorsqu'elle est associée à la mutation CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) (Jones et al., 2017a) (Figure 21). Elle affecte le gène proto-oncogène BRAF, un membre de la famille RAF (Rapid Accelerated Fibrosarcoma) et consiste en une substitution de la valine par l'acide glutamique en position 600 (cf II.4.1.2).

Plus récemment, de nouvelles pistes ont mis en évidence des translocations chromosomiques des gènes NTRK (neurotrophic tyrosine receptor kinase) (notamment NTRK2) comme de potentiels *drivers* oncogéniques dans des GHG pédiatriques, notamment ceux affectant les très jeunes enfants (Britton et al., 2021; El-Ayadi et al., 2017; Wu et al., 2014) (Figure 22). Elles entraînent la formation d'une protéine de fusion TrkB (tyrosine receptor kinase B) anormalement active menant à une dérégulation de la différenciation, de la survie et/ou de la prolifération cellulaire. Néanmoins, ces anomalies ne font pas encore partie intégrante de la classification de l'OMS et nécessite de plus amples investigations.

Ces différents *driver* peuvent être associés à d'autres altérations moléculaires de « second plan », plus couramment surnommées « passagers » et permettent d'aboutir à une classification avancée des GHG pédiatriques constituée de sous-groupes tumoraux plus homogènes.

II.3.4. Classification histo-moléculaire avancée des GHG pédiatriques

L'intégration des aspects anatomocliniques, des propriétés histologiques et des caractéristiques moléculaires des GHG permet de stratifier davantage les sous-groupes de GHG pédiatriques décrits par l'OMS, en distinguant notamment les DIPG des autres GHG de la ligne médiane (Figure 21).

II.3.4.1. Les gliomes diffus de la ligne médiane avec mutation H3K27M

Ces **gliomes diffus de la ligne médiane** (DMG) se développent dans les structures de la ligne médiane de l'encéphale ; thalamus, tronc cérébral et moelle épinière. Ils représentent 60% des GHG pédiatriques. L'âge de survenue se situe habituellement entre 5 et 11 ans mais des formes plus rares peuvent survenir à l'âge adulte. Depuis la classification de l'OMS de 2016, ils sont catégorisés sur le plan moléculaire par la mutation H3K27M qui les classe inexorablement dans la catégorie des gliomes de grade 4 (Louis et al., 2016, 2021).

La forme la plus fréquente est le **gliome diffus intrinsèque du pont** (DIPG = Diffuse Intrinsic Pontine Glioma), communément synonyme de « gliome infiltrant du tronc cérébral »

ou « gliome protubérantiel diffus ». Il représente entre 80 et 90% des gliomes diffus de la ligne médiane et près de 50% de l'ensemble des GHG pédiatriques (Braunstein et al., 2017; Buccoliero et al., 2022; Srikanthan et al., 2021b). Il touche préférentiellement des enfants de 6 à 9 ans (médiane \approx 7 ans) et constitue une entité anatomoclinique quasiment exclusive à la population pédiatrique.

Ce sous-type tumoral prend naissance au niveau de la protubérance et montre une infiltration locale qui augmente progressivement le volume du tronc cérébral, ce qui entraîne souvent une atteinte des voies longues, des nerfs crâniens et un syndrome cérébelleux. La tumeur peut laisser apparaître des zones nécrotiques et une faible perfusion sanguine. Elle est composée de cellules de phénotypes astrocytaires ou indéterminés plus ou moins densifiées. Dans les DIPG, le système de grading basé sur des critères histologiques n'est pas applicable mais leur localisation et leur imagerie typiques suffisent souvent à les considérer comme des GHG (Hoffman et al., 2018). Peu importe le grade attribué (de 2 à 4), l'évolution est similaire et dépend de la biologie moléculaire de la tumeur.

Sur ce plan, la présence de la mutation K27M des gènes des histones H3 confirme le diagnostic de grade 4. Elle concerne 70 à 80% des DIPG et affecte majoritairement le gène H3F3A (90%), plus rarement HIST1H3B/C (10%). Elle se traduit par une perte de la triméthylation K27M et une hypométhylation globale et s'accompagne souvent d'une mutation du gène TP53 voire d'une perte d'expression d'ATRAX (cf II.4.2.2.) (Johnson et al., 2017; Khuong-Quang et al., 2012; Solomon et al., 2015).

Les DIPG restent à ce jour inopérables en raison de leur forte infiltration et de leur localisation dans les régions cérébrales sensibles régissant des fonctions vitales de l'organisme. Leur pronostic est particulièrement sombre ; la médiane de survie globale est de 9 mois et la plupart des enfants ne survivent pas plus de 2 ans après le diagnostic (Grill et al., 2012; Mackay et al., 2017).

Les **gliomes thalamiques infiltrant de haut-grade** constituent l'essentiel du reste des DMG. Ils peuvent être de phénotype astrocytaire ou oligodendrogial et de grade 3 ou 4. Ils concernent des enfants légèrement plus âgés, avec un âge médian au diagnostic de 11 ans. Les imageries décrivent une atteinte thalamique essentiellement unilatérale au niveau du corps calleux. Sur le plan moléculaire, ces GHG sont typiquement mutés pour H3K27M, essentiellement pour le gène H3F3A. Ils montrent eux-aussi une perte de la triméthylation H3K27me3 et une hypométhylation globale de l'ADN. Là encore, leur localisation profonde et

leur diffusion les rendent inopérables. Leur pronostic est intermédiaire entre les DIPG et les gliomes hémisphériques, avec une médiane de survie de 12 mois.

II.3.4.2. Les gliomes hémisphériques infiltrants de haut-grade

Les GHG hémisphériques représentent 40% des GHG pédiatriques. Ils concernent des patients plus âgés et sont davantage diagnostiqués à l'adolescence, avec un âge médian de 19 ans (Jones et al., 2017b). Histologiquement, ils sont très similaires à ceux de l'adulte et sont catégorisés comme des glioblastomes (GBM), même s'ils ne partagent pas toujours les mêmes aspects en imagerie. Ils montrent une prolifération tumorale infiltrante avec une nécrose et une prolifération endothélio-capillaire. Ils présentent une activité mitotique élevée et les cellules expriment la GFAP mais rarement OLIG2 (Métais and Rousseau, 2021).

Sur le plan moléculaire, près d'un tiers de ces gliomes hémisphériques présentent la mutation H3.3G34V/R, la plupart du temps en concomitance avec les mutations TP53 et ATRX. Ils montrent également une hypométhylation globale de l'ADN mais conservent bien la triméthylation H3K27me3.

Une petite proportion de ces GHG corticaux (5 à 10%) est mutée pour BRAFV600E. Ces GHG concernent des classes d'âge plus jeunes que les G34V/R. Les mutations BRAF sont courantes dans les gliomes de bas-grade, mais la BRAFV600E est associée à un pronostic similaire aux GHG. Ces gliomes mutés partagent des critères histologiques et épigénétiques communs avec les xanthoastrocytomes et sont souvent associés à des mutations CDKN2A (Huillard et al., 2012; Korshunov et al., 2016). Du fait de leur localisation corticale et la possibilité d'une résection chirurgicale, leur pronostic est sensiblement meilleur avec une médiane de survie de 15 à 20 mois selon la mutation *driver*.

II.3.4.3. Les GHG considérés comme non-muté (WT)

Le reste des entités tumorales restantes forment un groupe hétérogène de gliomes non mutés pour les *driver* connus (« **wild type** »). On y retrouve des facteurs putatifs potentiels et des altérations génomiques et/ou épigénomiques qui se chevauchent mais ils ne dessinent à ce jour aucun sous-groupe clinico-biologique précis et validé. Une faible proportion de ces GHG wild-type peut être mutée pour IDH1 (Isocitrate deshydrogenase 1. Cette mutation est considérée comme un *driver* des GHG adultes mais elle est très rare chez l'enfant. De nouvelles pistes sont actuellement à l'étude pour l'identification de nouvelles mutations *driver* potentielles, à travers les fusions NTRK2 qui semblent définir des GHG hémisphériques chez les très jeunes enfants (Barritault et al., 2021; Gambella et al., 2020) ou les surexpressions EZHIP (Antin et al., 2020; Jenseit et al., 2022).

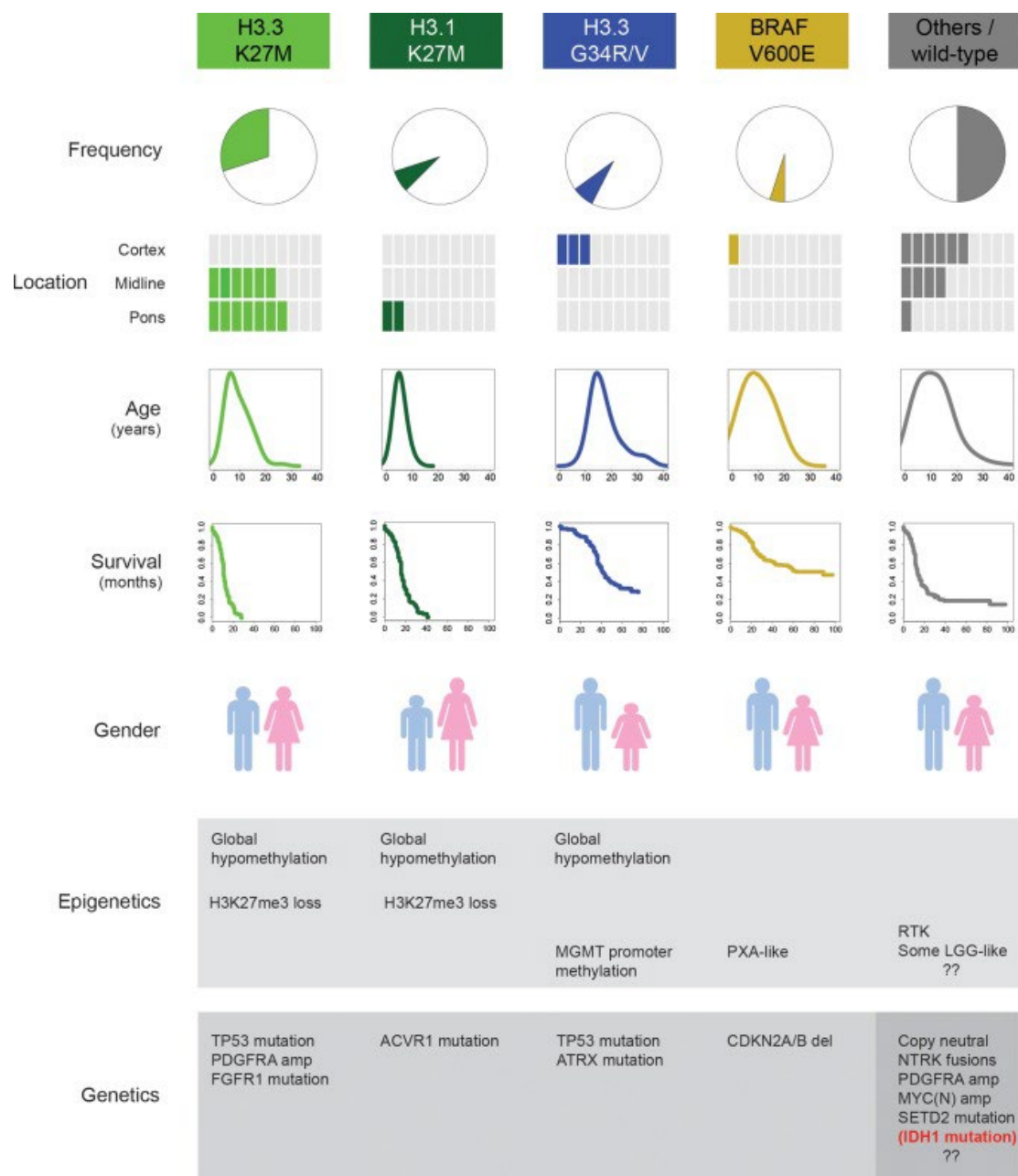


Figure 21 : Sous-groupes de GHG pédiatriques définis selon la mutation driver associée à l'ensemble de leurs proximités biologiques et cliniques (âge de diagnostic, pronostic, altérations génétiques et épigénétiques). (Jones et al, 2017a)

Il apparaît aujourd'hui clairement que la classification moléculaire est bien mieux corrélée avec l'évolution clinique des GHG que la classification histologique (Reuss et al., 2015a, 2015b). Néanmoins, aucune mutation *driver* n'a pu être identifiée dans près de la moitié des GHG pédiatriques et une importante hétérogénéité tumorale subsiste au sein même des sous-groupes associés aux mutations des histones ou de BRAF, en fonction des altérations (épi)génétiques concomitantes. De meilleurs diagnostics et prises en charge des GHG pédiatriques nécessitent d'explorer toujours davantage la biologie moléculaire de ces tumeurs.

II.4. Biologie moléculaire des GHG pédiatriques

Depuis les années 2000, le développement des techniques de séquençage et de génotypage à haut-débit ont ouvert la voie à une étude pangénomique des tumeurs, à travers des analyses intégrées du génome en termes d'anomalies quantitatives du nombre de copies de gènes et de perte d'hétérozygotie (CGH array), de mutations (exome), d'expression (transcriptome) et d'anomalies épigénétiques (méthylome).

Dès 2010, les caractérisations moléculaires des GHG pédiatriques n'ont cessé de souligner un profil moléculaire bien distinct de leurs homologues adultes (Bax et al., 2010; Johnson et al., 2017; Jones and Baker, 2014; Mackay et al., 2017; Schwartzentruber et al., 2012b). Elles ont permis d'établir des profils moléculaires combinant les mutations *driver* présentées précédemment à d'autres altérations génomiques appariées (Figure 22). Dans la suite de cette partie introductive, nous présenterons brièvement les caractéristiques et les conséquences biologiques des altérations génétiques et moléculaires les plus courantes dans les GHG pédiatriques.

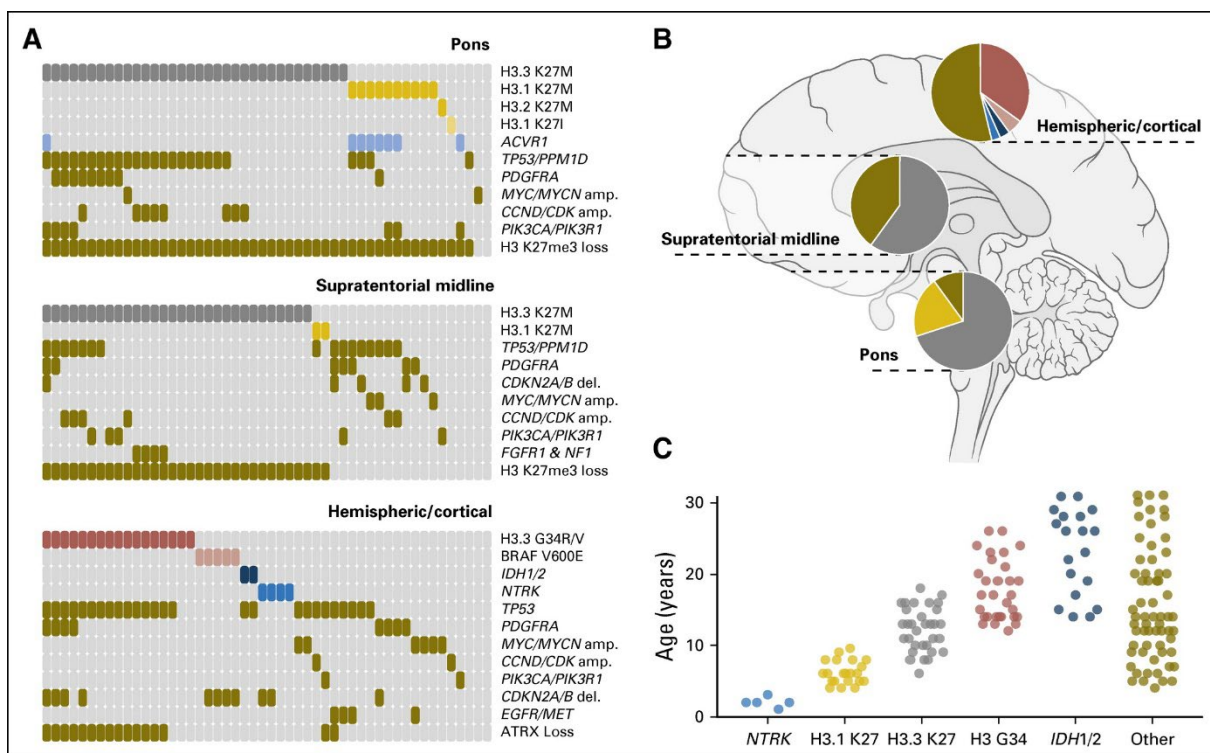


Figure 22 : Profils moléculaires et caractéristiques cliniques associées des sous-groupes de GHG pédiatriques. (A) Représentation des altérations moléculaires les plus communes dans les GHG pédiatriques selon leur emplacement anatomique. (B) Diagrammes circulaires des fréquences relatives des altérations moléculaires des GHG pédiatriques selon leur localisation cérébrale. (C) Répartition par âge des altérations moléculaires les plus courantes des GHG de l'enfant et du jeune adulte. (Sturm et al. 2017).

II.4.1. Les mutations *drivers*

II.4.1.1. Les mutations des histones

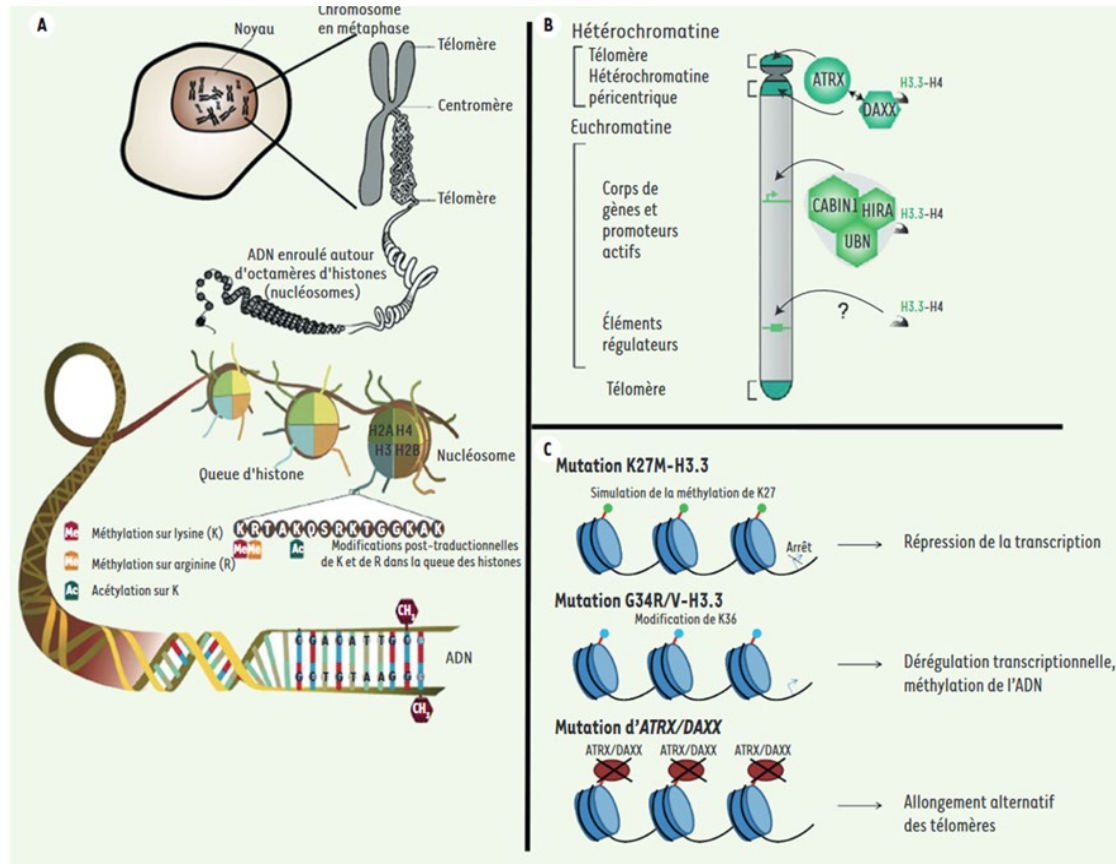


Figure 23: Représentation schématique de l'assemblage de la chromatine et de sa régulation par les histones. (A) L'ADN s'enroule autour des octamères d'histones s'organisent et se compacte. Cette conformation régule des processus de réplication, la transcription et la réparation de l'ADN. (B) Le complexe ATRX/DAXX permet d'intégrer H3.3 au niveau des télomères et de l'hétérochromatine. L'absence d'ATRX favoriserait le phénomène d'allongement des télomères et la dérive maligne de la cellule. (C) Proposition de modèles physiopathologiques des GHG pédiatriques (Khuong-Quang et al, 2012).

Les histones sont des protéines basiques impliquées dans le repliement et la compaction de la molécule d'ADN afin d'en former la structure de base de la chromatine : le nucléosome. On y trouve deux exemplaires de chacune des quatre variantes d'histones : H2A, H2B, H3 et H4, qui forment le cœur du nucléosome. La molécule d'ADN s'enroule autour de cet octamère d'histones à raison de 146 paires de bases sur 1,65 tours par nucléosome. Une cinquième histone notée H1 se fixe sur la molécule d'ADN et stabilise l'ensemble de la structure (Figure 23A). Cet enroulement multiplie par six le degré de compaction par rapport à un brin d'ADN nu de longueur équivalente (Olins and Olins, 2003). L'enchaînement bout à bout de ces nucléosomes

constitue le nucléofilament, communément représenté sous une forme dite « en collier de perle », visible en microscopie électronique. De cette manière, le nucléosome régule le degré de compaction de l'ADN et donc son accès à des facteurs modulant la transcription, la réplication ou la réparation de l'ADN. Il est aussi le siège d'une régulation épigénétique de l'expression génique à travers des modifications post-traductionnelles intervenant aux extrémités amino-terminale des histones, en particulier la méthylation (Kim, 2014; Marmorstein, 2001). L'histone 3 a un rôle majeur dans la régulation épigénétique car ses différents variants (H3.1, H3.2 et H3.3) sont particulièrement impliqués dans la dynamique et la régulation de l'expression des gènes (Lacoste and Côté, 2003; Lowe et al., 2019a).

- *La mutation H3K27M*

La mutation H3K27M se traduit par la substitution de la lysine par une méthionine en position 27 et affecte les isoformes H3.3, codées par le gène H3F3A (75% des cas) et H3.1, codées par le gène HIST1H3B/C (25% des cas) (Bender et al., 2013; Deng et al., 2018; Khuong-Quang et al., 2012; Mackay et al., 2017).

La méthylation usuelle de H3K27 est déterminée par le complexe PRC2 (Polycomb repressive complex) et l'activité de sa sous-unité catalytique EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2). Sa fonction est de catalyser la triméthylation de K27, favorisant un phénotype hétérochromatique et entraînant la répression des gènes. A l'inverse, des mécanismes de déméthylation des histones sont assurés par des complexes de type KDM (Histone lysine demethylase) (par exemple KDM4/6) (Figure 24). Les mutations H3K27M suppriment l'activité du complexe PRC2 en séquestrant sa sous-unité catalytique EZH2. Elles entraînent non seulement une perte de la triméthylation de l'histone mutée H3K27M mais également une hypométhylation globale des histones H3K27 sauvages (WT). Ce phénomène perturbe la dynamique de la chromatine et favorise la tumorigénèse en induisant une expression aberrante de gènes (Chan et al., 2013; Larson et al., 2019; Lewis et al., 2013; Lowe et al., 2019b). Ils sont couramment associées à des altérations des gènes TP53 et PDGFRA (Funato et al., 2014; Johnson et al., 2017; Mackay et al., 2017).

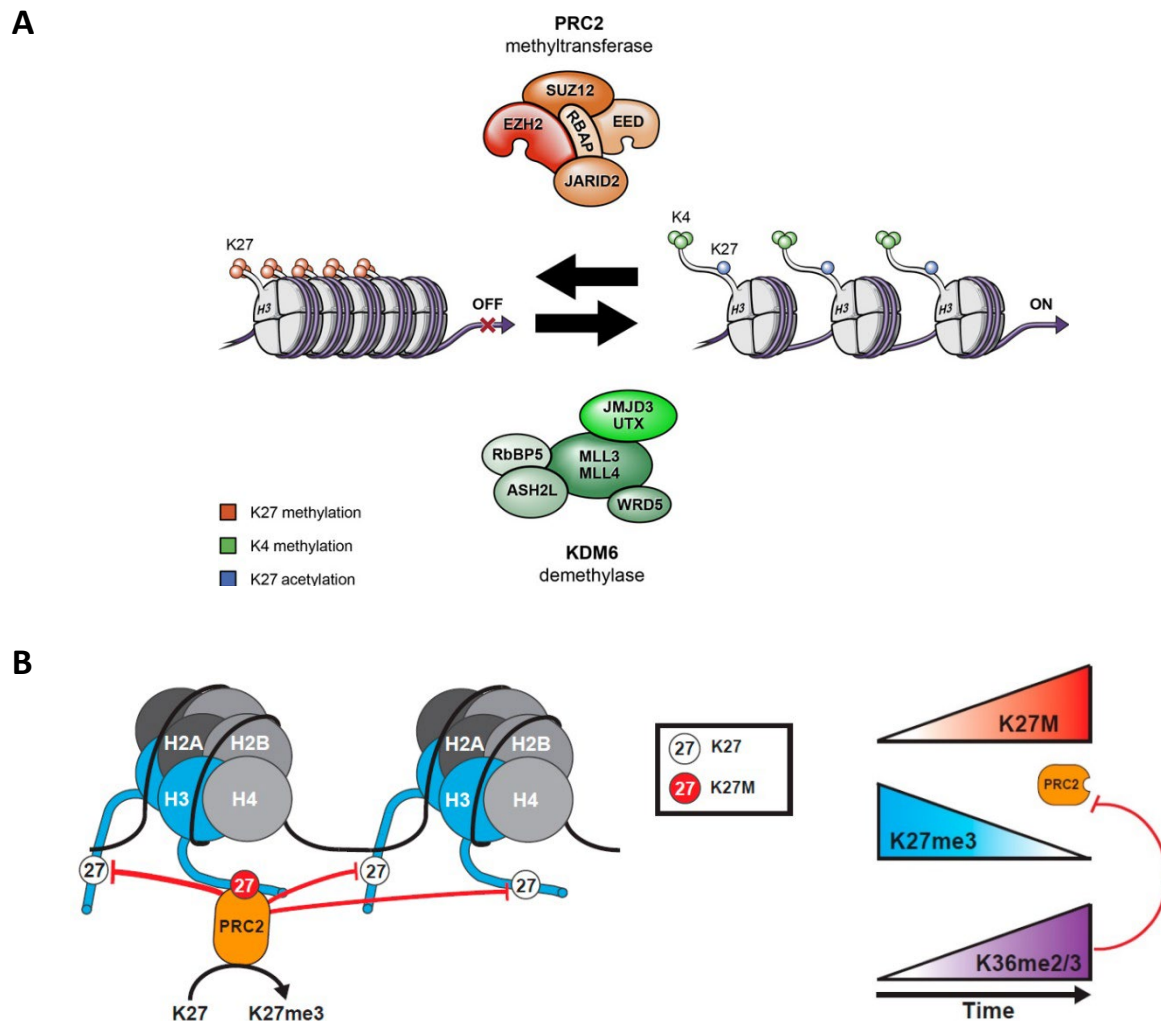


Figure 24 : Conséquences des mutations H3K27M sur le fonctionnement du complexe PRC2 et la méthylation des histones. (A) : En conditions normales, le PRC2 augmente la méthylation de K27 à travers l'activité catalytique de son composant enzymatique EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) (Adapté de Lulla et al., 2016). A l'inverse, le complexe KDM6 déméthylase élimine les groupements méthyl de K27 et augmente la méthylation de K4, favorisant un état de chromatine plus relâché et transcriptionnellement actif. (B) La mutation K27M bloque la méthylation par le complexe PRC2 en séquestrant la sous-unité catalytique EZH2, ce qui entraîne une réduction globale des taux de K27me. Les modifications transcriptionnelles induites par la perte de K27me3 favorisent la méthylation de K36 et contribue encore davantage à l'inhibition fonctionnelle de PRC2 (Lowe et al., 2019).

SUZ12, *SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*; *RBAP*, *RetinoBlastoma-Binding Protein 7*; *EED*, *Embryonic Ectoderm Development*; *JARID2*, *Jumonji And AT-Rich Interaction Domain Containing 2*.

Les mutants H3.3K27M sont de mauvais répondeurs aux traitements et sont associés à un pronostic particulièrement mauvais, avec une médiane de survie de 9 mois (Rakotomalala et al., 2021). L'évolution des H3.1K27M est un peu moins agressive et présente de meilleurs

résultats à la radiothérapie, mais le pronostic reste très sombre avec une médiane de survie de 12 mois (Castel et al., 2015).

- *La mutation H3G34V/R*

La mutation H3G34V/R est exclusive au gène H3F3A (isoforme H3.3) : une glycine est substituée par une valine (V) ou une arginine (R) en position 34 au niveau de la queue de l'histone. Cette mutation perturbe la triméthylation de la lysine voisine en position 36 (H3K36me3) en bloquant l'activité complexe SETD2, une histone méthyltransférase chargée de méthyler la lysine K36 de l'histone H3 (Figure 25). Contrairement à ce qui est observé avec H3K27M, les mutants G34 V/R ne présentent pas d'effet dominant ; le blocage de la méthylation de H3K36me2/3 s'effectue uniquement sur la queue de histone H3 mutée et non sur les sauvages (**Figure**) (Lewis et al., 2013; Schwartzenruber et al., 2012b). Par ailleurs, des mutations de SETD2 exclusives de H3G34V/R ont aussi été décrites dans les GHG pédiatriques (Fontebasso et al., 2013). En parallèle, le complexe histone-lysine déméthylase 4 (KDM4) peut être séquestré par le mutant G34R, ce qui favorise la déméthylation K36me3 en K36me2 sur la queue de l'histone mutée. A l'inverse, ce détournement de KDM4 de ces cibles habituelles conduit à une accumulation de K36me3 dans les loci cibles de KDM4 dans les cellules G34R.

De plus, la mutation H3G34V est particulièrement associée à une régulation à la hausse de MYCN (Bjerke et al., 2013). Cette régulation à la hausse de MYCN pourrait constituer un facteur initiateur de la tumorigenèse dans les cellules souches neurales et aboutir au développement de glioblastomes (Swartling et al., 2012).

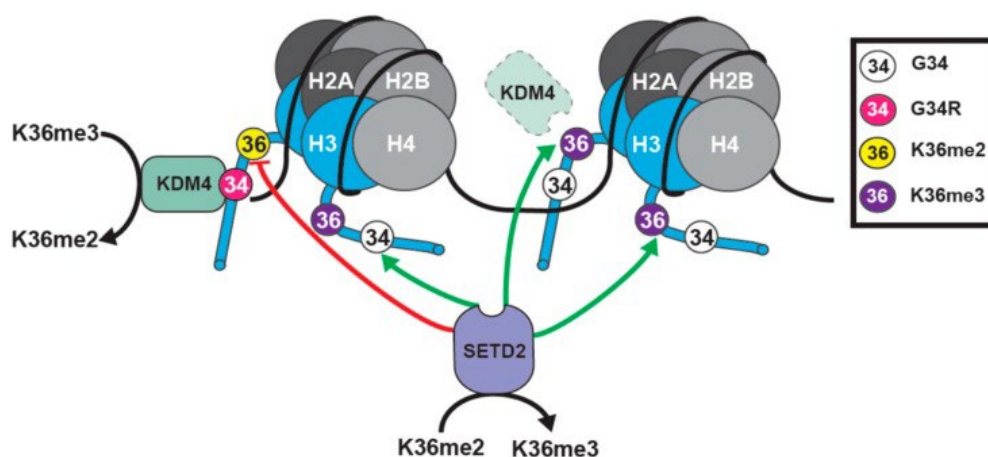


Figure 25: Modèle représentatif des conséquences fonctionnelles de la mutation H3G34R (Lowe et al, 2019)

II.4.1.2. La mutation BRAF

Le gène BRAF est un gène associé à la famille des gènes RAS et RAF, dont les protéines à activité kinase sont impliquées dans la voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK/MAPK qui médie les réponses cellulaires aux signaux de croissance. Cette voie est dérégulée dans de nombreux cancers et se traduit par une augmentation du nombre de copies de ces différents oncogènes, qui résulte en une croissance cellulaire aberrante (Jeuken et al., 2007). L'activité de RAS est inhibée par le gène suppresseur de tumeurs NF1, qui est fréquemment muté dans les GHG pédiatriques (25%), notamment dans le cadre de neurofibromatoses héréditaires (NF1). La voie Ras/Raf/MEK peut aussi subir des mutations ponctuelles, la plus courante étant la mutation V600E du proto-oncogène BRAF. Elle consiste en une substitution de la valine par de l'acide glutamique et conduit à l'activation aberrante de la kinase régulée par ERK. Elle caractérise un sous-type particulier de GHG majoritairement sus-tentoriels avec des taux allant de 10 à 25% des cas et est souvent associée à la délétion CDKN2A/B (Mackay et al., 2017; Sturm et al., 2014a). Cette mutation est plus fréquente dans des gliomes pédiatriques de grades inférieurs (xanthoastrocytomes pléomorphiques et gangliogliomes) (Buccoliero et al., 2022).

II.4.2. Anomalies moléculaires associées

II.4.2.1. Les altérations menant à une dérégulation du cycle cellulaire

- La mutation de TP53

TP53 est un gène suppresseur de tumeurs situé sur le chromosome 17. Il est impliqué dans de nombreux cancers et joue un rôle essentiel dans la réponse au stress cellulaire et la prévention du développement de tumeurs. Il code pour la protéine p53, couramment qualifiée de « gardienne du génome », un facteur de transcription modulant l'expression de différents gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et le déclenchement de l'apoptose. Il veille à la stabilité du génome en contribuant à la réparation de l'ADN et déclenche l'apoptose lorsque les lésions de l'ADN sont irréversibles (Figure 26). Les mutations affectant TP53 perturbent cette régulation et peuvent mener à une prolifération anarchique de cellules à l'ADN endommagé, qui aboutissent à une instabilité génomique et au développement de cancers (Olivier et al., 2010). Globalement, cette mutation est annonciatrice de l'évolution maligne de la tumeur, elle est rare dans les bas-grades.

Les mutations du gène TP53 sont courantes et toucheraient près de 50% de des cancers, tous types confondus. Elle est également incontournable dans les GHG pédiatriques, décrite dans 50 à 60% % des cas (Grill et al., 2012; Johnson et al., 2017; Mackay et al., 2017). Elle

serait notamment à l'origine de la radiorésistance des DIPG et associée à un mauvais pronostic (Werbrouck et al., 2019). Les mutations de TP53 et celles de la voie p53-ARF-MDM2 ont été décrites dans près de 84% des patients atteints de GBM et 94% des lignées cellulaires dérivées de GBM (Jones and Baker, 2014; Liu et al., 2018; Mackay et al., 2017). La fréquence des mutations de TP53 semble proportionnelle à l'âge des patients pédiatriques : dans une étude clinique de phase III sur des GHG pédiatriques, elle est présente dans 28% des enfants de moins de 3 ans contre 70% des enfants âgés de 3 à 6 ans (Batra et al., 2014).

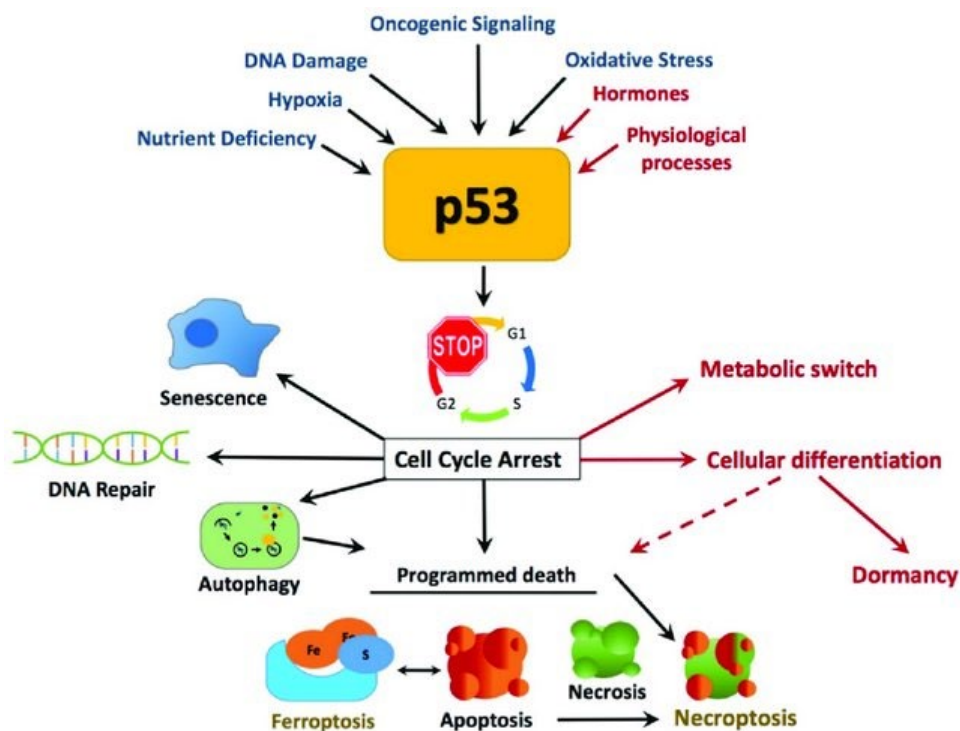


Figure 26 : Rôle suppresseur de tumeur de p53 en réponse au stress cellulaire. p53 est activée par un ensemble de signaux liés au stress cellulaire comme l'hypoxie, l'altération de l'ADN, l'activation d'oncogènes ou le stress oxydatif lié aux espèces réactives de l'O₂ (ROS). En réponse à ces signaux, p53 induit classiquement un arrêt du cycle cellulaire et la réparation des dommages de l'ADN, qui placent la cellule en état de sénescence ou conduisent à l'apoptose. D'autres rôles non-canoniques de p53 dans la mort cellulaire peuvent moduler l'autophagie, la nécrose, la nécroptose ou la ferroptose. D'autres processus physiologiques comme la signalisation hormonale peuvent également recruter p53 et être impliqués dans des modifications métaboliques et dans la différenciation cellulaire (Moulder et al, 2018).

- Les altérations CDKN2A/B

Les gènes CDKN2A/B sont des gènes suppresseurs de tumeur. Ils codent pour la protéine p16INK4a et servent d'inhibiteur du cycle cellulaire. Les altérations de CKDN2A/B dans les GHG pédiatriques se caractérisent majoritairement par une diminution du nombre de

copies de gènes, aboutissant à une diminution de l'expression de la protéine p16. (Purkait et al., 2013). Cette suppression de gène est plus fréquemment observée dans les GBM et corrélée avec l'amplification d'EGFR. Les altérations de CDKN2A/B ont été identifiées dans toutes les populations mais elles montrent une répartition sensiblement différente selon les classes d'âge : elles touchent davantage les personnes âgées et les adultes (42 et 44% respectivement) par rapport aux patients pédiatriques (de 15 à 25%) (Johnson et al., 2017; Mackay et al., 2017; Sturm et al., 2017).

- La voie MYC/MYCN

MYC est un proto-oncogène situé sur le chromosome 8q24, considéré comme l'oncogène le plus altéré dans le cancer humain (Dang, 2012). Il appartient à une famille de gènes qui comprend MYCL (L-Myc) et MYCN (N-Myc), qui régule la transcription de gènes impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire. Son expression est étroitement contrôlée par des motifs de régulation transcriptionnelle dans sa région promotrice et par différentes voies en lien avec l'activation de récepteurs membranaires (WNT, RTK, TCR, TGF- β). Il a également été identifié comme un gène capable de reprogrammer des cellules vers un état souche pluripotent (Laurenti et al., 2009; Singh and Dalton, 2009). Dans les GHG pédiatriques, il est muté dans environ de 10% des cas et concernent davantage des GHG hémisphériques (Mackay et al., 2017; Sturm et al., 2017)

II.4.2.2. La mutation ATRX et le phénotype d'allongement des télomères

Les cellules normales humaines sont toutes soumises à une loi naturelle de la sénescence répllicative, à l'origine du vieillissement des organismes. A l'échelle cellulaire, elle se traduit notamment par un raccourcissement progressif des télomères, induit par une accumulation de facteurs de stress physiologique au fil des divisions cellulaires. Cette érosion télomérique peut être compensée par l'activité des télomérases qui synthétisent des brins de novo et rallongent les télomères, en particulier au cours du développement embryonnaire. Dans les cellules normales somatiques, l'activité de cette télomérase est très limitée et ne suffit pas à compenser les pertes télomériques ; l'instabilité génétique grandit au fur à mesure que les télomères raccourcissent jusqu'à aboutir à un arrêt total du cycle cellulaire.

L'échappement de la cellule à cette sénescence répllicative constitue un facteur clé dans la tumorigenèse et permet à la cellule de franchir la barrière de l'immortalité et de poursuivre une prolifération hors de contrôle.

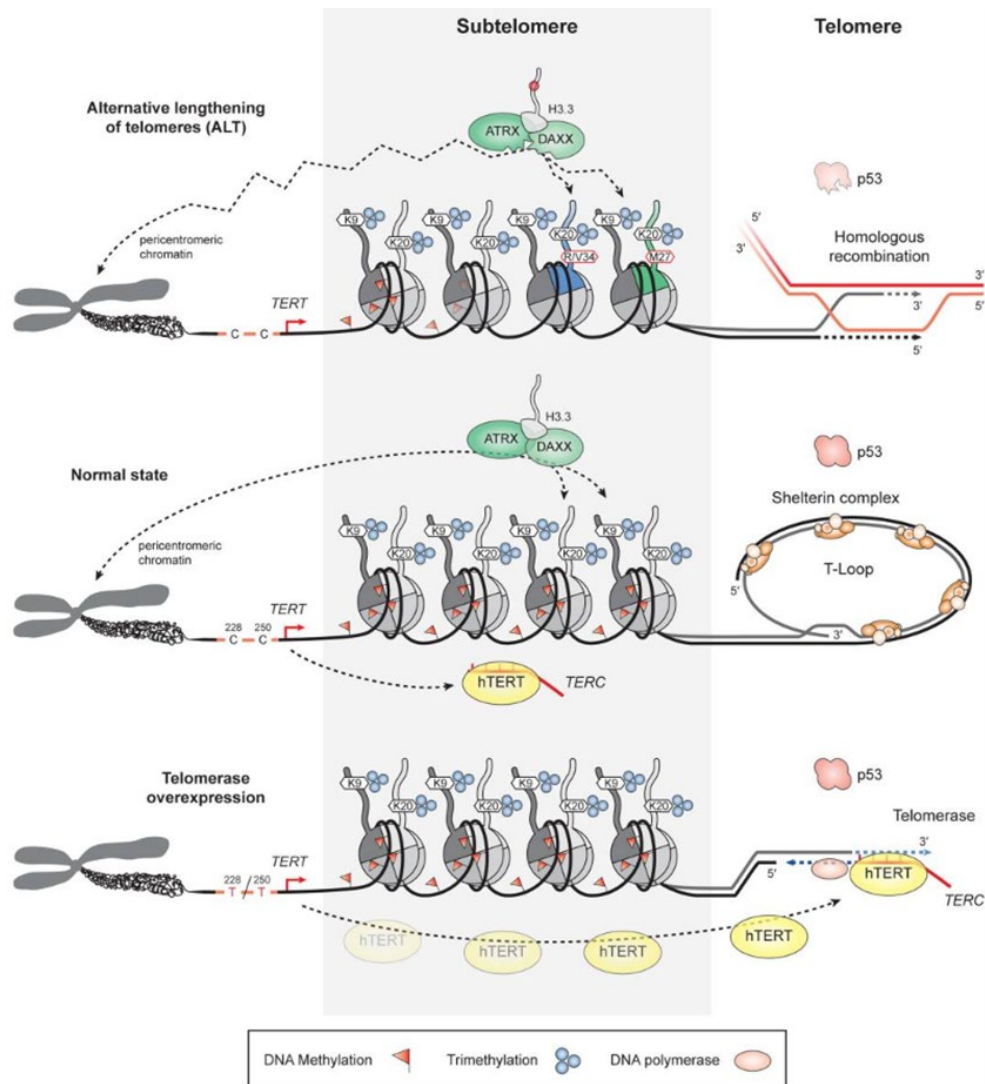


Figure 27 : Mécanismes de maintenance / élongation télomériques dans les GHG (Sturm et al, 2014)

Dans les gliomes, il est associé à deux types de mutations :

- la mutation du gène **ATRX** (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) perturbe des mécanismes de remodelage de la chromatine. Associé à la protéine DAXX (Death Domain-Associated Protein 6), le complexe ATRX-DAXX forme une protéine chaperonne chargée d'incorporer l'histone H3.3 dans des régions péricentromériques et subtélomériques afin de maintenir l'hétérochromatine. La mutation ATRX inactive ce complexe et empêche l'incorporation des H3.3, ce qui favorise des recombinaisons homologues et entraîne un allongement alternatif des télomères (ALT) (Figure 27).

Dans les GHG pédiatriques, les mutations ATRX-DAXX concernent 15 à 25% des tumeurs et coïncident plus largement avec les gliomes sus-tentoriels chez les jeunes adolescents, notamment ceux associés à la mutation G34V/R (Johnson et al., 2017; Jones and Baker, 2014;

Mackay et al., 2017; Schwartzenuber; Sturm et al., 2017). Les mutations H3F3A et ATRX-DAXX se chevauchent fréquemment avec la mutation de TP53 (Chen et al., 2006). Par ailleurs, les DIPG semblent montrer un phénotype d'ALT singulier dans les mutants H3.3K27M, même en absence de mutation ATRX (Buczkwicz et al., 2014).

- les mutations **C228T** et **C250T** augmentent l'expression transcriptionnelle du gène TERT (telomerase reverse transcriptase), codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase et entraînent une réactivation aberrante de la télomérase (Figure 27). Les mutations C228T et C250T sont plus fréquentes chez l'adulte et sont particulièrement associées aux amplifications d'EGFR (Labussière et al., 2014). La réactivation des télomérases est un phénomène observé dans près de 90% des cancers (Brunori and Gilson, 2005).

II.4.2.3. Les mutations ACVR1

Les mutations du gène codant pour le récepteur ACVR1 (activin A receptor type 1), également appelé ALK2 (activin receptor-like kinase-2). Elle ont été retrouvées dans 20 à 25% des DIPG et coïncident souvent avec la mutation H3.1K27M et une forme non-mutée de TP53 (Johnson et al., 2017; Taylor et al., 2014). Les mutations somatiques de ACVR1 rencontrées dans le DIPG sont similaires à celles qui ont été mises en évidence dans des lignées germinales de patients atteints de pathologies développementales de type fibrodysplasie ossifiante progressive (FOP) (Katagiri et al., 2018). Elles codent pour les substitutions p.Arg206His, p.Arg258Gly, p.Gly328Glu, p.Gly328Val, p.Gly328Trp et p.Gly356Asp. Leur conséquence est une activation constitutive des voies de signalisation BMP-TGF- β (BMP = bone morphogenic protein, TGF- β = Transforming Growth Factor Beta), en absence de ligands et entraîne une phosphorylation des protéines SMAD1/5/8 en aval (Figure 28). Dans la FOP, ces altérations sont classiquement associées à une dérégulation de la maintenance et de la différenciation des cellules souches. Des niveaux élevés des protéines SMAD ont été retrouvés dans des lignées de DIPG mutés H3.3K27M. De plus récentes études suggèrent que la mutation ACVR1 perturbe la différenciation des OPC et pourrait constituer une mutation à l'origine de la dérivation maligne initiale des OPC dans le DIPG (Fortin et al., 2020; Ramachandran et al., 2021).

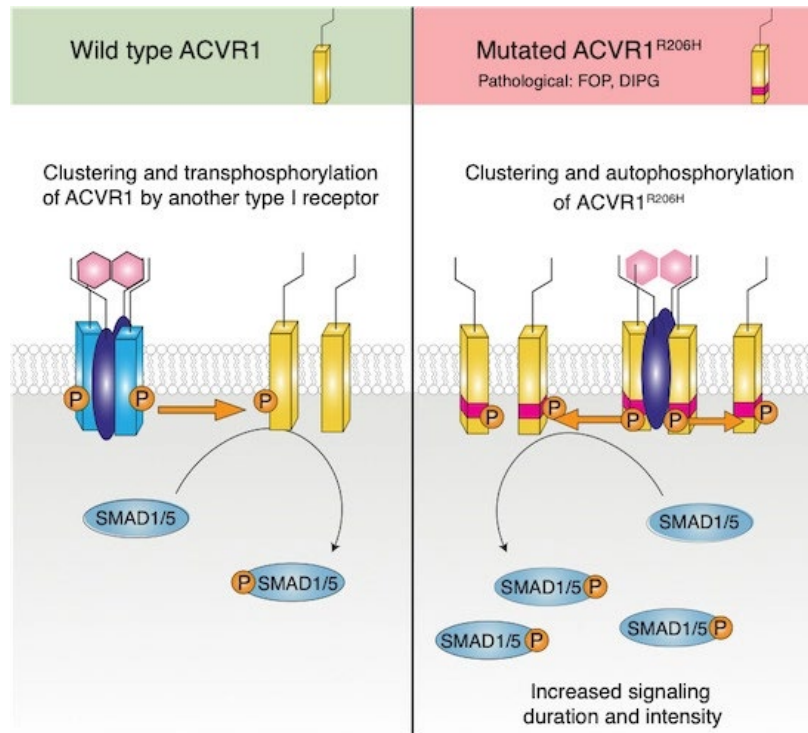


Figure 28 : Conséquences fonctionnelles de la mutation R206H sur le fonctionnement du récepteur ACVR1. En conditions normales, le récepteur ACVR1 est activé par transphosphorylation par les récepteurs canoniques suite à la fixation de l'activine A, conduisant à la phosphorylation des protéines SMAD sous-jacentes (gauche, panneau vert). Le récepteur ACVR1 s'auto-active lors du regroupement des récepteurs induits par l'activine A, ce qui induit une phosphorylation accrue de SMAD1/5/8 (Ramachandran et al., 2021)

II.4.2.4. Altérations des voies médiées par les récepteurs à activité tyrosine kinase

Les voies de signalisation activées par les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont impliquées dans une grande variété de cancers, en particulier les voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MEK. Elles régulent de multiples mécanismes impliqués dans la l'apoptose, la prolifération et la croissance cellulaire (Figure 29) (Brotelle and Bay, 2016a; Crespo* et al., 2016; Harrison and de Groot, 2017). Ces voies sont activées par différents types de RTK, notamment: FGFR (fibroblast growth factor receptors), EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), VEGFR (vascular endothelial growth factor), PDGFR (platelet derived growth factor receptor) (Figure 28). L'activation du récepteur par son ligand entraîne une cascade de signalisation intracellulaire complexe, médiée par un enchaînement d'enzymes de type kinase et/ou GTPase, elles-mêmes régulées par des protéines inhibitrices. Les gènes codants pour ces différents intermédiaires sont des cibles récurrentes d'altérations oncogéniques. Elles aboutissent globalement à une suractivation d'un régulateur positif et/ou à l'inhibition ou la suppression d'une protéine régulatrice inhibitrice. Ces altérations interviennent ainsi à

différents niveaux et conduisent à une signalisation oncogénique aberrante, ce qui favorise notamment la prolifération, la survie et/ou la propagation métastatique des cellules cancéreuses (Brotelle and Bay, 2016b; Crespo* et al., 2016; Harrison and de Groot, 2017; Li et al., 2016; Lin et al., 2017).

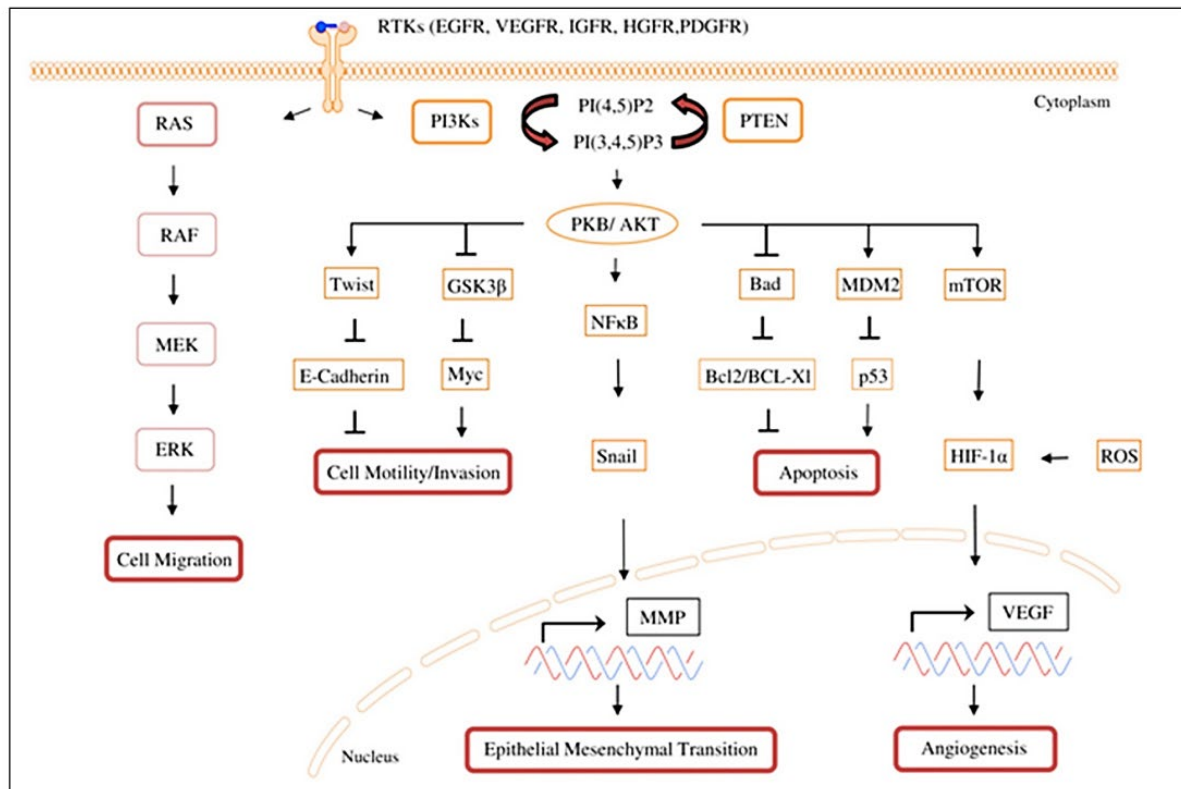


Figure 29 : Principales voies de signalisation médiées par les RTKs et conséquences sur le phénotype tumoral (Crespo et al, 2016)

- Les récepteurs à activité tyrosine-kinase (RTKs)

Les récepteurs tyrosine kinase initient les voies de signalisation oncogéniques précédemment citées en réponse à la fixation de leurs ligands respectifs (VEGF, EGF, FGF, PDGF notamment). Ils recrutent et activent la phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3K), premier médiateur intracellulaire, qui phosphoryle et active à son tour AKT qui agit sur divers cibles en aval (Figure 28).

Dans les GHG pédiatriques, les altérations des RTK les plus fréquentes sont associées au récepteur PDGFRA. Elles ont été mises en évidence dans près de 15 à 39% des GHG pédiatriques tous types confondus (Johnson et al., 2017; Mackay et al., 2017; Sturm et al., 2014b). Elle est particulièrement enrichie dans les gliomes infiltrants du tronc cérébral (DIPG) où elles représentent jusqu'à 50% des cas (Johnson et al., 2017; Mackay et al., 2017; Puget et

al., 2012b; Sturm et al., 2014b). De plus, on peut observer une surexpression du récepteur PDGFRA même en absence d'une amplification du gène PDGFRA, ce qui souligne l'importance de cette voie dans la tumorigenèse associée aux DIPG.

Des altérations des récepteurs EGFR et FGFR ont également été décelées chez l'enfant mais elles sont plus rares : 5 à 15% pour EGFR, comprenant 11% d'amplifications, 17% de délétions et 4% de mutations ponctuelles (Brennan et al., 2013; Sturm et al., 2014a; Paugh et al., 2010). Elles semblent caractériser de GHG hémisphériques de type WT ainsi que des sous-types de GHG thalamiques associés à une perte de H3K27me3. (Mackay et al., 2017; Sievers et al., 2021).

- Les altérations de PI3K

Les PI3Ks sont des protéines hétérodimériques constituées de 2 sous-unités ; une catalytique de 110 kDa et une régulatrice de 85 kDa. On dénombre actuellement 5 isoformes de la sous-unité régulatrice codées par les gènes PIK3R, avec p85 α , p55 α et p50 α codées le gène PIK3R1, p85 β codée par PIK3R2 et p55 γ , codée par PIK3R3. De même, on trouve trois isoformes de la sous-unité catalytique notées p110 α , p110 β et p110 γ et codées respectivement par les gènes PIK3CA, PIK3CB et PIK3CD (Brotelle and Bay, 2016a).

Ces protéines représentent le premier effecteur de la voie PI3K/AKT/mTOR, avec pour principale fonction de relayer la transduction du signal en réponse à l'activation du récepteur. Pour cela, elles catalysent la transformation des phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3), qui fait office de second messenger initiant de la cascade de signalisation moléculaire (Figure 28).

On retrouve des altérations des protéines PI3K dans les GHG pédiatriques. Pour la plupart, il s'agit de mutations de PIK3CA (7 à 20% des cas) et de PIK3R1 (6 à 12%) (Johnson et al., 2017; Mackay et al., 2017; Sturm et al., 2014a). La mutation PIK3CA semble particulièrement prévalente dans les DIPG (Grill et al., 2012).

- Les altérations de PTEN

L'activité enzymatique des PI3K est couramment associée à la protéine phosphatase PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), qui catalyse la réaction inverse à celle de la PI3K sur laquelle elle exerce une activité régulatrice inhibitrice. De ce fait, PTEN est considéré comme un gène suppresseur de tumeur et veille à réguler le fonctionnement de la PI3K. Des mutations et des délétions de PTEN ont été retrouvées dans 5 à 12% des GHG pédiatriques mais elles restent bien plus rares chez l'enfant que chez l'adulte (jusqu'à 30% de délétions) (Mackay et al., 2017; Sturm et al., 2014b). Elles se traduisent une inactivation de PTEN et conduisent

donc à une suractivation aberrante de PI3K. Même si elles semblent rares chez l'enfant, les altérations de PTEN pourraient constituer un évènement précoce dans le développement des DIPGs (Koschmann et al., 2017).

II.4.2.5. Les voies de réparation de l'ADN

Récemment, les gènes PARP1 (poly(ADP-ribose) polymérase-1) et XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1), associés à la réparation de l'ADN et à la régulation du cycle cellulaire, ont été proposés comme nouveaux marqueurs théranostiques dans les GHG pédiatriques suite à une étude réalisée au sein de notre équipe (Entz-Werlé et al., 2021). PARP1 fait partie du système BER (Base excision repair) est en première ligne dans la détection et la réponse aux dommages de l'ADN (DDR = DNA damage response). Elle vise à maintenir la stabilité de l'ADN et veille au maintien du génome. Son rôle ne sera pas détaillé davantage dans ce manuscrit mais des revues complètes ont été récemment publiées et peuvent être consultées pour plus d'informations (Helena et al., 2018; Pandey and Black, 2021). En résumé, les surexpressions de PARP1 et XRCC1 conduisent à une suractivation des mécanismes de réparation de l'ADN, favorisant un phénotype tumoral et la résistance aux traitements dans des sous-groupes de GHG pédiatriques. Ces mécanismes de réparation sont de plus sous-tendus par les états de méthylation des histones (Sun et al., 2020b; Gong and Miller, 2019; Pedersen et al., 2020).

Les différentes voies moléculaires décrites jusqu'ici constituent bien évidemment une liste non exhaustive des altérations moléculaires dans les GHG pédiatriques. Elle vise néanmoins à présenter brièvement les altérations les plus couramment décelées à ce jour. La caractérisation moléculaire des gliomes pédiatriques ne cesse d'évoluer, dans le but d'identifier de signatures moléculaires, afin de développer de nouvelles cibles thérapeutiques améliorer la prise en charge thérapeutiques des patients.

II.4.3. Théorie de la gliomagenèse en pédiatrie

Les mutations *driver* et les altérations génomiques et moléculaires décrites jusqu'ici pourraient intervenir dans un contexte de développement particulier dans le cadre des GHG pédiatriques. Bien que la cellule d'origine des GHG pédiatriques soit encore controversée, de plus en plus d'éléments convergent vers une cellule souche neurale (NSC), potentiellement de lignée oligodendrogliale (Filbin and Monje, 2019; Funato et al., 2014; Monje et al., 2011; Zong et al., 2015).

Ces NSC se concentrent dans des niches hypoxiques situées dans la SVZ et entretiennent des processus de neurogenèse qui persistent jusqu'à l'âge adulte (cf I). Des cellules de type souche similaires ont été identifiées dans de nombreuses tumeurs cérébrales adultes et pédiatriques (Ignatova et al., 2002; Thirant et al., 2011). Dans le tissu nerveux central, elles se distinguent notamment par des marqueurs spécifiques de type CD44, CD133, OCT4 ou SOX2. A elles-seules, elles peuvent donner naissance à un gliome après différentes altérations (épi)génomiques (Sturm et al., 2014b). De plus, des cellules nerveuses matures (neurones, astrocytes) sont capables de se dédifférencier et de développer des gliomes *in vivo* en réponse à des altérations de NF1 et TP53 (Friedmann-Morvinski et al., 2012). Cette plasticité de l'état souche constitue le modèle évolutif (ou stochastique) de l'hypothèse souche du cancer. Il est à ce jour le plus communément accepté pour expliquer l'origine et l'hétérogénéité tumorale (Figure 30).

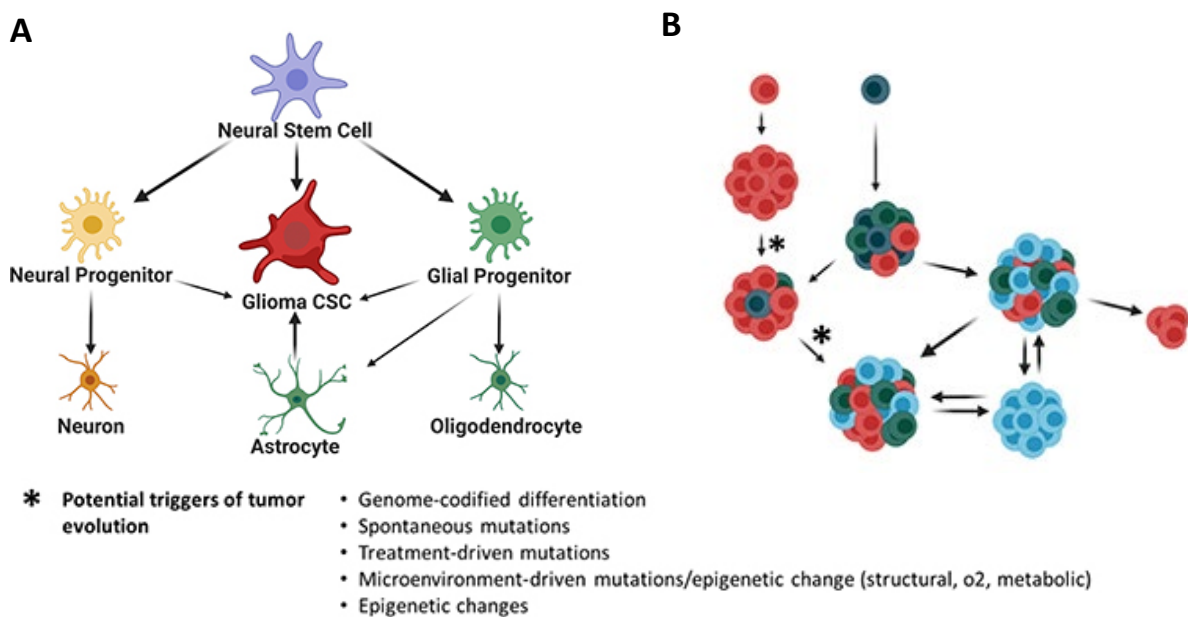


Figure 30: Hypothèse de l'implication des NSC dans la gliomagenèse. (A) Origine des cellules souches cancéreuses des gliomes. Des plus en plus d'éléments suggèrent que les CSC de gliomes peuvent dériver des NSC et des progéniteurs oligodendrogliaux (oPC) et neuronaux (nPC), mais également d'une dédifférenciation de cellules spécialisées comme les astrocytes. (B) Modèle stochastique de l'hypothèse souche du cancer. Ce modèle soutient l'idée que des événements génétiques ou épigénétiques aléatoires peuvent transformer n'importe quelle cellule en un cellule cancéreuse de type souche (Ruiz-Garcia et al, 2020)

Chez l'enfant, les GHG se développent préférentiellement dans une fenêtre spatio-temporelle qui coïncide fortement avec des étapes développementales post-natales du cerveau: elles mettent en jeu une prolifération et une différenciation de NSC et d'oPCs issues de la SVZ,

ainsi que des vagues de myélinisation axonale dans la partie médiane, puis corticale de l'encéphale (cf I). Les phases de myélinisation de la partie ventrale du pont sont notamment corrélées avec le pic d'incidence des DIPG (Lebel et al., 2012; Monje et al., 2011). Dans ce contexte, de nombreuses études se focalisent sur ces oPCs comme cellules d'origine potentielle des GHG pédiatriques sous l'influence de facteurs intrinsèques (mutations *drivers*, altérations (épi)génomiques), mais également extrinsèques.

La prolifération et la maturation des oPCs, au même titre la myélinisation axonale sont régulées par l'activité électrique de neurones glutamatergiques, notamment à travers les sécrétions de BDNF qui en résultent (cf I). De façon similaire, l'activité de ces neurones glutamatergiques favoriserait le développement des GHG pédiatriques corticaux et de la ligne médiane (Venkatesh et al., 2015a). Ils sécrètent du BDNF et de la neurologine-3 (NGLN3) dans le microenvironnement tumoral, des facteurs de croissance gliaux qui favorisent la prolifération tumorale. Au-delà d'un simple effet bénéfique, la NGLN3 semble même indispensable à la progression des gliomes ; son absence dans le microenvironnement tumoral empêche le développement de xénogreffes dérivées de patients (PDX) (Venkatesh et al., 2017). Les gliomes seraient ainsi en mesure de réquisitionner des molécules essentielles à la plasticité et à la croissance cérébrales dans l'intérêt de leur propre prolifération. Ils produiraient même leurs propres sécrétions de glutamate afin de stimuler l'excitabilité des neurones environnants et tirer profit de leurs sécrétions de facteurs pro-tumorigéniques. Ces phénomènes seraient notamment à l'origine des crises d'épilepsie développées par le patient (Buckingham et al., 2011; Campbell et al., 2012).

Au-delà des facteurs intrinsèques décrits tout au long de cette seconde partie (mutations *drivers*, altérations génomiques, modifications épigénétiques), le développement des GHG pédiatriques est sous l'influence de facteurs extrinsèques associés au microenvironnement tumoral. Ils comprennent non seulement l'activité neuronale mais également l'hypoxie, un facteur clé qui contribue au maintien des cellules souches dans la SVZ et qui est une caractéristique majeure du microenvironnement tumoral des GHG (cf III).

II.5. Prise en charge thérapeutique des GHG pédiatriques

Malgré l'accroissement des connaissances sur la biologie moléculaire des GHG pédiatriques, celles-ci peinent encore à impacter la prise en charge des GHG pédiatriques, où les progrès restent désespérément lents. Les DIPG/DMG et les GHG sus-tentoriels font l'objet de protocoles adaptés aux caractéristiques anatomocliniques spécifiques à ces entités.

II.5.1. L'acte chirurgical

II.5.1.1. L'exérèse chirurgicale dans les GHG sus-tentoriels

Longtemps sujette à controverse en raison de la morbidité qu'elle pouvait susciter, l'exérèse chirurgicale est aujourd'hui systématiquement envisagée et constitue une arme thérapeutique primordiale dans le traitement des GHG sus-tentoriels. La résection doit être maximaliste, tout en préservant les fonctions cognitives afin de ne pas induire de déficit neurologique ou aggraver l'état du patient. La résection complète (GTR = « gross total resection ») est corrélée à une augmentation de la survie globale chez les patients atteints de gliomes malins, aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte (MacDonald et al., 2011; Wisoff et al., 1998; Wolff et al., 2012, 2010). En étant incomplète, elle permet au moins de diminuer la pression intracrânienne exercée par la tumeur et d'en soulager les symptômes. Des progrès considérables ont été réalisés dans les techniques neurochirurgicales, combinant échographie, cartographies fonctionnelles, IRM peropératoire et chirurgie éveillée. Ils permettent des résections de plus en plus larges en diminuant la morbidité. De nouvelles techniques de résection « en bloc » (SPER) ont permis d'atteindre des résections de 92% dans les gliomes infiltrants contre 65% selon les méthodes conventionnelles (Mishra et al., 2022). Toutefois, malgré ces avancées, l'efficacité de la résection chirurgicale reste dépendante de la localisation de la tumeur.

II.5.1.2. La biopsie exploratoire dans les DIPG/DMG

Comme présenté précédemment (cf II.2.3) l'exérèse chirurgicale est impossible dans les DIPG et DMG en raison de la morbidité importante. L'opération chirurgicale se limite à une biopsie exploratoire dans un cadre essentiellement diagnostique, en vue de caractériser la tumeur selon les critères histologiques et moléculaires. Les progrès en neurochirurgie ont permis de réaliser systématiquement ces biopsies exploratoires et d'améliorer les connaissances sur la biologie de ces tumeurs au travers de multiples protocoles (Tableau 3). Ces caractérisations ont notamment fait l'objet d'essais cliniques de grande envergure comme l'essai BIOMEDE 1.0. De plus, les biopsies exploratoires permettent de développer des modèles d'études précliniques direct et/ou indirects à travers des PDX ou des lignées dérivées de patients (PDCLs = Patient derived cell line) (Blandin et al., 2019; Monje et al., 2011; Plessier et al., 2017; Rakotomalala et al., 2021; Tsoli et al., 2018)

Technique and Trajectory	Reference	Patients (N)	Confirmed DIPG/DMG (N)	Other Diagnosis (N)	Non-Diagnostic (N)	Complications # (N)	No Complications # (N)
SSB (15), RASB (1); TF (5); TC (11); Open (5)	Pfaff et al. (2019) [15]	21	18	3	0	2	19
SSB; TC	Mueller et al. (2019) [21]	15	11	4	0	0	15
RASB; TC (9); TF (2)	Dawes et al. (2018) [13]	11	7	3	1	0	11
SSB; TC	Tejada et al. (2018) [22]	1	1	0	0	0	1
SSB; trajectory not reported	Plessier et al. (2017) [23]	18	18	0	0	(not reported)	(not reported)
RASB; TF	Carai et al. (2017) [24]	7	6	1	0	1	6
SSB; TC	Puget et al. (2015) [25]	130	130	0	0	5	125
SSB; TC	Gupta et al. (2018) [19]	50	48	0	2	1	49
-	Total:	253	239/253 (94.5%)	11/253 (4.3%)	3/253(1.2%)	9/253 (3.6%)	244/253 (96.4%)

Complications reported as severe, unresolved, and attributable to the surgical procedure; RASB: robot-assisted stereotactic biopsy; SSB: standard stereotactic biopsy; TC: transcerebellar; TF: transfrontal.

Tableau 3 Etudes et essais cliniques récents utilisant des biopsies chirurgicales et dans la prise en charge des patients atteints de GHG de la ligne médiane mutés pour H3K27M. (Argersinger et al, 2021).

II.5.2. La radiothérapie

La radiothérapie (RT) est un traitement locorégional des tumeurs et consiste à utiliser la capacité des rayons ionisants à endommager les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier, soit en altérant directement l'ADN cellulaire (effet direct), soit par la libération de radicaux libres (effet indirect). Cependant, l'irradiation affecte également les tissus sains, c'est pourquoi son application doit être la plus ciblée possible, l'objectif étant d'éliminer le maximum de cellules cancéreuses tout en laissant indemnes les cellules saines.

II.5.2.1. Le traitement des GHG sus-tentoriels

Dans les GHG pédiatriques, les enfants de plus de 3 ans sont généralement traités à 54 Gy répartis en fractions quotidiennes de 1,8 Gy sur une durée totale de six semaines. Dans les GHG sus-tentoriels, elle est le plus souvent administrée directement après la résection

chirurgicale. A ce jour, la radiothérapie a permis d'améliorer la durée de vie dans les GHG sus-tentoriels (prolongement de 3 mois en moyenne). Malheureusement, elle débouche la plupart du temps sur le développement de cellules radiorésistantes et le ralentissement de la croissance tumorale n'est que transitoire (Chassot et al., 2012). Cette radiorésistance est notamment associée à des altérations de TP53 et des mécanismes de réparation de l'ADN dans le contexte tumoral (Entz-Werlé et al., 2021; Pedersen et al., 2020; Werbrouck et al., 2019). Quelques tentatives ont visé à augmenter les doses sous une forme hyperfractionnée, mais elles n'ont montré aucun véritable bénéfice pour le patient (Fulton et al., 1992; Packer et al., 1993).

II.5.2.2. Les traitements des DIPG/DMG

A ce jour, la radiothérapie reste le traitement standard dans les DIPG. L'administration s'effectue par doses par fraction de 1,8 Gy pour une dose totale de 54 Gy sur une période de six semaines. Il s'agit cependant d'un traitement palliatif ; il diminue temporairement la progression tumorale et améliore les symptômes, mais aucun avantage de survie n'a pu être identifié, quel que soit le mode d'administration utilisé (hyper- ou hypofractionnement) (Robison and Kieran, 2014 ; Roos and Smith, 2014; Zhu et al., 2021).

II.5.3. La chimiothérapie

La chimiothérapie adjuvante combinée à la radiothérapie est une stratégie récurrente dans le traitement des GHG. Dans les années 90, une méta-analyse regroupant 16 essais thérapeutiques et un total de 3000 patients soulignait déjà les bénéfices de cette approche dans les GHG adultes (Fine et al., 1993). Le protocole standard pour le traitement du GBM combine la radiothérapie au Témzolomide (TMZ), administrés selon le protocole Stupp (Figure 31) (Stupp et al., 2005). Cet agent alkylant est capable de traverser la BHE, perturbe la synthèse d'ADN dans les cellules tumorales et les empêche de proliférer et de se diviser.

De nombreuses études se sont basées sur ce protocole dans le but de l'appliquer aux traitements des GHG pédiatriques. Malheureusement, cette approche a rapidement montré ces limites, dans les GHG sus-tentoriels et surtout dans les DIPG/DMG.

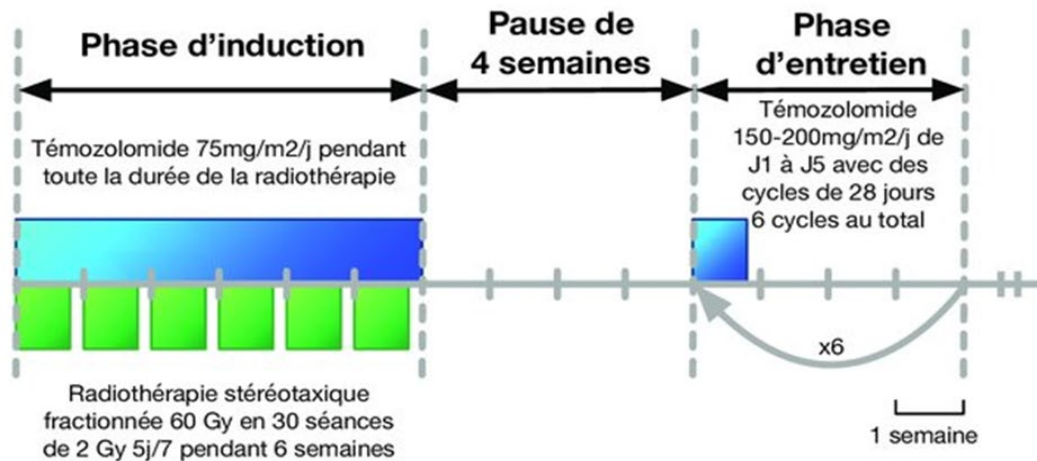


Figure 31 : Protocole Stupp combinant radiothérapie et chimiothérapie pour le traitement des glioblastomes. (Jean-Miche Lemée, 2015)

II.5.3.1. Les chimiothérapies dans les GHG sus-tentoriels

Le protocole de type Stupp reste le traitement de référence dans les GHG sus-tentoriels, faute d'une alternative plus efficace. Néanmoins, le TMZ ne montre pas la même efficacité dans le traitement des GHGp par rapport au GBM de l'adulte (Cohen et al., 2011; Estlin et al., 1998; Gaspar et al., 2010; Lashford et al., 2002). Une étude du COG (Children Oncology Group) a tenté une combinaison avec la RT mais elle n'améliore pas non plus la survie des patients (ACNS0126) (Cohen et al., 2011). Le résultat est le même avec un traitement additionnel à base de lomustine (COG ACNS0423) (Jakacki et al., 2016). Des études ont tenté d'utiliser d'autres chimiothérapies à base d'agents alkylants (nitrosourée, ifosfamide), d'inhibiteurs des topoisomères (etoposide, irinotecan) ou de sels de platine (carboplatine, cisplatine) mais les résultats demeurent décevants (Figure 32) (Jakacki et al., 2016; Jones et al., 2012; Wolff et al., 2010).

II.5.3.2. Les chimiothérapies dans les DIPG/DMG

L'efficacité du TMZ et des autres chimiothérapies conventionnelles est encore plus médiocre dans les DIPG/DMG (Figure 32) (Chassot et al., 2012; Grill et al., 2018; Jennings et al., 2002). Ainsi, il n'existe à ce jour aucun protocole standard de chimiothérapie dans la prise des DIPG/DMG. Leur traitement se limite à de la RT.

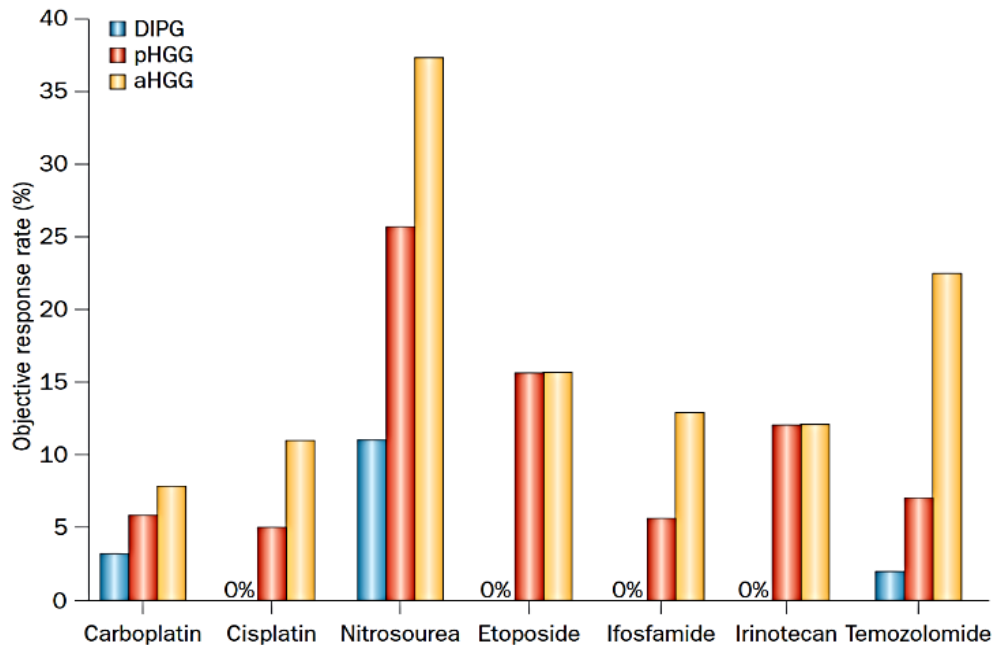


Figure 32: Taux de réponses objectives des gliomes de haut-grade adultes et pédiatriques aux chimiothérapies conventionnelles. aHGG = GHG adultes (jaune) ; pHGG = GHG pédiatriques sus-tentoriels (rouge) ; DIPG = gliomes diffus du tronc cérébral (bleu). (Jones et al., 2013)

II.5.4. Les thérapies ciblées

Face à l'inefficacité déconcertante des chimiothérapies dans les traitements des GHG pédiatriques, des essais cliniques développent de nouvelles stratégies thérapeutiques dites « de précision ». Elles ciblent des protéines spécifiques et ont pour objectif d'interférer avec les anomalies moléculaires décrites précédemment, à l'origine du développement et/ou de la progression des tumeurs (Figure 33) (Argersinger et al., 2021; Miklja et al., 2019; Sun et al., 2020a).

Là encore, l'hétérogénéité des GHG et l'interconnexion de leurs voies de signalisation oncogéniques compliquent ces approches. A l'heure actuelle, près de 170 essais cliniques portant sur les GHG pédiatriques sont référencés sur clinicaltrials.gov.

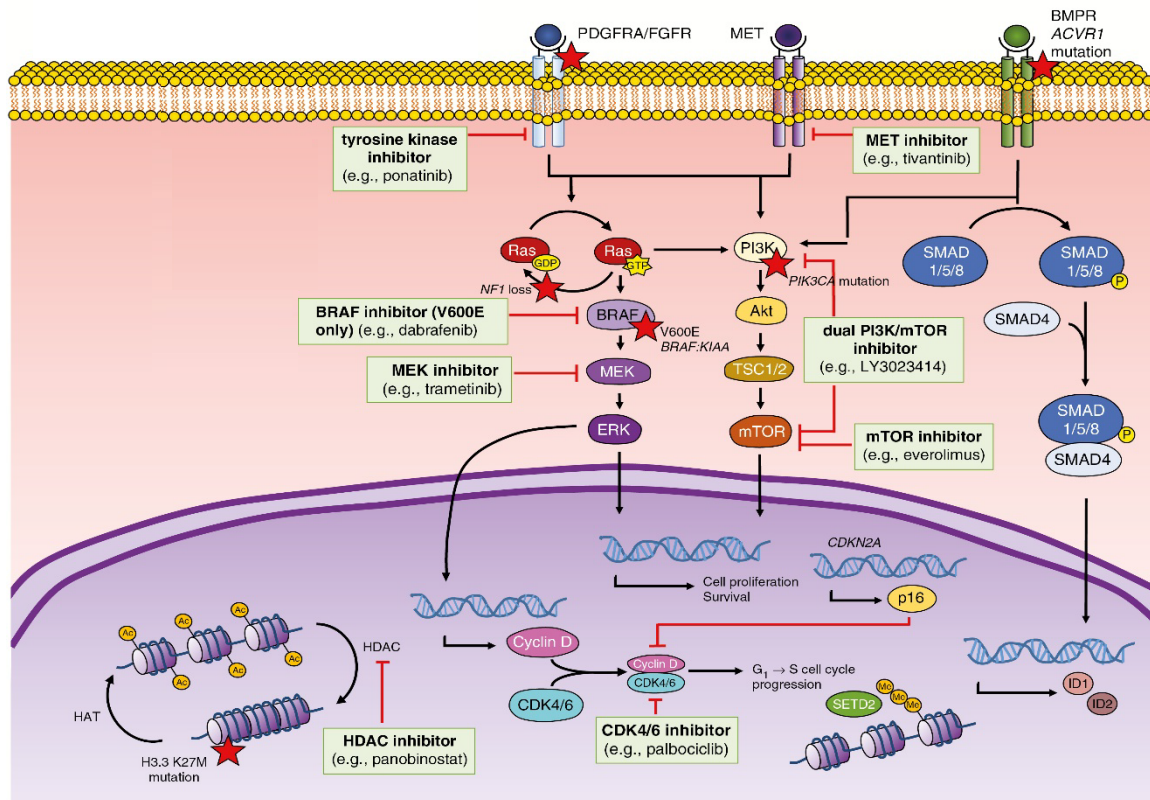


Figure 33 : Schématisation des différentes approches de thérapies ciblant les voies de signalisation altérées dans les GHG pédiatriques. MET = MET receptor tyrosine kinase; BMPR = bone morphogenetic protein receptor; ACVR1 = activin A receptor type 1; Ras = Ras family GTPase; Akt = protein kinase B; SMAD1/5/8 = mothers against decapentaplegic homolog 1/5/8; SMAD4 = mothers against decapentaplegic homolog 4; HAT = histone acetyltransferase; G1 = gap 1 phase; S = synthesis phase; p16 = cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (protein); SETD2 = SET domain containing 2; ID1/2 = inhibitor of DNA binding 1/2. (Miklja et al, 2019)

II.5.4.1. Les GHG sus-tentoriels

Des composés comme le bevacizumab (anticorps ciblant le vascular endothelial growth factor (VEGF)) ont montré des résultats *in vitro* très encourageants (Xu et al., 2015a) et ont suscité beaucoup d'espoir. Malheureusement, les essais cliniques de phases I et II n'ont pas montré de réels bénéfices sur le pronostic des patients en combinaison avec le TMZ (Hoffman et al., 2015). Plus récemment, l'essai randomisé HERBY (ClinicalTrials.gov, identifiant : NCT01390948) a testé ce protocole dans les GHG pédiatriques sus-tentoriels mais il n'a pas amélioré la survie (Grill et al., 2018).

L'essai NIVOGLIO, démarré en 2019 et actuellement en phase I-II, vise à évaluer l'efficacité du nivolumab (un inhibiteur de PD-1 et activateur des lymphocytes T) en combinaison avec le TMZ et la radiothérapie dans les GHG pédiatriques..

II.5.4.2. Les DIPG/DMG

Depuis le développement des thérapies ciblées appliquées au DIPG/DMG, près de 250 essais cliniques ont été initiés, ciblant les altérations génétiques et épigénétiques de ces tumeurs (Long et al., 2017). Ils visent notamment à rétablir une méthylation normale de l'histone H3 via des inhibiteurs des histones désacétylases et déméthylases (Hashizume et al., 2014; Mohammad et al., 2017; Wiese et al., 2016). D'autres mutations secondaires sont également ciblées, mais aucune bénéfice clinique n'a été mis en évidence à ce jour (Argersinger et al., 2021; El-Khouly et al., 2019).

L'essai BIOMEDE démarré en 2014 et piloté par le Dr Jacques Grill, vise à séquencer l'ADN de tumeurs de 250 patients atteints de DIPG afin de leur proposer un traitement ciblé. Depuis 2020, il se poursuit lors d'une seconde phase notée BIOMEDE 2.0 et s'ouvre aux patients atteints de gliomes malins de la ligne médiane dont les profils moléculaires sont similaires aux DIPG.

Le composé ONC201 représente une nouvelle classe de molécules anticancéreuses de type imipridones développées par Chimerix (Prabhu et al., 2020). Il agit comme un antagoniste sélectif du récepteur dopaminergique D2 (DRD2) et un agoniste du récepteur couplé à la protéine G (ClpP) et induit la mort cellulaire par une régulation à la hausse de facteurs apoptotiques tels que TNF (Tumor Necrosis Factor) et TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand). Il a montré des signaux d'efficacité chez 30% de gliomes thalamiques ligne mutés H3K27M (Chi et al., 2019 ; Prabhu et al., 2020). En développement clinique aux Etats-Unis uniquement, une autorisation de mise sur le marché est en cours auprès de l'agence américaine du médicament. En France, des essais sont menés à l'Institut Gustave Roussy (IGR, Paris) mais son accès est limité aux GHG mutés H3K27M et uniquement dans des conditions d'utilisation thérapeutique compassionnelle très strictes.

III. LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL HYPOXIQUE

III.1. Notions de normoxie, de physioxie et d'hypoxie

III.1.1. La normoxie

L'organisme humain et chaque organe qui le constitue ont besoin d'un apport en oxygène constant, qui se doit de répondre aux besoins métaboliques des cellules et de maintenir l'intégrité physiologique des tissus. Ces taux d'oxygène peuvent être exprimés en termes de pression partielle (pO_2) ou de concentration (en %). La pression partielle correspond à une mesure quantifiée en mmHg alors que la concentration indique un pourcentage relatif de l'oxygène par rapport aux autres gaz (N_2 , CO_2 , H_2O) présents dans l'atmosphère. La pO_2 atmosphérique moyenne couramment décrite et mesurée au niveau de la mer est de 160 mmHg, soit une concentration en oxygène de 21% ; il s'agit de la condition communément qualifiée de « **normoxie** ».

III.1.2. La physioxie cérébrale

Les taux d'oxygène réels au sein des différents tissus de l'organisme sont bien inférieurs à ces valeurs de normoxie et répondent aux besoins physiologiques de chaque organe ; c'est la **physioxie**. Les pO_2 tissulaires (notées P_{tiO_2}) physiologiques varient globalement entre 25 et 100 mmHg à l'échelle de l'ensemble de notre organisme, ce qui correspond à des concentrations en O_2 comprises entre 4,6 et 10%. Il n'existe donc pas de valeur physioxique généralisée mais celle-ci est relative à chaque organe selon les besoins métaboliques des cellules. A titre d'exemple, l'épithélium alvéolaire pulmonaire montre les P_{tiO_2} parmi les plus élevées car il est directement réoxygéné par l'air respiratoire.

Le cerveau figure au contraire parmi les organes qui présentent les taux d'oxygène tissulaires les plus faibles de l'organisme (Tableau 4). La physioxie cérébrale met en jeu des concentrations en O_2 qui varient de 2,5 à 5% ($=pO_2$ de 25 à 48mmHg) (Dings et al., 1998; Ortiz-Prado et al., 2019) avec une moyenne de 4,6% et près de la moitié des tissus cérébraux situés sous les 4% d' O_2 (Muz et al., 2015). Le cerveau présente donc des réserves d' O_2 très limitées. Paradoxalement, il concentre près de 20% de la consommation énergétique de l'organisme et les cellules qui le constituent sont parmi les plus intolérantes aux manques d' O_2 . Toute fluctuation majeure des taux d' O_2 peut endommager les cellules nerveuses et entraîner des déficits neurologiques plus ou moins graves. Les neurones des structures hippocampiques et du cortex préfrontal sont particulièrement intolérants au manque d' O_2 , dont les conséquences peuvent aller de simples troubles mnésiques à de graves séquelles neurologiques irréversibles (Cervós-Navarro and Diemer, 1991). A l'inverse, d'autres zones spécifiques impliquées dans

la neurogenèse post-natale comme le SGZ de l'hippocampe ou la SVZ doivent rester sous des conditions restreintes en O₂ pour maintenir la pluripotence et l'état indifférencié de leurs cellules souches (Coletti et al., 2018; Sun et al., 2019)

Le maintien des PtiO₂ cérébrales physiologiques est donc primordiale et s'effectue via des réseaux de microvascularisation très développés, associés à des mécanismes complexes capables d'adapter les apports en fonction des besoins en oxygène des tissus. Ceux-ci mettent en jeu des échanges gazeux où les molécules d'O₂ diffusent de manière passive à travers la paroi des capillaires sanguins selon des gradients de pression différentiels entre les tissus et les capillaires.

Table I Comparison of the oxygenation in organs and respective tumors

Tissue/organ	Physoxia (median % O ₂)	Reference	Cancer	Hypoxia (median % O ₂)
Brain	4.6	8,9	Brain tumor	1.7
Breast	8.5	6	Breast cancer	1.5
Cervix (nullipara)	5.5	4,6	Cervical cancer	1.2
Kidney cortex	9.5	7	Renal cancer	1.3
Liver	4.0–7.3	125,126	Liver cancer	0.8
Lung	5.6	127	Non-small-cell lung cancer	2.2
Pancreas	7.5	128	Pancreatic tumor	0.3
Rectal mucosa	3.9	130	Rectal carcinoma	1.8

Tableau 4 : Taux d'oxygénations physiologiques de différents organes et de leurs tumeurs respectives. (Muz et al, 2015)

III.1.3.L'hypoxie

Lorsque cette régulation n'est plus assurée et que les apports en O₂ deviennent inférieurs aux besoins physiologiques des cellules (=physioxie), les tissus se trouvent alors en condition d'**hypoxie**. Pour le cerveau, on retrouve des hypoxies qualifiées de modérées pour des concentrations en O₂ comprises entre 1 et 2,5%. Elles peuvent être liées à l'altitude ou la conséquence de pathologies obstructives bénignes telles que l'apnée du sommeil. Lorsque la concentration en O₂ est inférieure à 1%, l'hypoxie est qualifiée de sévère et peut aboutir à la mort cellulaire. Elle peut être d'origine ischémique (accidents vasculaires cérébraux, arrêts cardiaques) et entraîner des séquelles neurologiques irréversibles.

Dans certains cas, l'hypoxie est une condition physiologique nécessaire à l'organisme. Le microenvironnement hypoxique régule le maintien de l'auto-renouvellement et de la pluripotence des cellules souches embryonnaires et est indispensable au cours du développement (SGZ et SVZ). Celui-ci module également la neurogenèse et la gliogenèse post-natales et adultes en favorisant la prolifération, la migration et la maturation des NSC (Figure 32) (Aimone et al., 2014; Li et al., 2021; Toda et al., 2019; Zhao et al., 2008) (Figure 34). Ces

mêmes NSC de la SVZ sont actuellement à l'étude en tant que potentielles cellules d'origine de GHG adultes et pédiatriques ; sur ce point, l'hypoxie pourrait constituer un facteur favorisant la gliomagenèse (Lee et al., 2018; Monje et al., 2011, 2020).

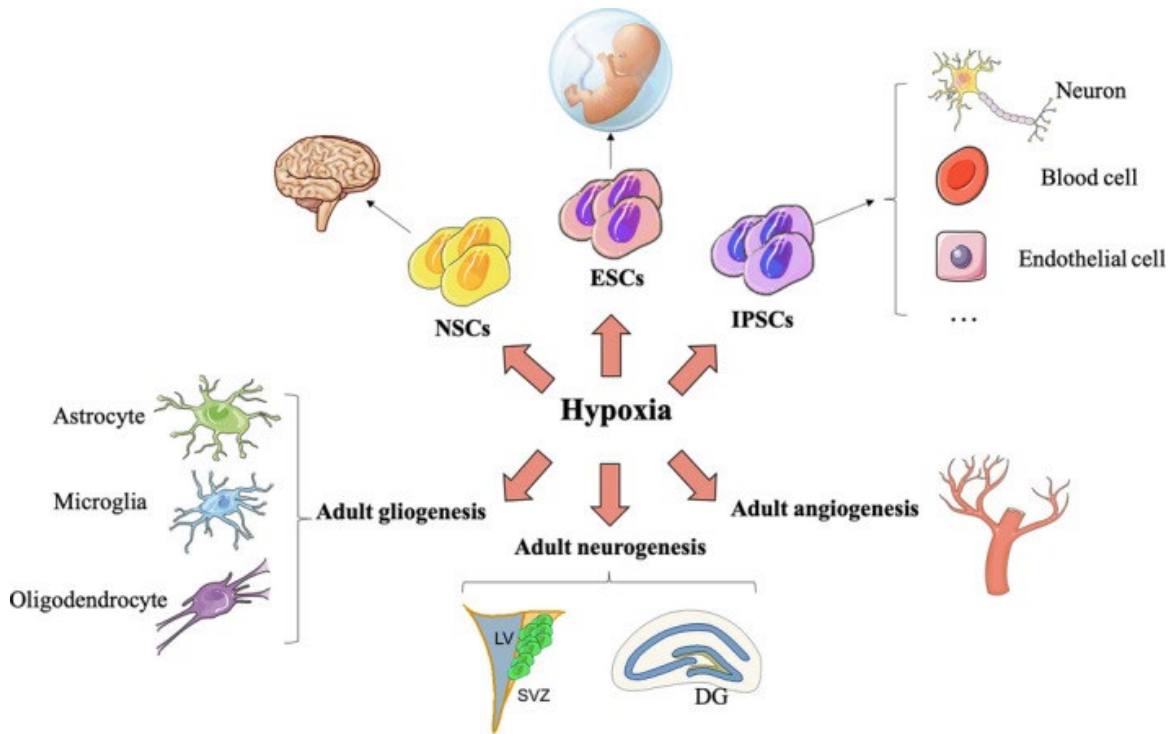


Figure 34 : Régulation des cellules souches par le microenvironnement hypoxique. L'hypoxie favorise la pluripotence, la prolifération et la différenciation des cellules souches embryonnaire (ESCs) et des cellules souches neurales (NSCs). L'hypoxie est également impliquée dans le développement embryonnaire, dans la neuro-/glio- gène post-natale et adulte et dans l'angiogénèse. In vitro, il contribue à la croissance et à la différenciation des cellules souches pluripotentes induites (iPSC). (Li et al, 2021).

Par ailleurs, l'hypoxie sévère est particulièrement caractéristique des GHG où les taux d'oxygène intratumoraux peuvent même frôler l'anoxie avec des concentrations <0,5% (Harris, 2002; Hayashi et al., 2019; Monteiro et al., 2017; Muz et al., 2015).

III.2. Aspects macroscopiques et microscopiques de l'hypoxie tumorale dans les GHG

III.2.1. L'hypoxie tumorale en imagerie

L'hypoxie est très fréquente dans les tumeurs solides, en particulier dans les GHG, et est une conséquence de l'effet de masse de la tumeur. L'hypoxie tumorale peut être visualisée en IRM, où l'on distingue des zones de faible diffusion de l'O₂ associées à des perturbations du flux sanguin (Jensen et al., 2014). Dans les GBM, l'utilisation de marqueurs comme le FDG (18F-fluorodeoxyglucose) révèle souvent une tumeur délimitée par un anneau périphérique très

marquée qui traduisent la présence de cellules infiltrantes qui diffusent dans le tissu cérébral. Cette zone périphérique se distingue nettement du centre anoxique sombre et peu perfusé de la tumeur qui souligne une région nécrotique (Figure 35). Cette disparité illustre l'hétérogénéité de l'oxygénation intratumorale (Mendichovszky and Jackson, 2011). Cet anneau péri-tumoral intensifié ne se retrouve pas forcément dans les DIPG/DMG, mais ces tumeurs montrent également des zones hypoxiques peu perfusées. La mise en évidence de cette hypoxie tumorale en imagerie constitue un critère de diagnostic des GHG et est corrélée à l'agressivité tumorale (coefficient ADC, cf II) et au pronostic des patients (Jensen et al., 2014; Yeom et al., 2015).

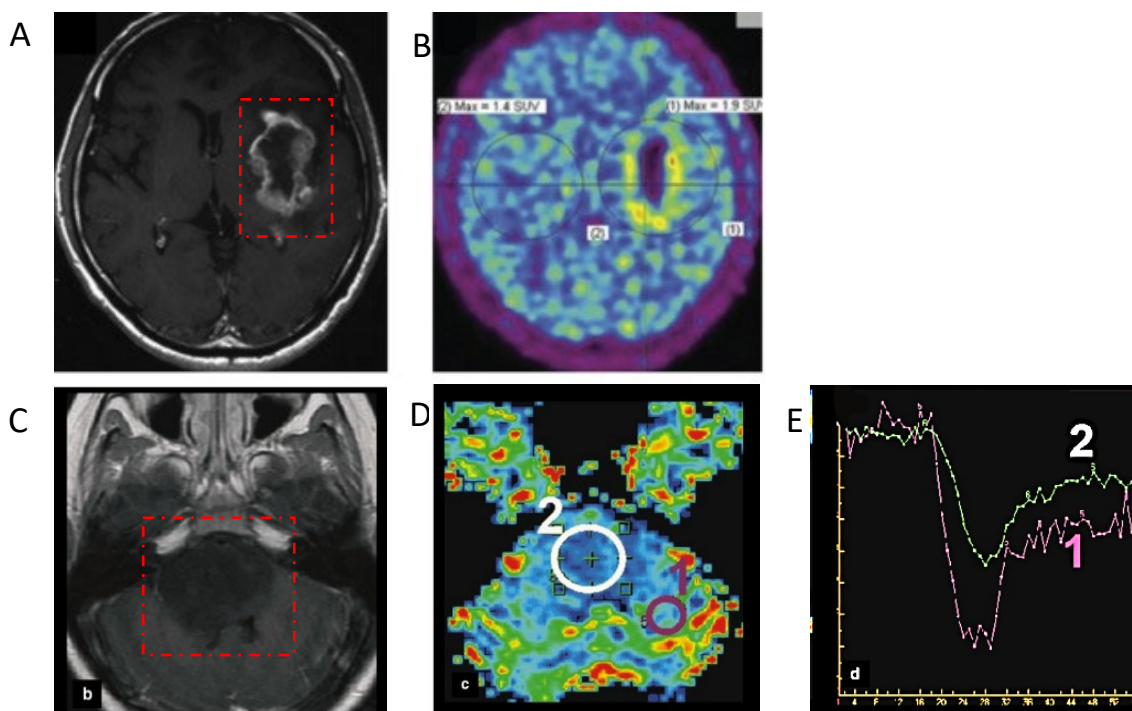


Figure 35 : Visualisation des zones hypoxiques/nécrotiques de GHG en IRM. (A-B) GBM chez un patient adulte (A) IRM axiale pondérée en T1 avec injection de gadolinium montrant l'anneau périphérique très marqué qui délimite le cœur nécrotique de la tumeur ; (B) Imagerie PET montrant une absorption périphérique marquée et l'absence d'absorption dans le centre tumoral nécrotique (Mendichovszky et Jackson, 2011). (C-D) DIPG chez un patient pédiatrique (C) L'IRM pondérée en T1 ne montre pas d'intensification péri-tumoral (D-E) Cartographie de perfusion avec courbes de perfusion associées aux zones tumorale (2) comparée à une zone saine (1). Ces courbes mettent en évidence une hypoperfusion de la tumeur (Yeom et al, 2015). Les cadres rouges désignent la zone de la tumeur.

III.2.2.Aspects histologiques de l'hypoxie tumorale

L'hypoxie tumorale a été décrite pour la première fois en 1955 par Thomlinsons et Gray, qui ont introduit la notion de gradients d'O₂ décroissants de la périphérie vers le centre de la tumeur (Thomlinson and Gray, 1955). Initialement, les cellules tumorales se concentrent à la périphérie des stromas vasculaires. Leur prolifération donne naissance à un amas cellulaire de plus en plus dense qui prive progressivement les tissus des apports en O₂ en les éloignant des vaisseaux sanguins. Ce phénomène entraîne une diffusion limitée de l'O₂ et débouche sur une hypoxie intratumorale chronique. Au centre de cette masse tumorale, les taux d'O₂ deviennent quasiment nuls (= anoxie), ce qui laisse apparaître une zone nécrotique. Dans les formes d'hypoxie les plus extrêmes, les cellules tumorales cherchent alors à s'échapper de ce cœur anoxique en migrant vers la périphérie et forment des anneaux cellulaires successifs qui entourent le cœur nécrotique. Cette architecture singulière des zones hypoxiques est typique des pseudo-palissades observées dans les GBM adultes et pédiatriques (Figures 36 et 37) (El-Ayadi et al., 2017; Monteiro et al., 2017; Muz et al., 2015; Rong et al., 2006b). Elle illustre les différences d'O₂ entre les cellules périphériques de la tumeur qui sont plus oxygénées et celles dans la zone hypoxique qui sont en quasi-anoxie.

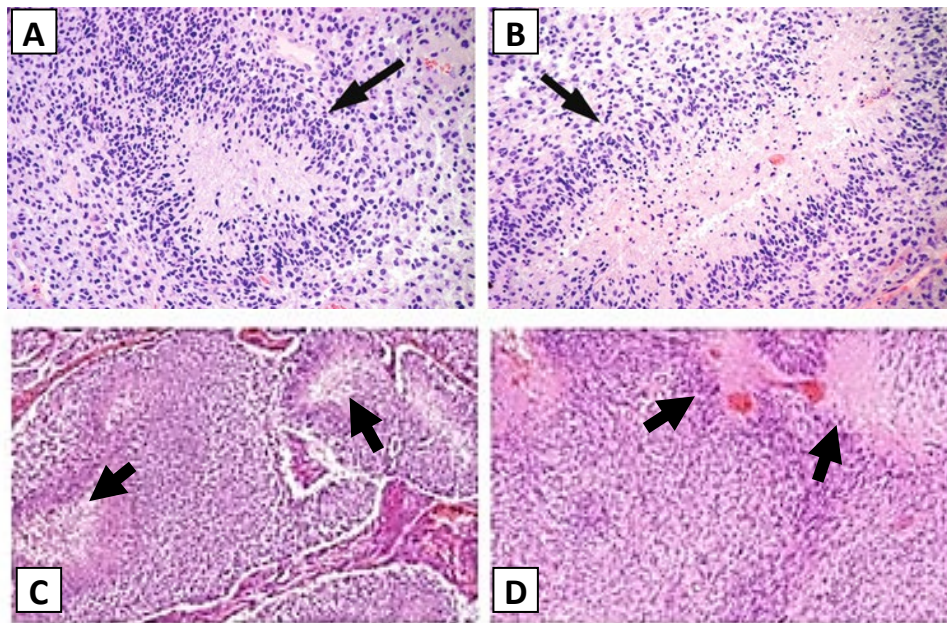


Figure 36 : Structures en pseudopalissades observées dans des coupes de GBM. Images d'un GBM chez l'adulte (A-B), chez un très jeune enfant (0-3 ans) (C) et chez un adolescent (12-16 ans) (D) (El-Ayadi, 2017).

- 1) Les cellules tumorales s'infiltrent progressivement dans le tissu cérébral normal et entourent les vaisseaux sanguins natifs. A ce stade, les apports en O₂ sont encore pleinement assurés.
- 2) La croissance tumorale finit par entrainer une atteinte vasculaire, ce qui provoque une lésion endothéliale et une infiltration vasculaire.
- 3) Cette lésion endothéliale entraîne une thrombose intravasculaire, qui débouche sur une hypoxie progressive dans la zone entourant la lésion. Les cellules tumorales cherchent à échapper à cette hypoxie et migrent vers la périphérie, créant un effet de vagues successives correspondant à l'aspect des palissades cellulaires.
- 4) La zone hypoxique s'élargit, donnant lieu à un cœur nécrotique et les cellules tumorales hypoxiques sécrètent des facteurs pro-angiogéniques (notamment VEGF).
- 5) Ces facteurs favorisent la prolifération vasculaire dans les régions adjacentes à la zone hypoxique et la néoangiogenèse. L'expansion des cellules tumorales vers de

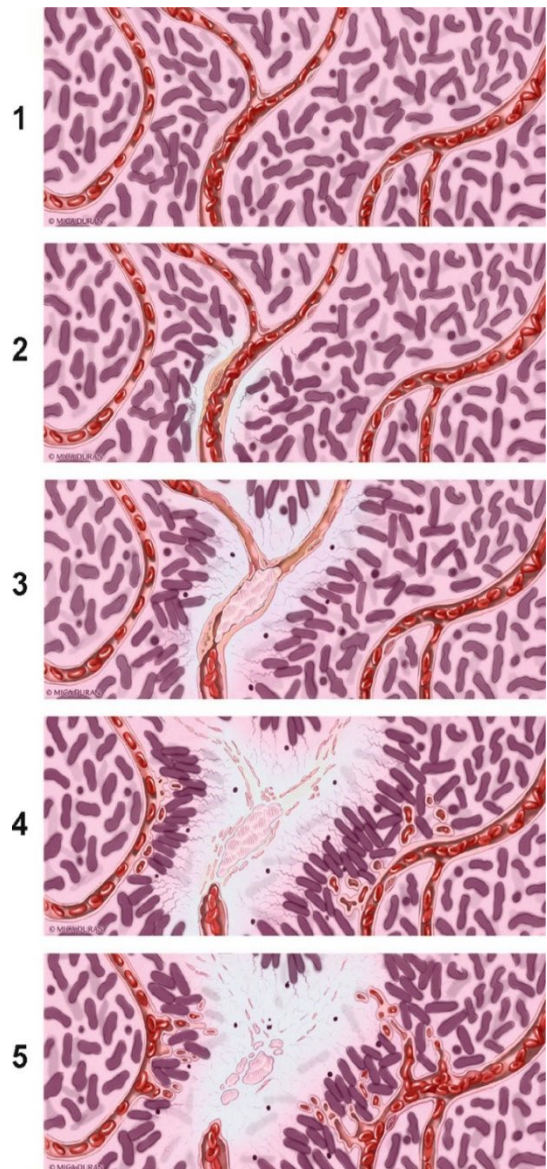


Figure 37 : Mécanismes potentiels de formation des pseudopalissades (Rong et al, 2006)

Ces structures en pseudo-palissades ne sont pas forcément présentes dans toutes les GHG, même hypoxiques, mais la caractérisation histologique de l'hypoxie intratumorale en IHC révèle un marquage important des facteurs induits par l'hypoxie (HIF) (Figure 38).

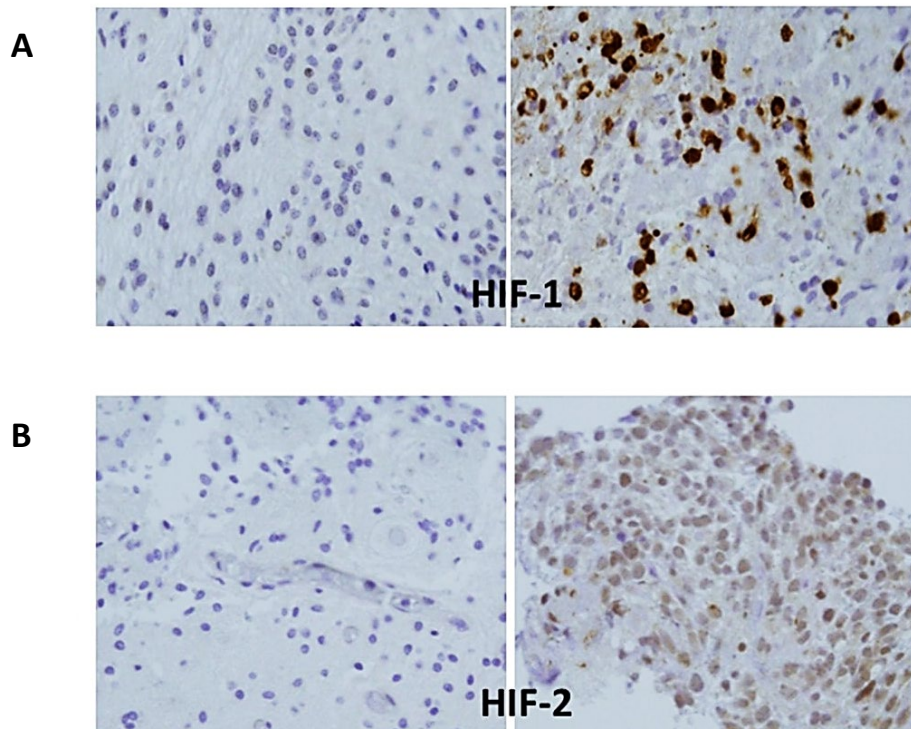


Figure 38 : Marquages immunohistochimiques des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α en dans des GHG pédiatriques. (A) Immunomarquage positif de HIF-1 α dans un tissu issu de GHG pédiatriques (droite) et négatif dans un tissu sain (gauche). (B) Immunomarquage positif à HIF-2 α dans une coupe de tumeur de GHG pédiatrique (droite) et négatif dans un tissu sain (gauche). (Nguyen et al, 2017 ; données complémentaires).

Dans une même tumeur, les taux d'O₂ sont hétérogènes et varient de manière spatiotemporelle ; i) les variations dans l'espace sont associées à la diffusion limitée de l'O₂ et dépendent de la distance entre la cellule et les vaisseaux sanguins les plus proches ii) les variations dans la durée sont décrites selon des hypoxies aiguës, chroniques ou cycliques, et dépendent de la fréquence des périodes intermittentes d'ouverture/fermeture des néovaisseaux sanguins tumoraux.

Ces différentes dynamiques de privation d'oxygène auront des conséquences cellulaires variées sur le phénotype tumoral.

III.3. Le rôle des facteurs HIF

D'une manière générale, l'hypoxie est une contrainte, aussi bien pour les cellules saines que pour les cellules cancéreuses. La plupart des cellules saines meurent en réponse à une hypoxie prolongée. A l'inverse, les cellules cancéreuses sont capables de s'adapter à ces conditions hypoxiques en remodelant l'expression d'une variété de gènes impliqués dans la prolifération, la migration, l'angiogenèse ou la reprogrammation métabolique. Ainsi, ce

microenvironnement hypoxique tumoral favorisera l'expansion des cellules tumorales au détriment des cellules saines et constitue finalement un critère majeur dans l'évolution des tumeurs solides et des GHG (Bar et al., 2010; Harris, 2002; Huang et al., 2018; Kaur et al., 2005). Cette adaptation tumorale à l'hypoxie est médiée principalement par des facteurs de transcription spécifiques induits par l'hypoxie appelés HIF (Hypoxie Inducible Factors).

III.3.1. Facteurs HIFs : les clés de l'adaptation tumorale à l'hypoxie

Les facteurs HIF sont les principaux régulateurs/médiateurs de l'expression des gènes en réponse à l'hypoxie. Cette régulation est rendue possible par la conformation particulière de ces facteurs de transcription. Ceux-ci se présentent sous la forme de protéines hétérodimériques constituées de deux sous-unités (Figure 39):

- une sous-unité **HIF-1 β** de 91 à 94 kDa également appelée **ARNT** (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator). Cette sous-unité est nucléaire et exprimée de manière constitutive.
- une sous-unité régulatrice **HIF- α** , principalement régulée par la concentration en O₂ et pour laquelle trois isoformes ont été identifiées :
 - **HIF-1 α** , constituée de 826 acides aminés et codée par le gène HIF1A localisé sur le chromosome 14 (14q21-q24) (Semenza and Wang, 1992)
 - **HIF-2 α** constituée de 870 acides aminées et codée par le gène EPAS1, (Endothelial PAS domain-containing protein 1) situé sur le chromosome 2 (2p21) (Tian et al., 1997)
 - **HIF-3 α** , constituée de 662 acides aminés et codée par le gène HIF3A (aussi appelé IPAS) localisé sur le chromosome 19 (19q13.32) (Gu et al., 1998)

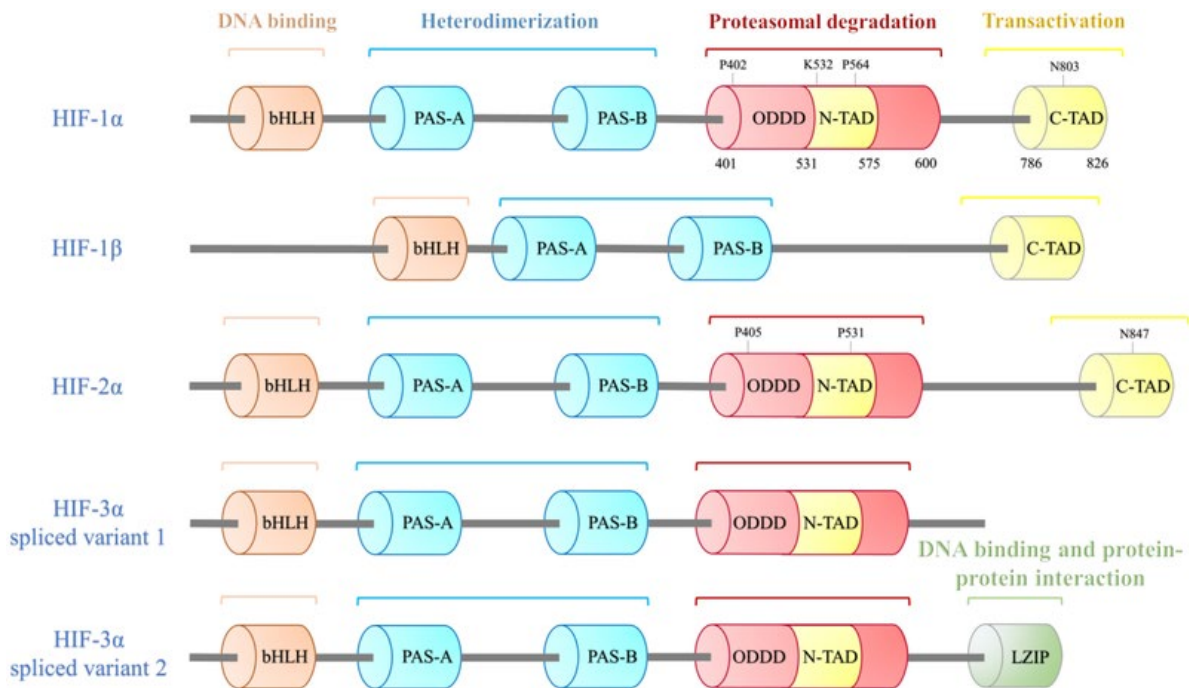


Figure 39 : Structures des différentes isoformes de la sous-unité HIF- α . Les facteurs HIF font partie de la superfamille des facteurs de transcription à motifs « basic helix-loop-helix » et « Per-ARNT-Sim » notés bHLH/PAS. Ils sont constitués d'un motif bHLH qui intervient dans la liaison du complexe protéique à la molécule d'ADN sur une portion de séquence spécifique nommée HRE (Hypoxia Responsive Element). Ce motif est associé à deux domaines PAS notés PAS-A et PAS-B, spécifiques à chaque isoforme. Ils permettent l'hétérodimerisation de la sous-unité HIF- α avec HIF-1 β et contribuent à la liaison à l'ADN. Les sous-unités HIF- α se distinguent de HIF-1 β par la présence d'un domaine ODDD, impliqué dans la dégradation dépendante de l'O₂ (voir plus loin). Elles montrent également toutes un domaine N-TAD (N-terminal transactivation domain), responsable de leur activité transcriptionnelle, associé à un second domaine C-TAD, à l'exception de HIF-3 α . Ce dernier peut présenter un domaine LZIP (C-terminal leucine zipper) spécifique impliqué dans la liaison à l'ADN et diverses interactions entre protéines. (Albbadari et al, 2019)

La sous-unité régulatrice alpha est l'élément déterminant qui attribue aux facteurs HIF le rôle de régulateur en réponse à l'O₂. L'implication de HIF-1 α et HIF-2 α est couramment décrite dans l'adaptation tumorale à l'hypoxie de nombreux cancers.

Ces deux sous-unités partagent près de 48% d'homologie de séquence d'acides aminés et présentent une structure protéique très similaire. Cette proximité leur permet d'agir de manière non redondante en partageant des voies de signalisation commune tout se distinguant par des mécanismes de régulation et des gènes cibles propres à chaque sous-unité (Fuchs et al., 2020; Keith et al., 2011; Loboda* et al., 2010; Ratcliffe, 2007). Cette dichotomie apporte une

singularité supplémentaire aux mécanismes cellulaires dépendants des facteurs HIF et mènent à des modulations différentielles selon que l'une et/ou l'autre des sous-unités intervienne. Dans la suite de ce travail, nous aborderons les différents aspects connus de la régulation de HIF-1 α et HIF-2 α ainsi que les conséquences de leur activations respectives sur le phénotype tumoral des GHG (le rôle de la sous-unité HIF-3 α est encore très mal connu à ce jour et ne sera pas développé davantage dans ce manuscrit).

L'activation de ces HIF et des voies cellulaires qui en découlent nécessite d'abord la stabilisation HIF- α , qui est régulée par défaut par la pO₂.

III.3.2. Régulation des HIFs relative à la pO₂

III.3.2.1. Rôles des PHD et de la protéine VHL

A des taux d'O₂ normaux (=normoxie ou physioxie décrites précédemment), les facteurs HIF synthétisés dans le cytoplasme de la cellule sont hydroxylés au niveau de deux résidus prolyl hautement conservés dans leur domaine ODDD (Oxygen dependant degradation domain) (Figure 40). Cette hydroxylation met en jeu les prolylhydroxylases 1-3 (PHD 1-3). Ces enzymes O₂-dépendantes utilisent l'ascorbate et l'ion ferreux Fe²⁺ présent dans leur site actif pour transformer l' α -cétoglutarate en succinate. L'hydroxylation de la sous-unité HIF- α permet ensuite sa prise en charge par la protéine Von Hippel-Lindau (VHL), qui recrute des ubiquitine-ligases E3 ; l'ubiquitination du complexe HIF aboutit finalement à sa dégradation par le protéasome. Un autre facteur appelé facteur inhibiteur de HIF (FIH) est capable d'inhiber HIF- α via des hydroxylations sur son domaine C-TAD ou en jouant le rôle de corépresseur auprès de la protéine VHL (Mahon et al., 2001; Sim et al., 2018).

En conditions hypoxiques, l'absence d'O₂ inhibe les PHDs dont l'activité enzymatique nécessite la présence de l'O₂ (Figure 40). La sous-unité HIF- α n'est alors plus hydroxylée, ce qui empêche sa prise en charge par la protéine VHL et sa dégradation par le protéasome. L'HIF- α est ainsi stabilisé, s'accumule dans le cytoplasme et peut être transloqué dans le noyau, dans lequel il s'associe à son homologue HIF-1 β . Le complexe hétérodimérique HIF- α /HIF-1 β ainsi formé recrute des cofacteurs de transcription p300/CBP à travers les domaines de transactivation C-TAD et N-TAD. Enfin, les domaines bHLH et PAS permettent finalement la liaison au complexe HRE présents dans les promoteurs des gènes cibles de HIF et va initier la réponse transcriptionnelle adaptée à l'hypoxie.

La caractérisation progressive de ces voies de régulation des facteurs HIF par l'O₂ ont donné lieu au prix Nobel de Médecine 2019 qui fut attribué à William Kaelin, Gregg Semenza et Peter Ratcliffe, récompensant l'ensemble de leurs travaux qui ont permis de percer le mystère moléculaire à l'origine de l'adaptation cellulaire à l'hypoxie (« How cells sense and adapt to oxygen availability, 2019 »).

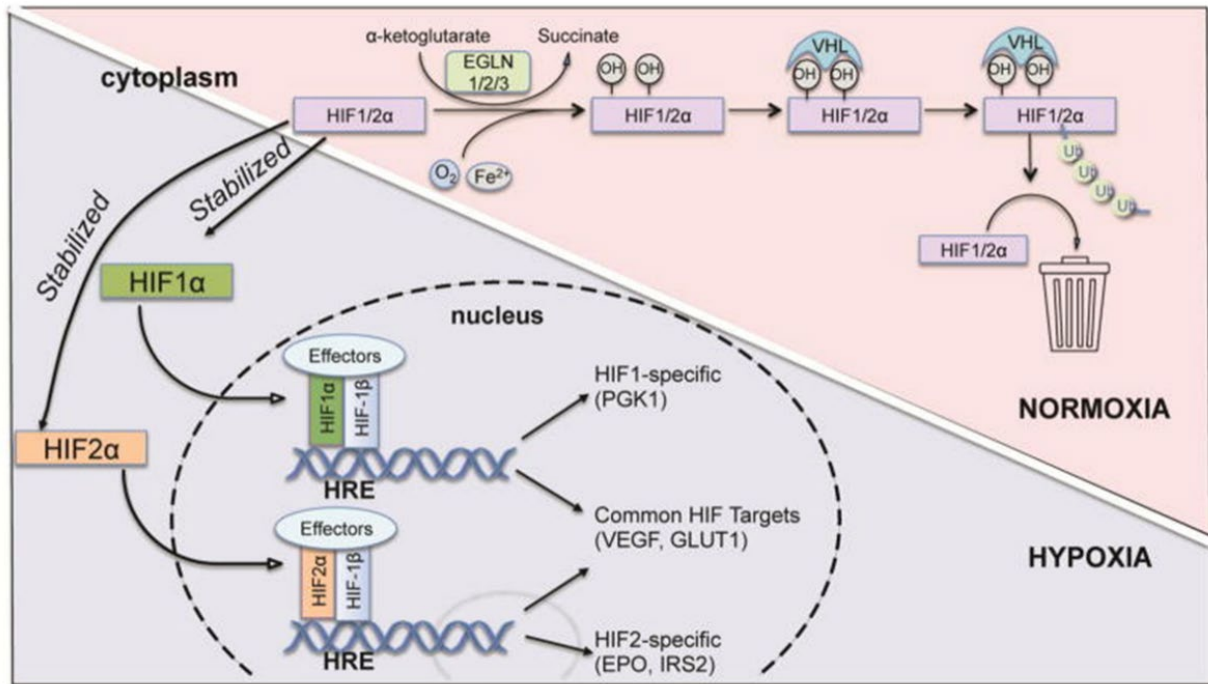


Figure 40 : Régulation des facteurs HIF- α dépendante de la pO₂. En normoxie, l'hydroxylation des HIF- α permet leur l'ubiquitination par la protéine VHL et aboutit à leur dégradation protéasomique. En hypoxie, l'absence d'O₂ empêche l'hydroxylation, ce qui permet la stabilisation des HIF- α , leur translocation dans le noyau et l'activation de la transcription des gènes cibles (Huang et al, 2018).

III.3.2.2. Régulation différentielle de HIF-1 α et HIF-2 α selon la pO₂

L'hétérogénéité spatiotemporelle des taux d'O₂ dans les GHG contraint les cellules tumorales à orchestrer différentes stratégies de réponses adaptatives. C'est là tout l'intérêt de synthétiser des formes homologues des facteurs HIF.

Les concentrations en O₂ et la durée de l'hypoxie favorisent en effet la stabilisation de l'une ou l'autre des sous-unités. Des études sur des lignées de neuroblastomes (SK-N-BE(2)C et KCN-69N) suggèrent que HIF-2 α est exprimé dans des gammes de taux d'O₂ plus larges que HIF-1 α : sa stabilisation persiste au-delà de 5% d'O₂ voire même en normoxie (21% O₂). La stabilisation de HIF-1 α se limite quant à elle à une hypoxie plus sévère (O₂ < 2,5%) (Holmquist-Mengelbier et al., 2006; Mohlin et al., 2015) (Figures 41A). Ces deux sous-unités sont donc stabilisées dans des conditions hypoxiques comparables à celles observées au sein des GHG

($O_2 \leq 1\%$). Par ailleurs, les expressions de HIF-1 α et HIF-2 α sont modulées différemment selon la durée de l'hypoxie : l'expression protéique de HIF-1 α se limite aux premières 24h pour moduler la réponse à une hypoxie aiguë (<24h) et diminue ensuite rapidement. Au contraire, la stabilisation de HIF-2 α persiste au-delà de 24h et module l'adaptation cellulaire à une hypoxie chronique (Figure 41B).

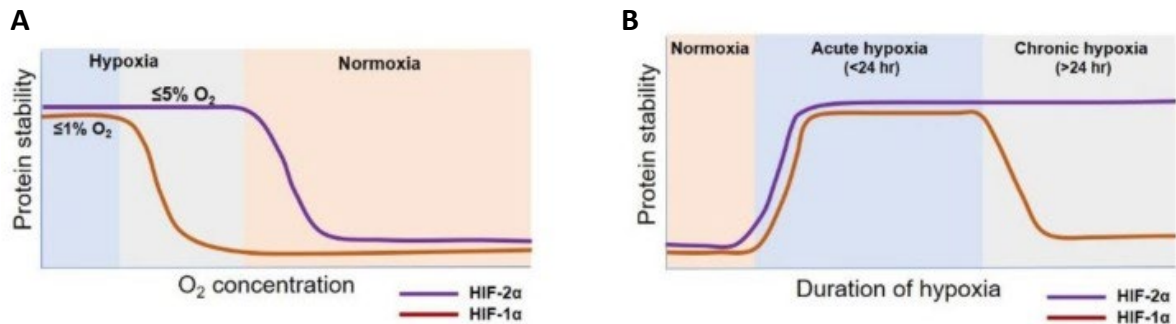


Figure 41 : Dynamiques des stabilisations protéiques de HIF-1 α et HIF-2 α en fonction des concentrations en O_2 et de la durée de l'exposition à l'hypoxie (A) HIF-2 α est stabilisé dans des taux d' O_2 très variables, allant de l'hypoxie la plus sévère ($\leq 1\%$) à la normoxie (21%), alors que HIF-1 α est essentiellement stabilisé lorsque $O_2 < 2,5\%$. (B) HIF-1 α est essentiellement stabilisé au cours d'une hypoxie aiguë alors que HIF-2 α persiste au-delà de 24h et module l'hypoxie chronique.

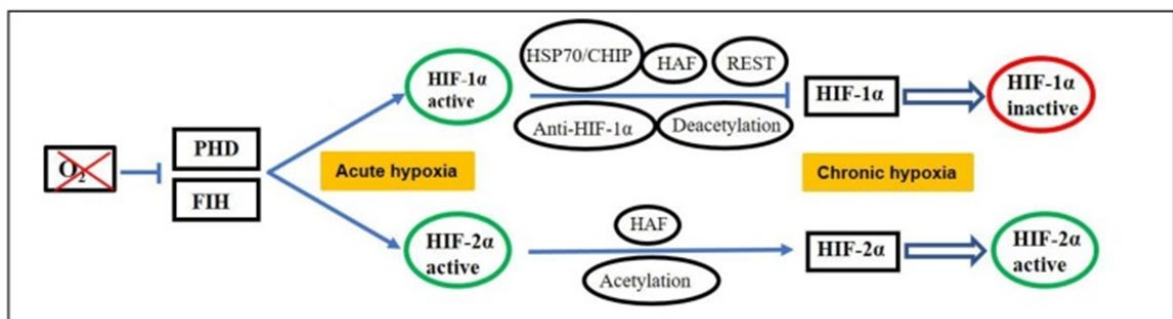


Figure 42 : Régulations différentielles de HIF-1 α et HIF-2 α en fonction de la durée de l'hypoxie. En hypoxie aiguë, HIF-1 α et HIF-2 α sont tous les deux stabilisés ; en hypoxie chronique, la stabilisation de HIF-2 α persiste alors que HIF-1 α est dégradé à travers l'intervention de différents complexes protéiques (Saxena et al, 2019).

Des études ont proposé différents mécanismes potentiels qui contribueraient à cette différence de régulation des HIF- α en fonction de la pO_2 dans le temps (Figure 42) :

- le **complexe HSP70-CHIP** qui entraîne l'ubiquitination de HIF-1 α mais non de HIF-2 α pendant une hypoxie prolongée, ce qui favorise la dégradation protéasomique de HIF-1 α (Bento et al., 2010; Luo et al., 2010).

- le **facteur HAF** (Hypoxia-associated factor), une ubiquitine ligase E3 qui est surexprimée en hypoxie chronique et qui permet de switcher la réponse hypoxique HIF-1 α vers HIF-2 α ; HAF favorise non seulement l'ubiquitination (et donc la dégradation) de HIF-1 α mais augmente également la transactivation de HIF-2 α en interagissant directement avec son domaine C-TAD (Koh et al., 2008, 2011).
- le **facteur REST** (Repressor Element 1-Silencing Transcription Factor) réprime spécifiquement l'expression de HIF-1 en se fixant sur son promoteur.
- des modifications épigénétiques ; les **acétylations des histones H3 et H4** dans les régions promotrices de HIF-1 α diminuent en hypoxie chronique alors qu'elle augmentent pour le promoteur HIF-2 α (Lin et al., 2011).

Cell Line	Conditions of Hypoxia	HIF-1 α Stability	HIF-2 α Stability	HIF-1 α vs HIF-2 α
SK-NBE(2)	1% O ₂ , 4 h and 72 h	Stabilized at 4 h, absent at 72 h	Stabilized at 4 h and 72 h	Greater HIF-2 α expression at 4 h and 72 h hypoxia
SK-NBE(2), KCN-69n	1% and 5% O ₂ , 2–72 h	Stabilized at 1% O ₂ after 2 h then gradually decreased, undetected at 5% O ₂	Stabilized at 1% and 5% O ₂ after 2 h then gradually increased	HIF-1 α stabilized under acute hypoxia, HIF-2 α stabilized under chronic hypoxia
T24 and J82	1% O ₂ , 0–48 h	Stabilized at 6 h, then gradually decreased	Stabilized at 6 h, then gradually increased	HIF-1 α stabilized under acute hypoxia, HIF-2 α stabilized under chronic hypoxia
SK-N-BE(2)C, IMR32 SK-N-ER, SH-SY5Y	1% O ₂ , 24 h and 72 h	Stabilized at 24 h	Stabilized at 24 h and 72 h	HIF-1 α stabilized under acute hypoxia, HIF-2 α stabilized under chronic hypoxia
PC-3, DU145, LNCaP	1% O ₂ , 2–24 h	Stabilized at 0.5–6 h, absent at 24 h	NA	HIF-1 α active during acute hypoxia
MCF7	1% O ₂ , 4–72 h	Stabilized at 4–8 h, decreased after 24 h	Stabilized at 24 h	HIF-1 α stabilized under acute hypoxia, HIF-2 α stabilized under chronic hypoxia
A549 cells	0.5% O ₂ , 4 h and 12 h	Stabilized at 4 h, then gradually decreased	Stabilized at 4–12 h	HIF-1 α stabilized under acute hypoxia, HIF-2 α stabilized under chronic hypoxia
HEK-293, MCF7, MDA-MB-231, MCF10A	1% O ₂ , 0–72 h	Stabilized at 4–16 h, then gradually decreased	NA	NA

h—hour, H—hypoxia, R—reoxygenation, NA—not available.

Tableau 5: Stabilisation et activation des HIF- α en hypoxies aiguë et chronique dans différentes lignées cellulaires in vitro (Saxena et al, 2019)

A l'échelle moléculaire, le maintien des physioxies intratissulaires (PtiO₂) s'apparente finalement à une forme d'équilibre complexe entre la stabilisation et la dégradation des HIF- α ,

ceux-ci étant constamment synthétisés et hydroxylés. Dans un contexte tumoral, cet équilibre est rompu en faveur d'une suractivation des voies médiés par les facteurs HIF. Cette suractivation est à la fois induite par des taux d'O₂ extrêmes, ainsi que d'autres facteurs liés au métabolisme tumoral et l'activation aberrante de voies oncogéniques.

La pO₂ a donc un rôle central dans la régulation des HIF- α . Si la voie de régulation décrite ci-dessus est commune à HIF-1 α et HIF-2 α , l'hétérogénéité spatiotemporelle des pO₂ intratumorales entraîne une régulation différentielle de HIF-1 α et HIF-2 α et illustre une première distinction fonctionnelle majeure entre ces deux sous-unités.

III.3.3. Régulation indépendante de la pO₂

III.3.3.1. Facteurs HIF et reprogrammation métabolique : l'effet Warburg

La principale source énergétique du cerveau humain est le glucose, dont le premier objectif est de produire l'ATP (Adenosine triphosphate) nécessaire pour couvrir la forte demande énergétique de la communication neuronale. En temps normal, les cellules nerveuses assurent cette production énergétique à travers la respiration cellulaire et la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Le glucose est initialement converti en pyruvate au cours de la glycolyse qui a lieu dans le cytosol et emprunte ensuite deux alternatives métaboliques selon les conditions d'oxygénation ; en conditions d'O₂ normales, le pyruvate entre dans la mitochondrie pour y être oxydé à travers le cycle de Krebs avant d'entamer une phosphorylation oxydative pour produire un maximum d'ATP (36/molécule de glucose). Lorsque l'O₂ se rarifie, le pyruvate entame une fermentation lactique, aboutissant à une synthèse abondante de lactate et peu d'ATP (2/molécule de glucose) : c'est la glycolyse anaérobie.

Au cours de ses travaux en 1924, Otto Warburg décrivait un phénomène, connu désormais sous le terme « effet Warburg », selon lequel les cellules cancéreuses réorganisent leur métabolisme en favorisant la fermentation lactique au détriment de la phosphorylation oxydative, même en présence d'oxygène : c'est la glycolyse aérobie (Warburg, 1956). De nombreuses études tentent de comprendre l'intérêt cellulaire de ce switch métabolique paradoxal, qui est moins efficace en termes de production d'ATP (Figure 43).

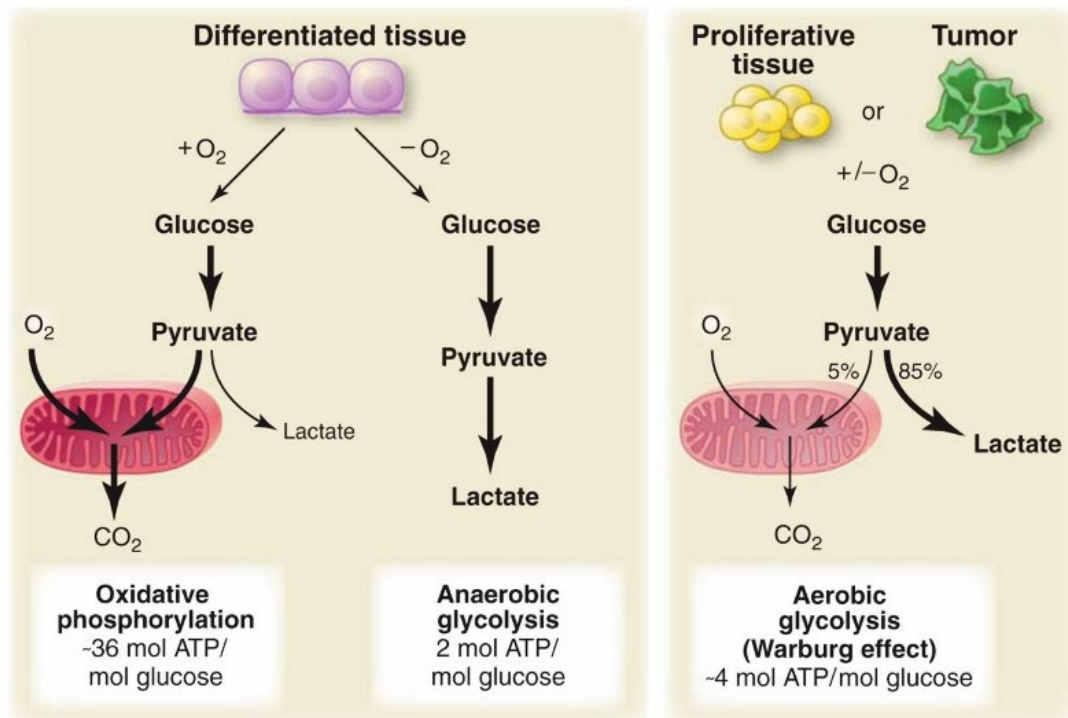
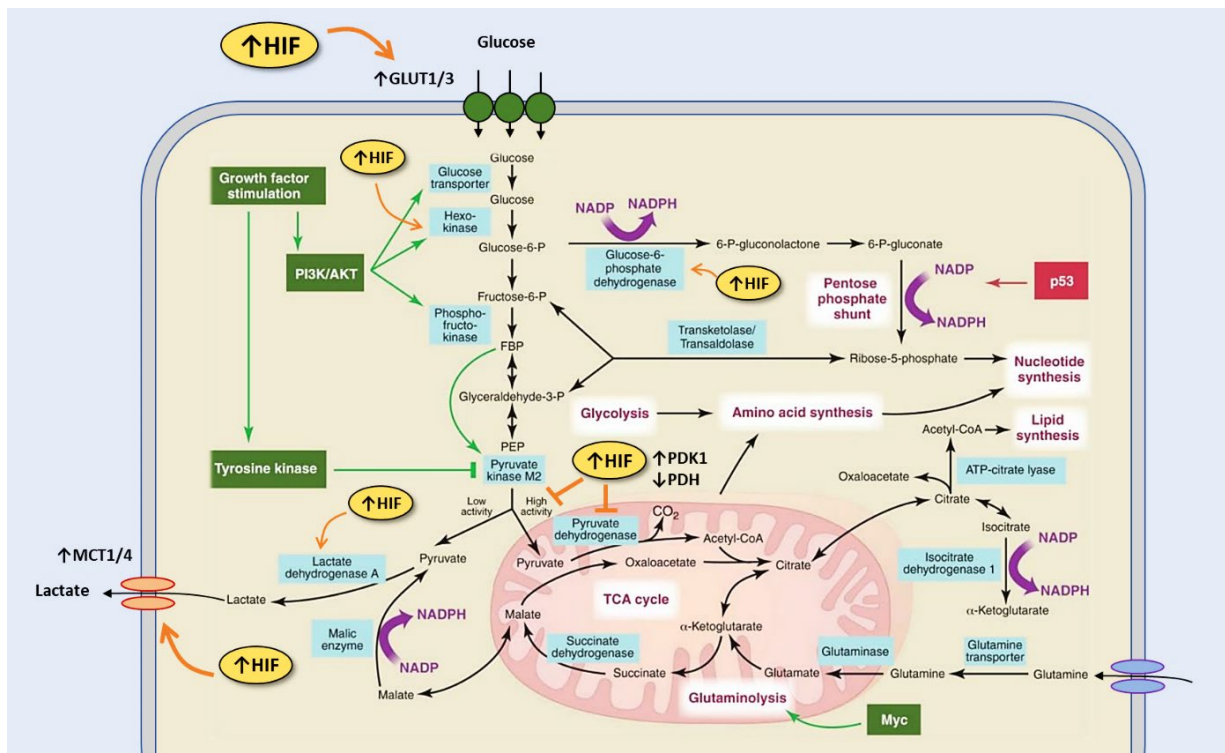


Figure 43 : Comparaison des voies métaboliques associées à la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et la glycolyse aérobie. Les tissus différenciés sains privilégient un métabolisme du glucose à travers la phosphorylation oxydative lorsque l'O₂ est présent, afin de produire un maximum d'ATP (gauche). A l'inverse, les tumeurs convertissent la plupart du glucose en lactate, et privilégient fermentation lactique, peu importe les taux d'O₂ (effet Warburg) (droite) (Vander Heiden et al, 2018)

Une des explications proposées a été que l'hypoxie intratumorale sélectionne les cellules dépendantes du métabolisme anaérobie (Gatenby and Gillies, 2004). Cependant, ce switch métabolique au profit de la glycolyse aérobie est observé bien avant l'exposition hypoxique. Certains cancers montrent par ailleurs des cellules cancéreuses hautement glycolytiques alors même qu'elles sont parfaitement oxygénées (Christofk et al., 2008; Elstrom et al., 2004; Gottschalk et al., 2004). Le métabolisme du glucose dans le contexte tumoral serait avant tout conçu pour maximiser la production de « blocs de construction » cellulaires nécessaires à la prolifération tumorale, plutôt que pour la production énergétique ATP-dépendante (Vander Heiden et al., 2009) (Figure 44).

L'hypoxie ne semble donc pas déclencher le switch métabolique initial des cellules tumorales, qui est propre à leur fonctionnement. En revanche, l'activation des facteurs HIF réquisitionne ces voies et accentue encore davantage la balance en faveur d'un métabolisme glycolytique au détriment de la respiration mitochondriale. L'objectif est d'utiliser comme substrat toutes les ressources disponibles autre que l'O₂ pour continuer de répondre aux besoins énergétiques de la cellule tumorale proliférative. Cette reprogrammation métabolique semble essentiellement

modulée par HIF-1 α qui augmente l'expression des transporteurs du glucose (GLUT1 et GLUT3) et de quasiment toutes les enzymes glycolytiques comme les hexokinases, la phosphofructokinase 1 (PFK1), la pyruvate kinase M2 ou la lactate déshydrogénase (LDHA) (Semenza, 2013a). Le pyruvate est majoritairement converti en lactate qui sera notamment relargué à travers les transporteurs MCT1/4 (monocarboxylate transporters 1/4), également sous la modulation de HIF-1 α . Ceci contribue en outre à l'acidification du milieu extracellulaire, un autre facteur favorisant l'invasion tumorale et la progression métastatique. HIF-1 α découple également la glycolyse et OXPHOS en exprimant PDK1, ce qui accentue l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase (PDH), empêche la transformation du pyruvate en Acétyl-CoA et verrouille un peu plus l'entrée dans le cycle de Krebs. Cette reprogrammation métabolique associée aux facteurs HIF ne se limite pas à la glycolyse ; selon les disponibilités en ressources, ils peuvent également favoriser la glutaminolyse, la sérinolyse ou le métabolisme des phospholipides, notamment dans les DIPG/DMG (Nguyen et al., 2017; Blandin et al., 2019; Jansen et al., 2016). Par ailleurs, la glycolyse et la glutaminolyse dans les DIPG seraient encore renforcées par la mutation H3K27M (Chung et al., 2020).



Légende sur la page suivante

Figure 44 : Schéma récapitulatif des principales voies métaboliques impliquées dans les cellules tumorales en prolifération et modulées par les facteurs HIF. La glycolyse, la glutaminolyse, la phosphorylation oxydative, la voie des pentoses phosphates sont interconnectées dans les cellules tumorales prolifératives. Elles permettent d'assurer à la fois la production de NADH et un flux régulier d'Acétyl-CoA en direction du cytosol pour assurer la biosynthèse des lipides. Les étapes clés de ces voies métaboliques sont sous la modulation de voies de signalisation connues pour être impliquées dans la prolifération cellulaire et altérées dans les tumeurs et font intervenir des oncogènes (vert) et des suppresseurs de tumeurs (rouge). L'activation de la voie PI3K/AKT stimule l'absorption et le flux de glucose à travers les phases précoces de la glycolyse. Myc module la glutaminolyse soutient lui aussi la formation de NADH. HIF favorise la glycolyse en augmentant l'activité des transporteurs du glucose (GLUT1/3), celle de l'hexokinase et en inhibant l'entrée du pyruvate dans le cycle TCA, par l'activation de PDK1 et l'inhibition de PDH1. (Elaboré à partir de Vander Heiden et al, 2018)

III.3.3.2. Facteurs HIF et régulation des ROS

La surproduction des espèces réactives à l'O₂ (ROS) est un phénomène caractéristique des cellules tumorales. Ces composés hautement réactifs sont principalement produits au cours de la chaîne respiratoire mitochondriale sous la forme d'anions superoxyde (O²⁻), de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de radicaux et/ou anions hydroxydes (OH ou OH⁻). Dans une situation physiologique normale, les ROS sont présents en quantité limitée, régulés par un système de défense d'antioxydants. Ils contribuent même à la régulation de l'homéostasie en servant de molécules de signalisation cellulaire (Chen et al., 2018).

Cependant, la surproduction de ROS est un phénomène caractéristique des cellules tumorales, accentuée par les conditions hypoxiques qui perturbent le fonctionnement des complexes de la chaîne de transport des électrons (Figure 45). Cette surproduction des ROS entraîne un stress oxydatif qui peut causer des dommages irréversibles sur l'ADN, les protéines ou les membranes biologiques pouvant mener à la mort de la cellule. Ces ROS peuvent également inhiber la protéine PHD en oxydant l'ion ferreux Fe²⁺ sur son site actif et indispensable à son activité enzymatique. L'inhibition de la PHD entraîne l'expression des facteurs HIF- α , déclenchant une réponse hypoxique et une activation de la signalisation HIF découplée de la teneur en O₂: c'est la **pseudo-hypoxie**.

En retour, les HIFs contribuent à la régulation de l'homéostasie redox. Ainsi, ils peuvent réduire la production des ROS en minimisant la fonction respiratoire liée au cycle de l'acide tricarboxylique mitochondrial (= cycle TCA ou cycle de Krebs), ou au contraire stimuler la production des ROS en augmentant l'activité de la NADPH oxydase. Cette interaction HIF/ROS est complexe et forme un nouveau cercle vicieux d'auto-régulation (Figure 46). Il permet de protéger la cellule du stress oxydatif tout en perpétuant l'activation des voies HIF,

favorisant un métabolisme pro-tumoral, et ce de manière totalement indépendante de la pO_2 . Cette diminution des ROS par les facteurs HIF contribue notamment aux résistances des tumeurs à la radiothérapie (Lan et al., 2019; Wigerup et al., 2016).

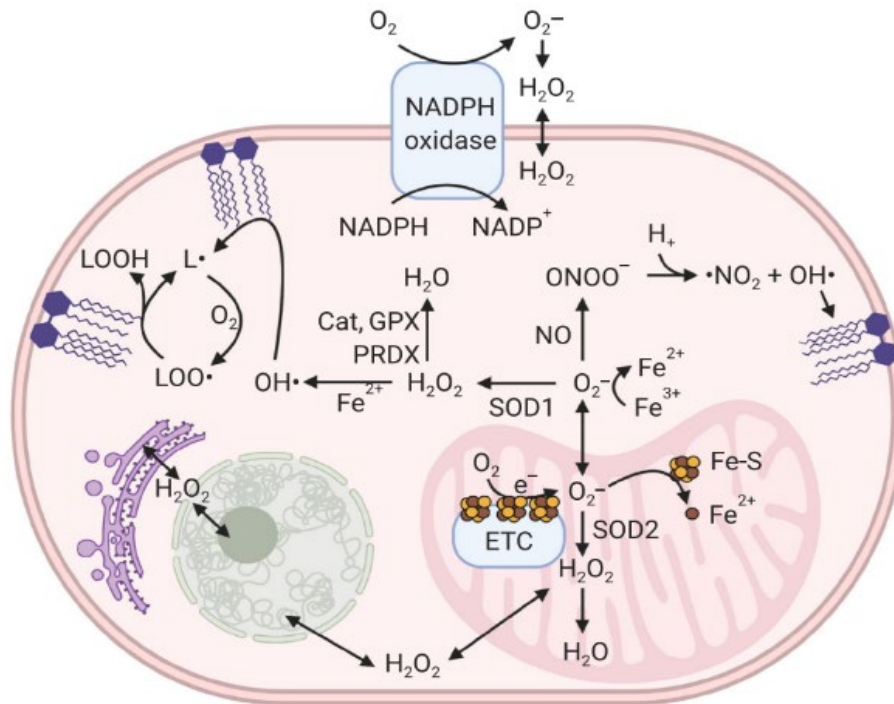


Figure 45 : Production des différentes espèces réactives à l'O₂ (ROS). O₂⁻ est produit au niveau extracellulaire par la NADPH oxydase ou à l'intérieur de la cellule au sein de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie. Il cible le fer-soufre (Fe-S) pour libérer Fe²⁺ et réduit le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺). En pénétrant dans la mitochondrie, O₂⁻ est transformé en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par les superoxydes dismutases (SOD1 et SOD2). H₂O₂ diffuse à l'intérieur de la mitochondrie et peut ensuite réagir avec les protéines et l'ADN ou être détoxifié en eau par les peroxydases cellulaires (Cat, GPX, PRDX). L'oxyde nitrique (NO) transforme l'O₂ en peroxynitrite (ONOO⁻). Le radical peroxyde (OH⁻) est formé suite à la réaction de H₂O₂ avec l'ion ferreux Fe²⁺ et la décomposition de ONOO⁻ initiant la peroxydation lipidique : OH⁻ réagit avec les lipides pour former des radicaux lipidiques (L⁻) qui réagissent avec l'oxygène pour former des radicaux peroxydes lipidiques (LOO⁻). De façon cyclique, LOO⁻ réagit avec les lipides pour reformer des L⁻ et des peroxydes lipidiques (LOOH) (Harris et DeNicola 2020).

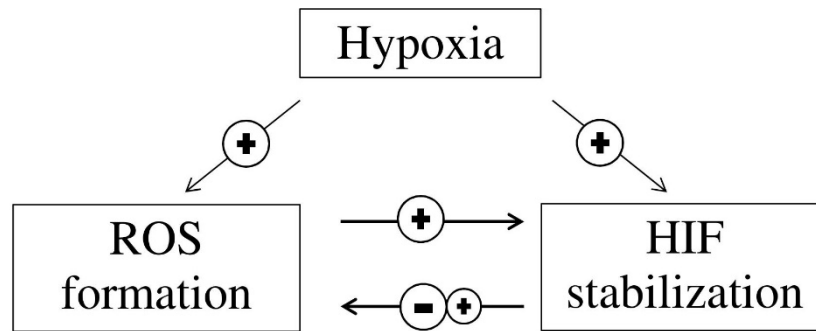


Figure 46 : Interactions entre les facteurs HIF et les ROS en conditions hypoxiques. En hypoxie, les HIFs sont stabilisés et la production de ROS augmente. Ces ROS stabilisent à leur tour HIF qui assurent leur propre stabilisation en régulant les ROS (Chen et al. 2018).

Les facteurs HIF peuvent également être régulés de manière indépendante de la pO_2 des suites d'une altération des voies de signalisation médiées par des RTK, très fréquentes dans les GHG, notamment celles affectant les voies PI3K/Akt/mTor et Ras/Raf/Mek.

III.3.3.3. Les facteurs HIF et les voies de signalisation médiées par les RTK

Les voies PI3K/Akt/mTor et Ras/Raf/Mek sont incontournables dans la tumorigenèse des GHG (cf II) et le sont tout autant dans la régulation des facteurs HIF (Figure 47). PI3K est fréquemment mutée dans les GHG adultes et pédiatriques, dont les DIPG et DMG (cf II) (Brotelle and Bay, 2016b; Grill et al., 2012; Li et al., 2016; Schwartzenruber et al., 2012b). Les altérations oncogéniques conduisant à une activation aberrante de ces voies dans le contexte des GHG suractivent également HIF- α et potentialisent la voie de signalisation HIF. En conséquence, le rapport stabilisation/dégradation des HIF augmente progressivement, ce qui aboutit à une accumulation et une activation des HIF- α indépendamment de la teneur en O_2 et contribue à la pseudo-hypoxie. Cette régulation passe notamment par l'intermédiaire des protéines ERK et mTOR. Là encore, une régulation différentielle par les kinases a pu être mise en évidence entre HIF-1 α et HIF-2 α , qui fait intervenir les kinases du complexes mTOR notées MTORC1 et MTORC2 (Figure 48). Des ciblage spécifiques de ces deux complexes enzymatiques dans des lignées issues de xénogreffes dérivée de tumeurs (PDX) de neuroblastomes ont montré que HIF-1 α serait majoritairement régulé par MTORC1 alors que HIF-2 α serait essentiellement régulé par MTORC2 (Mohlin et al., 2015). En effet, les inhibitions spécifiques de mTORC2 et de la PI3K dans des neuroblastomes agressifs ont permis de diminuer les niveaux de HIF-2 α , alors qu'il n'ont aucun effet sur HIF-1 α . Ces dépendances préférentielles ont également pu être mises en évidence contexte de carcinomes des cellules rénales (RCC) (Nayak et al., 2013; Toschi et al., 2008).

L'activation de cette voie PI3K/AKT/mTOR joue un rôle majeur dans la prolifération, la croissance et la survie cellulaire.

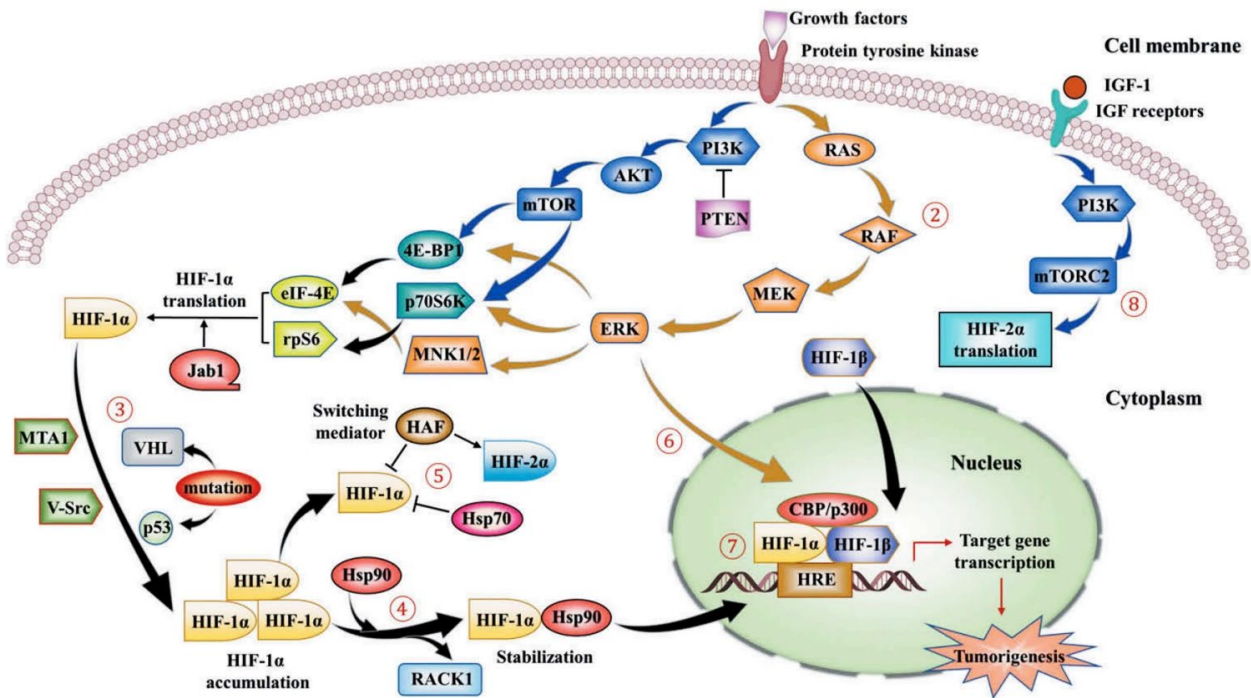


Figure 47: Récapitulatif des voies de signalisation intervenant dans la régulation des facteurs HIF et dans la tumorigénèse. (1)(2) HIF-1 α peut être régulé par la stimulation des facteurs de croissance via l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Cette stimulation conduit l'activation des voies PI3K/AKT/mTOR (en bleu) et/ou RAS/RAF/MEK (orange). Cette signalisation médiée notamment par mTOR et ERK entraîne la phosphorylation de trois effecteurs : 4E-BP1, p70S6K et MNK1/2 suivie des activations de eIF-4E et rpS6, ce qui augmente finalement la traduction de HIF-1 α . (3) Des mutations et/ou altérations fonctionnelles de la protéine VHL, PTEN et p53 augmentent l'expression de HIF-1 α . (4) Hsp90 est en compétition avec RACK1 pour la liaison des domaines PAS : RACK1 déstabilise HIF- α en l'entraînant dans la voie de dégradation protéasomique alors que Hsp90 empêche cette dégradation et favorise la stabilisation de HIF- α . (5) HAF régule une balance HIF-1 α /HIF-2 α en favorisant la transactivation de HIF-2 α au détriment de HIF-1 α qui est davantage dégradé. (6) ERK peut directement phosphoryler le complexe CBP/p300 et favorise l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α . (7) CBP/p300 sert de cofacteur et se lie à l'hétérodimère HIF-1 α /HIF-1 β : ce complexe se fixe au domaine HRE situé sur le promoteur EPO et augmente l'activation des gènes favorisant divers processus pro-tumoraux. (8) L'activation de récepteurs de type IGF (Insulin-like growth factor) active préférentiellement HIF-2 α à travers mTORC2. (Modifié à partir de Muz et al, 2015)

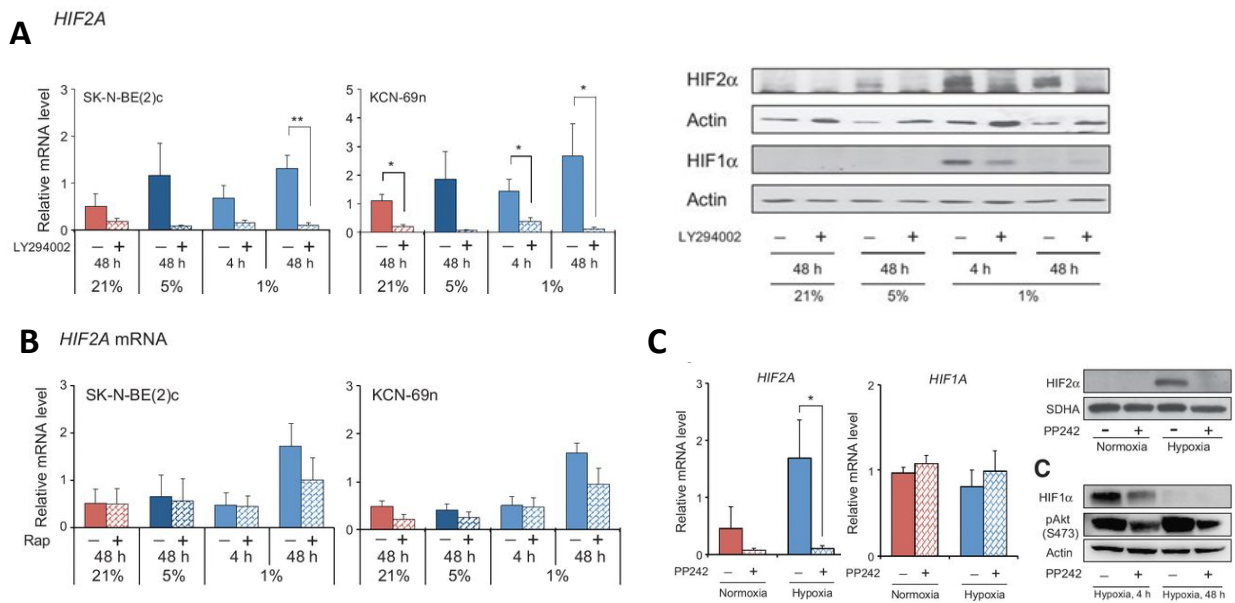


Figure 48 : Dépendance de l'expression de HIF-2 α à l'axe PI3K/mTORC2 dans les lignées issues de neuroblastomes SK-N-BE(2)c et KCN-69n. (A) L'inhibition fonctionnelle de la PI3K par le LY294002 entraîne une diminution de l'expression de l'ARNm (gauche) et de la protéine (droite) associés à HIF-2 α . (B) L'inhibition de mTORC1 seul par la rapamycine n'a pas d'effet significatif sur la transcription de HIF-2 α . (C) L'inhibition combinée de mTORC1/mTORC2 par PP242 entraîne une nette diminution de l'ARNm (gauche) et de la protéine HIF-2 α (droite) (Mohlin et al, 2015)

III.4. Conséquences pro-tumorales de l'activation des facteurs HIF

La reprogrammation métabolique tumorale, les surexpressions de ROS ou les altérations oncogéniques des voies PI3K/AKT/MTOR ou RAF/RAS/MAPK conduisent à des phénomènes de pseudo-hypoxie. Elle induit une stabilisation des HIFs et une activation aberrante de leurs voies de signalisation. Comme décrit précédemment, ces phénomènes entretiennent l'action des HIFs qui s'inscrivent dans un cercle vicieux et maintiennent à leur tour un phénotype tumoral. Ainsi, ces processus favorisent déjà le développement et la progression tumorale. L'activation des facteurs HIF conduit ensuite à d'autres processus oncogéniques tels que l'angiogenèse, la dérégulation de la survie/mort cellulaire et l'entretien des cellules souches tumorales.

III.4.1. La néoangiogenèse et la sécrétion de VEGF

Face à l'hypoxie intratumorale des GHG, les activations de HIF-1 α et HIF-2 α visent avant tout à rétablir des apports en O₂ suffisants pour répondre aux besoins de la cellule, en optimisant la vascularisation de la tumeur. Pour cela, HIF-1 α et HIF-2 α augmentent les expressions de différents gènes pro-angiogéniques, en particulier l'érythropoïétine (EPO) et le VEGFA (Vascular endothelial growth factor A) (Kaur et al., 2005; Mohlin et al., 2015; Muz et

al., 2015). L'EPO est la principale hormone qui stimule l'érythropoïèse (= formation des globules rouges). L'augmentation de son activité contribue à optimiser l'apport des nutriments aux cellules tumorales via le flux sanguin.

Les protéines VEGF sont directement liées à l'angiogenèse et sont indispensables à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, même en conditions normales. L'activation de HIF-1 α et HIF-2 α augmentent la sécrétion de VEGF et stimulent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en activant les cellules endothéliales. Cependant, ce VEGF synthétisé en excès conduit à une néoangiogenèse anarchique qui ne suffit pas à compenser les baisses de flux d'O₂. Au lieu de cela, elle entraîne des réoxygénations partielles et intermittentes des tissus et donne lieu à une hypoxie cyclique, alternant entre des phases d'hypoxie aiguë et de brèves réoxygénations des tissus ou une hypoxie chronique plus ou moins prolongée. Ceci aura pour conséquences de maintenir les gradients hypoxiques et perpétuer la stabilisation des HIFs à travers un cercle vicieux d'auto-renouvellement. Ce phénomène contribue fortement à l'agressivité des tumeurs et a suscité l'attention de nombreuses études visant à inhiber cette angiogenèse (cf II). L'inhibition de HIF-1 α diminue les sécrétions de VEGF et est associée à une baisse de la croissance tumorale et la formation de nouveaux vaisseaux (Tang et al., 2004). De son côté, l'inhibition de HIF-2 α impacte essentiellement la capacité de perfusion et l'intégrité des péricytes, impliquant les voies DII4/Notch et l'angiopoïétine 2 (Ang2) (Skuli et al., 2009). Certaines expériences ont montré que l'hypoxie chronique modulée par HIF-2 α accentue la sécrétion de VEGF par rapport à une hypoxie aiguë ou cyclique (Dong et al., 2019; Nauta et al., 2017) ; d'autres soulignent au contraire une angiogenèse et une perfusion tumorales plus marquées lors d'une hypoxie aiguë ou cyclique, majoritairement modulée par HIF-1 α (Gaustad et al., 2013; Rofstad et al., 2010). Globalement, HIF-1 α et HIF-2 α agissent tous deux de manière complémentaire sur ces facteurs pro-angiogéniques, selon une synchronisation qui suit leurs stabilisations respectives au cours d'une hypoxie aiguë ou chronique. En complément des facteurs angiogéniques, HIF-1 α et HIF-2 α peuvent moduler différemment d'autres molécules médiatrices de la vascularisation comme le monoxyde d'azote (NO) (Branco-Price et al., 2012). Pour optimiser toujours davantage le développement de ces vaisseaux sanguins néoformés, les facteurs HIF dégradent et remodelent l'organisation de la MEC à travers l'induction de diverses protéines comme des protéases ou des intégrines (Semenza, 2013b). Ces modulations contribueraient non seulement à l'angiogenèse, mais favoriseraient également la croissance et la dissémination tumorale aux tissus sains alentours.

L'hyperexpression de VEGF dans les gliomes adultes a été démontrée à plusieurs reprises (Seyedmirzaei et al., 2021). Les patients atteints de gliomes ont des niveaux de VEGF

plus élevés que les patients sains et les taux de VEGF et de VEGFR2 augmentent avec le grade tumoral (Kuczynski et al., 2011; Zhou et al., 2005). Chez l'enfant, les données sont plus limitées et l'hyperexpression du VEGF et VEGFR semble moins marquée dans les GHG pédiatriques. Des études ont pu associer un profil pro-angiogénique particulier aux tumeurs mutées pour H3K27M (Castel et al., 2015) et des analyses d'imagerie ont montré un lien direct entre la présence des zones hypoxiques et nécrotiques et des sous-groupes tumoraux plus agressifs comme les GHG pédiatriques mutés pour H3.3K27M ou pour TP53 (Ceschin et al., 2019). Néanmoins, les traitements au bevacizumab n'ont pas montré de bénéfice clinique remarquable (Grill et al., 2018; Jansen et al., 2016; Narayana et al., 2010).

III.4.2. Facteurs HIF et survie/apoptose des cellules tumorales

L'activation des voies HIF contribue à la prolifération tumorale à travers les différentes adaptations métaboliques et moléculaires décrites jusqu'ici : développement de l'angiogenèse, reprogrammation métabolique, régulation des ROS, modulation de voies oncogéniques sus- et sous-jacentes. Par ailleurs, ces voies hypoxiques peuvent également moduler de manière plus directe des processus liés à la prolifération et à la survie cellulaire.

- *Interactions des HIFs avec p53*

Les facteurs HIF semblent interagir de manière réciproque avec p53. Leurs principes de fonctionnement sont très similaires : ce sont des facteurs de transcription activés en réponse à un stress cellulaire. Néanmoins, leur interaction dans le contexte de régulation de la réponse cellulaire à l'hypoxie reste ambiguë et dépendante du contexte. Il a été rapporté que l'hypoxie induit des niveaux de p53 à la fois dépendants et indépendants des HIF. En agissant sur divers intermédiaires de la voie p53, ces derniers peuvent réguler positivement ou négativement la transcription et/ou la traduction de p53 selon le type de cancer et de tissu (Figure 47). Une récente publication de Zhang et al. résume les connaissances actuelles sur la régulation réciproque de p53/HIF dans différent(e)s cancers/lignées cellulaires (Zhang et al., 2021).

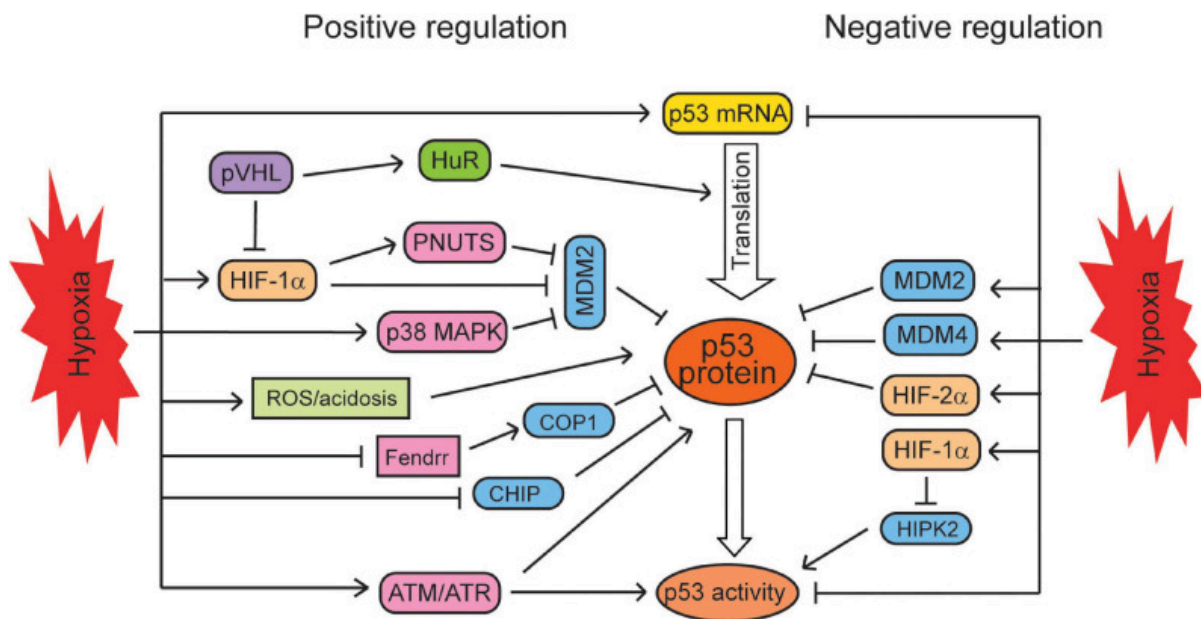


Figure 49 : Régulation de la signalisation de p53 par l'hypoxie. La régulation de p53 par l'hypoxie est contextuelle. L'hypoxie peut à la fois réguler positivement ou négativement les taux d'ARNm, la traduction, les taux de protéines et leurs activités en intervenant dans différentes voies de signalisation. *HuR*, *Human antigen R*; *PNUTS*, *Phosphatase INuclear Targeting Subunit*; *FOXF1*, *Adjacent Non-Coding Developmental Regulatory RNA*; *COP1*, *constitutive photomorphogenesis protein 1*; *CHIP*, *C terminus of Hsc70-interacting protein*; *ATM*, *Ataxia-Telangiectasia mutated*; *ATR*, *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*; *HIPK2*, *Homeodomain-interacting protein kinase 2*. (Zhang et al, 2018)

Un modèle conceptuel a été récemment proposé et met en jeu un rôle de chaperonnage de HIF par p53 (Figure 48). Mahan et al ont démontré que HIF-1 α peut induire l'expression de forme sauvage (WT) ou mutée (NT) de la protéine p53. Ces protéines p53 sont capables de chaperonner le facteur HIF, ce qui le protège de la dégradation par la protéine VHL et entraîne un phénotype de pseudo-hypoxie où HIF est stabilisé indépendamment de la concentration en O₂. De cette manière, p53 contribuerait à exacerber la signalisation HIF-dépendante et alimenterait les propriétés pro-tumorigéniques des facteurs HIFs.

Ce modèle a été initialement proposé pour HIF-1 α , mais un mécanisme similaire peut être envisagé avec HIF-2 α et p53 dans le cadre d'une hypoxie chronique.

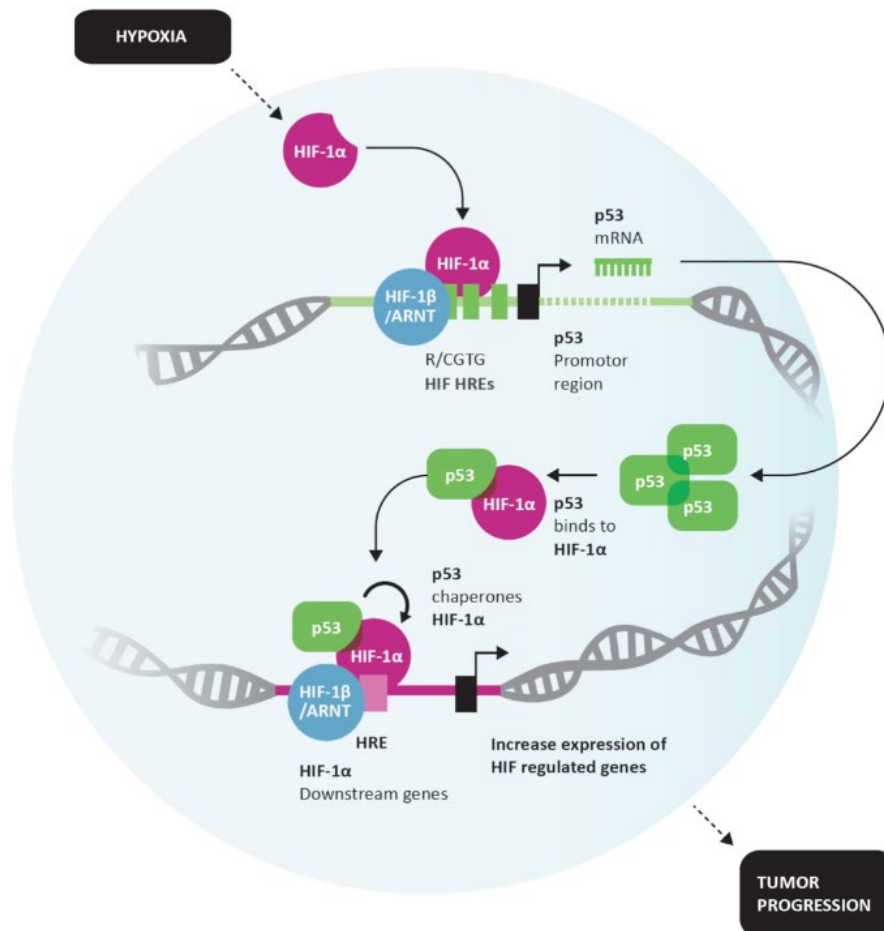


Figure 50 : Modèle conceptuel de rétrorégulation entre HIF-1 α et p53. Une boucle de rétrocontrôle positif existerait entre HIF-1 α et p53. Lorsque HIF-1 est activé en hypoxie, il se lie au HRE dans le promoteur de TP53 et augmente sa transcription, entraînant une accumulation de la protéine p53, sous des formes MT ou WT. Ces protéines p53 peuvent se lier à HIF-1 α , le protégeant de la dégradation par les protéines VHL et augmentent l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α (Madan et al, 2019).

- *Interactions des HIFs avec la voie MYC/MYCN*

Cette diaphonie moléculaire des facteurs HIF s'observe également à travers la modulation du cycle cellulaire et de la voie MYC, un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes, pour laquelle les facteurs HIFs semblent en compétition. En hypoxie, MYC est inhibé par HIF-1 α et induit une réponse adaptative qui favorise la survie cellulaire. Face à lui, HIF-2 α stabilise les complexes MYC/MYCN et favorise l'activité MYC en hypoxie chronique. Cette stabilisation est même plus forte que la dégradation opérée par HIF-1 α et finit par activer MYC en hypoxie chronique (Li et al., 2020). A son tour MYC peut induire la stabilisation des facteurs HIF, en particulier de HIF-2 α avec lequel il collabore étroitement dans la régulation de l'auto-renouvellement des cellules souches (Figure 51).

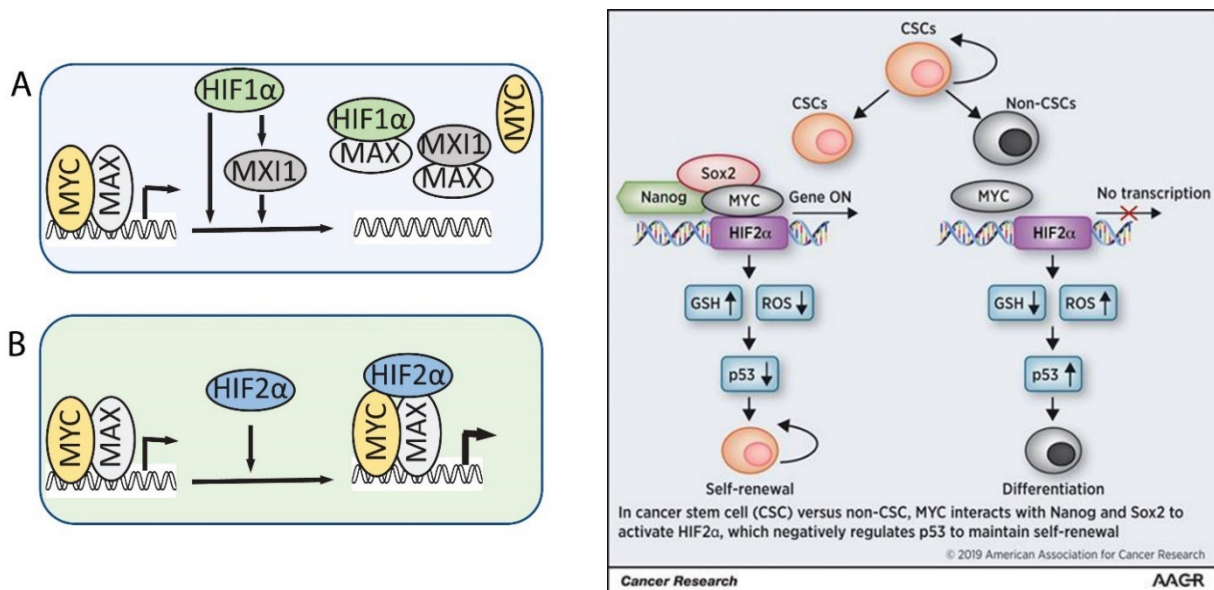


Figure 51 : Modèles conceptuels d'interaction entre les facteurs HIF et la voie MYC/MYCN. (A-B) Sous hypoxie, HIF-1 semble inhiber l'activité de MYC (A) alors que HIF-2 la favorise en stabilisant le complexe MYC-MAX (B). (C) A son tour, MYC serait en mesure de réguler la voie HIF-2α via Nanog et Sox2 pour maintenir l'autorenouvellement des cellules souches tumorales (Das et al, 2019). GSH, glutathion ; MAX, myc-associated factor X ; CSC, cancer stem cells.

III.4.3. Les facteurs HIF et le renouvellement des cellules souches cancéreuses

A ce jour, la régulation de l'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses (CSC) est essentiellement attribuée à HIF-2α, qui semble particulièrement surexprimé dans les cellules endothéliales périvasculaires et péri-nécrotiques de GBM par rapport à son homologue HIF-1α (Li et al., 2009b). L'expression de HIF-2α y est préférentiellement localisée dans le noyau des cellules tumorales et des cellules endothéliales des tissus tumoraux et péri-tumoraux, contrairement à HIF-1α qui est localisé à la fois dans le noyau et le cytoplasme, aussi bien de cellules tumorales que dans des cellules saines (D'Alessio et al., 2016). Cette localisation nucléaire suggère une activité transcriptionnelle plus active pour HIF-2α que son homologue HIF-1α et de plus spécifique aux cellules tumorales. HIF-2α y module principalement la survie et le maintien de la pluripotence des cellules souches tumorales concentrées dans les niches hypoxiques. Cette modulation est activée par une interaction directe avec CD44, dont le blocage inhibe le maintien de la pluripotence des cellules tumorales (D'Alessio et al., 2016; Johansson et al., 2017). HIF-2α induit notamment l'expression des gènes SOX2, NANOG et OCT4, lesquels sont nécessaires au maintien de la pluripotence (Bar et al., 2010; Das et al., 2019; Koh et al., 2011; Li et al., 2013).

En résumé, l'hypoxie est courante dans les tumeurs solides et plus spécifiquement dans les GHG. Les facteurs HIF sont capables de moduler une multitude de gènes impliqués dans des mécanismes pro-tumorigéniques : angiogenèse, reprogrammation métabolique, prolifération tumorale, survie, apoptose et maintien des cellules souches tumorales (Figure 52). De plus, la pseudo-hypoxie induite par des altérations oncogéniques mène à une activation exacerbée des voies de l'hypoxie et contribuent au phénotype tumoral. Cependant, l'essentiel des connaissances actuelles sur ces facteurs HIF sont issues d'études réalisées dans les GHG l'adulte ou dans d'autres types de cancers et très peu de données sont disponibles en pédiatrie. Dans ce contexte, de récents travaux menés au sein de notre équipe ont visé à explorer le rôle de ces facteurs HIF spécifiquement dans les GHG pédiatriques, d'autant plus qu'ils peuvent être à l'origine d'une résistance aux traitements et corrélés à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers. De ce fait, ils constitueraient une alternative potentielle pour cibler les GHG pédiatriques indépendamment de leur réarrangements moléculaires et épigénétiques spécifiques (cf II).

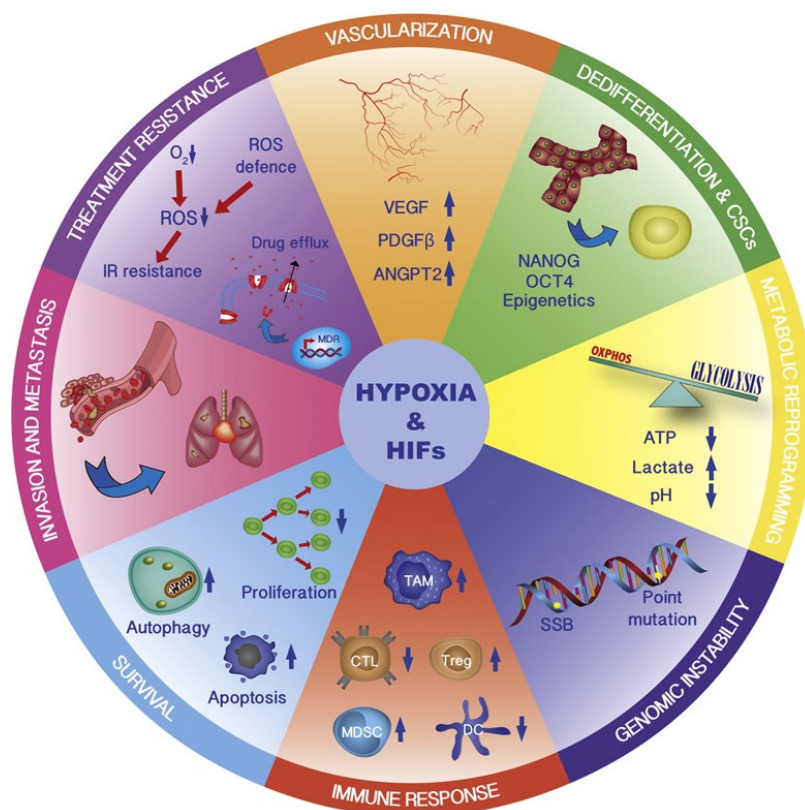


Figure 52 : Le rôle central de l'hypoxie et des facteurs HIF dans différents processus oncogéniques (Wigerup et al, 2016)

III.5. Implications pronostiques et thérapeutiques de l'hypoxie et des facteurs HIF dans les GHG pédiatriques

III.5.1. Rôles connus des facteurs HIF dans les GHG pédiatriques

Les rôles des facteurs HIF dans le contexte spécifique des GHG pédiatriques ont été peu étudiés à ce jour. L'essentiel de la caractérisation des rôles des facteurs HIF sont issues de GHG adultes ou d'autres cancers. Néanmoins, les GHG pédiatriques peuvent présenter des caractéristiques typiques de prolifération et/ou de nécrose périvasculaire associées à une hypoxie intra-tumorale. Les GBM sont notamment caractérisés par un noyau hypoxique et nécrotique, entouré de pseudo-palissades. Des GHG pédiatriques de la ligne médiane comme le DIPG sont hypoperfusés et les analyses histochimiques révèlent un important marquage des facteurs HIF. On y retrouve également des altérations de la voie PIK3/AKT/mTOR, centrale dans la régulation des HIF, avec des mutations de PI3KCA, TP53, MYC ou PTEN (cf II) (Johnson et al., 2017; Mackay et al., 2017; Schwartzenuber et al., 2012b; Wu et al., 2014). L'implication des facteurs HIF a également été mise en évidence dans d'autres cancers pédiatriques comme l'ostéosarcome (Pierrevelcin et al., 2020).

Des travaux publiés par notre équipe en 2017 constituent l'une des premières études consacrées spécifiquement aux rôles des facteurs HIF dans les DIPG/DMG. Ils ont pu démontrer une forte activation de la voie mTOR/HIF-1 α /HIF-2 α associée à une surexpression de gènes impliqués dans les voies de l'hypoxie tels que RAS, MAPK, AKT, VEGFA ou VHL. Par ailleurs, les lignées tumorales montraient une accumulation de lactate en hypoxie, corrélée à une activation constante de la glycolyse, ainsi que la glutaminolyse (Blandin et al., 2017; Nguyen et al., 2017). Une autre étude souligne la même implication des voies de la glycolyse associée à une expression différentielle des facteurs HIF dans des lignées de DIPG (Waker et al., 2017). Plus récemment, de nouveaux résultats dans l'épendynome pédiatrique de la fosse postérieure suggèrent que reprogrammation métabolique et notamment la glutaminolyse de ces tumeurs en réponse à l'hypoxie impacte l'épigénome des histones et favorise l'hypométhylation de H3K27, reflétant des anomalies épigénétiques caractéristiques des GHG pédiatriques de la ligne médiane. L'accumulation d' α -kétoglutarate issu de la glutaminolyse favoriserait notamment la déméthylation des histones par les complexes KDM (cf II.4.1.1) (Englinger et al., 2020; Michealraj et al., 2020). Ces différents résultats renforcent les arguments en faveur d'une implication des facteurs HIF dans la progression tumorale des GHG pédiatriques, d'autant plus que l'hypoxie et les facteurs HIF peuvent être corrélés à un mauvais pronostic.

III.5.2. Impact pronostic des facteurs HIF

La surexpression des facteurs HIF est caractéristique des tumeurs solides et est souvent corrélée à un mauvais pronostic pour les patients (Keith et al., 2011) (Tableau 6). L'hypoxie et l'expression des facteurs HIF est associée à une faible survie dans différents cancers, parmi lesquels le neuroblastome (Das et al., 2005), l'oligodendrogliome (Birner et al., 2001a), l'ostéosarcome (Mizobuchi et al., 2008; Pierrevelcin et al., 2020), le cancer de l'ovaire (Birner et al., 2001b) ou le cancer du sein (Kronblad et al., 2006).

A ce jour, les données cliniques concernant l'impact pronostique des facteurs HIF dans les GHG pédiatriques sont très limitées. En 2018, notre équipe de recherche a pu montrer une corrélation prédictive des marqueurs hypoxiques, métaboliques et en imagerie avec les résultats des patients. La diminution du coefficient ADC, témoignant d'une plus forte cellularité et donc d'une hypoxie tumorale plus prononcée, était corrélée à de pires évolutions pour le patient et une association significative a pu être effectuée avec l'expression de HIF-2 α . De son côté, HIF-1 α a été corrélé au coefficient ADC et à la glutaminolyse (Entz-Werle et al., 2018). Les marqueurs hypoxiques ont également été corrélés à une mauvaise survie dans l'épendynome léthale infantile (Michealraj et al., 2020).

Ces données préliminaires rejoignent les résultats obtenus chez l'adulte. De par son expression ubiquitaire, HIF-1 α a longtemps été considéré comme le principal médiateur de l'hypoxie. Néanmoins, de plus récentes études suggèrent que HIF-2 α serait particulièrement

Cancer type	HIF1 α	HIF2 α	Cancer type	HIF1 α	HIF2 α
Astrocytoma	+	+	Lung (NSCLC)	+	+
Bladder	+	ND	Lung (NSCLC)	+	ND
Breast	+	+	Lung (NSCLC)	NC	+
Cervical	+	+ ^a	Melanoma	+	+
Colorectal	+	+	Neuroblastoma	FP	+
Gastric	+	NC	Ovarian	+	ND
Gastric	+	ND	Ovarian	+	+ ^d
GIST	+	ND	Pancreatic	+	ND
Glioblastoma	ND	+	Prostate	+	+ ^d
Glioma	NC ^b	+ ^b	Renal	FP	ND
Head/neck	+	+	Renal	+	ND
Hepatocellular	ND	+			

Tableau 6 : Corrélations observées entre les expressions des HIF- α et l'aggravation du pronostic dans différents cancers (Keith et al, 2011)

impliqué dans les tumeurs cérébrales de haut-grade. HIF-2 α seul et non HIF-1 α est inversement corrélé à la survie des patients dans le GBM adulte (Keith et al., 2011; Li et al., 2009b; Renfrow et al., 2018) (Tableau 6).

III.5.3. Implications thérapeutiques des facteurs HIF

III.5.3.1. Rôle de l'hypoxie dans la résistance aux traitements

Les différents mécanismes modulés par les facteurs HIF et décrits jusqu'ici contribuent à la résistance des cellules tumorales hypoxiques aux traitements conventionnels : reprogrammation métabolique, dérégulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, activation de l'angiogenèse. Les mécanismes de résistance peuvent varier selon le type de traitement, les mécanismes moléculaires sous-jacents ou le type cellulaire. Encore une fois, très peu de données existent sur ces aspects dans les GHG pédiatriques.

- *L'hypoxie et la radiorésistance des tumeurs*

L'hypoxie tumorale est couramment associée à une radiorésistance des tumeurs (Boulefour et al., 2021). Dès les années 1930, Mottram, Crabtree et Cramer ont montré que les cellules étaient bien plus sensibles aux rayons X en présence d'O₂. Cela se traduit par une augmentation de l'OER (Oxygen enhancement ratio), un rapport de doses de rayonnement à délivrer en hypoxie/air ambiant pour atteindre le même effet biologique (Crabtree et al., 1933). Dans les zones hypoxiques, la quantité de rayonnements ionisants nécessaires serait 2 à 3 fois plus élevée que dans des zones normoxiques. Les tumeurs hypoxiques sont par définition plus résistantes à la radiothérapie en raison de l'absence d'O₂. Les rayonnements peuvent induire des effets directs sur les cellules tumorales via des cassures double-brins, mais les effets indirects via l'hydrolyse de l'eau sont plus faibles en raison de la formation limitée de ROS (Brown and Wilson, 2004). Par ailleurs, ces ROS sont également sous la modulation des facteurs HIF (cf III 3.3.2).

Cette radiorésistance des cellules en hypoxie peut aussi être associée à l'activation par HIF des voies de réparation de l'ADN. Les facteurs HIF sont capables de réguler à la hausse l'ADN-PK (protéine kinase ADN-dépendante) et des protéines du BER dans les cellules hypoxiques (Um et al., 2004). Une récente étude issue de notre équipe a mis en évidence des altérations des voies de réparation de l'ADN dans les GHG pédiatriques. Elles se traduisent notamment par une surexpression de PARP1, corrélée à une radiorésistance des tumeurs mais aucun lien direct avec les facteurs HIF n'a été investigué dans le cadre de cette étude (Entz-Werlé et al., 2021).

- *L'hypoxie et la résistance aux chimiothérapies*

De manière générale, la résistance des tumeurs hypoxiques aux chimiothérapies peut être associée au microenvironnement tumoral, notamment l'hypoperfusion sanguine de ces tumeurs qui limite la diffusion du composé au sein de la masse tumorale (Zlotecki et al., 1995). Par ailleurs, les cellules tumorales et endothéliales sont dotées d'un système de transporteurs membranaires capables de refluer les molécules à l'extérieur de la tumeur. On peut notamment citer les transporteurs ABC, qui sont particulièrement présents au niveau de la BHE (cf Figure 8). Or, HIF-1 α est capable d'activer des gènes de la famille de ces transporteurs ABC : MDR1 (multidrug resistance-1) et MRP1 (multidrug-resistance-associated protein). Comme leurs noms l'indiquent, ces gènes ont été associés à des phénomènes de résistance à diverses chimiothérapies comme les vinca-alkaloides et les anthracyclines (MDR1) ou l'irinotecan et l'étoposide (MRP1) (Chen et al., 2009; Liu et al., 2008; Zhu et al., 2005).

- *L'hypoxie et la résistance aux thérapies ciblées*

L'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR est récurrente au cours de l'adaptation des tumeurs à l'hypoxie, dans laquelle mTOR est régulé à la hausse pour stabiliser HIF-1 α (cf). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que des tumeurs comme les GHG, les neuroblastomes ou les ostéosarcomes sont sensibles à l'inhibition de mTOR (Georger et al., 2012; Gore et al., 2013; Houghton et al., 2008; Land and Tee, 2007). L'inhibition de mTOR est ainsi devenue une nouvelle stratégie thérapeutique, combinée ou non à la chimiothérapie dans le traitement de ces cancers. Néanmoins, les résultats, bien que prometteurs, ont mis en évidence une boucle de rétroaction capable de réactiver mTOR via la voie Ras/MAPK et entraînant une résistance aux traitements (Butler et al., 2017; Zitzmann et al., 2010).

Des travaux pré-cliniques au sein de notre équipe ont montré une activation similaire de la voie RAS/MAPK dans des lignées de GHG pédiatriques, à l'origine de la résistance à l'inhibition de la voie mTOR/HIF (protocole RAPIRI). Cette résistance était notamment observée dans des cellules surexprimant la voie EPAS1/HIF-2 α (Nguyen et al., 2017).

En 2020, notre équipe a publié les premiers résultats d'une étude de phase I, consacrée à l'inhibition de la voie mTOR/HIF1 chez des patients atteints de tumeurs cérébrales malignes et de sarcomes (SFCE-RAPIRI) (Jannier et al., 2020a). 45% des patients ont montré un arrêt de l'évolution de la maladie à 8 semaines de traitements et 35,5% à 16 semaines en réponse au traitement. De plus, parmi tous les biomarqueurs, l'hyperexpression de HIF-2 α était corrélée avec une progression tumorale en dépit de l'inhibition de mTOR/HIF-1 α . En parallèle, les taux

de VEGF-D diminuaient chez les répondeurs partiels et augmentaient dans les profils d'une maladie progressive.

Ces résultats suggèrent une implication thérapeutique de HIF-2 α dans la résistance au traitement ciblant la voie mTOR/HIF-1 α et en fait un facteur potentiel de mauvais pronostic dans les GHG pédiatriques. L'implication apparente des facteurs HIF dans l'adaptation tumorale à l'hypoxie et la résistance aux traitements des GHG pédiatriques conduisent inexorablement à leur ciblage pharmacologique dans la lutte contre ces tumeurs.

III.5.4. Ciblage moléculaire des facteurs HIF

Les facteurs HIF font l'objet de multiples ciblages pharmacologiques dans le but de bloquer l'adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie. Certains inhibiteurs ont été spécifiquement développés mais la plupart résultent d'un repositionnement de médicaments. Il peut s'agir d'un ciblage direct en agissant sur la transcription, la traduction, la dégradation/stabilisation ou la dimérisation des sous-unités HIF (Figure 53). Ce ciblage peut aussi être indirect en inhibant notamment des voies de signalisation, parmi lesquelles la voie PI3K/AKT/mTOR constitue une cible récurrente. La réactivation de mTOR en réponse à l'inhibition mTOR/HIF-1 α souligne une certaine addiction oncogénique des cellules tumorales à cette voie dans leur adaptation à l'hypoxie. Elle contrôle notamment la traduction de l'ARNm des facteurs HIF.

Le choix de ces inhibiteurs dépend du mode d'action recherché et peut aboutir à une inhibition plus ou moins spécifique de l'une et/ou l'autre des sous-unités HIF- α (voir la review de (Wigerup et al., 2016).

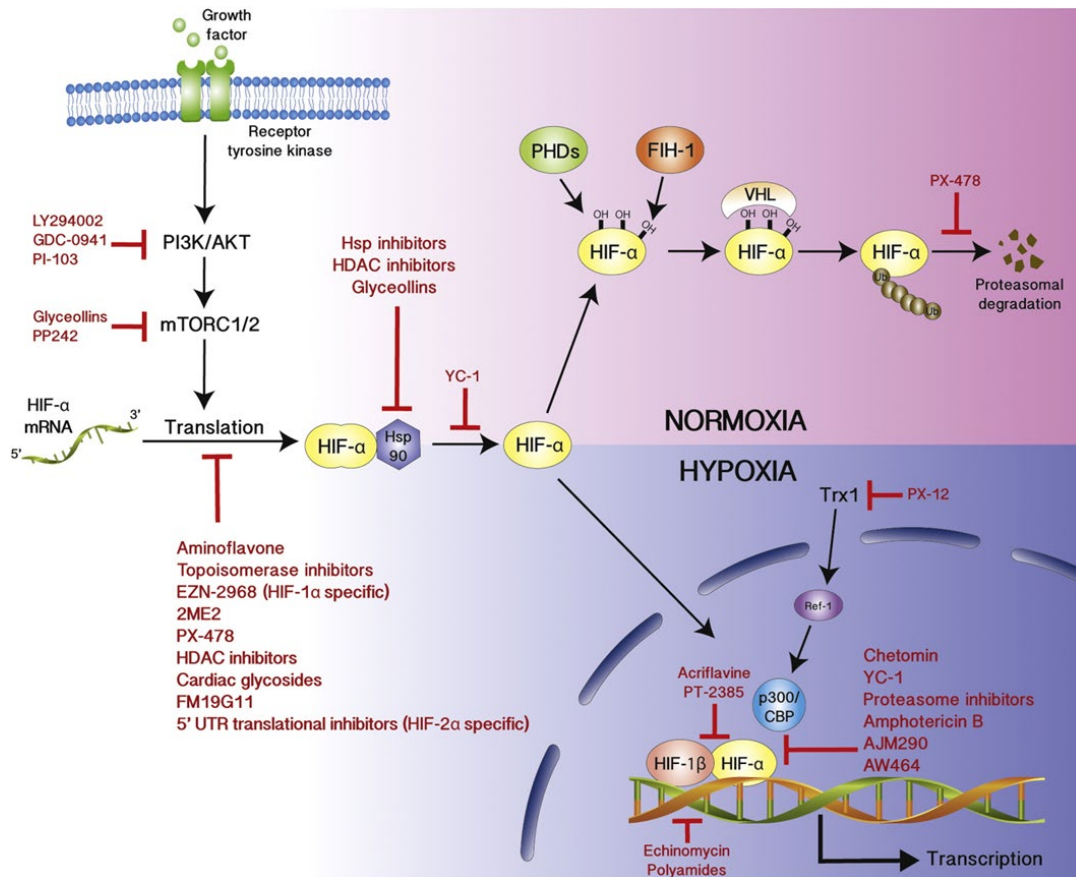


Figure 53 : Mode d'action des inhibiteurs des HIF- α à différentes étapes de la voie de régulation hypoxique (Wigerup et al, 2016)

III.5.4.1. L'inhibition de HIF-1 α

Par son expression ubiquitaire et son omniprésence dans les régulations hypoxiques, HIF-1 α est considéré comme le premier médiateur de l'hypoxie et concentre l'essentiel des inhibiteurs HIF développés à ce jour (Semenza, 2003) (Figure 53). Parmi eux, on trouve des inhibiteurs de la topoisomérase I (TOP I) (irinotecan, topotecan, camptothecin) (Guérin et al., 2012; Rapisarda et al., 2002) ou des agents intercalants (inomycine, daunorubicine, doxorubicine) (Lee et al., 2009). D'autres composés agissent sur la voie PI3K/mTOR qui est suractivée dans les GHG et module HIF-1 α à travers MTORC1 (Majumder et al., 2004; Thomas et al., 2006). Des inhibiteurs des récepteurs RTK (herceptine, Gleevec, erlotinib, gefinitib) ou de mTOR (rapamycine, temsirolimus, everolimus) ont montré une capacité à bloquer l'activité de HIF-1 α .

Dans notre équipe, un travail antérieur basé sur les cancers du côlon a montré une forte inhibition de HIF-1 α en réponse à l'irinotecan dans des microenvironnements tumoraux où les

taux d'O₂ varient de 5 à 1% (Guérin et al., 2012; Pencreach et al., 2009). Il est un parfait exemple d'un repositionnement de drogue en vue d'inhiber HIF-1 α . Cet inhibiteur de la topoisomérase I, initialement destiné à endommager l'ADN tumoral, inhibe la traduction de l'ARNm de HIF-1 α et diminue les taux de protéines et les gènes cibles de HIF-1 α dans des xénogreffes de côlon (Figure 51). Dans le cadre du protocole RAPIRI, le ciblage de mTOR/HIF-1 α par la combinaison de l'irinotecan et de la rapamycine (inhibiteur de mTor) ont montré un effet antiprolifératif sur des lignées de GHG et une diminution des expressions HIF-1 α et mTORC1. Ce même traitement a montré une diminution de la croissance tumorale chez les patients pédiatriques (Jannier et al., 2020b). Néanmoins, les résistances aux traitements rencontrées dans ces études et corrélées à l'expression de HIF-2 α suggèrent une inhibition additionnelle de la sous-unité HIF-2 α .

III.5.4.2. L'inhibition de HIF-2 α

L'inhibition de HIF-2 α a finalement suscité un intérêt grandissant au fur et à mesure que les études centrées sur HIF-1 α ont montré certaines limites thérapeutiques. Dans les GHG, la valeur pronostique de HIF-2 α discutée précédemment renforce encore davantage l'intérêt d'une inhibition de cette sous-unité. Des études en spectrométrie à résonance magnétique et en cristallographie initiées dans les années 2000 ont identifié une cavité singulière de 290Å³ dans le domaine PAS-B de HIF-2 α , que ne possèdent pas HIF-1 α et HIF-3 α (Scheuermann et al., 2013a). Cette découverte a donné naissance à différentes molécules : les composés nommés « Compound 2 » et « Compound 37 » (Scheuermann et al., 2013b) ainsi que les composés de type PT2385 (Wallace et al., 2016) et ses dérivés de nouvelles générations PT2399 (Chen et al., 2016) ou PT2977 (commercialisé sous le terme de belzutifan) (Xu et al., 2019). Ces molécules sont capables de se fixer de manière spécifique au domaine PAS B de la sous-unité HIF-2 α , ce qui empêche sa dimérisation avec HIF1- β (ou ARNT) et bloque l'activité transcriptionnelle de HIF-2 α (Figures 51 et 52). Les composés de type PT2385 sont donc des inhibiteurs directs et spécifiques de HIF-2 α et ne se lient pas à HIF-1 α ou HIF-3 α (Scheuermann et al., 2013a, 2015), ce qui représente un avantage sélectif majeur.

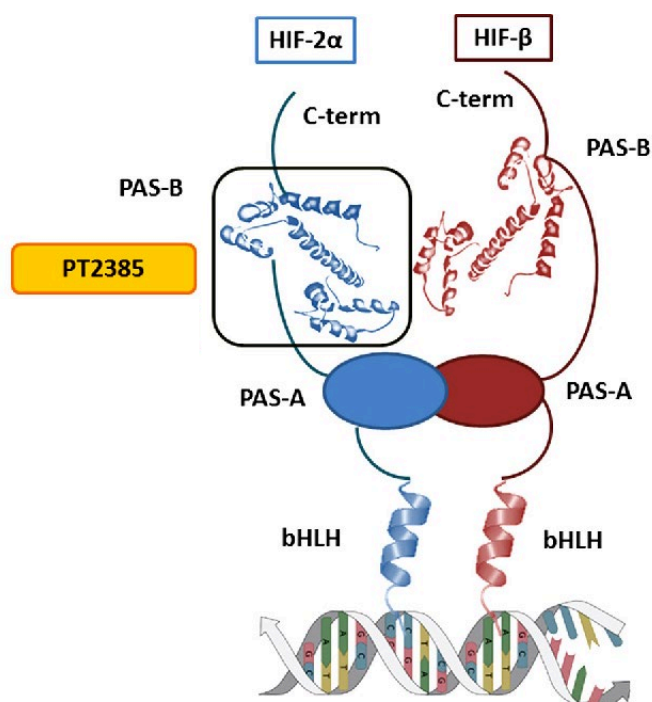


Figure 54 : Structure moléculaire du complexe hétérodimérique HIF-2 α /HIF-1 β et site de liaison des molécules de type PT2385. (Martinez-Saez et al, 2017)

Deux inhibiteurs de ce type ont pu être testés au sein de notre équipe : le PT2385 et le PT2977. Les résultats préliminaires obtenus dans le cadre de cette thèse (non publiés) nous ont amené à privilégier le PT2385 car ce dernier montrait notamment une meilleure solubilité et une inhibition fonctionnelle plus prononcée de HIF-2 α et de ses gènes cibles. De plus, ce composé reste à ce jour l’inhibiteur de HIF-2 α le mieux documenté et a fait l’objet de différentes études, dont des approches cliniques, en particulier dans les carcinomes des cellules rénales (Chen et al., 2016; Cho and Kaelin, 2016; Courtney et al., 2018; Wallace, 2016), le neuroblastome et plus récemment dans le GBM (Renfrow et al., 2020). Les approches cliniques ont montré qu’il est bien toléré par les patients. Les résultats obtenus à ce jour confirment qu’il inhibe les cibles en aval de HIF-2 α et permet de réduire la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* dans les tumeurs où HIF-2 α est surexprimé. Dans des modèles de souris développant des GBM dérivés de patients, les traitements de PT2385 augmentent la survie des animaux par rapport aux placebos (Renfrow et al., 2020). Ces études se rejoignent également sur le fait que l’inhibition de HIF-2 α seule n’a aucun impact sur la prolifération et la migration cellulaire *in vitro*. Ce phénomène soulève la question d’une activité compensatoire de HIF-1 α et de la complémentarité entre les deux sous-unités HIF (Kondo et al., 2003; Ratcliffe, 2007). Cependant, d’autres travaux sur le neuroblastome n’ont montré aucun effet bénéfique de

l'inhibition de HIF-2 α par le PT-2385, aussi bien sur la transcription des gènes cibles que sur la prolifération cellulaire ou la réponse aux traitements (Persson et al., 2020).

A ce jour, aucune étude n'a évalué l'effet d'une inhibition de HIF-2 α par le PT2385 dans des GHG pédiatriques.

Les caractérisations moléculaires des GHG pédiatriques ont fourni de précieuses informations sur les principaux moteurs oncogéniques intrinsèques de ces tumeurs. Un certain nombre d'éléments commencent également à souligner un impact du microenvironnement hypoxique sur la progression tumorale des GHG pédiatriques et le ciblage des facteurs HIF pourrait alors constituer une nouvelle approche thérapeutique d'intérêt. Cependant, l'inhibition de HIF-2 α par des composés de type PT2385 dans des GHG pédiatriques n'a jamais été réalisée et nécessite la mise au point de modèles d'étude pré-cliniques *in vitro* qui reconstituent au mieux l'hétérogénéité biologique de ces tumeurs et leurs facteurs micro-environnementaux. Ces modèles d'études *in vitro* représentent une étape incontournable et visent à caractériser les conséquences biologiques de cette inhibition et d'optimiser les traitements avant d'envisager une potentielle application *in vivo* coûteuse et éthiquement sensible. L'approche exploratoire de l'inhibition de HIF-2 α dans des GHG pédiatriques réalisée dans le cadre de cette thèse a été uniquement développée dans des modèles *in vitro*. Ainsi, cette dernière partie récapitulera brièvement les différents modèles *in vitro* développés à ce jour dans la modélisation du microenvironnement du cerveau et des tumeurs cérébrales. Pour davantage d'informations sur les modèles *in vivo* utilisés dans les GHG pédiatriques, la récente revue de Li et Langhaus peut être consultée en parallèle (Li and Langhans, 2021).

IV. LES MODELES D'ETUDES IN-VITRO DES GHG

Les modèles d'étude *in vitro* se basent sur la culture de lignées cellulaires dérivées à partir de tumeurs. Ils permettent d'en explorer des mécanismes moléculaires en reconstituant des aspects mécanistiques clés des tumeurs, au sein d'un contexte expérimental défini et contrôlé par l'expérimentateur. La variation artificielle des paramètres expérimentaux permet d'obtenir des résultats précis, reproductibles et statistiquement fiables.

IV.1. Les lignées de cellules cancéreuses en culture 2D

A l'instar de l'adulte, des lignées de GHG pédiatriques commerciales ont été développées et mises à disposition de la communauté scientifique. Toutefois, ces lignées dérivées de GHG pédiatriques se sont longtemps limitées à des tumeurs hémisphériques, la faute à un manque de matériel biologique dans les DIPG/DMG (Brabetz et al., 2018; Xu et al., 2015b). Trois lignées commerciales ont été particulièrement utilisées : KNS42 et SF188, dérivées de glioblastomes hémisphériques de patients de 16 et 8 ans (Takeshita et al., 1987) et UW479, dérivée d'un astrocytome anaplasique d'un enfant de 13 ans (Nguyen et al., 2017). Elles sont cultivées en monocouches, dans un milieu supplémenté en sérum (condition 2D). Cependant, l'amplification continue des lignées commerciales sur plusieurs décennies aboutit à une sélection clonale et une dérive génétique au fil des passages. Par conséquent, les propriétés moléculaires des cellules tumorales peuvent varier et le comportement biologique ne sera finalement plus représentatif de celui de la tumeur originelle (Clark et al., 2010). Les lignées commerciales constituent donc un modèle limité pour l'étude *in vitro* des tumeurs.

Sur ce point, une première avancée a été rendue possible par la systématisation progressive des biopsies exploratoires dans les DIPG/DMG. Elles ont permis de développer de lignées primaires directement dérivées de la tumeur du patient (PDCL = Patient derived cell line). Ces PDCLs conservent les caractéristiques histomoléculaires de la tumeur (exemple de la mutation *driver* H3K27M) tout en reconstituant l'hétérogénéité tumorale interindividuelle, ouvrant la voie à une médecine personnalisée (Blandin et al., 2019; He et al., 2021). Une centaine de PDCLs ont été dérivées au sein de notre laboratoire, comprenant notamment les lignées BT35, BT68, BT69 et BT83, qui conservent les mutations H3K27M ont été utilisées dans le cadre de cette thèse (Blandin et al., 2019) (Tableau 7). Le développement de ces lignées s'inscrit notamment dans le programme PEDIAMODECAN et plus particulièrement PEDIAGLIO, visant à développer des modèles d'études précliniques de gliomes pédiatriques.

Patients	BT35	BT69	BT68	BT83
Sample Location	Relapse Thalamic	Relapse Thalamic	Diagnosis Pons	Diagnosis Pons
Age (years)	18	14	9	13
Diagnosis	HGG	HGG	DIPG	DIPG
1st line therapy	Stupp protocol	Stupp protocol	RT + cilengitide	RT + dasatinib
2nd line therapy	RT + Iri/Beva	RAPIRI protocol	No treatment	RAPIRI protocol
Survival (months)	12	17	10	9

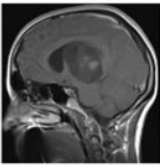
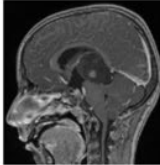
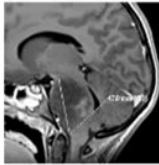
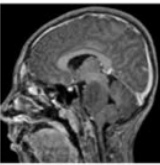
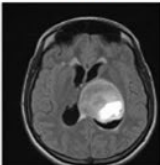
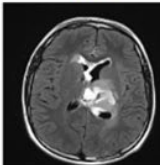
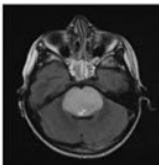
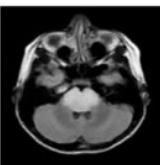
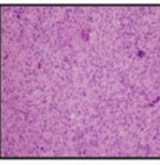
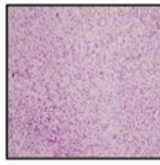
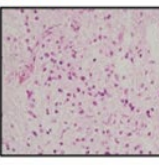
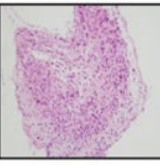
	Imaging			
Contrast-enhanced T1-weighted MRI				
ADC (mm ² /s)	1047	1029	945	1068
T2-weighted FLAIR MRI				
	Histology (diagnosis)			
H&E				
IHC				
Ki67 (%)	50–80	20–25	15	10–15
GFAP	pos	pos	pos	pos
p53	pos	neg	pos	pos
EGFR	neg	pos	pos	pos
PTEN	pos	pos	NA	pos
HIF-1 α (%)	20	50	50	20
Olig2 (%)	70	100	10	50
Olig2 (%) at relapse	30	50	NA	NA

Tableau 7: Caractéristiques cliniques des GHG pédiatriques mutés H3.3K27M et utilisés pour la dérivation des PDCLs de cette thèse (Blandin et al, 2019)

Là encore, la culture en monocouche (2D) des PDCLs se heurte aux mêmes risques de dérive génétique au fil des passages. De plus, ce sont des populations homogènes qui ne peuvent pas pleinement reconstituer l'hétérogénéité tumorale, ni les facteurs environnementaux. L'avènement de la culture des sphéroïdes a pu compenser certaines limites des cultures 2D conventionnelles.

IV.2. Les modèles 3D de type sphéroïde

IV.2.1. Les neurosphères

Les neurosphères sont les modèles 3D *in vitro* de type sphéroïdes les plus courants dans la recherche sur les gliomes (Ruiz-Garcia et al., 2020). Ils se développent à partir de la prolifération et de l'expansion clonale d'une CSC (Fennema et al., 2013; Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2003). Ces cellules sont usuellement cultivées dans un milieu de faible adhérence et dépourvu de sérum. Plusieurs tumeurs cérébrales pédiatriques, et notamment des DIPG, ont été cultivées avec succès en neurosphères (Monje et al., 2011; Welby et al., 2019), y compris au sein de notre équipe (Blandin et al., 2019).

IV.2.2. Les sphéroïdes tumoraux multicellulaires (MCTS)

Les MCTS utilisent les capacités d'agrégation et de compaction de différentes cellules souches tumorales en suspension (Tung et al., 2011), qui forment des sphéroïdes. Ces MCTS sont apparues dans la recherche sur les gliomes en 1989 avec les travaux de Mashimaya et al (Mashiyama et al., 1989). Ils peuvent dépendre ou non de la présence d'une structure d'ancrage.

Les MCTS standards se forment en suspension dans le milieu. Ils sont couramment obtenus par la méthode de la goutte suspendue (ou gouttelette inversée) où les cellules s'agrègent et forment des sphéroïdes par gravité. Cette méthode est peu coûteuse et peut atteindre une efficacité de près de 100% (Blandin et al., 2019; Kelm et al., 2003). Ces modèles permettent d'étudier notamment les interactions cellule-cellule au cours du développement des tumeurs. Cependant, l'absence de matrice extracellulaire ne permet pas d'étudier les interactions cellules-hôte, qui sont un facteur clé dans les pathologies tumorales.

IV.2.3. Les modèles 3D avec matrice extracellulaire

Dans ces modèles, les cellules ou les sphéroïdes sont encapsulées (= « matrice *with scaffold* ») dans des biomatériaux qui imitent la composition et les propriétés physiques de la MEC. Les hydrogels sont les structures les plus courantes ; ils forment un réseau de polymères réticulés hydrophiles et poreux, qui fournit un environnement biomimétique 3D. Il récapitule ainsi des fonctions de soutien de la survie, de la croissance et de la différenciation cellulaires assurée par la MEC cérébrale.

Les hydrogels naturels les plus couramment utilisés sont le collagène I et le Matrigel, majoritairement constitué d'un mélange de collagène et de laminine. Néanmoins, leur composition n'est pas bien adaptée à celle de la MEC cérébrale (Caragher et al., 2019). Des hydrogels synthétiques tels que le polyéthylène glycol (PEG), complété en acide

hyaluronique (HA), sont souvent privilégiés pour imiter la MEC du cerveau et ont permis de cultiver des lignées issues de GBM (Wang et al., 2014). Néanmoins, le microenvironnement tumoral des gliomes possède un MEC plus riche en collagène que la normale et les structures à base de collagène ont aussi été utilisées avec succès (Lv et al., 2016). Un autre hydrogel synthétique nommé MAX8- β a permis la culture de lignées issues de médulloblastomes pédiatriques (Worthington et al., 2017).

Ces hydrogels souples ont été conjugués à des structures solides à base de protéine en fibroïne de soie et ont permis de distinguer des zones d'ancrage des somas des neurones (zone solide) et de croissance et connectivité axonale (zone souple) (Chwalek et al., 2015). Plus récemment, cette approche a été utilisée pour la culture de différents types de tumeurs cérébrales pédiatriques (Sood et al., 2019; Tang-Schomer et al., 2022).

Globalement, les modèles de type sphéroïde avec ou sans matrice sont capables de maintenir la pluripotence des CSCs et reconstituent des interactions cellules-cellules et/ou cellules-MEC. Selon leur taille, ces sphéroïdes peuvent également présenter des gradients d'O₂ et de nutriments comparables à ceux des tumeurs solides, avec un centre nécrotique, une couche intermédiaire quiescente et une couche cellulaire périphérique proliférative (Blandin et al., 2019; Hirschhaeuser et al., 2010; Mehta et al., 2012). Ces modèles se rapprochent davantage de l'architecture tissulaire *in vivo*, favorisant des réponses physiologiques plus réalistes que les cultures 2D (Fennema et al., 2013; Hirschhaeuser et al., 2010; Weiswald et al., 2015)

Néanmoins, l'hétérogénéité cellulaire de ces sphéroïdes ainsi formés est souvent limitée et ces derniers montrent un profil particulièrement enrichi en CSCs, alors que ces cellules souches représentent une proportion très limitée dans les tumeurs. Sur ce point, les organoïdes cérébraux reconstituent un microenvironnement cellulaire bien plus varié et complet.

IV.2. Les organoïdes cérébraux

Les organoïdes cérébraux sont une technologie émergente pour l'étude des tumeurs cérébrales pédiatriques. Ils sont généralement développés avec des cellules souches embryonnaires (ESC) ou des cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) (Lancaster and Knoblich, 2014; Lancaster et al., 2013; Tuveson and Clevers, 2019). Ces cellules sont capables de récapituler l'histoarchitecture, la composition cellulaire et les aspects physiologiques du tissu primaire mature duquel elles ont été dérivées grâce à leur capacité à s'auto-renouveler et à se différencier.

Les travaux novateurs publiés par Lancaster et al (2013) ont révolutionné les approches *in vitro* dans le contexte cérébral. Pour la première fois, ils sont parvenus à reconstituer artificiellement des organoïdes cérébraux, sous la forme de cerveaux miniatures communément appelés « *mini-brains* » (Figure 55). Ces modèles offrent une modélisation bien plus complète du microenvironnement cellulaire cérébral et sont capables de reconstituer l'architecture et l'interconnectivité de différentes régions du cerveau. Ils montraient notamment un cortex cérébral avec des cellules progénitrices qui s'auto-organisent dans l'espace et se différencient en neurones corticaux matures (Lancaster and Knoblich, 2014). Ces organoïdes cérébraux ont ensuite pu être utilisés à travers diverses applications permettant de reconstituer le développement de GHG et sont de nouveaux outils incontournables en recherche fondamentale (Figure 56).

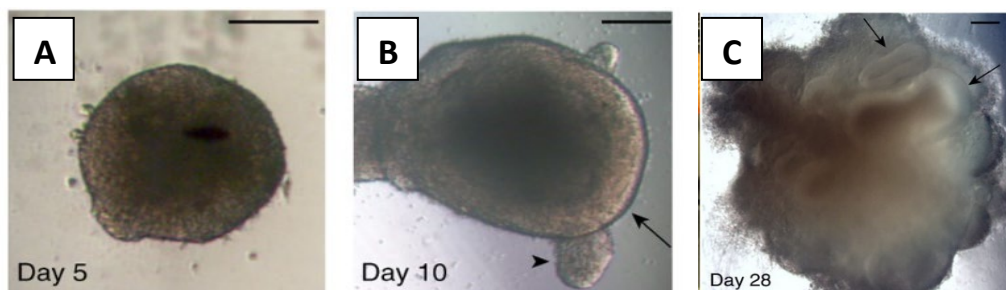


Figure 55: Progression du développement d'un organoïde cérébral à partir de cellules souches pluripotentes humaines. (A) Au 5^{ème} jour, le corps embryotaire montre des signes de différenciation ectodermique avec la présence de tissu clair. La surface lisse indique que le tissu est sain. (B) Au 10^{ème} jour, l'organoïde précoce montre de petits bourgeonnements de tissu ectodermiques. (C) Au bout du 28^{ème} jour, l'organoïde montre de grands tissus neuronaux (flèches) qui se développent une fois intégrés dans le Matrigel. Barre d'échelle = 200 µm (Lancaster et al, 2013)

Des *mini-brains* de ce type ont été génétiquement modifiés via la technologie CRIPR/Cas9 pour introduire des mutations oncogéniques, qui ont abouti à la formation de gliomes avec des altérations moléculaires typiques des GHG (par exemple TP53, protéine Ras, MYC, CDKN2A, EGFR, PTEN) (Ballabio et al., 2020; Bian et al., 2018; Ogawa et al., 2018). Plus récemment, une étude a modélisé des caractéristiques *in vivo* du médulloblastome dans des organoïdes de type cérébelleux (Ballabio et al., 2020). D'autres études ont pu développer des GHG dans des organoïdes sains après y avoir injecté des CSC ou des sphéroïdes issues de GBM (Linkous et al., 2019; Ogawa et al., 2018). Ces modèles permettent d'étudier l'interaction entre les tissus sains et la tumeur. Enfin, des organoïdes de glioblastomes ont pu être directement dérivés à partir d'échantillons de tumeurs cérébrales de patients et permettent de

reconstituer la cytoarchitecture tumorale. Ces organoïdes dérivés de GBM (GBO) récapitulent finalement les caractéristiques histologiques, la diversité cellulaire, l'expression des gènes et les profils mutationnels de leur tumeurs parentales. Ils présentent de plus un gradient hypoxique et une hétérogénéité tumorale régionale (Hubert et al., 2016; Jacob et al., 2020).

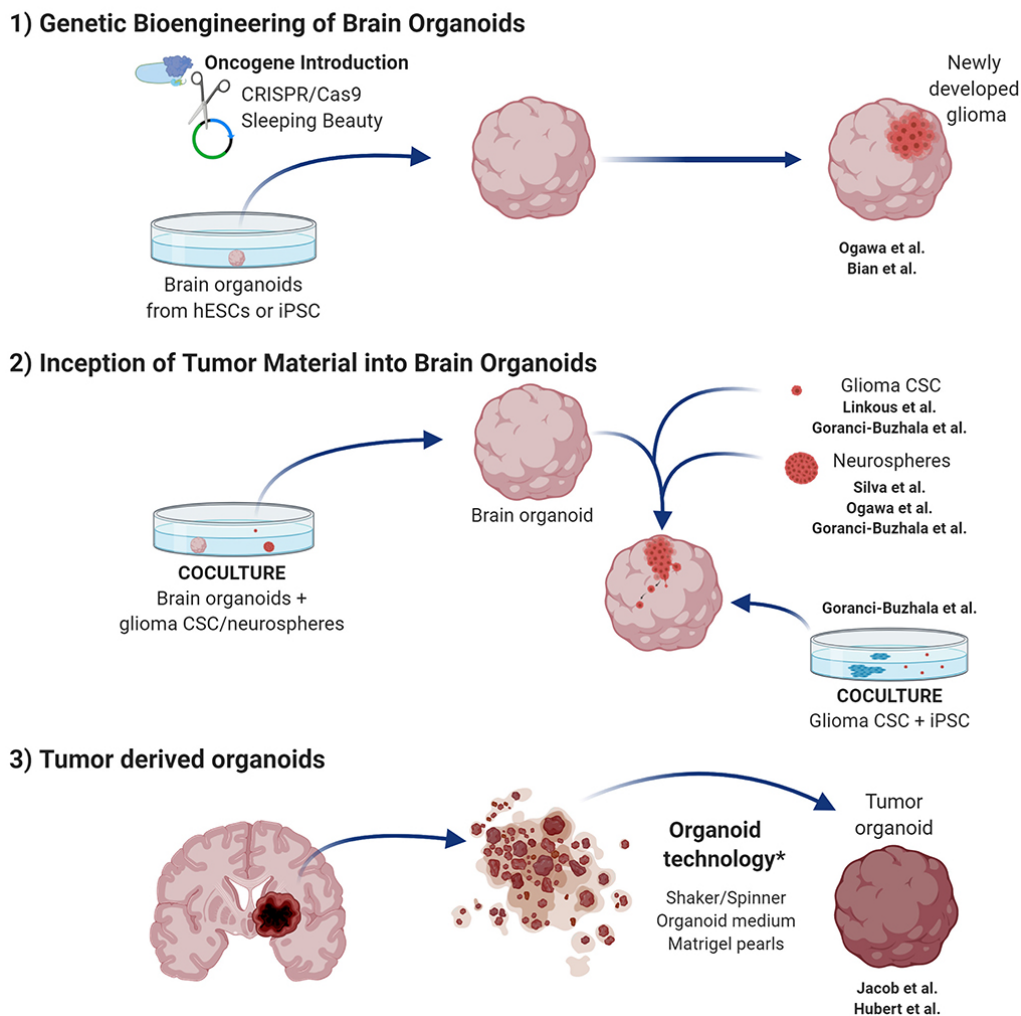


Figure 56 : Principes de développement de différents organoïdes de gliomes. (1) Organoïdes génétiquement modifiés. (2) Transfert de matériel tumoral dans un organoïde sain. (3) Organoïdes directement dérivés d'un échantillon tumoral de patient. (Ruiz-Garcia et al, 2020)

Les organoïdes semblent capables de reconstituer les structures cérébrales avec une distribution cellulaire et des caractéristiques génétiques et phénotypiques préservées. Ils représentent un modèle précieux pour mieux comprendre l'initiation et la progression tumorales et prédire la réponse aux traitements. Cependant, ces modèles sont souvent dépourvus de vaisseaux sanguins, ce qui les rend incompatibles avec les traitements ciblant l'angiogenèse et omettent le rôle de la BHE. De plus, bien que la présence des gradients d'O₂ et d'un noyau

nécrotique permettent d'étudier l'impact de l'hypoxie, ils limitent en même temps la longévité de la culture. Pour pallier à ce point, des dispositifs microfluidiques ont été incorporés.

IV.3. Les dispositifs microfluidiques

Les modèles de cerveau basés sur la microfluidique (= « brain-on-a-chip ») ont été développés pour reconstituer plus fidèlement l'aspect dynamique du cerveau. Ils peuvent intégrer des unités fonctionnelles au sein de constructions tissulaires simplifiées pour mieux prédire la réponse physiologique à l'échelle d'un organe. Ils permettent de mimer des flux permettant un apport régulier d'O₂ et de nutriments et l'élimination des déchets. La plupart de ces dispositifs sont fabriqués en polydiméthylsiloxane (PDMS), un composant biocompatible et optiquement transparent, capable d'absorber et d'adsorber des molécules chimiques et qui peut être coaté avec des composants de la MEC. Ils sont globalement catégorisés en différents types selon le phénomène étudié.

IV.3.1. Les dispositifs de type « *neurons-on-a-chip* »

Ces dispositifs présentent des cultures cellulaires compartimentées et des microcanaux, inspirés des chambres de Campenot (Campenot, 1977) (Figure 57A). Ils permettent notamment de séparer le soma, l'axone et les dendrites des neurones et de maintenir un isolement des fluides. Ces différentes parties des neurones peuvent ainsi être traitées avec divers composés. A travers ce dispositifs, des études se sont intéressées à la dynamique des axones et des dendrites sous l'effet de facteurs modulateurs (Hengst et al., 2009) ou aux différentes étapes de la myélinisation axonale (Kerman et al., 2015). Il peut être également couplé à une matrice de microélectrodes (MEA) pour enregistrer l'activité électrique physiologique du réseau de neurones ou en réponse à des traitements. Au sein de notre équipe, cette approche a permis de montrer pour la première fois l'impact de lignées tumorales issues de GHG pédiatriques sur l'activité électrique extracellulaire d'un réseau de neurones glutamatergiques (Fuchs et al., 2021).

IV.3.2. Les dispositifs multicellulaires stratifiés

Un dispositif microfluidique plus complexe a été développé avec une stratification de microcanaux organisés en couches et séparés par une membrane poreuse, à la manière d'un modèle Transwell (Figure 57B) (Booth and Kim, 2012). Ce type d'approche est particulièrement utile pour imiter et étudier l'implication de la BHE. Il reconstitue non seulement sa structure, mais y ajoute surtout la dimension dynamique, à travers le maintien d'un flux continu de part et d'autre de la membrane, imitant le flux sanguin. Un modèle

microfluidique a été établi pour étudier l'invasion de cellules tumorales de GBM à travers des cellules endothéliales et mimer l'infiltration des tissus sains. Il a été démontré que les cellules endothéliales favorisent l'invasion des cellules de GBM (Chonan et al., 2017; Xu et al., 2016). D'autres dispositifs ont reproduit la capacité de cellules tumorales d'autres cancers (poumon, foie, mélanome) à traverser la BHE et métastaser dans le cerveau (Xu et al., 2016).

IV.3.3. Les modèles microfluidiques 3D

Les systèmes microfluidiques 3D dits à « haut-contenu » visent à modéliser les circuits neuronaux et/ou la BHE en 3D et à les fusionner en un seul bloc constitué d'hydrogel (Figure 57C). Les circuits neuronaux n'y sont plus restreints dans un plan 2D mais s'agencent dans l'espace selon l'orientation prédéfinie des fibrilles d'hydrogel (Bang et al., 2016). Les axones en croissance suivent progressivement les fibres alignées grâce à leur capacité de guidage par contact. De même, la BHE ne se limite plus à une membrane poreuse ; les cellules endothéliales sont capables de former spontanément un réseau vasculaire en 3D, structurellement et fonctionnellement similaire aux capillaires *in vivo*. En fusionnant la BHE et les circuits neuronaux en un seul bloc, des études ont montré que la vascularisation favorise la croissance axonale et augmente l'activité électrique des neurones (Osaki et al., 2018; Sances et al., 2018).

La complexification des modèles de microfluidique ouvre la voie à une multitude de possibilités dans la reconstitution du microenvironnement cérébral en combinant les aspects liés aux réseaux neuronaux, à la BHE et aux cellules gliales. Ils permettront d'étudier les impacts liés au microenvironnement dans la progression de ces tumeurs, leur résistance aux traitements ou de tester la capacité de nouveaux médicaments à passer la BHE. Dans le cadre de l'hypoxie, l'approche microfluidique permet également de contrôler les taux d'O₂ dans le temps et dans l'espace afin de reconstituer des environnements hypoxiques localisés. Une étude s'est par exemple intéressée aux comportements de sphéroïdes tumoraux en conditions hypoxiques et a montré qu'ils se compactent et se décompactent en réponse à des variations d'O₂ comprises entre 0 et 10%. De même, la taille réduite de ces dispositifs les rend compatibles avec une utilisation dans un incubateur à taux d'O₂ variable.

Les premières applications des dispositifs microfluidiques dans le domaine des tumeurs cérébrales donnent des résultats très encourageants. Ils peuvent ainsi être sérieusement envisagés comme un nouvel outil précieux dans la recherche fondamentale sur les GHG pédiatriques.

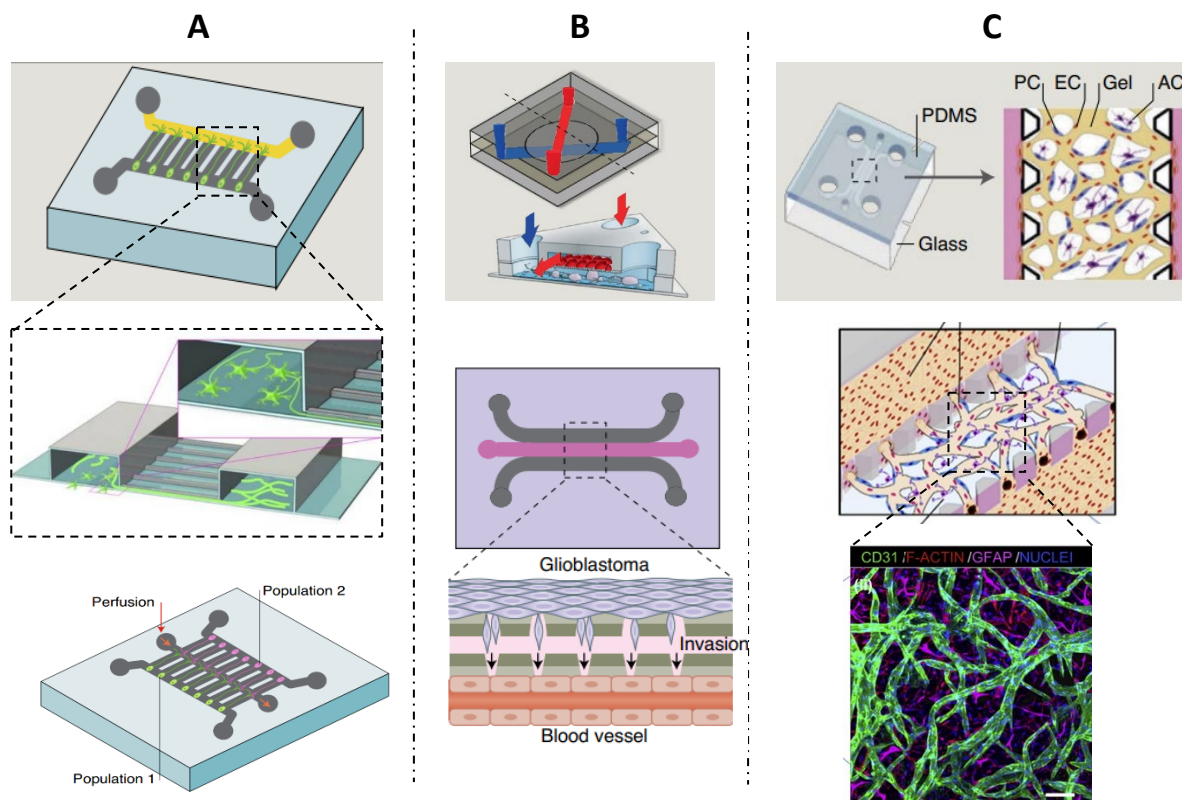


Figure 57 : Principales techniques de dispositifs microfluidiques cérébraux de type « brain-on-a-chip ». (A) Culture de neurones dans des dispositifs microfluidiques compartimentés avec croissance axonale dirigée au sein des microcanaux. Ce dispositif peut mettre en jeu une (Haut) ou plusieurs populations de neurones (Bas). (B) Dispositif microfluidique avec une membrane poreuse centrale imitant la BHE et séparant deux populations cellulaires (cellules endothéliales, neurones, cellules gliales) (Haut). Modèle microfluidique de GBM cultivé dans un dispositif à trois canaux où la zone centrale est constituée d'une matrice en gel et les canaux adjacents sontensemencés avec des cellules tumorales issues de GBM et des cellules endothéliales. Les cellules de GBM infiltrent la matrice en direction des cellules endothéliales (Bas). (C) Modèle microfluidique 3D à trois canaux composé d'une zone centrale de fibrine contenant des cellules endothéliales humaines, des péricytes et des astrocytes dérivés d'iPSCs, entourée de deux canaux contenant les ISPCs-ECs (Haut). Cette conformation résulte sur la formation de réseaux macrovasculaires interconnectés et fonctionnels (Milieu). Image confocale de du modèle comprenant les ISPC-EC (CD131-Vert), les péricytes (F-actine-Rouge), les astrocytes (GFAP-Magenta) et les noyaux (DAPI-Bleu) (Bas). PDMS Polydiméthylsiloxane = PC = Péricytes ; EC = cellules endothéliales ; AC = astrocytes. (Adapté de Tan et al, 2021 et Campisi et al, 2018)

Objectifs de la thèse

Les GHG pédiatriques de la ligne médiane semblent se développer dans un contexte spécifique, sous-tendu par une multitude d'altérations moléculaires associées à différents facteurs du microenvironnement, en particulier l'hypoxie intratumorale et la proximité des réseaux neuronaux. Dans ce contexte, le principal objectif de ce travail a été de mieux comprendre le rôle du microenvironnement hypoxique et des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α dans le développement et la progression tumorale des GHG pédiatriques de la ligne médiane. Les résistances thérapeutiques associées à HIF-2 α mises en évidence par de précédentes études au sein de notre équipe nous ont amené à cibler tout particulièrement la sous-unité HIF-2 α .

Pour répondre à cette problématique, deux principaux axes de travail ont été poursuivis tout au long de cette thèse :

- ✓ L'étude et le ciblage spécifique de HIF-2 α dans les GHG pédiatriques de la ligne médiane afin de mieux caractériser les implications moléculaires et fonctionnelles de cette sous-unité dans les mécanismes oncogéniques de ces tumeurs et de procéder à une stratégie thérapeutique basée sur une inhibition combinée des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α .
- ✓ Des modèles d'étude pré-cliniques *in-vitro* 2D et 3D ont été développés à partir de tumeurs de patients combinés à des facteurs du microenvironnement tumoral des GHG pédiatriques afin de reconstituer l'hypoxie intratumorale et les interactions avec les cellules gliales et les réseaux neuronaux environnants.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Culture cellulaire

I.1. Développement de lignées de GHG dérivées de patients

Tous les échantillons utilisés au laboratoire pour dériver des lignées de GHG pédiatriques sont issus de biopsies chirurgicales réalisées au CHU de Hautepierre (Strasbourg). A l'issue de l'opération et après le consentement du patient (ou de celui des parents dans le cas où le patient est mineur), un morceau de l'échantillon biologique est immédiatement immergé dans un milieu Hibernate (A1247501, Gibco) et conservé +4°C. Ce milieu permet de maintenir la viabilité des cellules ou des tissus d'origine cérébrale, à des niveaux de CO₂ ambiants et jusqu'à un mois après le prélèvement. Dans le but d'optimiser la dérivation des PDCLs, le transfert des échantillons au laboratoire de Bioimagerie et Pathologies (UMR 7021, Faculté de Pharmacie d'Illkirch) s'effectue sur glace et dans les 5 jours qui suivent le prélèvement, où ils sont pris en charge pour débiter le protocole de dérivation de la lignée (Figure 58).

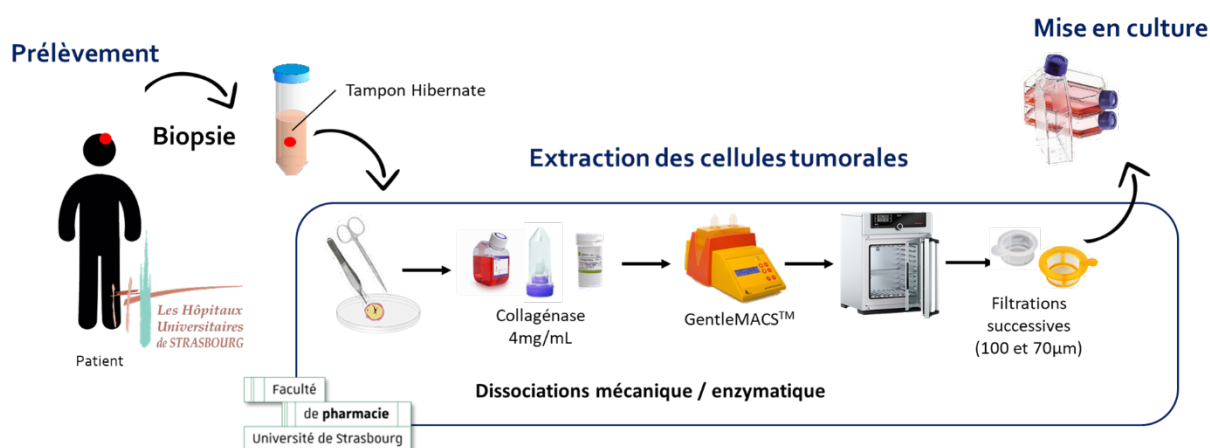


Figure 58 : Représentation schématique des étapes de dérivation de lignées de GHG pédiatriques à partir de biopsies de patients (PDCLs)

Lors de son arrivée au laboratoire, l'échantillon biologique est conservé sur glace le temps de préparer une solution de collagénase de type IV qui permettra la digestion enzymatique de la MEC. 40 mg de collagénase lyophilisée (17104-019 Gibco) sont pesés à l'aide d'une balance de précision et dissous dans 10 mL de milieu DMEM/F12 (31331-028, Gibco), afin d'obtenir une concentration de 4mg/mL. L'ensemble est placé sur un agitateur rotatif pendant 5 minutes jusqu'à dissolution complète. La suspension de collagénase obtenue est filtrée sur 0,22 µm afin de la stériliser. Elle peut alors être transférée dans un tube gentleMACS™ de 10 mL (Miltenyi Biotec). A ce stade, la dérivation proprement dite de la lignée peut commencer.

Celle-ci débute par une étape de lavage, qui a pour but de débarrasser l'échantillon des déchets biologiques et des globules rouges. Pour cela, le morceau de tumeur est prélevé dans le tube d'Hibernate à l'aide d'une pince métallique stérilisée et transféré dans une petite boîte de Pétri contenant du Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X (DPBS, Dutscher). Plusieurs lavages successifs peuvent être nécessaires si l'échantillon est particulièrement riche en globules rouges. L'échantillon tumoral est ensuite transféré dans le tube GentleMACS™ contenant la solution de collagénase IV. Une première dissociation mécanique est alors effectuée à l'aide de l'appareil GentleMACS™ (Miltenyi Biotec) et de son programme « mbrain_01 ». Si le morceau est particulièrement gros (> 8mm), une dissociation mécanique supplémentaire peut-être préalablement effectuée à l'aide de ciseaux chirurgicaux.

Le tube est ensuite placé sur un agitateur rotatif à 37°C pendant 30 minutes, afin d'activer la dissociation enzymatique par la collagénase. Ces deux étapes de dissociations mécanique/enzymatique sont ensuite répétées jusqu'à obtenir une suspension homogène dans laquelle l'échantillon tumoral est complètement dissous. La suspension obtenue est alors filtrée consécutivement sur 100 µm et 70 µm afin de se débarrasser des derniers débris biologiques. Pour optimiser la mise en culture et éviter les pertes de matériel biologique, le filtre de 70 µm est découpé à l'aide d'un scalpel et mis en culture dans une plaque 6 puits. Le filtrat est quant à lui centrifugé pendant 5 min à 300g, puis le culot est resuspendu et mis en culture dans un milieu spécifique de type FBS-B27 2% (Tableau 8) dans lequel sont ajoutés 1% de L-glutamine (Lonza™ BioWhittaker™), 1% de pénicilline-streptomycine (Lonza™ BioWhittaker™) et 1% d'amphotéricine B (Sigma).

La mise en culture est lancée dans une flasque T25 (Nunc) incubée à 37°C ; 5% CO₂ et régulièrement suivie au microscope dans les jours qui suivent. Selon la vitesse de prolifération, le taux de globules rouges et/ou l'acidification du milieu (jaunissement progressif du milieu), le milieu est changé au plus tard 7 jours après la mise en culture et au moins une fois par semaine par la suite.

Selon les lignées, la mise en culture dans le milieu de type B27-FBS 2% peut aboutir à une prolifération cellulaire en monocouche (conditions MNL ou 2D) et/ou sous forme de neurosphères (condition NS ou 3D). Lorsque les cellules atteignent 80 à 90% de confluence, ou que les neurosphères sont suffisamment grosses (bien visibles à l'œil nu), les cellules subissent un repiquage dans le but d'amplifier la lignée et/ou de la stocker, selon un protocole qui est propre à chacune de ces conditions de culture.

Ce développement de PDCLs issues de GHG pédiatriques s’inscrit dans le programme intitulé PEDIAGLIO, visant à développer des modèles d’études pré-cliniques de gliomes pédiatriques.

I.2. Entretien des PDCLs

	Milieux de culture		
Composants	FBS 10%	FBS-B27 2%	B27 2%
DMEM/F-12	45 mL	48 mL	48 mL
NEAA	1%	1%	1%
FBS (ou SVF)	5 mL (10%)	1 mL (2%)	/
B27 sans vit. A	/	1 mL (2%)	1 mL (2%)
EGF (100 µg/mL)	/	10 µL	10 µL
b-FGF (50 µg/mL)	/	20 µL	20 µL
PDCLs concernées	BT35 2D	BT68 2D BT69 2D BT83 2D	BT68 3D BT69 3D BT83 3D

Tableau 8: Composition des milieux de culture des PDCLs : volumes correspondants pour la préparation de 50mL de milieu. B27 Supplement (12587010, Gibco); NEAA, Non Essential Amino Acids (X0557-100, Dutscher); FBS, Foetal Bovine Serum (Dutscher); EGF, Epidermal Growth factor (100-008, Reliatech) ; b-FGF, basic Fibroblast Growth Factor (300-003, Reliatech)

I.2.1. Repiquage des cellules en monocouches

Quelles que soient leurs conditions de culture, toutes les cellules font l’objet d’une surveillance permanente à travers au moins deux observations au microscope par semaine. Le milieu doit être changé au moins une fois par semaine, ou plus en cas d’acidification du milieu, ou de la présence de nombreux débris flottants par exemple.

Lorsque les cellules en monocouches ont atteint environ 90% de confluence, elles sont repiquées. Cette procédure démarre par un lavage au DPBS 1X, puis les cellules sont dissociées de la flasque à l’aide d’une solution d’Accutase (A6964, Sigma). L’activation de cette enzyme et donc la dissociation des cellules nécessite une incubation à 37°C d’une durée variable selon les caractéristiques cellulaires (entre 5 à 10 min la plupart du temps). A l’issue de ce délai, les cellules sont encore dissociées mécaniquement en effectuant une série d’aspirations/refoulements du volume d’Accutase sur le fond de la flasque à l’aide d’une pipette

de 10mL. La flasque est finalement vérifiée au microscope pour s'assurer que les cellules soient bien individualisées ; celles-ci peuvent alors être transférées dans un tube de 15mL. Pour éviter les pertes, la flasque est lavée avec du DBPS 1X ou du milieu DMEM/F12 standard, puis ce volume est ajouté à l'Accutase dans le tube de 15 mL, avant d'être centrifugé 5 min à 300g. Le culot est resuspendu dans 1 à 2mL de milieu selon sa taille et un échantillon de 20 μ L est prélevé pour le comptage cellulaire. La plupart du temps, on privilégie un comptage automatisé (TC20, Biorad).

I.2.2. Repiquage des cellules en neurosphères

Les cellules étant en suspension libre dans le milieu, le volume de milieu est récupéré à l'aide d'une pipette de 10mL, transféré dans un tube de 15 mL et centrifugé à 250g pendant 1 minute. Le culot est ensuite lavé dans 5 à 10mL de DBPS 1X, puis centrifugé à nouveau à 250g pendant 1 min avant d'être resuspendu dans 5mL d'Accutase. Le tout est transféré dans une T25 neuve et incubé à 37°C pendant 10 à 30 min selon les lignées. En effet, la dissociation enzymatique n'est pas réalisée dans la flasque d'origine pour éviter de dissocier et récupérer d'éventuelles cellules qui auraient adhéré à la surface (de type MNL). Cela permet de sélectionner plus spécifiquement les cellules en condition NS. Une fois la dissociation achevée, la suite du protocole est similaire à celui des cellules MNL. En cas d'amas cellulaires restants et indissociables, la suspension cellulaire peut être filtrée.

A l'issue du comptage cellulaire, les cellules peuvent être réensemencées dans une nouvelle flasque dans leurs milieux respectifs (Tableau 8) afin de poursuivre leur amplification ou stockées à long-terme dans des cryotubes pour une utilisation ultérieure.

I.2.3. Réensemencement des lignées

PDCLs	Nombre de cellules	
	T25	T75
BT35	300 000 à 500 000	1 à 2 millions
BT68 2D	500 000 à 700 000	1,5 à 2,5 millions
BT68 3D	500 000 à 1 million	2 à 2,5 millions
BT69 2D	500 000 à 700 000	1,5 à 2,5 millions
BT69 3D	500 000 à 1 million	2 à 2,5 millions
BT83 2D	300 000 à 700 000	500 000 à 1 million
BT83 3D	500 000 à 1 million	1,5 à 2,5 millions

Tableau 9 : Densités d'ensemencement pour l'amplification des différentes PDCLs selon la taille de la flasque utilisée

En fonction des résultats du comptage cellulaire, la formule suivante permet de déterminer le volume de suspension cellulaire à prélever afin de relancer une nouvelle flasque à la densité cellulaire déterminée (voir tableau 9) :

$$\text{Volume à prélever (mL)} = \frac{\text{nb cellules nécessaires} * 1\text{mL}}{\text{nb de cellules/mL}}$$

Exemple :

- Résultats du comptage = $1,5 \cdot 10^6$ cellules / mL
- Volume total de la suspension cellulaire = 2mL
- Nombre total de cellules = $1,5 \cdot 10^6 * 2 = 3,0 \cdot 10^6$ cellules
- Densité de relance = $1,0 \cdot 10^6$ cellules

$$\rightarrow \text{Volume de suspension cellulaire à prélever : } \frac{1,0 \cdot 10^6 * 1000}{1,5 \cdot 10^6} = 667 \mu\text{L}$$

Pour relancer la lignée, du milieu neuf doit être introduit dans la flasque (5mL pour une T25 et 10mL pour une T75) **avant** d'y ajouter le volume de suspension cellulaire, afin d'éviter un stress supplémentaire pour les cellules.

I.2.4. Congélation et stockage des PDCLs

La même formule présentée ci-dessus est utilisée pour déterminer le volume cellulaire à prélever en vue d'une congélation. Ces cellules sont ensuite re-suspendues dans un milieu contenant 50% à 90% de FBS et 10% de DMSO avant d'être transférées dans un cryotube annoté et placé à -80°C dans un container de congélation (Dutscher Cryo cooler 913081) rempli

d'alcool isopropylique. Ce dernier permet une baisse de température de 1°C/min et évite une congélation trop rapide qui pourrait altérer la viabilité cellulaire. Dans la semaine qui suit cette congélation, le cryotube est transféré à -150°C (congélateur spécifique) ou à -196°C (container d'azote liquide) pour un stockage à long-terme.

I.3. Reconstitution in-vitro des conditions hypoxiques

L'amplification conventionnelle des lignées cellulaires s'effectue dans des conditions standards à 37°C ; 5% CO₂ ; 21% O₂. Pour les expériences nécessitant une mise en hypoxie des cellules, deux incubateurs multi-gaz sont utilisés, permettant de moduler les taux d'O₂ : un incubateur grand format de 255L (HERACell VIOS 250i, ThermoFischer), dans lequel se trouve notamment l'Incucyte® ZOOM, et un incubateur petit format de 50L (MCO-5M-PE, PHCbi inCusaFe). L'incubateur de 50L présente l'avantage de passer de 21 à 1% d'O₂ en moins de 15 min (contre 60 min pour le grand format). Il est donc privilégié pour toutes les expérimentations qui nécessitent une fixation rapide des cellules, notamment pour l'étude des facteurs HIF (demi-vie de la protéine à 21% = 5min) : extractions de protéines, d'ARN ou immunofluorescence.

I.4. Suivi de la prolifération des PDCLs

Pour les tests de prolifération, les différentes lignées ont étéensemencées dans des plaques 96 puits (TPP) selon des densités adaptées (Tableau 10). La confluence ou la taille des sphères a été suivie en temps réel à l'aide de la technologie Incucyte® ZOOM, un système de microscopie automatisé sur cellules vivantes (Figure 59). Les photos des puits entiers (= mode « whole well ») ont été prises toutes les 3 ou 4h avec un objectif de grossissement 4X (Nikon Plan Apo 4x/0,20 WD 20) sur une durée totale de 144h. La confluence ou le diamètre des sphères ont été déterminés selon un masque d'analyse virtuel configuré par l'expérimentateur sur le logiciel de l'appareil. Il permet notamment de distinguer les cellules selon leur contraste par rapport au fond du puit. Toutes les données ont été normalisées par rapport à la confluence cellulaire initiale à T₀, qui correspond à la première photo du puit, prise dans un délai maximal d'une heure après l'ensemencement.

L'Incucyte® est également doté de deux lasers qui permettent de suivre et distinguer en temps réel deux populations cellulaires en coculture dans un même puit, si celles-ci sont marquées par deux fluorophores différents ; l'un émettant dans le vert et l'autre dans le rouge (longueurs d'ondes d'excitation (nm) : vert = 440-480 / rouge = 565-605 ; longueurs d'ondes d'émission (nm) : vert = 504-544 / rouge = 625-705).

	Plaque 6 puits		Plaque 24 puits	Plaque 96 puits
	WB	RTqPCR	IF	Prolifération
BT35	300 000	500 000	30 000 à 50 000	2000 à 3000
BT68 2D	500 000	800 000	50 000	3000 à 4000
BT68 3D	500 000	1 000 000	/	5000 à 6000
BT69 2D	500 000	800 000	50 000	3000 à 4000
BT69 3D	500 000	1 000 000	/	5000 à 6000
BT83 2D	300 000	800 000	30 000	2000 à 3000
BT83 3D	500 000	500 000		5000 à 6000

Tableau 10 : Densités d'ensemencement des PDCLs dans les différentes plaques de culture cellulaire selon le type d'expérimentation

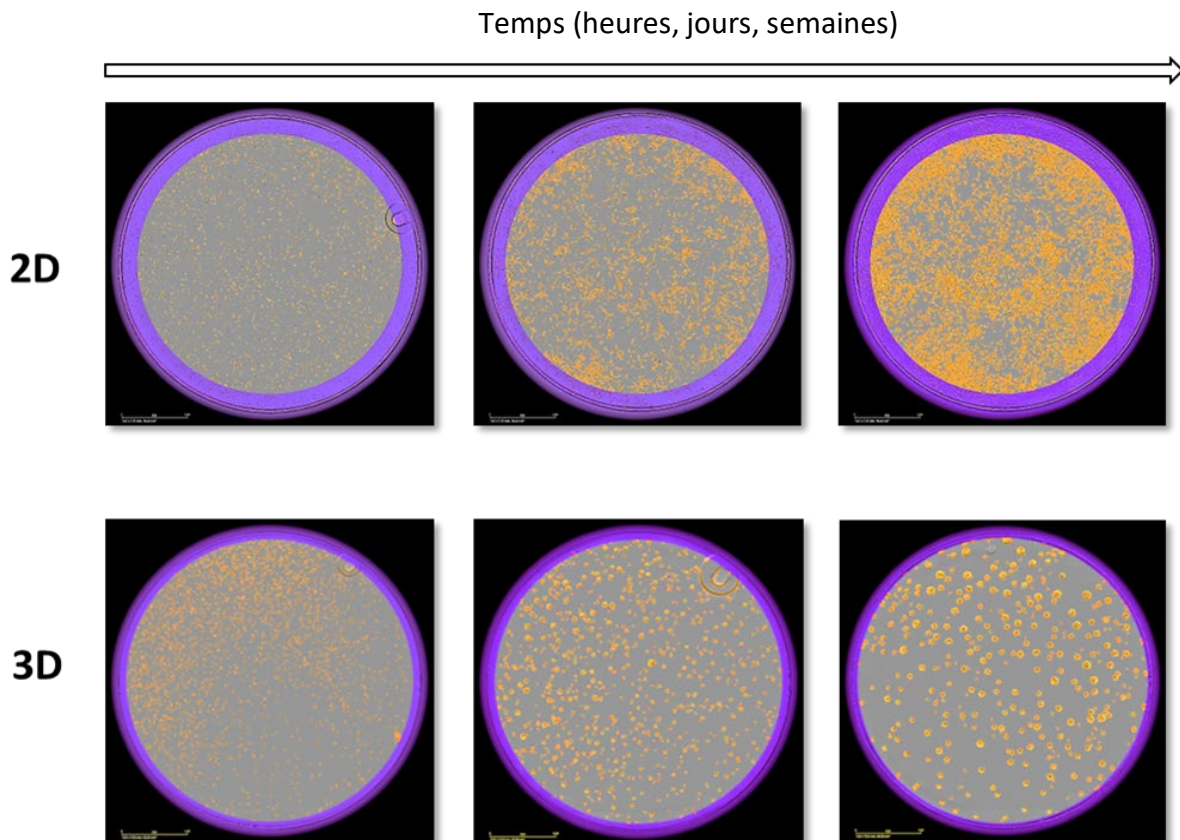


Figure 59 : Exemple de suivi de la confluence (haut) ou de la taille des sphères (bas) à l'Incucyte® ZOOM. Les masques d'analyse virtuels sont mis au point par l'expérimentateur ; en orange = masque de confluence/tailles des sphères ; en violet = masque d'exclusion des bords

I.5. Préparation des composés

L'irinotécan (Hospira, 20mg/mL) a été fourni par le service de pharmacie des CHU de Strasbourg. Il a été dilué à 20 mM dans du D-PBS 1X, puis aliquoté.

Le composé PT2385 a été acheté auprès de MedChem Express (HY-12867). Il a été dissous dans du DMSO à une concentration de 20 mM, puis aliquoté. Ces composés sont ensuite dilués aux concentrations utilisées pour les différentes expérimentations (Tableau 11).

Application	PT2385 (μM)	Irinotecan (μM)
Prolifération sur Incucyte (96 puits)	1; 5; 10 ; 20 ; 40	0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100
Migration cellulaire	5 ; 10 ; 20	0,25 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10
Western-Blot	20	/
Immunofluorescence	5 ; 10 ; 20	0,5 ; 1 ; 2,5

Tableau 11 : Récapitulatif des concentrations utilisées pour les différentes drogues par type d'expérience

II. Etude des capacités migratoires des PDCLs

II.1. Développement de sphéroïdes en gouttes suspendues

La méthode de formation de sphéroïdes en gouttes suspendues s'est effectuée de manière similaire au protocole décrit par Foty, 2011 (Foty, 2011). Elle nécessite une solution de méthylcellulose à 1,2% préparée au préalable : pour 500mL de méthylcellulose à 1.2%, 6g de méthylcellulose (Sigma-Aldrich, #M0262, 400 cPs) ont été autoclavés dans une bouteille de 500mL. En parallèle, 250mL de milieu DMEM sans sérum ont été chauffés à 60°C. La poudre de méthylcellulose y a été ajoutée sous agitation jusqu'à ce que les particules de méthylcellulose soient uniformément dispersées. La solution obtenue a été complétée avec du milieu froid pour atteindre un volume final de 500mL, puis agitée toute la nuit à 4°C permettant la solubilisation des particules de méthylcellulose. Elle a ensuite été filtrée sur 0.45 μm ou 0.22 μm puis aliquotée. La conservation s'effectue à 4°C.

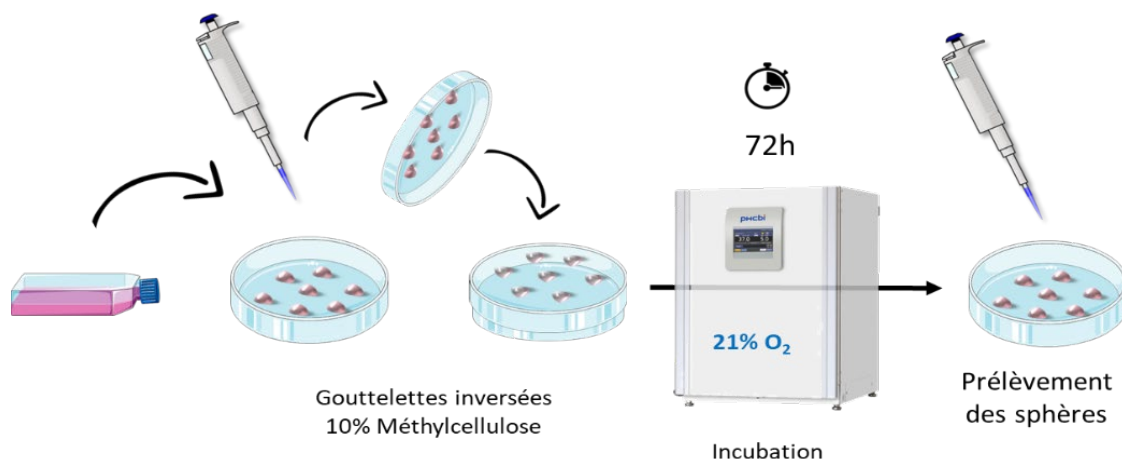


Figure 60 : Procédure de l'obtention de sphéroïdes en gouttes suspendues

Après dissociation et comptage, les cellules sont re-suspendues dans leur milieu de culture habituel supplémenté avec 10% de la solution de méthylcellulose 1,2%, à raison de 10 000 cellules par goutte. Après une brève agitation, des gouttes de 20 μ L sont déposées sur la face interne du couvercle d'une petite boîte de Pétri (\varnothing 5cm) (Figure 60). Le couvercle est ensuite délicatement retourné et reposé sur son socle, avant d'être transféré dans une boîte de Pétri (\varnothing 15cm), à raison de 3 petites boîtes pour une grande. Du papier absorbant imbibé de DBPS 1X stérile est ajouté à la périphérie de cette boîte pour maintenir une chambre humide et éviter que les gouttelettes ne dessèchent. L'ensemble est incubé à 37°C ; 5% CO₂ ; 21% O₂ pendant 72h.

II.2. Suivi de la migration

A l'issue du temps d'incubation nécessaire, les sphéroïdes sont prélevés à l'aide d'une pipette et déposés délicatement dans une plaque 24 puits coatée à la fibronectine (C43-060, Promocell) ou à la Poly-D-lysine (A3890401, Gibco). Ce coating s'effectue durant 1h à température ambiante, avec 200 μ L de fibronectine à 5 μ g/mL ou de poly-D-lysine à 50 μ g/mL par puit. A l'issue de cette incubation, un sphéroïde est déposé dans chaque puit dans lequel ont été préalablement ajoutés 500 μ L de milieu contenant les concentrations de drogues à tester. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C ; 5% CO₂ ; 1% O₂ pendant 96h. Si besoin, elles peuvent être suivies par la technologie Incucyte®. A l'issue des 96h, les sphéroïdes en migration sont fixés par l'ajout de 500 μ L d'une solution de glutaraldéhyde 1% dans chaque puit (concentration finale en glutaraldéhyde = 0,5%).

II.3. Marquage des sphéroïdes

Une fois fixés, les sphéroïdes sont lavés à trois reprises au DBPS 1X afin d'éliminer le glutaraldéhyde. Les plaques peuvent ensuite être conservées à 4°C pendant 2 semaines ou directement marquées au DAPI. Pour cela, les sphéroïdes sont incubés pendant une heure à température ambiante, dans une solution de DAPI dilué au 1/1000 dans du DBPS-BSA 3%, à raison de 250µL par puit. Après 3 nouveaux lavages successifs au DPBS 1X de 5 minutes chacun et un ultime lavage à l'eau MilliQ, les sphéroïdes peuvent être observés au microscope ou conservés à +4°C.

II.4. Analyse des tests de migration cellulaire

Les différents puits contenant les sphéroïdes fixés sont pris en photo par l'intermédiaire d'un microscope inversé à épifluorescence (Axio Zeiss NA 0.3 WD 73) équipé d'une caméra (Moticam Pro 285D 60N-C 2/3' 0.63x 426113), à un grossissement 5X (Ph1 Plan-NEOFLUAR 5x/0.15). Le gain et le temps d'exposition sont ajustés de manière à distinguer tous les noyaux qui s'échappent de la sphère, sans que ces derniers ne soient saturés. Les photos obtenues sont ensuite analysées sur le logiciel ImageJ (v1.53) par la macro- « Dispersion sphères 2D 1.7 ». L'utilisateur commence par tracer manuellement le contour du sphéroïde, puis la macro détecte tous les noyaux qui s'en échappent et associe à chacun une distance de migration (Figure 61). La taille du sphéroïde, le nombre de noyaux migrants et la distance de migration moyenne sont répertoriés dans un fichier au format xls.

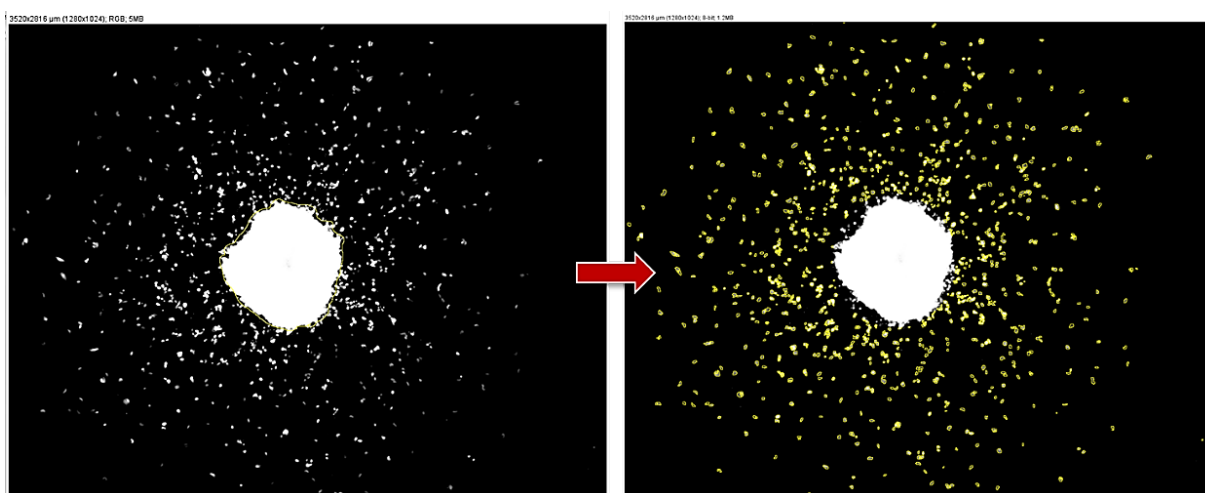


Figure 61 : Exemple de sélection manuelle du sphéroïde (gauche) et détection des cellules migrantes par la macro-« Dispersion sphères 2D 1.7 » (droite).

III. Développement de cocultures de PDCLs et de neurones glutamatergiques

III.1. Différenciation des neurones glutamatergiques à partir des iPSCs

Les cellules iPSC (Cortical Glutamatergic Neurons BX-0300) sont fournies par Brainxell (Madison, WI). Dès réception, elles doivent impérativement être transférées et stockées dans de l'azote liquide (et non à -80°C) pour éviter toute altération de la viabilité cellulaire. L'ensemencement des iPSC nécessite un coating préalable des plaques 96 puits (TPP) à la Poly-D-Lysine (PDL) (Gibco). Le coating a été réalisé avec $50\mu\text{L}$ de PDL à $50\mu\text{g/mL}$ diluée dans du DBPS 1X stérile. Les plaques ont été incubées une nuit à 37°C ; $5\% \text{CO}_2$. Le lendemain, 3 lavages successifs au DBPS 1X sont effectués et les plaques sont laissées à sécher pendant 4 heures minimum en conditions stériles, sous un poste de sécurité microbiologique (PSM). Une fois totalement sèches, elles peuvent être utilisées immédiatement ou stockées à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant 2 semaines, protégées par du parafilm.

Les iPSC ont étéensemencées à une densité de 30 000 cellules par puit en plaque 96 puits et 50 000 cellules en Lab-tekTM 8 puits selon le protocole disponible sur le site de Brainxell (Culturing Glutamatergic Neurons for Imaging and Plate Reader Assays, <https://brainxell.com/cortical-glutamatergic-neurons#protocols>).

Pour l'utilisation des neurones dans les dispositifs microfluidiques et d'enregistrements électrophysiologiques, le protocole est détaillé dans la publication jointe à ce manuscrit (Fuchs et al., 2021).

III.2. Marquage des cellules avec les nanoparticules

Des nanoparticules ont été utilisées dans l'objectif de distinguer deux populations cellulaires en coculture dans les puits, à savoir les neurones et les PDCLs. Ces nanoparticules sont synthétisées au sein de notre laboratoire UMR CNRS 7021, par l'équipe « Nanochimie et Bioimagerie » dirigée par Andrey KLYMCHENKO. Elles sont obtenues à partir d'un polymère biodégradable chargé de colorants cyanine (notés DiO, DiI et DiD), qui émettent une fluorescence dans le vert ou le rouge. Ces nanoparticules sont endocytées naturellement par les cellules, ce qui permet de les marquer sans altérer leur viabilité (Andreiuk et al., 2017). Dans le cadre de ce projet, les composés DiO et DiD ont été privilégiés car leurs longueurs d'onde d'émission sont les mieux adaptées aux lasers de l'Incucyte[®].

En tant que composé fluorescent, les nanoparticules doivent être conservées à l'abri de la lumière et idéalement à +4°C (toute congélation doit être évitée).

Le traitement des cellules par les nanoparticules s'effectue via un milieu Opti-MEM (Gibco – 11058-021) dépourvu de rouge de phénol et de sérum. Cette particularité permet d'éviter des phénomènes d'agrégation des nanoparticules au contact du sérum ainsi qu'un bruit de fond fluorescent lié au rouge de phénol.

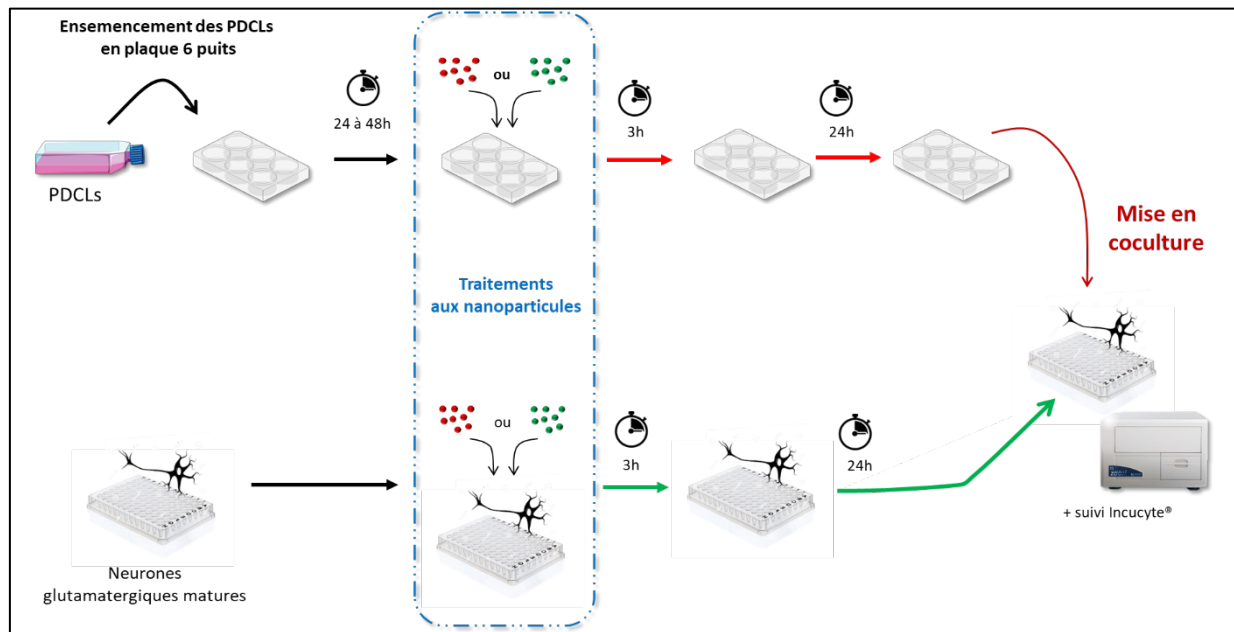


Figure 62 : Protocole global de marquage des cellules aux nanoparticules et mise en coculture des PDCLs avec les neurones glutamatergiques

III.2.1. Marquage des lignées PDCLs

Dans un premier temps, les cellules sont préalablement ensemencées dans une plaque 24 ou 6 puits, au moins 24h avant le traitement, de manière à obtenir une confluence de 30 à 50% dans les puits le jour du marquage. Pour les lignées BT35 et BT68 2D testées dans ce projet, 300 000 cellules ont été ensemencées dans des plaques 6 puits et incubées 48h avant le traitement par les nanoparticules (Figure 62).

Le jour du marquage, les puits sont d'abord lavés à 2 reprises avec le milieu Opti-MEM. En parallèle, les dilutions des nanoparticules à 1/5 et/ou 1/10 ont été réalisées, pour un volume total de 2mL d'Opti-MEM par puit. Ces dilutions doivent être préparées extemporanément et immédiatement transférées au contact des cellules dans les puits, pour éviter l'agrégation des particules entre elles. Au moins un puit contrôle (milieu Opti-MEM sans nanoparticules) est systématiquement préparé en parallèle pour s'assurer que les nanoparticules n'induisent pas de mort cellulaire. A ce stade, les cellules sont incubées à 37°C ; 5% CO₂ ; 21% d'O₂ pendant 3h.

A l'issue de cette incubation, les différents puits sont à nouveau lavés à 2 reprises avec du milieu Opti-MEM, puis les cellules sont remises dans leur milieu de culture, mais le DMEM/F12 habituel est remplacé par un DMEM/F12 sans rouge de phénol (X0557-100, Dutscher). Afin de reconstituer toute sa composition habituelle, ce milieu est supplémenté avec 2,5mM de L-glutamine, 17,5mM de D-glucose, 1% de NEAA. Les cellules sont incubées 24h à 37°C ; 5% CO₂ ; 21% d'O₂ et peuvent être repiquées dès le lendemain.

III.2.2. Marquage des neurones glutamatergiques

Les neurones glutamatergiques sont maintenus en culture au moins 15 jours après leur ensemencement pour arriver à maturation. Leur marquage s'effectue directement dans la plaque 96 puits dans laquelle ils ont été ensemencés. Après 2 lavages successifs au milieu Opti-MEM, les neurones sont traités avec les nanoparticules diluées au 1/5 pour un volume total de 100 µL par puit. Le protocole global est similaire à celui des PDCLs ; les neurones sont incubés 3h au contact des nanoparticules et lavés à 2 reprises avec du milieu Opti-MEM. A l'issue du marquage, ils sont remis dans leur milieu habituel jusqu'à ce que les PDCLs soient ajoutées afin de démarrer les cocultures (Figure 62).

III.3. Suivi des cocultures à l'Incucyte[®] ZOOM

L'observation des cocultures à l'Incucyte[®] nécessite un certain nombre de paramètres précis. La durée d'acquisition pour les nanoparticules de type DiO est réglée sur 800 ms et celle pour les nanoparticules DiD à 600 ms. Le Top-Hat radius est défini sur 50 µm et le seuil GCU sur 0,4.

IV. Etude des expressions protéiques des marqueurs de l'hypoxie par western-blot (WB)

IV.1. Extractions protéiques des PDCLs

Pour les extractions protéiques en vue des western-blot, les lignées cellulaires sont ensemencées dans des plaques 6 puits à des densités spécifiques (Tableau 10).

- Pour les cinétiques des facteurs HIFs au cours du temps, les cellules sont maintenues en hypoxie à 1% d'O₂ pendant 3, 6, 12, 24, 48 ou 72h.
- Pour les comparaisons 21% vs 1%, les cellules sont incubées pendant 72h à 21% ou 1% d'O₂.
- Pour les comparaisons des conditions « Non traité » vs « 20µM PT2385 », les cellules sont incubées pendant 72h à 1% d'O₂.

A l'issue de la période d'incubation correspondante, elles sont rapidement lavées au DPBS 1X et extraites dans un volume de 60 à 100 μL de Laemmli 2X (Biorad) + 5% de β -mercaptoéthanol (Biorad). Les lignées en condition 2D sont détachées des puits à l'aide d'un grattoir de cellules (TPP) et immédiatement transférées dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Pour les cellules en conditions NS, celles-ci sont directement récupérées dans un tube de 15mL puis centrifugées pendant 1min à 300g. Elles sont ensuite lavées avec 1mL de milieu DPBS 1X avant d'être à nouveau centrifugées 1min à 300g. Après avoir retiré le volume de lavage, les sphères sont resuspendues dans 50 à 80 μL de Laemmli 2X + 5% β -mercaptoéthanol. Des va-et-vient avec un pipette de type P1000 permet de mieux dissocier les sphères. L'ensemble de ces étapes doit être effectué en moins de 5 min pour éviter toute dégradation des protéines HIF en normoxie (demi-vie de la protéine à 21% $\text{O}_2 = 5 \text{ min}$).

A l'issue de ces étapes, on obtient différentes solutions plus ou moins visqueuses selon la quantité de cellules récupérées. Ces solutions sont soniquées (IKA labortechnik) à trois reprises pendant 3 secondes, puis les échantillons sont chauffés à 95°C sur un bloc chauffant pendant 10 à 15min pour dénaturer les protéines. Les extraits protéiques obtenus peuvent alors être conservés à -20°C ou chargés directement sur un gel pour migration.

IV.2. Migration sur gel de polyacrylamide et transfert à sec

La migration des protéines extraites s'effectue sur un gel de polyacrylamide 4-20% (Biorad) de 18 ou 24 puits selon les besoins. Entre 12 et 16 μL d'extraits protéiques sont chargés par puit selon la quantité de matériel extrait disponible. Plusieurs puits sont chargés avec 5 à 8 μL d'un marqueur de poids moléculaire (Precision Protein Plus All Blue 0-250kDa, Biorad) pour distinguer les protéines après migration. Le gel est immergé dans 500 mL de tampon de migration contenant 100mL de Tris-Glycine 10X (Euromedex), 5mL de SDS 10% (Euromedex) qsp eau MilliQ et la migration s'effectue pendant 25 à 30 min à 230V. Elle est stoppée lorsque le front de migration se situe à 0,5 cm du bord inférieur du gel.

Les protéines contenues dans le gel sont ensuite transférées à sec sur une membrane PVDF (polyfluorure de vinylidène) 0,2 μm (Midi format, Biorad) à l'aide du système Trans-Blot Turbo (Biorad). Avant le transfert, la membrane est préalablement activée en la plongeant 15 sec dans de l'éthanol absolu, suivi d'un lavage dans l'eau MilliQ pendant 2 minutes. Une fois activée, la membrane est placée dans la cuve et le transfert est lancé pendant 7 minutes à 25V et 2,5A.

IV.3. Immunodétection des protéines

A l'issue du transfert, les sites de liaison non spécifiques sont saturés à l'aide d'une solution de BSA 3% (Euromedex) diluée dans du tampon de lavage contenant 50mL de TBS 10X (TBS = TRIS buffered saline, Euromedex), 500 μ L de Tween-20 (Euromedex), qsp 500mL d'eau MilliQ, le tout filtré sur 0,22 μ m. La membrane y est incubée durant 1h à température ambiante et sous agitation. Les anticorps primaires sont dilués dans le tampon de saturation BSA 3% et mis au contact de la membrane durant une nuit à +4°C sous agitation. Le lendemain, après 3 lavages successifs au tampon de lavage de 5 minutes chacun, la membrane est incubée avec les anticorps secondaires dilués dans le tampon de saturation durant 45 minutes, à température ambiante et sous agitation. Après une nouvelle série de 3 lavages, la membrane peut être révélée par chimioluminescence grâce au kit Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad) couplé au système d'imagerie Las4000 (GE Healthcare). Les intensités des différentes bandes sont quantifiées sur le logiciel ImageJ (v1.53) et normalisées par rapport au contrôle endogène (β -actine ou α -tubuline).

V. Etude de la localisation et des niveaux d'expression des facteurs HIF dans les PDCLs

V.1. Immunomarquage des PDCLs cultivées en 2D

Pour les expérimentations en immunofluorescence, les PDCLs sontensemencées dans une plaque de 24 puits (TPP), dans lesquels des lamelles en verre stérilisées (\varnothing 12mm) ont été préalablement déposées et recouvertes de 500 μ L de milieu. Les densités d'ensemencement sont indiquées dans le tableau 10. Les cellules sont incubées durant 72h à 21% ou 1% d'O₂ selon les conditions, traitées ou non au PT2385 avant d'être fixées. Pour cela, le milieu de culture est retiré et remplacé par 200 μ L de DBPS-Paraformaldéhyde-4% (PFA) (Electron Microscopy Sciences, Thermo Scientific) pendant 10 minutes. Les puits sont ensuite lavés 3 fois au DPBS 1X et les cellules sont perméabilisées à l'aide de 200 μ L de DPBS-Triton 0,1% par puit durant 3 minutes, à température ambiante. Après 3 nouveaux lavages au DBPS 1X, 500 μ L de tampon de saturation DPBS-BSA 3% sont ajoutés dans chaque puit et laissé incubé pendant 2h afin de saturer les sites de liaison non spécifiques. Les anticorps primaires sont dilués dans une solution de DPBS-BSA 1%. A la fin de la saturation, des gouttelettes de 30 μ L de l'anticorps primaire sont déposées sur un morceau de parafilm (face stérile), plaqué sur le fond d'une grande boîte de Pétri (\varnothing 15cm). Chaque lamelle est délicatement sortie de son puit et la face contenant les cellules fixées est déposée au contact de la gouttelette d'anticorps primaire. L'ensemble est

incubé à +4°C durant une nuit, à l'abri de la lumière et en y ajoutant des morceaux de papier absorbant imbibé d'eau stérile, de manière à maintenir une chambre humide.

Le lendemain, les différentes lamelles sont replacées dans une plaque 24 puits neuve contenant 500 µL de DPBS 1X. 3 lavages successifs sont effectués avant d'ajouter 200 µL de la solution d'anticorps secondaires (Tableau 13), dilués dans le tampon de saturation. Ce tampon contient également le DAPI (Sc3598) et l'actine phalloïdine (phalloïdine-Atto 488 sc3598) pour les marquages des noyaux et du cytosquelette. Les cellules y sont incubées durant 45 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. 3 lavages successifs sont encore effectués ainsi qu'un bref lavage supplémentaire dans de l'eau MilliQ. La lamelle peut alors être montée sur une lame de microscope (Thermo Scientific) à l'aide d'une colle de montage spécifique (Fluoromount GTM, Invitrogen). Elles sont ensuite mises à sécher à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant une durée minimale de 24h avant d'être observées au microscope.

V.2. Observation des lames au microscope confocal

Les marquages d'immunofluorescence sur PDCLs en culture 2D sont observées sur un microscope confocal (LEICA TCS SPE II) avec un objectif 63X à immersion à l'huile (N.A : 1.40 – HCX PL APO CS). Les images obtenues permettent de localiser les protéines d'intérêt dans les cellules et de quantifier leurs proportions relatives dans différents compartiments cellulaires selon l'intensité de la fluorescence, à l'échelle du noyau, du cytoplasme ou de la cellule entière. Pour cela, les images obtenues sont analysées sur le logiciel ImageJ (v1.53k) par la macro « Quentin HIF Noyau Cyto », développée par Romain Vauchelles, ingénieur et responsable de la plateforme d'imagerie quantitative (PIQ) du laboratoire. Pour ces différentes analyses, les réglages de gain, d'offset et la puissance du laser doivent impérativement restés identiques lors de l'observation des différentes lames (Tableau 12). Pour optimiser les analyses comparatives, on s'assure également de toujours se placer dans le plan de l'axe Z où le marquage de la protéine d'intérêt est maximal.

Cible	Espèce	Référence	Fournisseur	Poids moléculaire	Dilution	
					WB	IF
HIF-1α	Rabbit	Ab51608	Abcam	93 kDa	1/1000	1/200
HIF-2α	Rabbit	Ab199	Abcam	118 kDa	1/800	/
HIF-2α	Rabbit	Ab109616	Abcam	96 kDa	/	1/200
GAPDH	Mouse	MAB374	Millipore	35 kDa	1/5000	/
α-tubuline	Mouse	T9026	Sigma	55 kDa	1/2000	/
γ-H2AX	Mouse	05-636-l	Merck	/	/	1/500
anti-Rabbit IgG HRP Conjugate	Chèvre	W401B	Promega	/	1/ 5000	/
anti-Mouse IgG HRP Conjugate	Chèvre	W402B	Promega	/	1/5000	/
Alexa fluorTME 568 @rabbit IgG	Chèvre	A11011	Abcam	/	/	1/2000
Alexa fluorTME 647 @mouse IgG	Chèvre	A11004	Abcam	/	/	1/2000

Tableau 12 : Liste des anticorps et dilutions utilisés en WB et en IF

V.3. Etude de la localisation des facteurs HIF en IF

Le protocole décrit précédemment a notamment été utilisé dans le but de quantifier l'expression des protéines HIF-1 α et HIF-2 α en normoxie (21% O₂) et en hypoxie (1% O₂) ou après traitement au PT2385. Pour cela, tous les réglages de puissance de laser, de gains et d'offset sont spécifiques et restent strictement identiques dans toutes les conditions (Tableau 13). Les intensités de fluorescence sont quantifiées à l'échelle du noyau, du cytoplasme ou de la cellule entière à l'aide de la macro « Quentin HIF Noyau Cyto ».

	Puissance du laser	Gain (V)	Offset (%)
HIF-1a	25%	850	-0,7
HIF-2a	25%	850	-0,8
ARNT	20%	812	-0,8
γ-H2AX	25%	820	-1,2
GM130	20%	785	-0,8
DAPI	15%	720	-0,8
Phalloïdine	20%	750	0,8

Tableau 13: Réglages des paramètres du microscope confocal pour l'acquisition des images en immunofluorescence. Grossissement 63X avec immersion à huile (N.A : 1.40 – HCX PL APO CS)

VI. Etude des expressions en ARN des facteurs HIF et des gènes cibles par RTqPCR

VI.1. Extraction d'ARN des PDCLs

VI.1.1. Lyse des PDCLs

Pour les extractions d'ARN, les PDCLs sont ensemencées dans des plaques 6 puits aux densités décrites dans le tableau 10. Les cellules sont incubées pendant 72h à 37°C ; 5% CO₂ sous différentes conditions selon les modulations étudiées (Tableau 14).

Facteurs de modulation des gènes cibles	Echantillon 1	Echantillon 2	Normalisation
Taux d'O ₂	21% O ₂ ; 72h	1% O ₂ ; 72h	RQ _{ech2} / RQ _{ech1}
Traitement au PT2385	1% O ₂ Non traité ; 72h	1% O ₂ + 20µM de PT2385 72h	RQ _{ech2} / RQ _{ech1}

Tableau 14 : Conditions de culture des échantillons et normalisations utilisées dans chaque lignée pour l'étude de la modulation des gènes cibles des HIFs en RTqPCR

- Pour les PDCLs cultivées en conditions MNL (2D) : A l'issue des 72h d'incubation, les cellules sont sorties de l'incubateur, lavées rapidement (< 30sec) avec 2mL de DPBS 1x et lysées avec 350 ou 600µL de tampon de lyse spécifique « RLT Plus Buffer », issu du kit d'extraction RNEasy Plus Mini Kit (QIAGEN). La solution obtenue est ensuite transférée dans un tube de 1,5 mL.
- Pour les PDCLs cultivées en conditions NS (3D) : A l'issue des 72h d'incubation, les sphères en suspension sont transférées dans un tube de 15 mL et centrifugées à 300g pendant 1min. Elles sont ensuite lavées rapidement avec 1mL de DPBS 1X, puis centrifugées à nouveau à 300g pendant 1min avant d'être lysées avec 350 ou 600 µL de tampon RLT Plus Buffer (QIAGEN). La solution obtenue est transférée dans un tube de 1,5 mL.

A l'issue de la lyse, les extraits cellulaires obtenus peuvent être utilisés immédiatement ou stockés à -20°C.

VI.1.2.Extraction et purification de l'ARN des PDCLs

Les extraits cellulaires obtenus après lyse cellulaire sont filtrés successivement sur différentes colonnes avec des tampons spécifiques afin d'éliminer l'ADN génomique et obtenir un échantillon d'ARN pur. Cette étape est réalisée selon le protocole fourni avec le kit RNeasy Plus Mini Kit et disponible sur le site de QIAGEN (« HB-0405-005_HB_RNY_Plus_0920_WW.pdf ») (Figure 63).

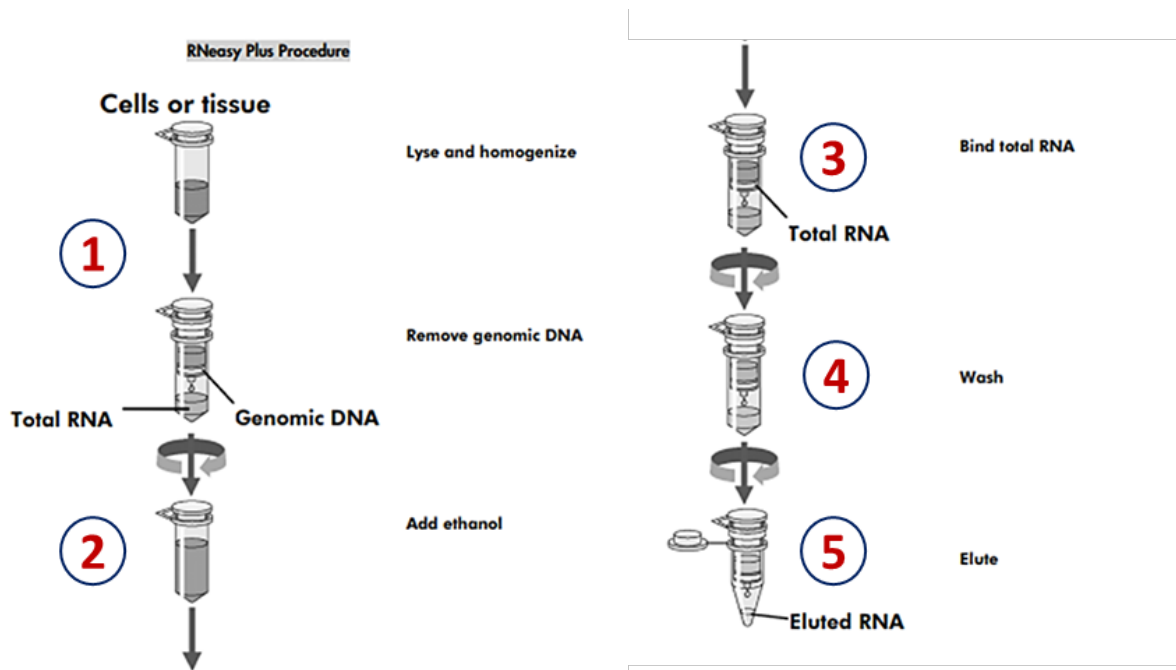


Figure 63: Schéma récapitulatif des étapes de purification sur colonnes de l'ARN des PDCLs (QIAGEN RNeasy Plus Mini Kit Handbook)

VI.1.3.Dosage et évaluation de la pureté des échantillons d'ARN au spectrophotomètre

La pureté et la concentration en ARN des échantillons sont évaluées avec un spectrophotomètre UV-Visible NanoDrop™One (ThermoFisher). Un blanc est effectué à l'aide d'une goutte de 1 à 2µL de la solution d'eau RNase-free dans laquelle les ARN ont été élués. Chaque échantillon est ensuite dosé à l'aide d'une goutte de 1 à 2µL. de l'extrait d'ARN. Le NanoDrop™ affiche un spectre d'absorption et indique la concentration en ARN (ng/µL) ainsi que les valeurs des rapports A260/280 et A260/230. Un échantillon pur doit avoir un rapport A260/280 compris entre 1,8 et 2,1 et un rapport de A260/230 compris entre 1,8 et 2,2.

VI.2. Transcription inverse de l'ARN en ADNc

La transcription inverse nécessaire à la RTqPCR est réalisée avec le kit « iScript™ Reverse Transcription Supermix » (Biorad). Elle est généralement effectuée avec 1 µg ou 0,5 µg d'ARN si la concentration de l'échantillon est limitée (< 60 ng/µL). Les différentes étapes sont indiquées dans le protocole disponible sur le site de Biorad : document 6031 « iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR Product Information Sheet » (www.biorad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/10020178.pdf). Une fois le mélange réactionnel préparé, les échantillons sont déposés dans un thermocycleur (T100, Biorad) et la réaction de transcription inverse est réalisée avec le programme iScript. A l'issue de la réaction, les échantillons sont transférés sur glace pour une utilisation immédiate ou stockés à -20°C.

VI.3. RTqPCR

VI.3.1. Lancement de la RTqPCR

La RTqPCR est réalisée dans une plaque de réaction optique MicroAmp™ 96 puits (Applied Biosystems™). Un milieu réactionnel est préparé pour chaque primer pour un volume final de 15 µL par puit (Tableau 15).

Réactif	Volume / puit
SYBR Green™	10 µL
Primer QIAGEN	1 µL
Primers Invitrogen	0,06 µL
Eau MilliQ	qsp 15 µL

Tableau 15 : Composition du milieu réactionnel pour la RTqPCR

15 µL de mélange réactionnel sont déposés dans chaque puit selon les primers utilisés. Pour chaque gène, chaque condition est réalisée en triplicatas. En parallèle, la solution d'ADNc issue de la transcription inverse est diluée 5 fois dans de l'eau MilliQ (80 µL ajoutés au 20 µL d'ADNc) et 5 µL sont ajoutés dans les puits de la plaque optique pour la RTqPCR (MicroAmp™ optical reaction plate, Applied Biosystems™). La plaque est ensuite scellée avec un film adhésif optique (10095714, Applied Biosystems™) et centrifugée 2 min à 1800 rpm et à température ambiante.

La RTqPCR est réalisée avec l'appareil de PCR en temps réel StepOnePlus™ (4376357, Thermofisher) et lancée sur le logiciel StepOne™ (v2.3) avec les réglages suivants :

- **Instrument** : StepOnePlus™
- **Type of experiment** : Quantitation – Comparative C_T
- **Reagents** : SYBR Green Reagents
- **Ramp speed**: Fast (40min to a complete run)

Gènes cibles	Fabricant	Référence	Transcrit détecté	Taille de la bande	Position de référence
HIF1A	QIAGEN	PPH01361B-200	NM_001243084 (3979 bp)	97	2315
EPAS1	QIAGEN	PPH02551C-200	NM_001430 (5184 bp)	88	2730
GLUT1	QIAGEN	PPH14692A-200	NM_020231 (1973 pb)	85	462
POU5F1	QIAGEN	PPH02394E-200	NM_001173531 (1589 pb)	138	1401
VEGFA	QIAGEN	PPH00251C-200	NM_001025366 (3677 pb)	71	3169

Gènes de référence	Fabricant	Séquence du primer Forward	Séquence du primer Reverse
PPIA	Invitrogen	5'-GCCGAGGAAAACCGTGTACT-3'	5'-TCGACGGCAATGTCTGAAGAA-3'
UBB	Invitrogen	5'-GCTTTGTTGGGTGAGCTTGT-3'	5'-CGAAGATCTGCATTTTGACCT-3'

Tableaux 16: Caractéristiques des primers utilisés pour la RTqPCR

VI.4. Analyse des résultats

Toutes les analyses sont effectuées à partir de deux contrôles endogènes : les gènes UBB et PPIA. Ils ont été préalablement testés sur toutes les PDCLs et montrent les C_T les plus homogènes, sans variations liées aux variations d'O₂.

Pour chaque lignée, les analyses consistent en une quantification relative de l'ARN de chaque gène d'intérêt en évaluant soit l'impact du taux d'O₂, soit l'impact du traitement au PT2385.

Pour cela, deux types de comparaisons sont effectués pour chaque lignée :

- La variation du taux d'O₂ : **21% O₂** vs **1% O₂**
- Le traitement au PT2385 : **1% O₂ Non traité** vs **1% O₂ + 20µM de PT2385**

Pour chaque condition, le coefficient de quantification relative (RQ) est calculé par le logiciel selon la formule suivante :

$$RQ = 2^{-[(CT \text{ gene cible} - CT \text{ ctrl endogène})_{\text{sample}} - (CT \text{ gene cible} - CT \text{ ctrl endogène})_{\text{calibrateur}}]}$$

Pour chaque expérience, les valeurs des RQ sont normalisées par rapport à :

- l'échantillon à 21% d'O₂ pour les comparaisons liées aux taux d'O₂
- l'échantillon non traité à 1% d'O₂ pour l'évaluation des traitements au PT2385

Les résultats présentés sont issus de la moyenne des RQ de trois expériences indépendantes.

VII. Identification des gènes cibles de HIF-2 α par CUT&RUN sur les PDCLs

VII.1. Préparation des échantillons et séquençage

Dans le cadre du CUT&RUN (Cleavage Under Target & Release Using Nuclease), toutes les PDCLs utilisées ont été cultivées pendant 72h à 1% d'O₂. Selon les conditions, 150 000 ou 500 000 cellules ont été extraites (Tableau 17).

Echantillon	Nb de cellules
35MNL_p17_contrôle sans anticorps	500 000
35MNL_p17_Hyp	500 000
68MNL_p20_Hyp	150 000
69MNL_p17_Hyp	500 000
83MNL_p19_Hyp	500 000

Tableau 17 : Nombre de cellules utilisées pour les différents échantillons dans le cadre du CUT&RUN

Le protocole d'extraction est strictement similaire à celui décrit par Hainer et Fazzio pour des facteurs de transcription de cellules de mammifères (Hainer and Fazzio, 2019) (Figure 64). Toutes les solutions ont été préparées selon les compositions décrites par Moore (Moore, 2001).

L'anticorps anti-HIF-2 α utilisé est la référence « ep190b » (Invitrogen). Tous les échantillons ont été comparés à une condition contrôle sans anticorps, notée 35 MNL p17 sans anticorps.

La préparation des bibliothèques a été effectuée sur la plateforme GenomEast de l'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire à l'aide du TruSeq Stranded mRNA Reference Guide - PN 1000000040498. Illumina-TruSeq RNA UD Indexes (96 index, 96 échantillons) (Illumina, San Diego, États-Unis), conformément aux instructions du fabricant. En bref, après purification avec des billes magnétiques poly-T oligo attachées, l'ARNm a été fragmenté en utilisant des cations divalents à 94°C pendant 8 minutes. Les fragments d'ARN clivés ont été copiés dans l'ADNc du premier brin en utilisant la transcriptase inverse et des amorces aléatoires. La spécificité de brin a été obtenue en remplaçant dTTP par dUTP lors de

la synthèse d'ADNc second brin à l'aide d'ADN polymérase I et de RNase H. Après l'ajout d'une seule base « A » et la ligature ultérieure de l'adaptateur sur des fragments d'ADNc double brin, les produits ont été purifiés et enrichis en PCR (30 s à 98 oC ; [10 s à 98 oC, 30 s à 60 oC, 30 s à 72 oC] x 12 cycles ; 5 min à 72 oC) pour créer la banque d'ADNc. Les amorces PCR excédentaires ont ensuite été éliminées par purification à l'aide de billes de sélection SPRI (Beckman-Coulter, Villepinte, France) et la qualité des bibliothèques d'ADNc finales a été vérifiée et quantifiée par électrophorèse capillaire. Les bibliothèques ont été séquencées sur un séquenceur Illumina HiSeq 4000 en lecture unique de 50 bases. L'analyse d'image et l'appel de base ont été effectués à l'aide de la version 2.7.7 de RTA et de la version 2.20.0.422 de bcl2fastq.

VII.2. Séquençage et alignement des données

- Type de séquençage : en paire (paired-end)
- Assemblage du génome : hg38

Les données ont été prétraitées avec Cutadapt (Martin, 2011) v1.18 pour couper les séquences d'adaptateur (Nextera Transposase Sequence) à partir de l'extrémité 3' des lectures. Cutadapt a été utilisé avec les paramètres suivants "-a AGATCGGAAGAG -A AGATCGGAAGAG -m 25:25".

Les lectures ont été cartographiées sur le génome d'Homo Sapiens (assemblage hg38) à l'aide de Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) v2.2.8 avec les paramètres par défaut, à l'exception de « -end-to-end -very-sensitive -no-mixed -no-discordant -I 10 » X 700 » (Tableau 18).

Sample ID	Sample name	Raw pairs	Aligned pairs	Multimapped pairs	Unmapped pairs
SHFL52	35MNL_Hyp_500K_CTLnoAb	60,270,350	41826742 (69.40%)	8005528 (13.28%)	10438080 (17.32%)
SHFL53	35MNL_Hyp_O2_500K	65,071,831	44058925 (67.71%)	8491378 (13.05%)	12521528 (19.24%)
SHFL55	68MNL_Hyp_150K_2	16,272,390	12316071 (75.69%)	2489455 (15.30%)	1466864 (9.01%)
SHFL56	69MNL_Hyp_500K_1	31,186,515	23005210 (73.77%)	5528626 (17.73%)	2652679 (8.51%)
SHFL58	83MNL_Hyp_500K_1	26,397,736	19684793 (74.57%)	3980143 (15.08%)	2732800 (10.35%)

Tableau 18 : Caractéristiques des données issues du CUT&RUN et analysées dans ce projet : nombre de lectures alignées sur le génome d'Homo sapiens. « Raw pairs » correspond au nombre de séquences de paires de lectures. « Aligned pairs » correspond au nombre de paires de lectures alignées. « Multimapped pairs » correspond au nombre de paires de lectures alignées >1 fois. « Unmapped pairs » correspond au nombre de lectures alignées 0 fois.

VII.3. Peak calling

Avant le peak calling, les lectures tombant dans les régions de la liste noire « Encode v2 » (Amemiya et al., 2019) ont été supprimées à l'aide de BEDtools intersect v2.30.0 (Quinlan and Hall, 2010). Le peak calling a été effectué avec Macs2 v2.2.7.1 avec les paramètres suivants "-g hs -scale-to large -q 0.01." Les pics ont été annotés par rapport aux caractéristiques génomiques à l'aide de Homer v4.11.1 (Heinz et al., 2010).

VII.4. Enrichissement

Les heatmaps ont été générées à l'aide de Deeptools (Ramírez et al., 2016) v3.5 en utilisant l'outil bamCoverage pour générer des fichiers bigwigs avec un pas de 10 nt. Les fichiers Bigwig ont été normalisés à l'aide de la méthode CPM et d'une taille de génome effective de 2913022398. Ensuite, l'outil Deeptools computeMatrix v3.5 a été utilisé pour générer une matrice de comptage aux positions d'intérêt. Enfin, l'outil Deeptools plotProfile v3.5 a été utilisé pour générer des tracés de profil moyen et l'outil Deeptools plotHeatmap v3.5 a été utilisé pour générer une carte thermique.

VII.5. Analyse des enrichissements associés aux voies de signalisation

Le « upset plot » comparant les positions des pics HIF2 a été créé à l'aide de scripts R internes basés sur le package Bioconductor ComplexHeatmap v2.10.0 (Gu et al., 2016).

Les analyses de surreprésentation pour les voies WikiPathways, KEGG et GO BP et les dotplots, cnetplots et des emaplots montrant les résultats de l'analyse d'enrichissement fonctionnel ont été générés à l'aide du package R cluster Profiler v4.2.1 (Yu et al., 2012). Un seuil de valeur p de 0,05 a été utilisé pour les analyses d'enrichissement des KEGG et WikiPatchways et un seuil de valeur p de 0,01 a été utilisé pour l'analyse d'enrichissement GO BP.

Pour détecter les motifs d'ADN dans les régions ayant des pics HIF2, meme-chip v4.10 (Machanick and Bailey, 2011) a été utilisé avec défaut paramètres sauf pour « -meme-mod zoops -meme-nmotifs 20 -meme-minw 8 -meme-maxw 15 ». Des motifs ont été détectés dans des séquences situées à +/- 30 nt autour des sommets des pics pour les 800 plus pics HIF2 enrichis. Bedtools slop et Bedtools getfasta v2.30.0 (Quinlan and Hall, 2010) ont été utilisés pour calculer les régions +/-30nt autour des sommets des pics et extrait les séquences nucléotidiques respectivement.

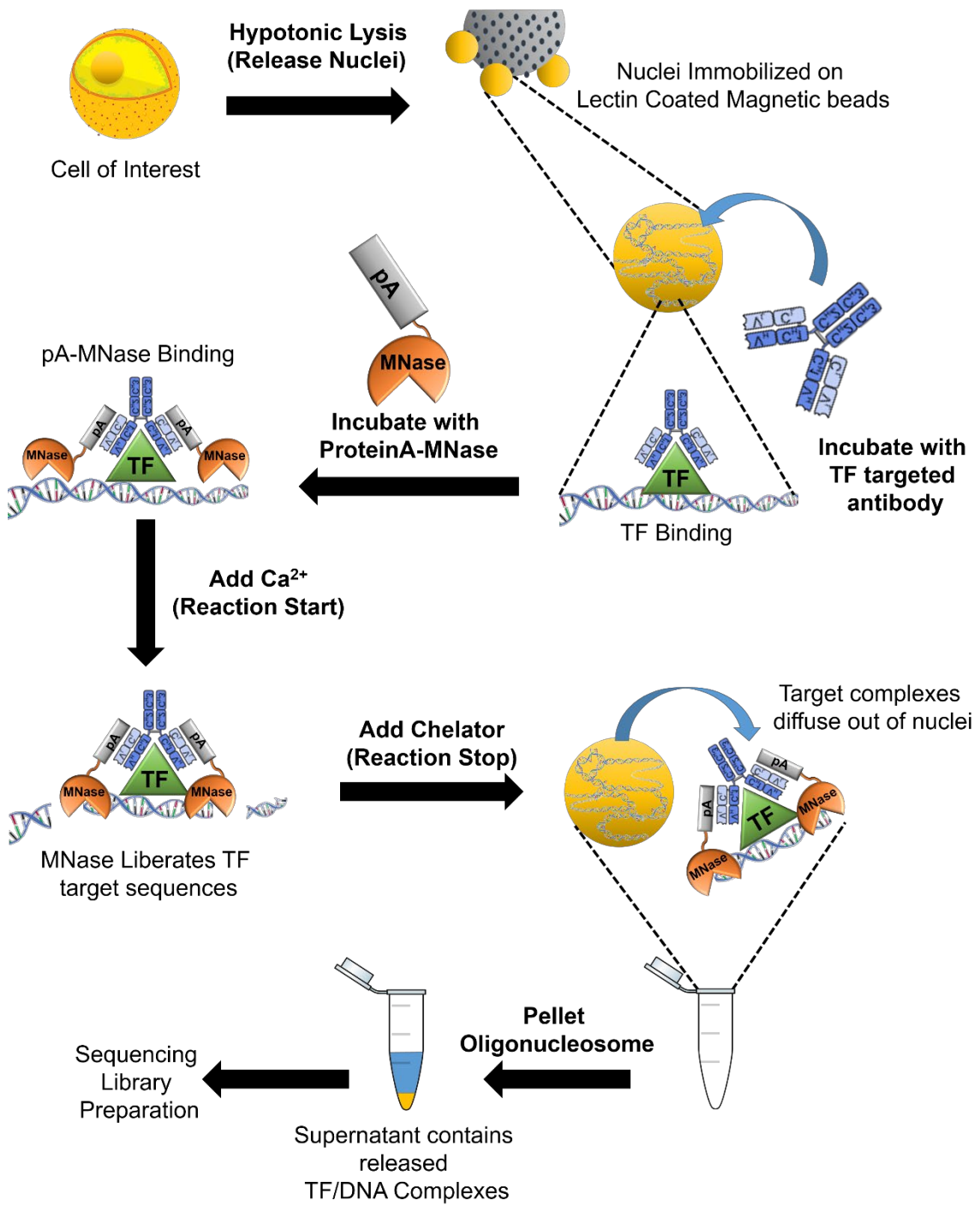


Figure 64 : Représentation conceptuelle du principe de la technique de séquençage de CUT&RUN (ArtWork réalisé par Mannan369, Wikipédia)

VIII. Analyses métabolomiques de PDCLs de GHG pédiatriques

VIII.1. Culture et fixation des PDCLs

Pour les expériences de métabolomiques, les lignées ont été mises en culture dans des T75 à 21% d'O₂, 1% d'O₂ ou 1% d'O₂ + PT2385 20μM pendant 72h. Les cellules ont ensuite été dissociées à l'Accutase selon le protocole standard (cf I.2) et immédiatement transférées sur glace de manière à ralentir le métabolisme cellulaire et conserver l'état des métabolites présents en hypoxie. Après élimination de l'Accutase, des culots secs sont réalisés dans des tubes de 1,5 mL et sont plongés dans l'azote liquide afin de figer instantanément les cellules et les métabolites qu'elles contiennent. Les tubes sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à la quantification des métabolites.

VIII.2. Quantification des métabolites

La quantification des métabolites a été réalisée sur l'expérience 1D ¹H CPMG en utilisant la méthode Pulcon (Wider and Dreier, 2006). Cette expérience a été acquise avec les paramètres suivants : largeur de balayage = 14 ppm, nombre de points = 32 k, délai de relaxation = 2 s et temps d'acquisition = 2,3 s. Un total de 128 numérisations ont été acquises, résultant sur un temps d'acquisition total de 10 min. Le délai inter-impulsions entre les impulsions à 180° du train d'impulsions CPMG a été fixé à 285μs et le nombre de boucles a été fixé à 328, donnant au train d'impulsions CPMG une durée totale de 93 ms. Tous les spectres ont été enregistrés de telle manière à ce qu'une seule correction de phase d'ordre zéro était nécessaire pour mettre correctement en phase le spectre. Le spectromètre RMN a été calibré avec un étalon externe d'Alanine dans du D₂O (oxyde de deutérium ou eau deutérée) contenant 68,9 nmoles d'Alanine.

IX. Etude de la radiosensibilité des PDCLs

IX.1. Tests de prolifération après irradiations des PDCLs

Les PDCLs ont étéensemencées dans des flasques de type T25 (Nunc) à des densités de 3.10⁵ à 6.10⁵ cellules et cultivées en conditions hypoxiques (1% O₂) pendant 24h. A l'issue de ces 24h, les cellules ont été irradiées à une dose unique de 2, 4, 6 ou 10Gy. L'irradiation photonique a été réalisée à l'aide d'un accélérateur linéaire PRIMUS (Siemens), avec des photons d'énergie de 6 MV et un débit de dose de 200 UM/min.

A l'issue de ces irradiations, les PDCLs ont été incubées à 1% d'O₂ et laissées au repos pendant 24h avant d'être dissociées à l'Accutase et ré-ensemencées dans des plaques 96 puits (TPP), à raison de 3000 à 5000 cellules par puit. La confluence/taille des sphères ont ensuite

été suivies en temps réel par la technologie Incucyte® ZOOM sur une durée de 144h, à raison d'une image toutes les 4h. La confluence/taille de sphères ont été normalisées par rapport à la confluence/taille des sphères initiales au temps zéro. Des courbes de doses-réponses ont été modélisées sur le logiciel GraphPad Prism v9. Pour chaque lignée, les confluences/tailles des sphères à 144h de chaque condition d'irradiation ont été normalisées par rapport à la confluence/taille des sphères de la condition contrôle non irradiée.

IX.2. Evaluation de la radiosensibilité des PDCLs par des tests γ H2AX

IX.2.1. Culture des PDCLs en Lab-teks™

Les PDCLs ont étéensemencées dans des Lab-teks™ de 8 puits selon les densités indiquées dans le tableau 19.

PDCLs	Nombre de cellulesensemencées par puit en Labteks 8 puits
BT35 2D	10 000
BT68 2D	20 000
BT69 2D	25 000
BT83 2D	10 000

Tableau 19 : Nombre de cellulesensemencées par puit dans les lab-teks™ 8 puits pour les tests d'irradiations

Selon les conditions, les cellules ont été cultivées en hypoxie à 1% d'O₂ durant 72h et traitées ou non avec 20µM de PT2385, ajoutés au moment de l'ensemencement. Les PDCLs ont ensuite été irradiées par une dose unique de 2Gy après 72h d'incubation. Ces expérimentations ont été effectuées au sein du Centre de cancérologie Paul Strauss (ICANS, Strasbourg, France). Les PDCLs ont été cultivées sur place et l'irradiation photonique a été réalisée à l'aide d'un accélérateur linéaire PRIMUS (Siemens), avec des photons d'énergie de 6 MV. Les cellulesensemencées ont été irradiées avec un débit de dose de 200 UM/min. Toutes les PDCLs ont été fixées à la PFA 4% et 24h après les irradiations. Des conditions contrôles ont été réalisées en parallèle, pour lesquelles les PDCLs n'étaient pas irradiées (NI) et/ou traitées avec du DMSO 0,1% en place du PT2385 (NT) (Figure 65).

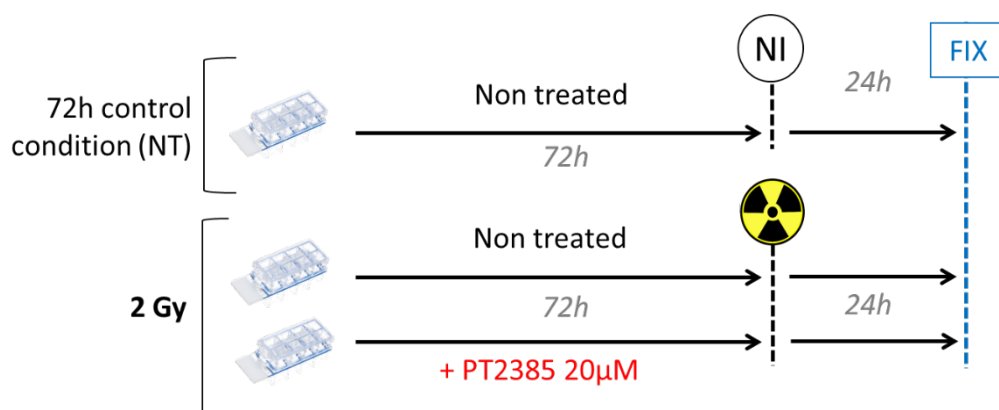


Figure 65 : Protocole expérimental des irradiations des PDCLs avec pré-traitement ou non au PT2385 (antagoniste de HIF-2 α). NT, Non traitées ; NI, non irradiées, FIX, fixation à la PFA

IX.2.2. Quantification des foci H2AX en IF

Après fixation, les cellules ont été marqués par un anticorps primaire anti- γ H2AX (1:500, 05-636I Merck), puis par un anticorps secondaires Alexa Fluor™ 568 (1:2000, A11004 Invitrogen). Pour évaluer la radiosensibilité des PDCLs, les cellules marquées ont été observées au microscope confocal au grossissement 63X (paramètres similaires au V.2). Les images obtenues ont été analysées sur ImageJ (v1.53) par la macro « Noyau and Foci v1.2 », développée par Romain Vauchelles, ingénieur d'étude et responsable de la plate-forme d'imagerie quantitative (PIQ) de notre laboratoire. La macro détecte automatiquement les noyaux via le canal 1 associé au DAPI et les foci γ H2AX via le canal 4 et associe un nombre de foci à chaque noyau détecté. Les résultats ont été extraits dans un fichier xls et analysés via GraphPad Prism v9. Le nombre de foci moyen par cellule a été moyenné sur l'ensemble des cellules observées (au minimum 100 par réplica) dans chaque condition testée. Pour chaque condition, l'expérience a été réalisée en triplicatas. Le nombre moyen de foci γ H2AX a été comparé entre chaque condition pour déterminer de taux de dommages de l'ADN en réponse aux irradiations et évaluer la radiosensibilité des PDCLs après traitement ou non au PT2385.

X. Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en duplicata ou triplicata. Les analyses statistiques ont été effectuées pour comparer les différentes conditions traitées et les conditions non traitées. Lorsque seulement deux conditions ont été comparées, le test statistique consistait en un t-test paramétrique ou non paramétriques selon que les données suivent ou non la loi Normale. Lorsque plus de 2 conditions ont été comparées, un test ANOVA corrigé par un post-test Kruskal Wallis ou Dunnett ont été utilisés. Le seuil de significativité statistique a été

déterminé pour une valeur $p < 0,05$ et contrôlé sur un intervalle de confiance de 95%. L'ensemble de ces analyses ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism v9.

RESULTATS

Hypoxia Inducible Factors' Signaling in Pediatric High-Grade Gliomas: Role, Modelization and Innovative Targeted Approaches

L'objectif de ce premier papier était d'établir un état des lieux général sur les études et les connaissances actuelles sur les rôles des facteurs HIFs dans les GHG pédiatriques ainsi que les modèles d'études *in-vitro* utilisés à ce jour. Pour cela, nous avons résumé le rôle de l'hypoxie dans le cerveau dans des conditions physiologiques ainsi que les conséquences de l'hypoxie intra-tumorale dans les GHG adultes et pédiatriques. Nous sommes revenus sur les différents mécanismes moléculaires connus pour être modulés par les facteurs HIF-1 α et HIF-2 α et les notions d'hypoxie aiguë, chronique et cyclique ont été présentées. Ceci nous a ensuite permis d'aborder les approches thérapeutiques actuelles visant à cibler les facteurs HIF et les différents modèles d'étude *in-vitro* utilisés. Cette review a notamment permis de souligner le manque d'étude actuel traitant de l'impact du microenvironnement tumoral hypoxique sur le développement et la progression des GHG pédiatriques, alors que de premières approches suggèrent un potentiel thérapeutique intéressant dans la lutte contre ces tumeurs.

Review

Hypoxia Inducible Factors' Signaling in Pediatric High-Grade Gliomas: Role, Modelization and Innovative Targeted Approaches

Quentin Fuchs ¹, Marina Pierrelvein ¹, Melissa Messe ¹, Benoit Lhermitte ^{1,2}, Anne-Florence Blandin ³, Christophe Papin ⁴, Andres Coca ⁵, Monique Dontenwill ¹ and Natacha Entz-Werlé ^{1,6,*}

¹ UMR CNRS 7021, Laboratory Bioimaging and Pathologies, Tumoral Signaling and Therapeutic Targets team, Faculty of Pharmacy, 74 route du Rhin, 67405 Illkirch, France; quentin.fuchs@unistra.fr (Q.F.); marina.pierrelvein@etu.unistra.fr (M.P.); melissa.messe@etu.unistra.fr (M.M.); benoit.lhermitte@chru-strasbourg.fr (B.L.); monique.dontenwill@unistra.fr (M.D.)

² Pathology Department, University Hospital of Strasbourg, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg, France

³ Pediatric Oncology, Dana Farber Institute, Boston, MA 02215, USA; aneflorence.blandin@gmail.com

⁴ Inserm U1258, UMR CNRS 7104, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Université de Strasbourg, 67400 Illkirch, France; papin@igbmc.fr

⁵ Neurosurgery, University Hospital of Strasbourg, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg, France; hugoandres.coca@chru-strasbourg.fr

⁶ Pediatric Onco-Hematology Department, Pediatrics, University hospital of Strasbourg, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg, France

* Correspondence: Natacha.entz-werle@chru-strasbourg.fr; Tel.: +33-388128396; Fax: +33-388128092

Received: 4 March 2020; Accepted: 7 April 2020; Published: 15 April 2020



Abstract: The brain tumor microenvironment has recently become a major challenge in all pediatric cancers, but especially in brain tumors like high-grade gliomas. Hypoxia is one of the extrinsic tumor features that interacts with tumor cells, but also with the blood–brain barrier and all normal brain cells. It is the result of a dramatic proliferation and expansion of tumor cells that deprive the tissues of oxygen inflow. However, cancer cells, especially tumor stem cells, can endure extreme hypoxic conditions by rescheduling various genes' expression involved in cell proliferation, metabolism and angiogenesis and thus, promote tumor expansion, therapeutic resistance and metabolic adaptation. This cellular adaptation implies Hypoxia-Inducible Factors (HIF), namely HIF-1 α and HIF-2 α . In pediatric high-grade gliomas (pHGGs), several questions remained open on hypoxia-specific role in normal brain during gliomagenesis and pHGG progression, as well how to model it in preclinical studies and how it might be counteracted with targeted therapies. Therefore, this review aims to gather various data about this key extrinsic tumor factor in pHGGs.

Keywords: high-grade gliomas; pediatric; hypoxia; HIFs

1. Introduction

Pediatric high-grade gliomas (pHGG) are aggressive and incurable tumors of the central nervous system (CNS). These infiltrative solid tumors account for 15% to 20% of all pediatric brain tumors and represent the leading cause of morbidity and death related to cancer during childhood and adolescence [1]. Only forty percent of the pHGGs originated from cerebral hemispheres and the remaining 60% are located in the midline (half in the brainstem and pons and half in the thalamus) [2]. The common standard protocol to treat hemispheric pHGG is largely inspired by adult glioblastomas and starts with surgical resection of the tumor, followed by radiotherapy and chemotherapy [3–5].

Unfortunately, with this type of protocol, up to 80% of children will finally relapse in the two following years, more rapidly than adult high-grade gliomas (aHGGs). In midline pHGGs, due to the widespread invasiveness of HGG cells, complete surgical resection is quite complex with the coexistence side by side of malignant and healthy cells. While many other pediatric cancers have experienced therapeutic management advances in recent decades, the median survival of pHGG has remained unchanged, with a range from 12 to 15 months in hemispheric and thalamic locations and from 9 to 12 months in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPGs). For all these reasons, there is a pressing need for novel therapeutic approaches to treat pHGGs. The first step was to understand and characterize intrinsic and extrinsic tumor features to reproduce pHGG conditions and be able to model it in *in vitro* and *in vivo* preclinical studies.

Since 2010 [6–8], clearer intrinsic pHGG features have arisen from molecular and genomic studies that led to the update in 2016 of the World Health Organization (WHO) classification of CNS tumors and its continuous improvement [9,10]. These molecular insights differentiated pHGGs from their adult counterparts, except for thalamic locations, where similar genomic features can be described in both [11]. Those studies evidenced driver mutations on histone H3 and their impact on patient outcome, linking H3.3 mutations to a specific brain location and to a worst evolution compared to H3.1 mutation [2,12,13]. Additionally, to those genomic modifications, several mutations or CNVs (Copy Number Variations) are also described mainly on *ACVR1* (Activin A receptor type I), *TP53*, *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor), *ATRX* (Alpha-Thalassemia/mental Retardation X-linked), *PTEN* (Phosphatase and TENsin homolog) or *PDGFRA* (Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha) [2,6–8,12–14]. Other rare driver mutations are also observed on *BRAF* or *IDH1* (Isocitrate DeHydrogenase 1). All these molecular abnormalities opened the path to new treatment approaches, but also increased knowledge on tumor heterogeneity and, thus, tumor complexity [15,16]. These molecular aspects are fundamentally different from those observed in aHGGs, explaining the specificities of pHGG and how they are divergent from the aHGGs in terms of cellular origins, epidemiology, genetic complexity, driver mutations, but also their specific extrinsic tumor features such as interactions with local hypoxic environment and brain locations [17].

For extrinsic tumor features, studies mainly focus on brain microenvironment, taking into account vascular cells, brain cells and their electric activity, but also immune cells [18,19]. As most solid tumors, one key of the brain microenvironment in pHGGs seems to be hypoxia, as a result of the dramatic proliferation and expansion of tumor cells that deprive the tissues of oxygen inflow [18,20–25]. Basically, hypoxia has deleterious effects on normal cells that rapidly undergo apoptosis or necrosis after prolonged oxygen deprivation [26]. However, cancer cells, especially tumor stem cells, can endure extreme hypoxic conditions by rescheduling various genes' expression involved in cell proliferation, metabolism and angiogenesis and thus, promote tumor expansion, resistance, and metabolic adaptation. This cellular adaptation implies HIFs (Hypoxia-Inducible Factors), namely HIF-1 α , HIF-2 α and HIF-3 α [27–29]. These transcription factors mediate several key pathways in cancer and might represent interesting targets for cancer treatments, especially in pHGGs [21,24,29]. Nevertheless, several questions remained open specifically in pHGGs on the role of hypoxia in the brain during gliomagenesis, pHGG cell proliferation and widespread across normal structures, as well how to model it in preclinical studies and how it might be counteracted with targeted therapies. Therefore, this review aims to gather various data about extrinsic and intrinsic pHGG features that might interfere with intra-tumor hypoxia and where HIFs play central roles (Figure 1).

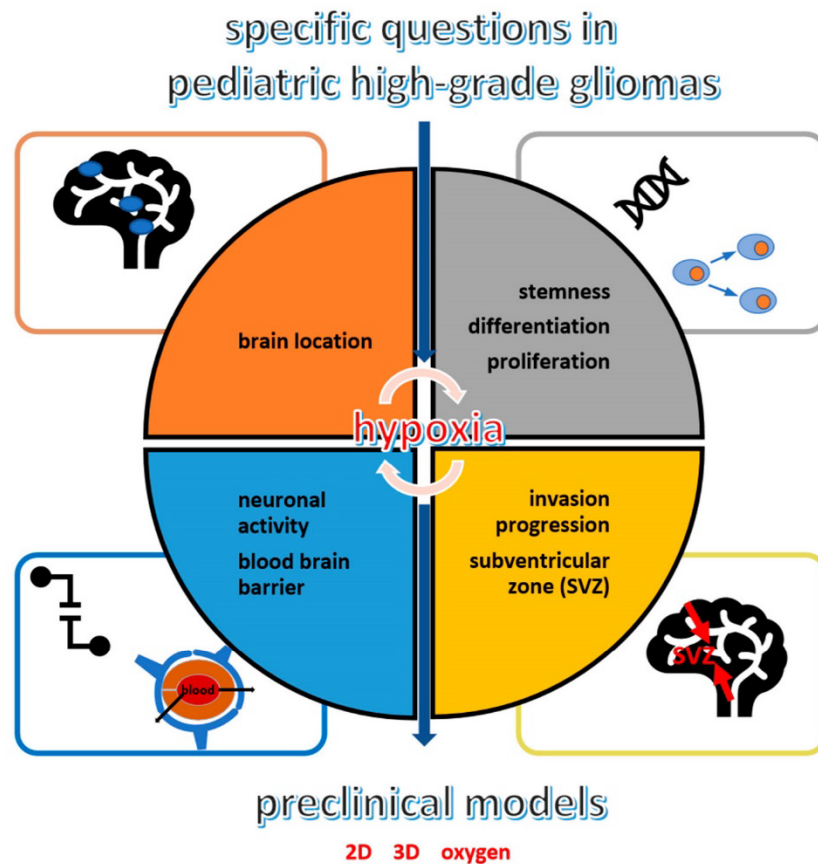


Figure 1. Specific questions on pediatric high-grade gliomas (pHGGs): hypoxia links with locations (orange), cell properties (grey), propensity to migrate especially from and in a subventricular zone (SVZ) (yellow) and the neuronal/blood–brain barrier environment (blue).

2. Role of Brain Physiological Hypoxia Location or Brain Physioxia and the Sub-Ventricular Zone in pHGGs

Hypoxia is a general concept referring to decreased oxygen (O_2) amounts reaching a tissue. However, in humans, physiological O_2 levels in healthy tissues vary from 3% to 10% [21,30,31]. Thus, the physiologically hypoxic conditions are organ-dependent and can be renamed physioxia. Furthermore, O_2 is not homogeneously distributed into one single organ but unevenly distributed in tissues, creating O_2 gradients [32]. The brain is one of the organs with the poorest tissue oxygen concentrations, covering a range from 3% to 4.5% [30,31,33]. This is the equivalent of an oxygen partial pressure (pO_2) of about 25 to 48 mmHg, depending on altitude. Any oxygen level below this value would be considered brain hypoxia. The high brain energy requirements compared to the paradoxically low brain energy reserves implies that the brain will need continuous oxygen inflows through a very developed and active vascularization. In fact, any important oxygen fluctuation can cause nerve cell injuries. Hippocampus and cerebellum neurons seem very sensitive and hypoxia-intolerant [26], whereas neural stem-cells require hypoxic niches to remain in an undifferentiated state and maintain their pluripotency [34]. The physiological hypoxic niches are notably located in the sub-ventricular zone (SVZ) along the lateral walls of the lateral ventricles, the major site of post-natal continuous neurogenesis [23,34,35]. Controversial studies have investigated this SVZ niche as a region originating glioma stem cells [36,37]. Among those publications, signaling via mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), protein activating HIF-1 α , has been proposed to regulate self-renewal, proliferative divisions, differentiation, and brain ventricle morphogenesis in this SVZ [38]. HIF-1 α was also described as a repressor of BMP (Bone Morphogenetic protein) and thus, promoting HGG

precursors in the SVZ niche [21]. On the other hand, glioma stem cells might directly result from the intra-tumoral hypoxic gradient [39] and explain how the glioma stem cells are located away from the SVZ [40–42]. They are directly initiated in the periphery of the necrotic/hypoxic regions, where HIFs are highly expressed (Figure 2).

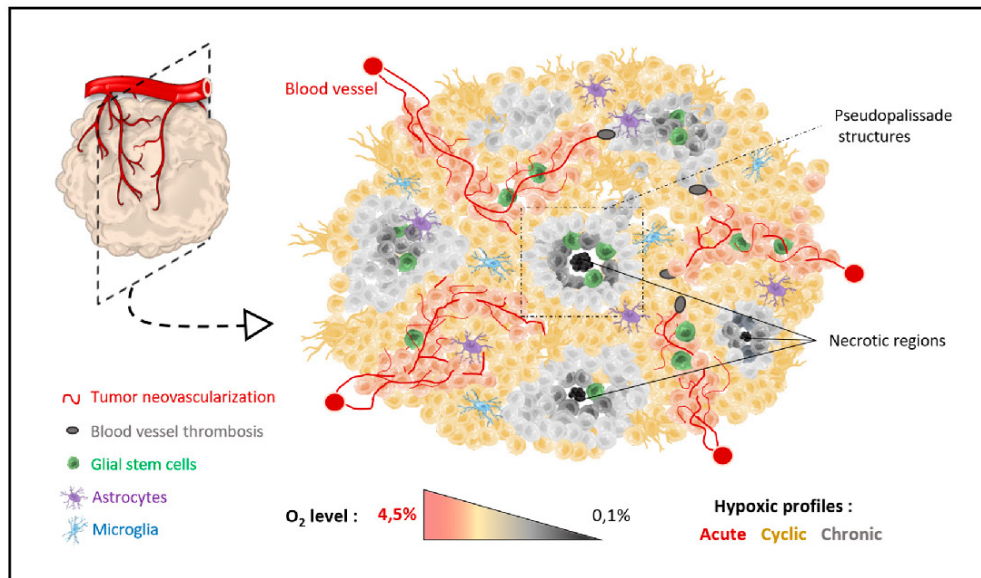


Figure 2. Organization of hypoxic regions across tumors. The pediatric high-grade gliomas are composed by necrotic regions surrounded by pseudopalisade structures and associated with stem cell niches. Neovascularization is starting from the periphery of the tumor and is decreasing in the center. Three hypoxic profiles are, then, described within pHGG tumors: acute, cyclic and/or chronic oxygen tensions.

Despite these contradictory results between SVZ and local hypoxia, it appears that physiological neural stem cells benefit from hypoxic conditions in a healthy brain and are thus capable of self-renewing to give birth to neural cells that migrate while differentiating into mature and functional neurons. Probably, these normal stem cell capacities in hypoxic niches are also used by pHGG stem cells, leading to an even more complex HGG hypoxic environment, unlimited and slow self-renewal and a high propensity to migrate rapidly [43]. This can also explain why a really frequent invasive terminal process in this SVZ is present during pHGG progression. It results from mTor/HIF-1 α expression in the tumors and its close hypoxic environment [13,38,44].

3. Macroscopic and Microscopic Aspects of pHGG Hypoxia within the Tumors

Hypoxia in brain tumors might be closely related to the dramatic proliferation of tumor cells. Tumor expansion progressively deprives tissues from oxygen inflows by increasing their distance from blood vessels. In response to this oxygen deprivation, tumor cells promote neovascularization via VEGF (vascular endothelial growth factor) secretion. However, this tumor neovascularization is very anarchic; it results in the formation of altered and disorganized blood vessels and is unable to assure the complete oxygen delivery to tumor tissues [44]. Even VEGF and its receptor VEGFR hyperexpression have not frequently been observed in the molecular publications on pHGGs; angiogenic features and interactions with angiogenesis have been frequently discussed in preclinical studies, as well as in pHGG and DIPG trials [5,45–48]. For this specific blocking, usually, bevacizumab was used as single agent or in combination with chemo- or radiotherapy. The study of Castel et al. associated this pro-angiogenic signature to H3.1 K27M mutated tumors, but other studies using Magnetic Resonance Imaging (MRI) analyses on T2-weighted sequences showed a direct link between necrotic and hypoxic

zones within pHGGs and more aggressive subtypes like H3.3 K27M mutated DIPG or those bearing TP53 mutation [47,49]. Typical DIPG images have depicted it as arising from the brainstem and being diffusively involved in more than half of the pons. Surprisingly Hoffmann et al. found that the MRIs of short-term survivors were associated with a low necrosis percentage but a less frequent ring enhancement [50]. All those studies might explain a balance between level of hypoxic zones, neoangiogenesis and the high diffusive phenotype of the pHGG cells side to side with normal neurons and fibers, especially in pons.

The MRI imaging also showed a heterogeneous hypoxic environment in pHGG with various oxygen gradients inside one single tumor. In the same tumor, the oxygen level typically can differ in a spatio-temporal manner, creating pockets of regions with a low oxygen level surrounded by regions with a normal oxygen level that could vary over time and might be mostly localized at the tumor periphery (Figure 2). This process can be subdivided into acute, chronic and/or cyclic hypoxia [18,22,27,39,50–52]. Acute hypoxia acts on peripheral cells that are incompletely and intermittently oxygenated by an aberrant neovascularization. The temporal scale for acute hypoxia is generally considered from minutes to several hours. After 24 h of poor oxygen levels, the tumor cells are considered in a chronic hypoxic state and usually located in the furthest part of the tumor from the blood vessels. Lastly, the cyclic hypoxia might be considered as a kind of intermediary between acute and chronic hypoxia. The cells from the intermediate layer of the tumor endure very low oxygen levels for a few minutes to several days before being briefly re-oxygenated by immature blood vessels. These variations can explain HGG stem cell niches [29,36,53], as well as the microscopic architecture characterized by central pseudopalisades associated to neovessels and necrosis [54]. They outline the differences observed between peripheral cells of the tumor, which are oxygenated and bear less aggressive features, and inner core cells with less ring enhancement in the MRI and a very aggressive cell phenotype [37,50] (Figure 2). Usually, those extrinsic hypoxic-related features are correlated to a worst outcome and resistance to treatments (e.g., radio- and chemotherapy) [21,24,50].

4. Hypoxia Inducible Factors (HIFs) in pHGGs

Hypoxia-Inducible Factors are heterodimeric transcription factors composed of a regulating α subunit, which is sensitive to oxygen, and a constitutively expressed β subunit also named ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator). Three different homologous α subunits are commonly described, namely HIF-1, HIF-2 and HIF-3 [18,20,22,27,28,55]. For instance, knowledge is very limited regarding the HIF-3 α role, but HIF-1 α and HIF-2 α are frequently described in hypoxia regulation. HIF- α s are a type of on/off switch for cellular adaptation to hypoxia. In the presence of oxygen, the regulating α subunit undergoes hydroxylation by the PHD (Prolyl Hydroxylase Domain) enzymes, which use oxygen and α -ketoglutarate as substrates and iron and ascorbate as cofactors. HIF- α s are, then, degraded through the proteasome pathway after being recognized and ubiquitinated in the presence of VHL (Von Hippel-Lindau) tumor suppressor. As oxygen level decreases, PHD is inhibited and the HIF- α subunit is no more degraded and accumulates in the nucleus, where it binds to the ARNT subunit. This heterodimeric complex can then fix the HRE (Hypoxia Response Element), inducing various genes' expression mediating cell response to hypoxia. HIF-1 α and HIF-2 α , sharing 48% of their sequences, bind to the same HRE sequences and have many overlapping target genes. However, growing evidence suggests that HIF-1 α and HIF-2 α are differentially regulated in a time-dependent manner. In fact, HIF-1 α is dedicated to acute hypoxia, whereas HIF-2 α seems to be expressed during chronic phase of hypoxia to maintain immature cells and probably pHGG stem cell niches [27,29,35,53,54]. Their hyperexpressions are quite frequent in DIPG and pHGG cohorts. They are usually associated to mTor activation or PI3K (PhosphoInositide 3-kinase)/Akt signaling, just above the central node HIF-1 α /HIF-2 α [2,8,13,24,48]. Preclinical studies inducing HIF-2 α knockdown reduced only in vitro glioma stem cell-mediated angiogenesis and increased glioma cell apoptosis, whereas HIF-1 α knockdown resulted in reduced cell growth in both stem cells and non-stem cells [24,55].

5. HIF Target Genes in pHGG

As already described above, hypoxia, subsequently to HIFs induction, is associated to the expression of various proteins that will increase oxygen inflows in tissues through erythropoiesis (EPO (erythropoietin), transferrine, transferrin receptor) and aberrant neoangiogenesis in tissues (secretion of VEGF and iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase)) [18,20–22,28]. A metabolic adaptation to these low oxygen concentrations is also present with the Warburg effect, inducing glucose transporters and glycolytic enzymes. pHGGs, like most other solid tumors, are highly glycolytic cancers producing large amounts of lactate as a metabolic by-product, increasing resistance to radiotherapy. All these genes have a common objective: adapt the pHGG cells to the newly encountered hypoxia conditions and maintain their proliferation and homeostasis [24,25,56,57].

For cell proliferation, HIF-1 α and HIF-2 α seem to govern differentially their downstream signaling pathways, although in opposite ways [24,27,28] (Figure 3). To regulate cell cycle progression, HIF-1 α inhibits MYC, while HIF-2 α promotes MYC/MYCIN stabilization. On cell lines with poor MYC expression but high HIF-2 α expression, this latter was sufficient to promote cell proliferation in the absence of MYC/MYCIN deregulation. Indeed, the unique inhibition of HIF-2 α , but not HIF-1 α , was sufficient to decrease cell proliferation in MYC amplified cells, suggesting a complex transcriptional synergy between HIF-1 α and HIF-2 α . MYC seems also to maintain self-renewal exclusively in pHGG stem cells by selective binding to the HIF-2 α promoter and the activation of the HIF-2 α stemness pathway [58]. The balanced expression of HIF-1 α /HIF-2 α probably is one of the key drivers of pHGG cell survival and renewal concomitantly to a high level of Oct4 or CD133+ cells [40,58].

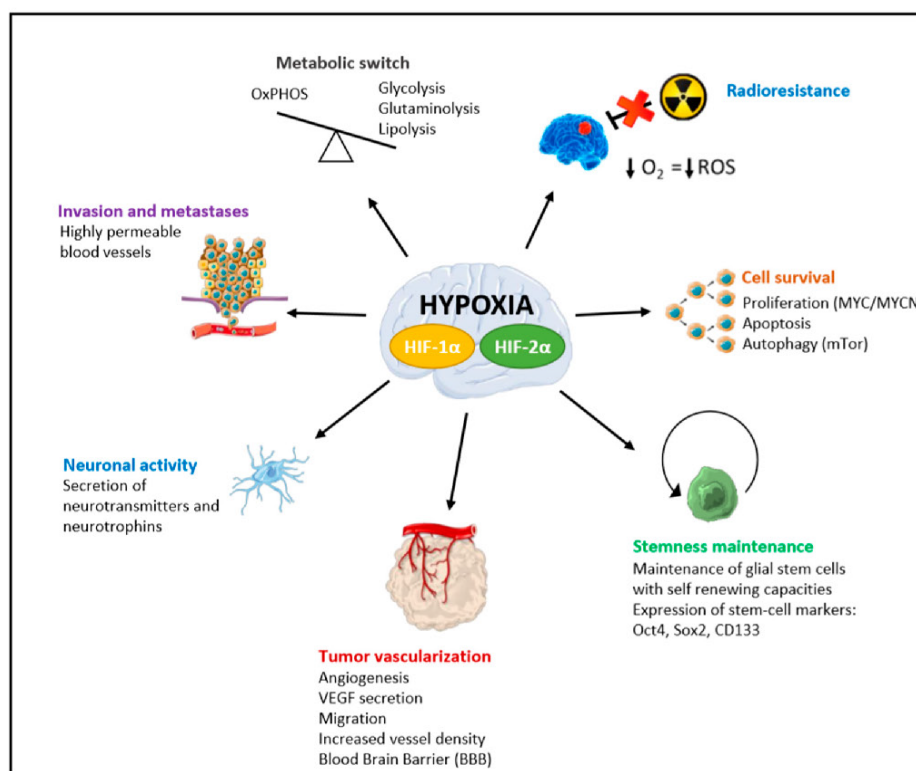


Figure 3. Effects of Hypoxia-Inducible Factors' (HIF-1 α and HIF-2 α) hyperexpressions in pediatric high-grade gliomas. HIFs have a specific role in metabolism, radioresistance, cell survival and stemness maintenance, but also in vascularization, neuronal activity and pHGG cell migration. (OxPHOS = mitochondrial oxidative phosphorylation system, ROS = Reactive Oxygen Species).

For cell homeostasis, in addition to the glycolytic switch, the mitochondrial oxidative phosphorylation system (OxPHOS) usually appears when Warburg effect decreases during tumor reoxygenation, and promotes a smaller pHGG cell viability [56] (Figure 3). However, HIF-1 α and HIF-2 α led the cells to a final complete metabolic reprogramming with the activation of glutaminolysis, serinolysis and/or phospholipid metabolism [24,25]. Glutamine addiction is usually associated to glycolysis impairment and Akt induction in those HGG cells [6]. This was demonstrated in patients' tumors, as well as in pHGG-derived cell lines [24,25]. Glutaminolysis and serinolysis were associated significantly to histone *H3F3A* mutation and phospholipid metabolism to a poorer outcome [25,59,60]. These metabolic alterations represent an onco-requisite factor of pHGG progression and probably tumorigenesis. These metabolism modifications can be explored by MRI spectroscopy as well as FDG-PET (Fluoro-Deoxy-Glucose/Positron Emission Tomography) [61].

Following the metabolic modifications and linked to the oxidative stress, ROS (Reactive Oxygen Species) can increase dramatically and lead to important DNA damages, aiming to destroy tumor cells [62]. The ROS in brain tumors has long been studied since they are major criterion for radiotherapy resistance. Nevertheless, lower is the oxygen level, lower is the rate of ROS produced, resulting in lower DNA damages for the same radiation dose. Hypoxic tumors are, thus, considered as radioresistant cancers. Thus, high hypoxic regions in pHGG are predictive of poor response to radiotherapy with poor overall survival in direct correlation with ROS production. This ROS increase can also lead to autophagy induction and interplay with mTORC1 and MTORC2 hyperexpressions [38].

All those adaptive processes favor invasion and cell migration [21]. In addition, the aberrant vasculature resulting from HIF-hypoxia signaling allows a higher permeability of vessels. In addition to regular vessels, in the brain, there is a specific structure named the blood–brain barrier (BBB) that is considered as the major obstacle to adequate drug delivery in brain tumors [63,64]. The BBB is a neurovascular unit composed of endothelial cells and surrounding pericytes (Figures 1 and 3). Both are characterized at the molecular level by tight junction proteins. Directly on the BBB, astrocytic feet, neurons and microglia are described. Indeed, neurogenesis and angiogenesis share regulatory factors that contribute to the simultaneous formation of vascular networks and neuronal circuits in the brain. The driving pathways of this interplay are usually based on VEGF/VEGFR balance as well as neurotransmitters like dopamine or glutamate that activate hypoxia response and the other way around [19,36,65] (Figure 3). Moreover, the interaction between hypoxic pHGG cells and neuronal activity or neurotransmitters might be now an opening field understanding further tumorigenesis and pave the way for innovative therapeutic strategies.

For instance, to our knowledge, studies in pHGGs on the interplay between immune response and hypoxia or genomic instability are very rare and would give further insight to treatment possibilities.

6. Comparison with Adult High-Grade Glioma (aHGG) Hypoxia

The aHGG are quite different from pHGG in various aspects, explaining the differential roles of hypoxia during their gliomagenesis. Epidemiology, clinical features, outcome, brain locations, as well as genetic and epigenetic abnormalities, are completely divergent between the two age entities.

Immunity and genomic instability are clearly two specific interplays already described with hypoxia in aHGGs. In fact, pHGGs are driven by epigenetic events, mainly mutations involving Histone 3 that are confer a hypomethylated profile, setting them clearly apart from their adult counterparts, where a predominant DNA hypermethylation is usually present [66]. These epigenetic modifications have a direct impact on tumor development and their features. DNA methylation patterns are described in adult cancers as a mechanism explaining the changes in splicing patterns under hypoxia. Recent publications in aHGG described this post-transcriptional process as a new hallmark of aggressiveness and linked intra-aHGG hypoxia to hypermethylation [67]. This RNA splicing is not present and induced in pHGG in association with hypoxia. The other additional impact of hypoxia is its role in aHGG genomic instability, where genomics, epigenomics and hypoxia are directly linked together [68].

The other main difference between adult and pediatric patients is the tumor location that we did not precisely describe in the previous paragraphs. In fact, aHGG are mainly located in hemispheres, whereas pHGG are frequently located in midline brainstem and thalamic structures. As already mentioned, O₂ tensions and hypoxic niches are not directly located in those brain areas [21,23,34,35,43]. Nevertheless, both aHGG and pHGG invade the SVZ at the end of their evolution with differences in the invasive process under the pressure of hypoxic regions and gene deregulations [36]. The starting points in the brain of age HGG-entities may also result in differences between hypoxia locations changing during brain development and neuronal maturation during life [21,23].

All those observations bring grist to the mill for separate hypoxic-related consequences in aHGGs and pHGGs.

7. Hypoxia Modelization in pHGG In Vitro Studies

Today, the most accurate in vitro model for pHGG is a patient-derived cell line initiated from tumor biopsy at diagnosis or at relapse time [13,24,25,69]. Therefore, a worldwide effort was dedicated in the last decade to develop such models to mimic accurately the intrinsic patient tumor behavior. Nevertheless, in vitro hypoxia induction is underdeveloped in the preclinical pHGG studies, but as we discussed above, HIFs seem to be key drivers for pHGG cell proliferation, survival, migration and stemness maintenance. To recreate acute, chronic and cyclic hypoxic conditions in pHGG, different techniques can be proposed: either chemically hypoxia induction using Cobalt (II) Chloride hexahydrate (CoCl₂) or Deferoxamine (DFO or DFX), either “physically” using a modular incubator chamber, 3D organoid/spheroid models or cells cultured in microenvironment matrix [24,25,32,70]. CoCl₂ inhibits the PHD enzyme, which is then unable to mark HIF-1 α subunit, stop its degradation and favor its accumulation in the nucleus, leading to the expression of its target genes. CoCl₂ mimics only one aspect of hypoxic conditions, which is HIF-1 α stabilization, but little is known about its effects on HIF-2 α . We can probably obtain the same effect with recently developed PHD inhibitors [70,71]. For DFO, an iron chelator, its use in cells also leads to HIF-1 α and VEGF accumulations due to MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) signaling activation, with the same questioning on HIF-2 α .

Finally, the only way to better reproduce the global hypoxic conditions in cells is using a hypoxic chamber or incubator in which oxygen levels can be regulated from 21% (normoxia) to the most extreme hypoxia encountered in HGG with O₂ less than 0.1%. It can easily help us to study the variations in oxygen levels to understand the acute versus chronic versus cyclic hypoxia and then decipher the dynamics of HIF- α signaling [24,25]. Another tool that can help to quantitatively dissect the effects of hypoxia is microfluidic devices, as well as 3D and matrix environment cultures, which enable to mimic successfully the tumor microenvironment in vitro with varying concentrations of oxygen in the presence of brain cells in addition to pHGG cells and/or the BBB structures [63]. Those models are thereafter used for drug screening to find the appropriate therapies in pHGGs combined or not with irradiation, but taking into account this major microenvironment actor. In fact, the hypoxia environment impacts pHGG cell response to conventional or new therapies [24,25] through their proliferation, their metabolism and their gene expressions.

8. HIF Targeted Therapies

Beyond the understanding of hypoxia-related actors in pHGG, this pathway and especially HIF α s can be new therapeutic options to improve conventional chemo- and radiotherapy, but also as specific targeted therapies. Despite their close homologies in amino-acid sequence, HIF-1 α and HIF-2 α proteins conformations are very different and probably need specific targeting. Several mechanisms and targets can stop $\alpha\alpha$ activity when inhibited: mRNA or protein HIF expression, HIF- α /HIF- β dimerization, DNA binding at HRE, transcriptional activity or increase of proteasomal degradation [71]. To target all these steps, different drugs are proposed.

For mRNA, partial or total downregulation of HIF-1 α , aminoflavone, an aryl hydrocarbon receptor ligand, has been described, as well as synthetic antisense oligonucleotides, like EZN-2968. They only

partially impact HIF-2 α mRNA expression. The translation of HIF- α mRNA is also controlled by growth factor signaling pathways such as the PI3K/Akt/mTor pathway, that can be targeted with specific drugs. Irinotecan and topotecan are topoisomerase I inhibitors also able to downregulate HIF-1 α and HIF-2 α levels [24,25].

To avoid HIF- α /HIF- β complex assembly, small molecules were recently developed to interact with PAS domains in the HIF- α and HIF-1 β /ARNT subunits, like cyclic peptide inhibitor (cyclo-CLLFVY) for HIF-1 α , PT2385 or PT2977 for HIF-2 α and acriflavine for both HIF- α s. This blocking prevents HIFs transcription factor activity. Another way is to stop p300/CBP co-activator binding to HIF- α /HIF- β complex with chetomin, bortezomib or amphotericin B, for example. Transcriptional activation of target genes by HIFs requires a direct binding at HRE. Echinomycin or specific polyamides are those inhibitors. The last mechanism that might be used for therapeutic inhibition is an induction of HIF-1 α proteasomal degradation in a VHL-independent manner (heat shock protein inhibitors) or not (histone deacetylase inhibitors). This approach is not fully understood for HIF-2 α inhibition [71].

Another strategy that has been rarely, but recently, described is using drug-enhancing oxygen in the tumors, like trans sodium crocetinate [72].

In the very last trials in pHGG which have not yet been published—but information on them is available on the ClinicalTrials.gov website—the use of topoisomerase I inhibitors and PI3K/Akt/mTor targeting is frequent. As it is a frequently induced pathway in the pHGG environment, more and more studies will probably be opened or are currently recruiting with specific HIF inhibitors, like our French national RAPIRI phase I trial based on our previous preclinical work using a mTor and HIF-1 α targeting [24].

Nevertheless, only partial HIF inhibition is for now available with those inhibitors and a lot of effort will be applied in the next decade to search for potent specific HIF-1 α and HIF-2 α antagonists. In addition to the lack of a complete antagonism of HIF- α , we might also be able to face, in the case of the entire inhibition of one single HIF- α , the balanced pathway based on HIF-1, HIF-2 and probably HIF-3 expressions and/or upstream and downstream reinduction able to overpass this inhibition. For other targeted therapies, a deep knowledge on their functional inhibition will help us to refine accurately the future trials in pHGGs.

9. Conclusions

In conclusion, HIF-hypoxia signaling seems to be very frequently involved in each step of pHGG development or progression and might be a new path for tumorigenesis and treatment resistance understanding. Nevertheless, we need many more pHGG studies to extend our knowledge and to select which specific groups of pHGG will benefit from these therapeutic strategies targeting the hypoxia-driven pathway. This might also be an indispensable factor to consider when developing preclinical drug screening in future pHGG trials because of its particularly high impact on cell resistance to therapies (e.g., radiotherapy or targeted drugs).

Author Contributions: All authors contributed to the conceptualization and methodology of this review. Q.F., A.-F.B., M.M., B.L., C.P., A.C. and N.E.-W. completed the previous and current research topics on hypoxia in pHGGs in the Lab. Q.F, M.P., B.L., M.D. and N.E.-W. were involved in the writing-original draft preparation. Q.F. and N.E.-W. were designing and preparing the Figures. All authors contributed to writing-review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

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

References

1. Ostrom, Q.T.; de Blank, P.M.; Kruchko, C.; Petersen, C.M.; Liao, P.; Finlay, J.L.; Stearns, D.S.; Wolff, J.E.; Wolinsky, Y.; Letterio, J.J.; et al. Alex's Lemonade Stand Foundation Infant and Childhood Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro-Oncol.* **2015**, *16*, x1–x36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Mackay, A.; Burford, A.; Carvalho, D.; Izquierdo, E.; Fazal-Salom, J.; Taylor, K.R.; Bjerke, L.; Clarke, M.; Vinci, M.; Nandhabalan, M.; et al. Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 520–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. El-Khouly, F.E.; Veldhuijzen van Zanten, S.E.M.; Santa-Maria Lopez, V.; Hendrikse, N.H.; Kaspers, G.J.L.; Loizos, G.; Sumerauer, D.; Nysom, K.; Pruunsild, K.; Pentikainen, V.; et al. Diagnostics and treatment of diffuse intrinsic pontine glioma: Where do we stand? *J. Neurooncol.* **2019**, *145*, 177–184. [[CrossRef](#)]
4. MacDonald, T.J.; Aguilera, D.; Kramm, C.M. Treatment of high-grade glioma in children and adolescents. *Neuro-Oncol.* **2011**, *13*, 1049–1058. [[CrossRef](#)]
5. Grill, J.; Massimino, M.; Bouffet, E.; Azizi, A.A.; McCowage, G.; Cañete, A.; Saran, F.; Le Deley, M.C.; Varlet, P.; Morgan, P.S.; et al. Phase II, Open-Label, Randomized, Multicenter Trial (HERBY) of Bevacizumab in Pediatric Patients with Newly Diagnosed High-Grade Glioma. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 951–958. [[CrossRef](#)]
6. Bax, D.A.; Mackay, A.; Little, S.E.; Carvalho, D.; Viana-Pereira, M.; Tamber, N.; Grigoriadis, A.E.; Ashworth, A.; Reis, R.M.; Ellison, D.W.; et al. A distinct spectrum of copy number aberrations in pediatric high-grade gliomas. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 3368–3377. [[CrossRef](#)]
7. Schwartzentruber, J.; Korshunov, A.; Liu, X.Y.; Jones, D.T.; Pfaff, E.; Jacob, K.; Sturm, D.; Fontebasso, A.M.; Quang, D.A.; Tönjes, M.; et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* **2012**, *482*, 226–231. [[CrossRef](#)]
8. Taylor, K.R.; Mackay, A.; Truffaux, N.; Butterfield, Y.; Morozova, O.; Philippe, C.; Castel, D.; Grasso, C.S.; Vinci, M.; Carvalho, D.; et al. Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 457–461. [[CrossRef](#)]
9. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta. Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [[CrossRef](#)]
10. Louis, D.N.; Ellison, D.W.; Brat, D.J.; Aldape, K.; Capper, D.; Hawkins, C.; Paulus, W.; Perry, A.; Reifenberger, G.; Figarella-Branger, D.; et al. cIMPACT-NOW: A practical summary of diagnostic points from Round 1 updates. *Brain Pathol.* **2019**, *29*, 469–472. [[CrossRef](#)]
11. Aihara, K.; Mukasa, A.; Gotoh, K.; Saito, K.; Nagae, G.; Tsuji, S.; Tatsuno, K.; Yamamoto, S.; Takayanagi, S.; Narita, Y.; et al. H3F3A K27M mutations in thalamic gliomas from young adult patients. *Neuro-Oncol.* **2014**, *16*, 140–146. [[CrossRef](#)]
12. Khuong-Quang, D.-A.; Buczkowicz, P.; Rakopoulos, P.; Liu, X.-Y.; Fontebasso, A.M.; Bouffet, E.; Bartels, U.; Albrecht, S.; Schwartzentruber, J.; Letourneau, L.; et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta. Neuropathol.* **2012**, *124*, 439–447. [[CrossRef](#)]
13. Castel, D.; Philippe, C.; Kergrohen, T.; Sill, M.; Merlevede, J.; Barret, E.; Puget, S.; Sainte-Rose, C.; Kramm, C.M.; Jones, C.; et al. Transcriptomic and epigenetic profiling of 'diffuse midline gliomas, H3 K27M-mutant' discriminate two subgroups based on the type of histone H3 mutated and not supratentorial or infratentorial location. *Acta. Neuropathol. Commun.* **2018**, *6*, e117. [[CrossRef](#)]
14. Mackay, A.; Burford, A.; Molinari, V.; Jones, D.T.W.; Izquierdo, E.; Brouwer-Visser, J.; Giangaspero, F.; Haberler, C.; Pietsch, T.; Jacques, T.S.; et al. Molecular, Pathological, Radiological, and Immune Profiling of Non-brainstem Pediatric High-Grade Glioma from the HERBY Phase II Randomized Trial. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 829–842. [[CrossRef](#)]
15. Filbin, M.G.; Tirosh, I.; Hovestadt, V.; Shaw, M.L.; Escalante, L.E.; Mathewson, N.D.; Neftel, C.; Frank, N.; Pelton, K.; Hebert, C.M.; et al. Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq. *Science* **2018**, *360*, 331–335. [[CrossRef](#)]
16. Silveira, A.B.; Kasper, L.H.; Fan, Y.; Jin, H.; Wu, G.; Shaw, T.I.; Zhu, X.; Larson, J.D.; Easton, J.; Shao, Y.; et al. H3.3 K27M depletion increases differentiation and extends latency of diffuse intrinsic pontine glioma growth in vivo. *Acta Neuropathol.* **2019**, *137*, 637–655. [[CrossRef](#)]

17. Jean-Quartier, C.; Jeanquartier, F.; Holzinger, A. Open Data for Differential Network Analysis in Glioma. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, e547. [[CrossRef](#)]
18. Samanta, D.; Semenza, G.L. Metabolic adaptation of cancer and immune cells mediated by hypoxia-inducible factors. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2018**, *1870*, 15–22. [[CrossRef](#)]
19. Venkatesh, H.S.; Morishita, W.; Geraghty, A.C.; Silverbush, D.; Gillespie, S.M.; Arzt, M.; Tam, L.T.; Espenel, C.; Ponnuswami, A.; Ni, L.; et al. Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature* **2019**, *573*, 539–545. [[CrossRef](#)]
20. Kaur, B.; Khwaja, F.W.; Severson, E.A.; Matheny, S.L.; Brat, D.J.; Van Meir, E.G. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-oncol.* **2005**, *7*, 134–153. [[CrossRef](#)]
21. Muz, B.; de la Puente, P.; Azab, F.; Azab, A.K. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)* **2015**, *3*, 83–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Schito, L.; Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer* **2016**, *2*, 758–770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Pistollato, F.; Chen, H.L.; Rood, B.R.; Zhang, H.Z.; D’Avella, D.; Denaro, L.; Gardiman, M.; te Kronnie, G.; Schwartz, P.H.; Favaro, E.; et al. Hypoxia and HIF1alpha repress the differentiative effects of BMPs in high-grade glioma. *Stem Cells* **2009**, *27*, 7–17. [[CrossRef](#)]
24. Nguyen, A.; Moussallieh, F.M.; Mackay, A.; Cicek, A.E.; Coca, A.; Chenard, M.P.; Weingertner, N.; Lhermitte, B.; Letouzé, E.; Guérin, E.; et al. Characterization of the transcriptional and metabolic responses of pediatric high-grade gliomas to mTOR-HIF-1 α axis inhibition. *Oncotarget* **2017**, *8*, 71597–71617. [[CrossRef](#)]
25. Blandin, A.F.; Durand, A.; Litzler, M.; Tripp, A.; Guérin, É.; Ruhland, E.; Obrecht, A.; Keime, C.; Fuchs, Q.; Reita, D.; et al. Hypoxic Environment and Paired Hierarchical 3D and 2D Models of Pediatric H3.3-Mutated Gliomas Recreate the Patient Tumor Complexity. *Cancers* **2019**, *11*, e1875. [[CrossRef](#)]
26. Cervós-Navarro, J.; Diemer, N.H. Selective vulnerability in brain hypoxia. *Crit Rev. Neurobiol* **1991**, *6*, 149–182.
27. Pugh, C.W.; Ratcliffe, P.J. New horizons in hypoxia signaling pathways. *Exp. Cell Res.* **2017**, *356*, 116–121. [[CrossRef](#)]
28. Loboda, A.; Jozkowicz, A.; Dulak, J. HIF-1 and HIF-2 Transcription Factors-Similar but Not Identical. *Mol. Cells* **2010**, *29*, 435–442. [[CrossRef](#)]
29. Li, Z.; Bao, S.; Wu, Q.; Wang, H.; Eyler, C.; Sathornsumetee, S.; Shi, Q.; Cao, Y.; Lathia, J.; McLendon, R.E.; et al. Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 501–513. [[CrossRef](#)]
30. Dings, J.; Meixensberger, J.; Jäger, A.; Roosen, K. Clinical experience with 118 brain tissue oxygen partial pressure catheter probes. *Neurosurgery* **1998**, *43*, 1082–1095. [[CrossRef](#)]
31. Brahimi-Horn, M.C.; Pouyssegur, J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3582–3591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Wenger, R.; Kurtcuoglu, V.; Scholz, C.; Marti, H.; Hoogewijs, D. Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia* **2015**, *3*, e35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ortiz-Prado, E.; Dunn, J.F.; Vasconez, J.; Castillo, D.; Viscor, G. Partial pressure of oxygen in the human body: A general review. *Am. J. Blood Res.* **2019**, *9*, 1–14. [[PubMed](#)]
34. Sun, C.; Fu, J.; Qu, Z.; Li, D.; Si, P.; Qiao, Q.; Zhang, W.; Xue, Y.; Zhen, J.; Wang, W. Chronic mild hypoxia promotes hippocampal neurogenesis involving Notch1 signaling in epileptic rats. *Brain Res.* **2019**, *1714*, 88–98. [[CrossRef](#)]
35. Coletti, A.M.; Singh, D.; Kumar, S.; Shafin, T.N.; Briody, P.J.; Babbitt, B.F.; Pan, D.; Norton, E.S.; Brown, E.C.; Kahle, K.T.; et al. Characterization of the ventricular-subventricular stem cell niche during human brain development. *Development* **2018**, *26*, e145. [[CrossRef](#)]
36. Qin, E.Y.; Cooper, D.D.; Abbott, K.L.; Lennon, J.; Nagaraja, S.; Mackay, A.; Jones, C.; Vogel, H.; Jackson, P.K.; Monje, M. Neural Precursor-Derived Pleiotrophin Mediates Subventricular Zone Invasion by Glioma. *Cell* **2017**, *170*, 845–859. [[CrossRef](#)]
37. Lee, J.H.; Lee, J.E.; Kahng, J.Y.; Kim, S.H.; Park, J.S.; Yoon, S.J.; Um, J.Y.; Kim, W.K.; Lee, J.K.; Park, J.; et al. Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature* **2018**, *560*, 243–247. [[CrossRef](#)]

38. Rushing, G.V.; Brockman, A.A.; Bollig, M.K.; Leelatian, N.; Mobley, B.C.; Irish, J.M.; Ess, K.C.; Fu, C.; Ihrle, R.A. Location-dependent maintenance of intrinsic susceptibility to mTORC1-driven tumorigenesis. *Life Sci. Alliance* **2019**, *25*, e2. [[CrossRef](#)]
39. Pistollato, F.; Abbadi, S.; Rampazzo, E.; Persanon, L.; Della Puppan, A.; Frassonn, C.; Sarton, E.; Scienzan, R.; D'avellann, D.; Basso, G. Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem Cells* **2010**, *28*, 851–862. [[CrossRef](#)]
40. Soedan, A.; Park, M.; Lee, D.; Mintz, A.; Androutsellis-Theotokis, A.; McKay, R.D.; Engh, J.; Iwama, T.; Kunisada, T.; Kassam, A.B.; et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene* **2009**, *28*, 3949–3959. [[CrossRef](#)]
41. Semenza, G.L. Dynamic regulation of stem cell specification and maintenance by hypoxia-inducible factors. *Mol. Asp. Med.* **2016**, *47*, 15–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bohman, L.-E.; Swanson, K.R.; Moore, J.L.; Rockne, R.; Mandigo, C.; Hankinson, T.; Assanah, M.; Canoll, P.; Bruce, J.N. Magnetic resonance imaging characteristics of glioblastoma multiforme: Implications for understanding glioma ontogeny. *Neurosurgery* **2010**, *67*, 1319–1327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hoffman, M.; Gillmor, A.H.; Kunz, D.J.; Johnston, M.J.; Nikolic, A.; Narta, K.; Zarrei, M.; King, J.; Ellestad, K.; Dang, N.H.; et al. Intratumoral Genetic and Functional Heterogeneity in Pediatric Glioblastoma. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 2111–2123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Jensen, R.L.; Mumert, M.L.; Gillespie, D.L.; Kinney, A.Y.; Schabel, M.C.; Salzman, K.L. Preoperative dynamic contrast-enhanced MRI correlates with molecular markers of hypoxia and vascularity in specific areas of intratumoral microenvironment and is predictive of patient outcome. *Neuro-Oncol.* **2014**, *16*, 280–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Shaik, S.; Kennis, B.; Maegawa, S.; Schadler, K.; Yanwen, Y.; Callegari, K.; Lulla, R.R.; Goldman, S.; Nazarian, J.; Rajaram, V.; et al. REST upregulates gremlin to modulate diffuse intrinsic pontine glioma vasculature. *Oncotarget* **2017**, *9*, 5233–5250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Duchatel, R.J.; Jackson, E.R.; Alvaro, F.; Nixon, B.; Hondemarck, H.; Dun, M.D. Signal Transduction in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Proteomics* **2019**, *19*, e1800479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Castel, D.; Philippe, C.; Calmon, R.; Le Dret, L.; Truffaux, N.; Boddaert, N.; Pagès, M.; Taylor, K.R.; Saulnier, P.; Lacroix, L.; et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol.* **2015**, *130*, 815–827. [[CrossRef](#)]
48. Piha-Paul, S.A.; Shin, S.J.; Vats, T.; Guha-Thakurta, N.; Aaron, J.; Rytting, M.; Kleinerman, E.; Kurzrock, R. Pediatric patients with refractory central nervous system tumors: Experiences of a clinical trial combining bevacizumab and temsirolimus. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 1939–1945.
49. Ceschin, R.; Kocak, M.; Vajapeyam, S.; Pollack, I.F.; Onar-Thomas, A.; Dunkel, I.J.; Poussaint, T.Y.; Panigrahy, A. Quantifying radiation therapy response using apparent diffusion coefficient (ADC) parametric mapping of pediatric diffuse intrinsic pontine glioma: A report from the pediatric brain tumor consortium. *J. Neurooncol.* **2019**, *143*, 79–86. [[CrossRef](#)]
50. Hoffman, L.M.; van Zanten, S.E.V.; Colditz, N.; Baugh, J.; Chaney, B.; Hoffmann, M.; Lane, A.; Fuller, C.; Miles, L.; Hawkins, C.; et al. 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. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 1963–1972. [[CrossRef](#)]
51. Mohyeldin, A.; Garzón-Muvdi, T.; Quiñones-Hinojosa, A. Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell* **2010**, *7*, 150–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Saxena, K.; Jolly, M.K. Acute vs. Chronic vs. Cyclic Hypoxia: Their Differential Dynamics, Molecular Mechanisms, and Effects on Tumor Progression. *Biomolecules* **2019**, *9*, e339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Donovan, L.K.; Potter, N.E.; Warr, T.; Pilkington, G.J. A Prominin-1-Rich Pediatric Glioblastoma: Biologic Behavior Is Determined by Oxygen Tension-Modulated CD133 Expression but Not Accompanied by Underlying Molecular Profiles. *Transl. Oncol.* **2012**, *5*, 141–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Rong, Y.; Durden, D.L.; Meir, E.G.V.; Brat, D.J. Pseudopalisading Necrosis in Glioblastoma: A Familiar Morphologic Feature That Links Vascular Pathology, Hypoxia, and Angiogenesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2006**, *65*, e11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ratcliffe, P.J. HIF-1 and HIF-2: Working alone or together in hypoxia? *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 862–865. [[CrossRef](#)]

56. Shen, H.; Yu, M.; Tsoli, M.; Chang, C.; Joshi, S.; Liu, J.; Ryall, S.; Chornenkyy, Y.; Siddaway, R.; Hawkins, C.; et al. Targeting reduced mitochondrial DNA quantity as a therapeutic approach in pediatric high-grade gliomas. *Neuro-Oncol.* **2020**, *22*, 139–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Al-Saffar, N.M.; Marshall, L.V.; Jackson, L.E.; Balarajah, G.; Eykyn, T.R.; Agliano, A.; Clarke, P.A.; Jones, C.; Workman, P.; Pearson, A.D.; et al. Lactate and choline metabolites detected in vitro by nuclear magnetic resonance spectroscopy are potential metabolic biomarkers for PI3K inhibition in pediatric glioblastoma. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e103835. [[CrossRef](#)]
58. Das, B.; Pal, B.; Bhuyan, R.; Li, H.; Sarma, A.; Gayan, S.; Talukdar, J.; Sandhya, S.; Bhuyan, S.; Gogoi, G.; et al. MYC Regulates the HIF2 α Stemness Pathway via Nanog and Sox2 to Maintain Self-Renewal in Cancer Stem Cells versus Non-Stem Cancer Cells. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 4015–4025. [[CrossRef](#)]
59. Sainz de la Maza, D.; Moratilla, A.; Aparicio, V.; Lorca, C.; Alcaina, Y.; Martín, D.; De Miguel, M.P. Metabolic Reprogramming, Autophagy, and Reactive Oxygen Species Are Necessary for Primordial Germ Cell Reprogramming into Pluripotency. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, e4745252. [[CrossRef](#)]
60. Yang, C.; Sudderth, J.; Dang, T.; Bachoo, R.M.; McDonald, J.G.; DeBerardinis, R.J. Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 7986–7993. [[CrossRef](#)]
61. Zukotynski, K.A.; Vajapeyam, S.; Fahey, F.H.; Kocak, M.; Brown, D.; Ricci, K.I.; Onar-Thomas, A.; Fouladi, M.; Poussaint, T.Y. Correlation of ¹⁸F-FDG PET and MRI Apparent Diffusion Coefficient Histogram Metrics with Survival in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: A Report from the Pediatric Brain Tumor Consortium. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 1264–1269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Chen, R.; Lai, U.H.; Zhu, L.; Singh, A.; Ahmed, M.; Forsyth, N.R. Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors. *Front. Cell Dev. Biol.* **2018**, *6*, e132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Warren, K.E. Beyond the Blood:Brain Barrier: The Importance of Central Nervous System (CNS) Pharmacokinetics for the Treatment of CNS Tumors, Including Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, e239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Da Ros, M.; De Gregorio, V.; Iorio, A.L.; Giunti, L.; Guidi, M.; de Martino, M.; Genitori, L.; Sardi, I. Glioblastoma Chemoresistance: The Double Play by Microenvironment and Blood-Brain Barrier. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, e2879. [[CrossRef](#)]
65. Caragher, S.P.; Shireman, J.M.; Huang, M.; Miska, J.; Atashi, F.; Baisiwala, S.; Hong Park, C.; Saathoff, M.R.; Warmke, L.; Xiao, T.; et al. Activation of Dopamine Receptor 2 Prompts Transcriptomic and Metabolic Plasticity in Glioblastoma. *J. Neurosci.* **2019**, *39*, 1982–1993. [[CrossRef](#)]
66. Tabouret, E.; Nguyen, A.T.; Dehais, C.; Carpentier, C.; Ducray, F.; Idbah, A.; Mokhtari, K.; Jouvet, A.; Uro-Coste, E.; Colin, C.; et al. For POLA Network. Prognostic impact of the 2016 WHO classification of diffuse gliomas in the French POLA cohort. *Acta Neuropathol.* **2016**, *132*, 625–634. [[CrossRef](#)]
67. Zheng, H.; Momeni, A.; Cedoz, P.L.; Vogel, H.; Gevaert, O. Whole slide images reflect DNA methylation patterns of human tumors. *NPJ Genom. Med.* **2020**, *5*, e11. [[CrossRef](#)]
68. Archer, T.C.; Sengupta, S.; Pomery, S.L. Brain cancer genomics and epigenomics. *Handb. Clin. Neurol.* **2018**, *148*, 785–797.
69. Tsoli, M.; Shen, H.; Mayoh, C.; Franshaw, L.; Ehteda, A.; Upton, D.; Carvalho, D.; Vinci, M.; Meel, M.H.; van Vuurden, D.; et al. International experience in the development of patient-derived xenograft models of diffuse intrinsic pontine glioma. *J. Neurooncol.* **2019**, *141*, 253–263. [[CrossRef](#)]
70. Sood, D.; Tang-Schomer, M.; Pouli, D.; Mizzoni, C.; Raia, N.; Tai, A.; Arkun, K.; Wu, J.; Black, L.D., 3rd; Scheffler, B.; et al. 3D extracellular matrix microenvironment in bioengineered tissue models of primary pediatric and adult brain tumors. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, e4529. [[CrossRef](#)]
71. Wigerup, C.; Pählman, S.; Bexell, D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *164*, 152–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Gainer, J.L.; Sheehan, J.P.; Lerner, J.M.; Jones, D.R. Trans sodium crocetinate with temozolomide and radiation therapy for glioblastoma multiforme. *J. Neurosurg.* **2017**, *126*, 460–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



HIF-2 α overexpression dictates aggressiveness additionally to TP53 mutations in H3.3K27M pediatric high-grade gliomas through RAS-MAPK and Wnt/ β catenin pathways

- **Introduction de ce travail**

Les GHG pédiatriques de la ligne médiane mutés pour H3K27M sont des tumeurs particulièrement agressives et représentent la première cause de mortalité liée au cancer en pédiatrie. Elles se développent dans les régions de la ligne médiane, notamment le thalamus et le tronc cérébral et constituent les entités appelés DMG et DIPG. De nombreuses études se sont intéressées aux caractéristiques moléculaires intrinsèques de ces tumeurs pour tenter de déceler des altérations à l'origine de leur agressivité, qui ont été présentées tout au long de l'introduction de ce manuscrit. Ce profil de tumeur pourrait également être modulé par l'hypoxie intratumorale induite par la forte prolifération de ces tumeurs, qui forme une masse de cellules très dense et perturbe la diffusion de l'oxygène. Cette hypoxie résulte notamment sur la reprogrammation d'une multitude de gènes impliqués dans l'angiogenèse, le métabolisme, la prolifération et la survie des cellules en réponse à l'activation des facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α . Ces phénomènes créent un environnement favorable à la progression tumorale. Le rôle pro-oncogénique de HIF-1 α et HIF-2 α a pu être mis en évidence dans de nombreux cancers, mais très peu d'études se sont intéressées à leurs rôles dans les GHG pédiatriques. Des travaux initiés au sein de notre équipe ont pu montrer qu'une surexpression de HIF-2 α semblait associée à une résistance de ces tumeurs à l'inhibition de la voie mTOR/HIF-1 α , par des traitements combinant de l'irinotecan et de la rapamycine. Par ailleurs, d'autres études avaient pu corrélérer HIF-2 α à un mauvais pronostic dans les GHG adultes. Ces résultats nous ont amené à nous intéresser tout particulièrement à l'implication de HIF-2 α dans le phénotype tumoral des DMG et DIPG portant la mutation H3K27M et à explorer les voies de signalisation modulées par ce facteur de transcription.

- **Objectifs**

En premier lieu, l'objectif de ce travail a été d'étudier le statut de HIF-2 α dans une cohorte de DMG et de DIPG de patients pédiatriques et dans des PDCLs dérivées à partir de

ces tumeurs (Blandin et al., 2019). La suite du travail s'est focalisée sur ces PDCLs pour explorer les voies de signalisation et les gènes cibles modulés par HIF-2 α . Nous avons également tenté de mettre en évidence des effets d'une inhibition fonctionnelle de HIF-2 α sur la prolifération, la migration ou la radiosensibilité de ces PDCLs pour déterminer cette inhibition pouvait représenter un intérêt thérapeutique dans les traitements des GHG pédiatriques de la ligne médiane.

- **Méthodologie**

Les statuts de HIF-2 α et de différentes altérations moléculaires courantes des GHG pédiatriques ont été étudiés dans une cohorte de tumeurs de type DMG et DIPG en IHC. Dans les PDCLs, les expressions protéiques et transcriptomiques de HIF-2 α et de son gène EPAS1 ont été étudiées par des approches combinant du western-blot, de la RTqPCR et de l'immunofluorescence, en comparant des conditions de normoxie (21% O₂) et d'hypoxie (1% O₂). Après avoir identifié différents profils d'expression de HIF-2 α associés aux différentes PDCLs, nous avons cherché à étudier plus spécifiquement le rôle de ce facteur de transcription. Pour cela, nous avons utilisé un protocole de séquençage de la chromatine par immunoprécipitation de type CUT&RUN, qui nous a permis de mettre en évidence un ensemble de promoteurs et de voies de signalisation modulés par HIF-2 α . Nous avons également effectué une inhibition fonctionnelle de HIF-2 α par l'intermédiaire d'un antagoniste partiel PT2385 et observé ses effets sur les gènes cibles de HIF-2 α à travers du séquençage d'ARN et en RTqPCR. Ceci nous a permis de préciser le type de modulation de certaines voies mises en évidence par le CUT&RUN (activation ou inhibition par HIF-2 α .) Enfin, nous avons procédé à des tests de prolifération et de migration/invasion sur les différentes PDCLs en réponse à des traitements au PT2385, en monoculture ou au sein d'un tissu cérébral (« *mini-brains* ») pour évaluer d'éventuelles interactions de HIF-2 α avec ce microenvironnement. Les conséquences d'une inhibition fonctionnelle de HIF-2 α sur la radiosensibilité des lignées ont également été explorées à travers une irradiation de nos lignées prétraitées ou non au PT2385.

HIF-2 α overexpression dictates aggressiveness additionally to TP53 mutations in H3.3K27M pediatric high-grade gliomas through RAS-MAPK and Wnt/ β catenin pathways

Quentin Fuchs¹, Stephanie Legras², Benoit Lhermitte³⁻⁴, Romain Vauchelles¹, Erika Cosset⁵, Lucas Gorka⁵, Hassiba Outilaft⁶, Jacques Izzie Namer⁶, Ercüment Cicek⁶, Eric Van Dyck⁷, Petr Nazarov⁸, Eric Guérin⁹, Carole Mura¹⁰, Hélène Burckel¹⁰, Georges Noel¹⁰, Youssef Hibaoui⁵, Anis Feki⁵, Agathe Chammas¹¹, Consuelo Sebastia¹¹, Thibaut Wolf³, Andres Hugo Coca¹², Mélissa Mess  ¹, Sophie Foppolo¹, Monique Dontenwill¹, Sophie Martin¹, Natacha Entz-Werl  ^{1-13*}

¹ CNRS UMR 7021, Laboratory of Bioimaging and Pathologies, Faculty of Pharmacy, Illkirch, France

² GENOMEAST platform, IGBMC, CNRS UMR 7104, Inserm U964, Illkirch, France.

³ Pathology Department, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France

⁴ Centres de Ressources Biologiques, University Hospital of Strasbourg, France

⁵ GLIMMER Of lIght (GLIoblastoma MetabolisM, HetERogeneity, and OrganoIds), Cancer Research Centre of Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR 5286, Lyon, France

⁶ Department of Nuclear Medicine, University hospital of Strasbourg, Strasbourg, France

⁷ DNA Repair and Chemoresistance, Department of Oncology, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg

⁸ Multiomics Data Science, Department of Oncology and Bioinformatics Platform, Quantitative Biology Unit, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg

⁹ Department of Cancer Molecular Genetics, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, University Hospital of Strasbourg, France

¹⁰ Laboratory of Radiobiology, ICANS, University of Strasbourg, France

¹¹ Department of Radiology, pediatric unit, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France

¹² Department of Neurosurgery, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France

¹³ Pediatric Onco-hematology Department, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France

*** Corresponding author**

Natacha Entz-Werl  , MD, PhD

Pediatric Onco-Hematology – University Hospital of Strasbourg
1 avenue Molière – Strasbourg – 67098 Cedex
UMR CNRS 7021 – Laboratory of Bioimaging and Pathologies
74 route du Rhin – 67400 – Illkirch
Phone: +33 3 88 12 83 96 – Fax: +33 3 88 12 80 92
Natacha.entz-werle@chru-strasbourg.fr

Short title: HIF-2 α , a co-driver of aggressiveness in H3.3K27 M mutant DIPGs

Abstract

Diffuse midline (DMG) and brainstem (DIPG) high-grade gliomas (HGGs) bearing H3.3K27M driver mutation are aggressive and incurable brain tumors. We previously evidenced HIF-2 α and its transcriptional gene, EPAS1, as markers of resistance when targeting the mTor/HIF-1 α pathway. To decipher the involvement of HIF-2 α in chronically active hypoxic environment in DIPG/DMG resistance and aggressiveness, we investigated its status in a cohort of pediatric HGGs, notably comprising H3.3K27M mutant tumors and in their paired *in vitro* derived models. By combining the low-input chromatin immunoprecipitation sequencing (CUT&RUN), RNAsequencing and metabolomics, we profiled the landscape of promoters and pathways regulated by HIF-2 α in DIPGs and DMGs associated with H3.3K27M and TP53 mutations. Elucidation of HIF-2 α downstream genes revealed pathways significantly linked to DIPGs (e.g., mTor and canonical Wnt signaling) and to DMGs (glutamatergic synapse and non-canonical Wnt signaling). Finally, we evidenced HIF-2 α as a new therapeutic target paving the way for its therapeutic use concomitantly to irradiation.

Statement of significance

DIPGs and thalamic diffuse midline gliomas (DMGs) are aggressive and incurable tumors, where the driver mutation H3.3K27M and its associated molecular passengers only providing partial evidence to explain tumor therapeutic resistance. Our study investigates a new co-driver, HIF-2 α , significantly associated with H3.3K27M and TP53 mutations, how it directly regulates downstream gene networks in DIPG *vs.* DMGs and how it might be therapeutically targeted.

Introduction

High-grade gliomas (HGGs) bearing the H3.3K27M driver mutation are aggressive brain tumors and remain the leading cause of cancer-related death in pediatric brain cancers (1–3). These gliomas are driven by this recurrent mutation developed in the midline, particularly in the thalamus and brainstem. The latter constitutes a singular anatomoclinical entity called diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPGs). These cerebral locations and their dramatic implication in many vital functions prevent any surgical resection. In addition, DIPGs and diffuse midline gliomas (DMGs) show significant resistance to conventional chemotherapies, but also to radiotherapy especially when *TP53* is mutated (4,5). The prognosis of these aggressive gliomas is then particularly poor, with a median survival of 12 to 15 months for DMGs and 9 to 12 months for DIPGs (6–8). The main driver mutations, usually leading to specific epigenetic signature, modulate a multitude of pro-oncogenic events such as epigenetic modifications and are frequently associated with other common genomic alterations, affecting notably *TP53*, *PDGFRA*, *ATRX*, *EGFR*, or *PTEN* genes (2,9–12). All those passenger molecular abnormalities provide further evidence for the biological and prognostic diversity of DIPGs and DMGs. Furthermore, microenvironmental factors are already known as modulators of glioma progression, like synaptic and electrical integration in neural circuits (13–16). This interaction with neuronal environment is one of the additional mechanisms that drive progression, while H3.3K27M mutations suppress neuroglial differentiation through the dysregulation of epigenetic modifications. Nevertheless, it remains unknown whether other mechanism, if any, might drive pathogenesis, progression, or aggressiveness in midline gliomas. DIPGs/DMGs are characterized by a rapid and diffused cell proliferation, creating an increasingly dense and diffuse mass that draws cells away from pre-existing blood vessels and disrupts the diffusion of oxygen in locations where neurons and their axons are preferentially

preserved (17,18). Tumor cells must thus adapt to these hypoxic conditions and survive. Recent publications evidenced a metabolic reprogramming linked to the epigenomic state of H3.3K27M mutant cells (19), but no data are available on how hypoxic pathway regulations might influence those metabolic adaptations and how they impact glioma pathogenesis or aggressiveness. It is well-known that hypoxic tumor cells adapt to these harsh conditions by up-regulating angiogenesis, glycolysis, and mechanisms related to cell proliferation and survival, creating an anarchic neoangiogenesis and heterogeneous oxygen gradients within the tumor (20,21). These spatiotemporal variations (from 0.1 to 4%) in intra-tumoral oxygen levels give rise to acute and chronic hypoxia and modulate the activation of HIFs (Hypoxia Induced Factor) that are key induced transcription factors (22). Two main isoforms of their α subunit, HIF-1 α and HIF-2 α , exist and are sensitive to oxygen. In normoxia or physioxia (20,23), these subunits will undergo proteasomal degradation, whereas, in hypoxia, these are stabilized and translocated into the nucleus to dimerize with the HIF- β /ARNT subunit to become efficient transcription factors (TFs). Nevertheless, in pediatric HGGs, very few data are available on those TFs or their roles, whereas, in adult glioblastomas, HIF-2 α seems to be an appealing target due to its high expression in glioma stem cells, activation in states of chronic hypoxia and an expression correlated with patient survival and recurrence. Our past work highlights HIF-2 α in DIPGs and DMGs, as a factor involved in resistance to HIF-1 α and mTor targeting (24,25), keeping in mind that mTor inhibitors are largely used in their treatment following recent publications (26,27) and BIOMEDE international protocol (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02233049>). Furthermore, the recent development of HIF-2 α inhibitors can provide opportunities to therapeutically target this important pathway (28–31). To gain further insight into the potential roles of HIF-2 α in DIPG/DMG resistance and aggressiveness, our present work focused on its status in a cohort of pediatric HGGs comprising notably H3.3K27M mutant tumors and in their paired *in vitro* patient-derived models. Using

the low-input chromatin immunoprecipitation sequencing method CUT&RUN and RNAsequencing, we profiled the landscape of promoters regulated by HIF-2 α in DIPGs and DMGs specifically bearing H3.3K27M mutation and investigated how those biomarkers could play a role when HIF-2 α is targeted. Elucidation of HIF-2 α co-regulators and mapping of its downstream genes revealed pathways that may contribute to aggressiveness of double TP53 and H3.3K27M mutated DIPGs and DMGs.

Results

HIF-2 α overexpression drives brainstem location, poor prognosis, specific metabolic profiles, and response to radiotherapy in pediatric DIPGs/DMGs

To investigate the potential role of HIF-2 α and several other characteristic biomarkers, a monocentric cohort of 37 patients referred for a pediatric high-grade glioma pHGG was analyzed by next generation sequencing (NGS) searching for driver and TP53 mutations and immunohistochemistry (IHC) for expression assessment of HIF-2 α , mTor pathway (phospho-mTor), MYC and EGFR. As summarized in Figure 1A, the cohort comprises 12 DIPGs, 10 thalamic DMGs, 11 hemispheric pHGGs and 4 gliomatosis cerebri (GCs). The fifteen H3.3K27M mutations were mostly observed in DIPGs and thalamic locations (e.g., 7 cases in each subgroup, respectively), whereas the H3.1K27M driver was only diagnosed in 3 DIPGs and H3.3G34V in 4 hemispheric locations. As expected, the median overall survival (OS) varied from brainstem to hemispheric locations (e.g., 10 months to 18 months). Positive immunohistochemical HIF-2 α assessment, as seen in Figure 1B, upper panel, was observed in 18 pHGGs with a predominant and significant ($p=0.0445$) proportion in DIPG/DMG tumors (Figures 1A, 1C and upper panel of 1D). This positive HIF-2 α immunostaining (named HIF2 pos group in the stacked box charts) was significantly correlated with the absence of response to radiotherapy (e.g., stable, or worst patient evolution during the 6 months post-radiotherapy,

middle panel of Figure 1D, $p=0.0324$). Another biomarker of radioresistance in DIPGs/DMGs is the presence of TP53 mutation (bottom panel of Figures 1D, $p=0.0069$), which was significantly associated to with HIF-2 α overexpression. We next conducted a survival analysis on this cohort based on HIF-2 α analyses (Figure 1E) and showed a direct link with a worst survival in case of its positive immunostaining ($p=0.0133$). To understand the clinical role of this elevated HIF-2 α expression, MRI and fluorodeoxyglucose (FDG) PET-scanning parameters were studied in both groups (e.g., “HIF2 pos” vs. “HIF2 neg”). The “HIF2 pos” presented a significantly lower mean adherent diffusion coefficient (ADC) at diagnosis, thus suggesting the associating between the hyperexpression of this protein and increased tumor hypoxia on patient MRIs (Figure 1F left panel, $p=0.0123$). This “HIF-2 α pos” group of patients was also correlated with a higher glucose metabolism, as evidenced by a higher standard uptake value (SUV) at 4 hours (right panel of Figure 1F, $p=0.043$). Completing this metabolic imaging approach and using ADEMA analyses, metabolomics performed in pHGG fresh-frozen samples of this collection (Figure 1G) confirmed in the “HIF2 pos” group a significant increase in anaerobic glycolysis associated with specific aminoacid (cell intake of glutamine, hypotaurine and taurine), and phospholipidic (cell intake of NAA, FreeCholine, glycerophosphocholine (GPC) and phosphocholine (PC)) metabolisms.

In this patient cohort, we also performed in the available paired samples of pHGG recurrences immunohistochemical analyses of HIF-2 α expression, MRI ADC assessment and metabolomics (Supplemental Figure 1A, 1B and 1C). Eight patients were retrieved in this collection, as they were reoperated for their first recurrence in thalamus or in hemispheres. Among them, 5 previously belonged to the “HIF2 neg” group. Four of those 5 tumors became HIF-2 α overexpressed (Supplemental Figure 1A), additionally showing a lower adjustment of their ADC mean value on the MRI performed at relapse, as in the “HIF2 pos” diagnostic group (Supplemental Figure 1B). Furthermore, metabolomics of pHGG recurrences, when compared

to their paired diagnostic sample analyses, resemble to the metabolomic characteristics of “HIF2 pos” tumors.

Hence, HIF-2 α hyperexpression in pHGGs might be linked to H3.3 mutation and treatment resistance and is associated with a worse outcome in these patients. We observed that the HIF-2 α protein was increasingly present in collaboration with pHGG recurrence and render tumors more hypoxic and metabolically adapted to a harsh tumoral microenvironment. Those first observations led us to hypothesize that increased expression of HIF-2 α is likely a key driver of pHGG aggressiveness and progression.

HIF-2 α is modulated spatio-temporally during cell proliferation and under a profound hypoxia in DIPG/DMG models

In order to decipher the underlying impact of HIF-2 α on DIPG and DMG patients, we next assessed the *in vitro* cellular consequences and its protein expression in patient-derived cell lines (PDCLs) generated from 2 DIPGs (e.g., B68 and BT83) and 2 DMGs (e.g., BT35 and BT69), included in the patient collection described above and whose cellular and genomic characteristics were already published (32). The diagnostic and relapse tumor specimens from which BT69 2D and 3D lines were derived remained in the “HIF2 neg” group (Figure 1C and Supplemental Figure 1A). By IHC, HIF-2 α protein expression in the paired diagnostic tumors samples of BT35, BT68 and BT83 was set at 20, 30 and 100%, respectively. As observed in the Figure 2A, BT69 monolayer (named 2 dimensional or 2D culture) and neurosphere or stem cell fate (named 3 dimensional or 3D culture) are overtly on HIF-2 α Western blots the lowest expressed comparatively to the other lines (Figures 2A and 2B). Time-dependent differences were observed between the 2D and 3D states of each PDCL (Figure 2A). In the case of 2D cell properties, the increase in HIF-2 α expression was induced rapidly 12 hours after a continuous exposure to hypoxia and, thereafter, stabilized, whereas in the case of 3D properties, HIF-2 α

expression was immediately present and persistently stable during the deep hypoxic conditions, as in the tumor core and during chronic hypoxia. Of note, independently of the cell fate in the tumors, the brain location might also impact HIF-2 α expression as presented on the bar graph chart of Western blot analyses on Figures 2A and 2B, and as already shown in patients (below bar graph chart in Figure 2B). DIPGs presented a more frequent and increased HIF-2 α expression compared to DMGs bearing the same driver. Furthermore, as observed in patient recurrences, later passages of each PDCL increased their HIF-2 α protein expression compared to early culture passages, especially in DIPG cells.

To further understand the role of HIF-2 α , we investigated where this TF was located in cells and how its transcriptional level changed under chronic hypoxia (Figures 2C and 2D). As expected, under 1% of oxygen, HIF-2 α was increasingly located in the cell nuclei, whereas its concentration concomitantly dropped in the cytoplasm (Figure 2C). Furthermore, the RNA expression studied by RTqPCR supported the induction of its transcription under profound hypoxia, especially when cells were in 3D stem-cell fate (Figure 2D). To assess the functional role of HIF-2 α in DIPG/DMG cells, we also used a HIF-2 α partial antagonist that is PT2385, disrupting HIF-2 α /ARNT heterodimerization and inhibiting expressions of its target genes. We, then, investigated, as described in Figures 2E and 2F, the HIF-2 α protein location and quantity, as well as its transcription. With this inhibitor, we reversed the translocation of HIF-2 α into the cell nucleus (Figure 2E) without modifying the protein concentration (Figure 2E western blot analyses in right panel) or RNA transcription (Figure 2F) except for 3D BT83 culture, where the protein was particularly abundant from the start (Figure 1B upper panel). Next, to understand which specific genes and/or signaling pathways that are controlled in DIPG/DMG highly expressing HIF-2 α , we performed chromatin profiling using CUT&RUN technique in those PDCLs.

HIF-2 α engages TP53/H3.3K27M mutant DIPGs in open and active chromatin of RAS/MAPK/mTor and Wnt signaling pathways

The CUT&RUN technique directed against HIF-2 α TF permitted native cross-linking-free genomic mapping of proteins in PDCLs samples where proliferation time exceeded 72 hours (32). Combining two-independent experiments, using a negative control without HIF-2 α antibody, we identified 28 to 13 407 binding sites in the 4 PDCLs, as seen in the heatmap of binding site localizations (Figures 3A), in distribution of HIF2 peaks relative to TSS (Figure 3B) and in binding counts in each PDCL (Figure 3C). The numbers increased significantly and concomitantly to increased HIF-2 α expression in cells. As expected from a TF protein (33), the peaks were detected in small fragment patterns (< 100 bp) (Figure 3D), especially in DIPG cells where the binding sites are mostly enriched in promoters (Supplemental Figure 2A). Interestingly, the comparison of functional annotation enrichment with GO Biological Process (Figure 3E) or KEGG pathway enrichment analysis (Supplemental Figure 2B) of BT35, BT68 and BT83 PDCLs led to an induction of common pathways. HIF-2 α bound to the 4-PDCL gene promoters of MAPK/RAS signaling pathway, but also of canonical and non-canonical Wnt signaling. As expected from the role of this TF during physiological developmental processes (23,34), active maturational processes by modulating cell differentiation, axon and neuron guidance, synapse organization and cell to cell adhesion were also commonly disrupted under the pressure of HIF-2 α after chronic hypoxia (Figures 3E and 4A). No promoter of cell proliferation network was identified. Of note, in the case of particularly elevated HIF-2 α expression, as in BT83, histone modifications also seemed to be impacted and might be a way to open more binding sites, which may explain the proportional increase in these binding sites with HIF-2 α expressions (Figure 3C). When we further investigated all data and the subsequent emaplots obtained after KEGG pathway analysis in each PDCL (examples of the thalamic

pHGG BT35 line (left panel of Figure 4A) and of the DIPG BT83 line (right panel of Figure 4A). The comparison revealed several sets of pathways more specifically linked to H3.3K27M and TP53 mutant glioma locations. Hence, mTor, autophagy and cellular senescence networks associated with sphingolipid and glucose metabolisms through insulin pathway seem to be stimulated by HIF-2 α active transcription on their promoters in DIPGs. Despite a lower HIF-2 α expression in thalamic locations, glutamatergic and dopaminergic synapse pathways were significantly bound by the TF.

To go deeper in promoter analyses, bound by HIF-2 α and the potential co-recruitment of transcriptional promoter coactivators, we reasoned that HIF-2 α might indicate highly significant aberrant recruitment of transcriptional activation complexes linked to specific promoter DNA motifs. Using an approach of *de novo* motif discovery and by comparing CUT&RUN to known motifs from JASPAR database, four significant motifs were identified (Supplemental Figure 3) and similar co-factors were already published (35) with HIF-1 α (CCAAT box factor, EGR-1, SP1, KLF): CCAAT box linked to NF-YC, CCGCC motif for SP2, GCCCC motif for EGR-1 and CA repeats for Klf9.

Transcriptional programs induced by HIF2- α confirmed its elevated expression, as a driver of oncogenic programs differentiating H3.3K27M DIPG and DMG aggressiveness

To validate CUT&RUN conclusions, we used protein explorations in our patient tumor collection, as well as RNA sequencing analysis in PDCLs before and after HIF-2 α inhibition with the PT2385 compound. We ended by exploring RNA sequencing in patient collections previously published to evaluate EPAS1 modulation and its transcription consequences (5,36). mTor activation was significantly associated with “HIF-2 pos” tumors (e.g., phospho-mTor and pS6-RP, p=0.0007 and p=0.0005, respectively) and to the PDCLs expressing the highest concentrations of HIF-2 α (e.g., AKT1S1, DEPTOR, RPS6KB2, HIF1A, MTOR) (Figures 4B

and 4C). However, no correlation was observed with phospho-ERK proteic expression, but RAS pathway was clearly downregulated in case of HIF-2 α inhibition (Figure 4C). The same approaches validated canonical and non-canonical Wnt pathway involvement. The nuclear expression of β catenin was significantly associated with HIF-2 α presence (p=0.0351) and FZD7, WNT5A, CCDC88C, SFRP4, FRMD8, FGF2, DAAM2, MARK2, SDC1 and TPBG were outlined from differential analyses in RNA sequencing in both DIPGs and thalamic cells (Figures 4C and 4D). When focusing on the 8 DIPGs for which β catenin IHC was available, 5 of 8 samples displayed a positive nuclear staining, whereas 2/8 DMGs only bore this nuclear expression. As previously published, β catenin/Wnt network was related notably to VEGFA (37,38), as in our samples (Figure 4E and raw data of RNAseq). In the ErbB family mentioned in the emaplot of Figure 4A (left panel), EGFR protein expression was not the target of HIF-2 α (Figure 4F) and its promoter binding, but ERBB4 seems to be one of the targets of this TF in DIPGs (raw data not shown of RNAseq). In parallel, we showed like in the CUT&RUN conclusions that GRM3, part of the glutamatergic synapse network, was particularly expressed in thalamic pHGGs (p= 0.0485) and in “HIF2 pos” tumors (tendency, p=0.075). In RNAseq data in Figure 4C, SLC1A3, SLC1A4, SLC6A9, SYT1 and GRIN2A were specifically downregulated in thalamic HIF2 positive cells.

Having established that concomitant HIF-2 α positive staining and H3.3K27M mutation in DIPG/DMG were reliant on TP53 mutations in patient samples, we next sought for the TP53 status and its regulators (Figure 4C). We confirmed that TP53 itself was not controlled by this TF but determined several p53 activity regulators as key targets of HIF-2 α whether increasing probably p53 profound dysregulation in both DIPG and DMG cells.

HIF-2 α positive pHGG cells exhibit specific metabolic signatures conferring cell with a way to adapt to brain hypoxic environment

As with the RNAseq validation, we used metabolomics assessment to understand and validate the role of HIF-2 α in pHGGs. In the patient collection in Figure 1, anaerobic glycolysis, glutaminolysis, as well taurine and hypotaurine and phospholipidic metabolisms, were part of the metabolic signature imprinting cells with HIF-2 α hyperexpression. This signature was also significantly different in Figure 5A, when we compared the hypoxia 1% untreated and treated cells with PT2385 compound, functionally validating this signature in HIF-2 α positive DIPGs and DMG cells. To reinforce this conclusion, we compared the results to the HIF-2 α negative cell line, BT69, displaying distinct metabolic processes involved in surviving cells after PT2385 treatment. To comprehensively determine metabolic alterations driven by elevated HIF-2 α expression in H3.3K27M and TP53 mutated tumors, we interrogated RNAsequencing data to check whether genes were down or upregulated, when HIF-2 α was inhibited. In Figure 5B, compared to untreated cells, the inhibition of HIF-2 α H3.3K27M directly impacted in DIPG cell glycolysis (A4GALT, ALKBH7), as well as phospholipid metabolism (SPHK2, ACP6, ACER3 and PFAS). In DMGs, a differentially significant signature was defined on Figure 5B reliant on the same metabolisms but involving other enzymes especially in lipid lysosomal and peroxisomal metabolisms (NAGA, MGLL, NUDT7) and phospholipases (PLCL1 and PLA2G12A). Finally, and as a focused example of glycolytic differential enhancement, GLUT1/SLC2A1 was studied by RTqPCR, which determined its specific involvement in DIPGs vs. DMGs. All those results confirmed the driving role of HIF-2 α in differential metabolic adaptation of H3.3K27M mutated DIPG/DMG cells.

HIF-2 α inhibition, a new way to interfere with DIPG/DMG cell progression and resistance

As demonstrated in all previous results using the PT2385 compound, when inhibiting HIF-2 α , upregulation in the molecular pathway and the metabolic adaptations defining DIPG/DMG cell resistance and aggressiveness were reversible (RNAseq and metabolomic results in Figures 4C,

5A and 5B). To check whether HIF-2 α inhibition might play a key role in tumor control and later in patient treatment, we further studied its impact on cell proliferation in mono- and co-culture with neurons and in minibrains. The simple culture using only DIPG/DMG cells was not contributive to show any consequences on cell proliferation (Figure 6A) and/or on migration (Figure 6B), except for BT35 (Figure 6B and in details in 6C). Nevertheless, the *in vitro* co-culture with neurons showed a significant drop in tumor cell proliferation with the PT2385 compound ($p < 0.005$, example of BT68 Figure 6D), likely explained by HIF-2 α interactions described in CUT&RUN and RNAsequencing analyses with neuron and synapse pathways. Furthermore, when culturing the BT68 PDCLs in minibrains and considering an invasion score based on the comparison between PT2385 untreated and treated conditions, a significant decrease in cell invasion was observed ($p < 0.05$, Figure 6E). Finally, to confirm the link between radiation (RT) sensitivity and HIF-2 α in TP53 and H3.3K27M DIPG and DMGs, we explored, first, the cell sensitivity to isolated cell culture irradiation from 2 to 10 Gy (grays) left panel of Figure 6F). This allowed us to subgroup the cells based on RT: more radioresistant cells that are DIPG PDCLs (e.g., BT68 and BT83) and a less radioresistant group composed of DMG cells (e.g., BT35 and BT69). We hypothesized that HIF-2 α inhibition could reverse or impact cell proliferation and render the cells more sensitive to a standard 2-Gy irradiation. To verify this, we used an experimental approach described in Figure 6F and, using the γ H2AX follow-up (right upper panel of Figures 6F showing the immunofluorescent γ H2AX staining in different conditions) to evaluate the cell apoptotic impact of HIF-2 α inhibition in combination with RT. We were able to see a significant impact in BT35, BT68 and BT83 DIPG cells ($p < 0.05$ in mostly all conditions except for BT69 in below panel of Figure 6F) where HIF-2 α was highly expressed supporting the potential role of PT2385 as a radiosensitizer in DIPG and DMG cells bearing this protein hyperexpression.

Discussion

High aggressiveness and radioresistance of midline pHGG bearing H3.3K27M were recently linked to the TP53 mutation (18), consistent with its previously reported correlation in adult glioblastomas (39–42). The TP53 mutation, arising concomitantly to the epigenetic modulation after histone mutation, was mostly associated with DNA repair checkpoint dysregulations rendering cells less sensitive to radiation DNA lesions (43–45). Here, to further investigate DIPG/DMG aggressiveness, we explored a pediatric patient collection of pHGGs to document their TP53 status and other protein biomarkers. Based on the literature on HIF-2 α , which is known to drive cell aggressiveness through hypoxia cell adaptation rendering tumors particularly resistant to their standard treatment, we focused on its status, role, and functional impact on DIPGs and DMGs and in vitro PDCL models. Indeed, we hypothesized that as a result from previous work on hypoxia driven therapies or incomplete explanation in DNA repair radioresistance (24,25). Moreover, recent works on DIPGs and/or DMGs also supported or implicitly suggested the role of hypoxia pathways as metabolic or Pi3K/RAS/MAPK/mTor inducers (19,26,46,47). Collectively, our results advocated for the association of HIF-2 α hyperexpression and TP53 mutation and radioresistance, but defined molecular and metabolomics signature associated with this co-driver of DIPG/DMG aggressiveness. Our conclusion is to push forward mTor and canonical Wnt signaling induced by the hyperexpression of HIF-2 α in resistant DIPG cell to RT and glutamatergic and non-canonical Wnt signaling in DMG cells. These conclusions are partially consistent or are covering multiple complementary recently published works involving MAPK or specific metabolisms in DIPGs and their treatment (19,26,48–51). Notably, the metabolomic association in DIPG with anaerobic glycolysis and glutamine which was demonstrated by Chung et al. to regulate global H3.3K27me3 levels in H3.3K27M cells is consistent with the HIF-2 α induction of histone

modifications in the cells, where this protein is highly expressed. Furthermore, our *in vitro* experiments might also provide new therapeutic approaches linked to HIF-2 α targeting in conjunction with irradiation. Our preliminary data in patients provided appropriate biomarkers for routinely use on tumor biopsies, in addition to MRI and PET-scanning evaluation at diagnosis. Those immunohistochemical data enable us to stratify patients and should identify in this well-defined cohort the most accurate therapeutic approach using HIF-2 α , as a radiosensitizer and in a prolonged treatment.

Material and methods

Tumor sample collection and patient-derived cell lines

All samples were obtained after the informed consent of parents and patients was given. The study was conducted in accordance with the ethical committee approval (declaration number DC-2017-3090). We investigated retrospectively data from 37 pHGGs (12 DIPGs, 10 DMGs, 11 supra-tentorial locations and 4 GCs) compiled consecutively from our center (University Hospital of Strasbourg, UHS) and diagnosed between January 1, 2010, and December 31, 2019. Aged from 3 to 18 years, their clinical and histological characteristics were confirmed by pathology and radiological review. All were screened by Next-Generation Sequencing (NGS) for driver mutations including H3.3 and H3.1K27M, H3.3G34V/R, IDH1R132H and BRAFv600 mutations and explored for TP53 mutation (32). All pHGG patients were treated in first line therapy with radiotherapy, which was systematically associated to temozolomide except for DIPGs and 2 GCs. The patient response to irradiation was assessed at as follows during the next 3 months: improvement in case of clinical better neurological assessment, stable as no neurological modification was seen and, finally, a worsening in case of neurological progression. The stable and worsening situations were grouped in the statistical analyses as no response to RT.

For MRI analyses, the ADC mean values were retrospectively reviewed by two neuroradiologists and were calculated from diffusion-weighted imaging (DWI) sequences on solid tumor portion using a commercially available software (Advantage Windows, GE Healthcare). Twenty-three patients had the DWI sequences on their initial diagnostic MRI assessment. The cerebral FDG PET-scanning was available for 14 patients at diagnosis with a SUV calculation at 2 and 4 hours after injection.

The PDCLs, named BT35, BT69, BT68 and BT83, were initiated from samples of this patient collection (tagged in the Figure 1C by an asterisk) and their characteristics were already published (32).

Immunohistochemistry

We used formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) specimens for immunohistochemical analyses stored in the Centre de Ressources Biologiques of UHS. IHC was performed using an automated tissue staining system (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). The phospho-mTor, MYC, phospho-ERK and pS6-RP antibodies were purchased from Abcam (Paris, France), HIF-2 α from Cell Signaling Technology (Ozyme, St-Quentin-en-Yvelines, France), GRM3 from Thermofischer Scientific and EGFR and β catenin from Dako (clone E30 and E14, respectively, Dako, Santa Clara, CA, USA). Two pathologists analyzed protein expression independently. The positive assessment was set above 5% of positive staining cells in the slide.

Compound

PT2385, HIF-2a antagonist, was obtained from a CDA with Peloton Therapeutics. They were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 20 mM.

Metabolomics

Fresh-frozen tumor samples were provided by the Centres de Ressources Biologiques. Cell lines were treated or not with 20 μ M PT2385 and cultured for 72h at 1% O₂ for 72h. Cells were then dissociated with Accutase and immersed in liquid nitrogen to instantly freeze the cells and metabolites. The tumor samples were weighted and put in inserts for the experiments. Metabolites quantification was performed on the 1D 1H CPMG experiment using the Pulcon method (52). The NMR spectrometer was calibrated with an external standard of Alanine in D₂O containing 68.9 nmoles of Alanine.

For metabolomic analyses, a multivariate network-based method, the algorithm to determine expected metabolite level alterations using mutual information (ADEMA), was used to statistically assess the changes in metabolite concentrations for all samples. We determined the relevant metabolites and grouped them using the metabolic network topology provided in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (53) and the metabolic atlas by Selway et al. (54). The significant comparisons in both conditions (tumors expressing HIF-2 α or not, tumors and their paired recurrences, untreated and treated cells with PT2385) are implemented in the tables presented in the Figures with a decrease showed in blue color and a metabolite increase in red color.

PDCL culture and passages

All PDCLs were cultured in DMEM/F12 GlutaMAX medium (31331-028, Gibco) containing 1% MEM non-essential amino acids (NEAA) (X0557-100, Dutscher). BT35 2D medium was supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS, Dutscher). BT68 2D BT69 2D and BT83 2D medium was supplemented with 2% FBS, 2% B27 (12587010, Gibco), human epithelial growth factor (EGF) (100-008, Reliatech) and human Fibroblast Growth Factor-basic (bFGF) (300-003, Reliatech), both at 20ng/mL. 3D PDCL medium was supplemented with 2% B27 and

EGF/bFGF (both at 20ng/mL). All cells were cultured at 1% of oxygen (O₂) in an MCO-5M-PE, PHCbi inCusaFe incubator (Panasonic) and dissociated with Accutase (A6964, Sigma).

Experiments were also conducted with PT2385 compound (provided by an MTA with Peloton Therapeutics), which was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 20 mM.

Protein isolation and western-blot analyses

5.10⁵ to 10⁶ cells were maintained at 1% O₂ for 6, 12, 24, 48, or 72 hours. Cells were lysed and subjected to an SDS-PAGE gradient. After dry transfer, immunoblots were probed with primary antibodies against HIF-2 α (1:800 dilution, ab199 Abcam), GAPDH (1:5000, MAB374 Millipore), α -tubulin (1:2000, T9026 Sigma), anti-mouse IgG HRP Conjugate (1:10000, W402B Promega) and anti-rabbit IgG HRP Conjugate (1:10000, W401B Promega). Immunoblots were imaged with the chemiluminescent kit ClarityTM Western ECL Substrate (BioRad) on the LAS4000 imaging system (GE Healthcare) and quantified with ImageJ software (v1.53).

Immunofluorescence (IF) assay

30 000 cells/well were seeded onto 12-mm sterilized coverslips and cultured for 72h in 24-well plates in three conditions: 21% O₂, 1% O₂ and 1% O₂ with 20 μ M PT2385. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (ThermoScientific) and permeabilized with D-PBS-Triton 0.1%. Immunostaining was performed with primary antibody against HIF-2 α (1:200, ab109616 Abcam) together with an anti-rabbit Alexa FluorTM 568 IgG (1:2000, A11011 Invitrogen). Nuclei and cytoskeleton were labeled with DAPI and phalloidin actin 488 (1:2000, Sc3598 and Sc3598; Santa Cruz Biotech). Images were obtained using a confocal microscope (LEICA TCS SPE II) with an x63 oil immersion objective (NA:1.40-HCX PL APO CS). Fluorescence

intensity and location were quantified in ImageJ (v1.53) with a macro developed by our imaging platform.

RNA extraction and Quantitative Reverse Transcription PCR (RTqPCR) assessment

$5 \cdot 10^5$ to $7 \cdot 10^5$ cells/well were seeded onto 6-well plates and 2 wells were pooled for each RNA extraction. Cells were cultured at 21%O₂, 1%O₂ and a comparison between treated and untreated cells with 20μM PT2385. After 72 hours, each cell condition was lysed with 350 μL RLT Plus Buffer/well (RNEasy Plus Kit, QIAGEN). RNA extraction and purification were performed using RNEasy Plus Kit (QIAGEN). RNA purity and concentration were evaluated using a UV-Visible NanoDrop™One spectrophotometer (ThermoFisher). Reverse transcription (RT) was performed in a T100 thermocycler using iScript™ RT Supermix (Biorad). Targeted genes were quantified by RTqPCR using the SYBR Green I Dye method and Real-Time PCR System (StepOne Plus Instrument). The primers of the following genes were from QIAGEN: HIF1A (PPH01361B-200, detected transcript NM_001243084, 3979 bp); EPAS1 (PPH02551C-200, detected transcript NM_001430, 5184 bp); GLUT1 (PPH14692A-200, detected transcript NM_020231, 1973 bp); POU5F1 (PPH02394E-200, NM_001173531, 1589 bp) and VEGFA (PPH00251C-200, detected transcript NM_001025366, 3677 bp). Two reference genes were used for relative quantification: UBB (Ubiquitin B) and PPIA (cyclophilin A). The forward and reverse primers were for UBB: 5'-GCTTTGTTGGGTGAGCTTGT-3' and 5'-CGAAGATCTGCATTTTGACCT-3', for PPIA: 5'-GCCGAGGAAAACCGTGTACT-3' and 5'-TCGACGGCAATGTCGAAGAA-3'. All experiments were performed in triplicate. The relative quantification was comparing C_T (cycle number for which a fluorescent product is measured just above the fluorescent noisy background) between the following conditions: at 21%O₂, 1%O₂, and 1%O₂ associated to

PT2385 treatment. The relative quantification coefficient (RQ) was based on the calculation:

$$RQ = 2^{-[(C_{T \text{ target}} - C_{T \text{ reference}})_{\text{sample}} - (C_{T \text{ target}} - C_{T \text{ reference}})_{\text{calibrator}}]}$$

CUT&RUN

Assay

All PDLCs were incubated for 72h at 1% O₂. CUT&RUN assay was performed as described by Hainer and Fazzio for transcription factors in mammalian cells (55). Briefly, 1,5.10⁵ to 5,10⁵ cells were lysed and nuclei were extracted, captured with BioMag®Plus Concanavalin A beads (86057, Polysciences), and incubated with anti-HIF-2 α primary antibodies (ep190b, Invitrogen) for 2hrs at 4°C. After washing away the EDTA in the buffer and unbound antibody with wash buffer, protein A-Mnase (pA-MN) was added and incubated for 1hr at 4°C. The cells were washed again and placed in an ice-water bath for 5mins. CaCl₂ was added to the final concentration of 2 mM to activate pA-MN for 30mins on the ice-water bath. The reaction was stopped by the addition of an equal volume of 2XSTOP buffer (55). RNA was digested with incubation at 37°C on a thermomixer for 20mins. The protein-DNA complex was released, and DNA was extracted and cleaned up with Phenol-chloroform-isoamyl alcohol precipitation. The obtained pellet was dissolved in 0,1X Tris/EDTA buffer (56) and stored at -20°C until DNA sequencing.

Buffers were prepared according to the recipes described by Moore (56). Extractions were made in duplicates for each PDCLs and samples were compared to a control condition with no antibody (“35 MNL p17 without antibody”). The pA-MN was provided by Dr Valérie Schreiber (IGBMC, Illkirch-Graffenstaden, France).

Library preparation and sequencing

Library preparation was performed at the GenomEast platform at the Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology using TruSeq Stranded mRNA Reference Guide- PN

1000000040498. RNA-Seq libraries were generated from 400 ng of total RNA using TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit and IDT for Illumina- TruSeq RNA UD Indexes (96 Indexes, 96 Samples) (Illumina, San Diego, USA), according to manufacturer's instructions. Briefly, following purification with poly-T oligo attached magnetic beads, the mRNA was fragmented using divalent cations at 94oC for 8 minutes. The cleaved RNA fragments were copied into first strand cDNA using reverse transcriptase and random primers. Strand specificity was achieved by replacing dTTP with dUTP during second strand cDNA synthesis using DNA Polymerase I and RNase H. Following addition of a single 'A' base and subsequent ligation of the adapter on double stranded cDNA fragments, the products were purified and enriched with PCR (30 sec at 98oC; [10 sec at 98oC, 30 sec at 60oC, 30 sec at 72oC] x 12 cycles; 5 min at 72oC) to create the cDNA library. Surplus PCR primers were further removed by purification using SPRI select beads (Beckman-Coulter, Villepinte, France) and the final cDNA libraries were checked for quality and quantified using capillary electrophoresis. Libraries were sequenced on an Illumina HiSeq 4000 sequencer as single read 50 base reads. Image analysis and base calling were performed using RTA version 2.7.7 and bcl2fastq version 2.20.0.422.

CUT&RUN data processing

Data were preprocessed with Cutadapt (57) v1.18 to trim adapter sequences (Nextera Transposase Sequence) from 3' end of reads. Cutadapt was used with the following parameters '-a AGATCGGAAGAG -A AGATCGGAAGAG -m 25:25.' Reads were mapped to Homo Sapiens genome (assembly hg38) using Bowtie2 (58) v2.2.8 with default parameters except for "--end-to-end --very-sensitive --no-mixed --no-discordant -I 10 -X 700." Reads which mapping quality is below 30 were removed using samtools v1.13 (59) with the command line "samtools view -b -q 30." Then, reads falling into Encode blacklisted regions v2 (60) were removed using BEDtools intersect v2.30.0 (61). Prior to peak calling, reads falling into Encode blacklisted regions v2 (60) were removed using BEDtools intersect v2.30.0 (61).

The peak calling was done with Macs2 v2.2.7.1 with the following parameters “-g hs -scale-to-large -q 0.01.” Peaks were annotated relative to genomic features using Homer v4.11.1 (62) (annotations got extracted from gtf file downloaded from ensemble v106). Heatmaps were generated using Deeptools (63) v3.5 using the tool bamCoverage to generate bigwigs files with a step of 10 nt. Bigwig files were normalized using the CPM method and an effective genome size of 2913022398. Then, the tool Deeptools computeMatrix v3.5 was used to generate a count matrix at the positions of interest. Finally, the tool Deeptools plotProfile v3.5 was used to generate mean profile plots and the tool Deeptools plotHeatmap v3.5 was used to generate a heatmap. The upset plot comparing positions of HIF2/EPAS1 peaks were created using in-house R scripts based on the Bioconductor package ComplexHeatmap v2.10.0 (64). Over-representation analyses for KEGG and GO BP and dotplots and emaplots showing functional enrichment analysis results were generated using the R package clusterProfiler v4.2.1 (65). A p-value cutoff of 0.05 was used for the KEGG enrichment analyses and a p-value cutoff of 0.01 was used for GO BP enrichment analysis. To detect DNA motifs in regions having EPAS1 peaks, meme-chip v4.10 (61) was used with default parameters except for « -meme-mod zoops -meme-nmotifs 20 -meme-minw 8 -meme-maxw 15 ». Motifs were detected in sequences located +/-30nt around peak summits for the 800 most enriched EPAS1 peaks. Bedtools slop and Bedtools getfasta v2.30.0 (66) were used to compute the regions +/-30nt around peak summits and extract nucleotide sequences, respectively.

RNA sequencing

As described above in RNA extraction section, the three different conditions for each PDCL (e.g., untreated 21%O₂ and 1%O₂ cells vs. treated 1%O₂ cells with 20μM PT2385) were after 72h of exposure extracted for RNA. Libraries suitable for high throughput sequencing were generated from 500 ng of total RNA using TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit

(Illumina, Part Numbers RS-122-2101/RS-122-2102). DNA libraries were checked for quality and quantified using a Fragment Analyzer automated CE system (Advanced Analytical Technologies, Inc., Bath, UK). The libraries were sequenced on the Illumina HiSeq4000 system as single-end 1×50-base reads following Illumina's instructions. Image analyses and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14 (Illumina, San Diego, CA, USA). Reads were mapped onto the hg38 assembly of the human genome using TopHat2 pipeline (67) with the bowtie v2.1.0 (written in C++) aligner (68). Gene expression was quantified using HTSeq v0.6.1 (69) and gene annotations from Ensembl release 87 (70). Read counts were normalized across libraries with the method proposed by Anders et al. (68). The data were published on the Gene Expression Omnibus website (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) with the following accession number: [GSE](#). To analyze each molecular pathway or gene expression in each cell line, we used gene analyses normalized to the length of each gene. A fold change coefficient was then calculated by a ratio between these numbers of reads, comparing the untreated cell and PT2385 treated conditions. The Heatmaps were generated based on those comparative calculations using GraphPad Prism software v9.

Proliferation assay

2000 to 6000 cells/well were seeded onto a 96-well plate. Cells were treated with increasing concentrations of PT2385 (0 to 40 μ M) diluted in the lineage-specific medium and administered immediately after seeding. Cell confluence was followed for 144h with an IncuCyte® ZOOM system placed in an HERACell VIOS 250i incubator (Thermo Fischer) maintained at 1%O₂. Images were taken every 4 hours and cell confluence was normalized to the confluence at time zero.

Migration assay

Spheroids were formed for 72h by the hanging drop method (71) using 10 000 cells/drop seeded in their medium containing methylcellulose (#M0262, Sigma-Aldrich). Spheroids were then seeded into 24-well plates coated with fibronectin (5 μ g/mL, C43-060 Promocell) or Poly-D-Lysine (50 μ g/mL, A3890401, Gibco) and filled with 500 μ L of medium containing or not PT2385 treatments. Migration tests were performed for 96h at 1% O₂. Spheroids were then fixed with glutaraldehyde (1%) and nuclei were labeled with DAPI diluted in 3% BSA D-PBS (1:2000). Images were obtained on an epifluorescence microscope (Axio Zeiss NA 0.3 WD 73) equipped with a camera (Camera Moticam Pro 285D 60N-C 2/3' 0.63x 426113) and a 5x lens (Ph1 Plan-NEOFLUAR 5x/0.15). The spheroid diameter, the number of evading cells and their migration distance were quantified in ImageJ (v1.53).

Co-culture of engineered neural tissue (ENT) and PDCLs

The iPSCs were maintained in StemFlex medium supplemented with its supplement and 1% penicillin/streptomycin. Cells were passaged onto Matrigel (Stemcell Technologies) with a standard enzymatic procedure (Accutase, Invitrogen) and replated with Rho-associated protein Kinase (ROCK) inhibitor (10 μ M Y-27632; Ascient Biosciences) for 24 hours to enhance cell survival.

For iPSC-derived engineered neural tissue (ENT), tissues were generated as previously described (72–74) including some modifications. Briefly, iPSC colonies were detached with Accutase and cultured in suspension in ultra-low attachment plates (Corning Costar) for 28 days in two different neural induction media: the neural and dopaminergic induction medium.

Neural induction medium

From day 1 to day 3, B27 medium was supplemented with the Dual-Smad cocktail (SB431542 at 10 nM and LDN at 4 nM: all from Cell Guidance) and Y-27632 at 2 μ M. From day 7 to day

13, B27 medium was supplemented with 20 ng/mL bFGF and EGF. From day 13 to day 16, B27 medium was supplemented with 10 ng/mL of GDNF and BDNF. From day 16 to day 20, B27 medium was supplemented with 1 μ M CpE, a γ -secretase inhibitor (from Cell Guidance).

Dopaminergic induction medium

From day 1 to day 3, B27 medium was supplemented with the Dual-Smad cocktail (SB431542 at 10 nM and LDN at 4 nM: all from Cell Guidance) and Y-27632 at 2 μ M. From day 3 to day 7, B27 medium was supplemented with 100 ng/mL sonic hedgehog (shh) and FGF8 with 2 μ M of Purmorphamin. From day 7 to day 13, CHIR-99021 at 3 μ M was added to the differentiation medium. From day 10 to day 16, B27 medium was supplemented with Trichostatin A (1 μ M), TGF β 3 (1ng/ml), and FGF20 (5ng/ml). From day 16 to day 20, B27 medium was supplemented with 1 μ M CpE, a γ -secretase inhibitor (from Cell Guidance). At day 20, 25 to 30 aggregates provided from both media (50:50) were plated on a hydrophilic polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane (6mm diameter, 0.4 μ m; BioCell Interface) for 1 week in B27 medium with media changes every 2 days. At day 35 day, one TC68 gliomasphere was added on top of the ENT and the co-culture was maintained in culture for one additional week.

PDCL radiosensitivity assay

Photon irradiation was carried out using a PRIMUS linear accelerator (Siemens), with 6 MV energy photon. Seeded cells were irradiated with a single fraction of 2 to 10Gy of physical dose and a dose rate of 200 UM/min.

Proliferation assay

3.10^5 to 5.10^5 cells were cultured in T25 flasks (Nunc) for 24h and irradiated with a single fraction of 2, 4, 6 or 10 Gy. 24h after irradiation, cells were dissociated and seeded in 96-wells plates. Cell confluence was followed with an IncucyteTM ZOOM system for 144h at 1% O₂.

Cell confluence was normalized to the confluence at time zero and the percentage of surviving fraction were calculated at 144h.

γH2AX foci quantification assay

10 000 to 25000 cells/well were seeded in 8-well labteks, treated or not with 20μM PT2385, and cultured for 72h. Cells were then irradiated with a single dose of 2Gy. 24 h after irradiation, cells were fixed with 4% PFA and labeled with an anti-γH2AX primary antibody (1:500, 05-636I Merck) coupled to an Alexa Fluor™ 568 antibody (1:2000, A11004 Invitrogen). IF was performed using a confocal microscope (LEICA TCS SPE II) with an x63 oil immersion objective (NA:1.40-HCX PL APO CS). γH2AX foci were counted with a specific macro developed in ImageJ software (v1.53).

General statistical analyses

GraphPad Prism 9 software (GraphPad software, Inc.) was used for graphs generation and for all correlations between clinical, imaging and IHC results. Those comparisons were using depending on the number of parameters and of samples with Chi-square or Fisher exact tests, as well as non-parametric Mann-Whitney and one-way ANOVA tests. Kaplan meier survival analyses were also performed. A p-value <0.05 was considered significant and controlled on a confidence interval of 95%. “ns” was corresponding to “not significant”.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest related to the topic.

Funding supports and acknowledgements

We thank first all children and families affected by pediatric high-grade gliomas for their contributions to this research and their courage.

All experimental work was supported by Enfants Cancer et Santé, LifePink, Ligue contre le Cancer, J'ai demandé la lune, Franck un rayon de soleil grants and subventions. NEW was also supported by a Roche/University of Strasbourg Foundation scholarship from 2015 to 2020 for the PEDIAMODECAN program for PDCL generations and its subprogram named PEDIAGLIO (specific to glioma line generation). The Satt Conectus program also granted partially the initiation of PEDIGLIO program.

We also thank Dr Anne-Florence Blandin, Dr Aurélia Nguyen and Mrs Aurelie Durand initiating with NEW the PEDIAMODECAN global project. We are also highly thankful to Dr Isabelle Lelong-Rebel for cell line development and their improvement.

References

1. Veldhuijzen van Zanten SEM, Baugh J, Chaney B, De Jongh D, Sanchez Aliaga E, Barkhof F, et al. Development of the SIOPE DIPG network, registry and imaging repository: a collaborative effort to optimize research into a rare and lethal disease. *J Neurooncol.* 2017;132:255–66.
2. Mackay A, Burford A, Carvalho D, Izquierdo E, Fazal-Salom J, Taylor KR, et al. Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell.* 2017;32:520-537.e5.
3. Erker C, Lane A, Chaney B, Leary S, Minturn JE, Bartels U, et al. Characteristics of patients ≥ 10 years of age with diffuse intrinsic pontine glioma: a report from the International DIPG/DMG Registry. *Neuro Oncol.* 2022;24:141–52.
4. Rodriguez D, Calmon R, Aliaga ES, Warren D, Warmuth-Metz M, Jones C, et al. MRI and Molecular Characterization of Pediatric High-Grade Midline Thalamic Gliomas: The HERBY Phase II Trial. *Radiology.* 2022;304:174–82.
5. Castel D, Philippe C, Calmon R, Le Dret L, Truffaux N, Boddaert N, et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol.* 2015;130:815–27.
6. El-Khouly FE, Veldhuijzen van Zanten SEM, Santa-Maria Lopez V, Hendrikse NH, Kaspers GJL, Loizos G, et al. Diagnostics and treatment of diffuse intrinsic pontine glioma: where do we stand? *J Neurooncol.* 2019;145:177–84.
7. Jones C, Karajannis MA, Jones DTW, Kieran MW, Monje M, Baker SJ, et al. Pediatric high-grade glioma: biologically and clinically in need of new thinking. *Neuro Oncol.* 2017;19:153–61.

8. Ostrom QT, de Blank PM, Kruchko C, Petersen CM, Liao P, Finlay JL, et al. Alex's Lemonade Stand Foundation Infant and Childhood Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro Oncol.* 2015;16:x1–36.
9. Sievers P, Sill M, Schrimpf D, Stichel D, Reuss DE, Sturm D, et al. A subset of pediatric-type thalamic gliomas share a distinct DNA methylation profile, H3K27me3 loss and frequent alteration of EGFR. *Neuro Oncol.* 2021;23:34–43.
10. Braunstein S, Raleigh D, Bindra R, Mueller S, Haas-Kogan D. Pediatric high-grade glioma: current molecular landscape and therapeutic approaches. *J Neurooncol.* 2017;134:541–9.
11. Johnson A, Severson E, Gay L, Vergilio J-A, Elvin J, Suh J, et al. Comprehensive Genomic Profiling of 282 Pediatric Low- and High-Grade Gliomas Reveals Genomic Drivers, Tumor Mutational Burden, and Hypermutation Signatures. *Oncologist.* 2017;22:1478–90.
12. Schwartzenuber J, Korshunov A, Liu X-Y, Jones DTW, Pfaff E, Jacob K, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature.* Nature Publishing Group; 2012;482:226–31.
13. Monje M. Myelin Plasticity and Nervous System Function. *Annu Rev Neurosci.* 2018;41:61–76.
14. Monje M. Synaptic Communication in Brain Cancer. *Cancer Res.* 2020;80:2979–82.
15. Monje M, Borniger JC, D'Silva N, Deneen B, Dirks PB, Fattahi F, et al. Roadmap for the Emerging Field of Cancer Neuroscience. *Cell.* 2020;181:219–22.
16. Monje M, Mitra SS, Freret ME, Raveh TB, Kim J, Masek M, et al. Hedgehog-responsive candidate cell of origin for diffuse intrinsic pontine glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:4453–8.
17. Calmon R, Dangouloff-Ros V, Varlet P, Deroulers C, Philippe C, Debily M-A, et al. Radiogenomics of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPGs): correlation of histological and biological characteristics with multimodal MRI features. *Eur Radiol.* 2021;31:8913–24.
18. Werbrouck C, Evangelista CCS, Lobón-Iglesias M-J, Barret E, Le Teuff G, Merlevede J, et al. TP53 Pathway Alterations Drive Radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG). *Clin Cancer Res.* 2019;25:6788–800.
19. Chung C, Sweha SR, Pratt D, Tamrazi B, Panwalkar P, Banda A, et al. Integrated metabolic and epigenomic reprogramming by H3K27M mutations in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Cancer Cell.* 2020;38:334–349.e9.
20. Fuchs Q, Pierrevelcin M, Messe M, Lhermitte B, Blandin A-F, Papin C, et al. Hypoxia Inducible Factors' Signaling in Pediatric High-Grade Gliomas: Role, Modelization and Innovative Targeted Approaches. *Cancers (Basel).* 2020;12:979.

21. Huang Y, Lin D, Taniguchi CM. Hypoxia inducible factor (HIF) in the tumor microenvironment: friend or foe? *Sci China Life Sci.* 2017;60:1114–24.
22. Saxena, Jolly. Acute vs. Chronic vs. Cyclic Hypoxia: Their Differential Dynamics, Molecular Mechanisms, and Effects on Tumor Progression. *Biomolecules.* 2019;9:339.
23. Pierrevelcin M, Fuchs Q, Lhermitte B, Messé M, Guérin E, Weingertner N, et al. Focus on Hypoxia-Related Pathways in Pediatric Osteosarcomas and Their Druggability. *Cells.* 2020;9:E1998.
24. Nguyen A, Moussallieh FM, Mackay A, Cicek AE, Coca A, Chenard MP, et al. Characterization of the transcriptional and metabolic responses of pediatric high grade gliomas to mTOR-HIF-1 α axis inhibition. *Oncotarget.* 2017;8:71597–617.
25. Jannier S, Kemmel V, Sebastia Sancho C, Chammas A, Sabo A-N, Pencreach E, et al. SFCE-RAPIRI Phase I Study of Rapamycin Plus Irinotecan: A New Way to Target Intra-Tumor Hypoxia in Pediatric Refractory Cancers. *Cancers (Basel).* 2020;12:E3051.
26. Carvalho DM, Richardson PJ, Olaciregui N, Stankunaite R, Lavarino C, Molinari V, et al. Repurposing Vandetanib plus Everolimus for the Treatment of ACVR1-Mutant Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Discov.* 2022;12:416–31.
27. Tsoli M, Liu J, Franshaw L, Shen H, Cheng C, Jung M, et al. Dual targeting of mitochondrial function and mTOR pathway as a therapeutic strategy for diffuse intrinsic pontine glioma. *Oncotarget.* 2018;9:7541–56.
28. Toledo RA. New HIF2 α inhibitors: potential implications as therapeutics for advanced pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocrine-Related Cancer.* 2017;24:C9–19.
29. Wallace E. PT2385: HIF-2 α Antagonist for the Treatment of VHL Mutant ccRCC. 2016;5.
30. Wallace EM, Rizzi JP, Han G, Wehn PM, Cao Z, Du X, et al. A Small-Molecule Antagonist of HIF2 α Is Efficacious in Preclinical Models of Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 2016;76:5491–500.
31. Renfrow JJ, Soike MH, Debinski W, Ramkissoon SH, Mott RT, Frenkel MB, et al. Hypoxia-inducible factor 2 α : a novel target in gliomas. *Future Med Chem.* 2018;10:2227–36.
32. Blandin A-F, Durand A, Litzler M, Tripp A, Guérin É, Ruhland E, et al. Hypoxic Environment and Paired Hierarchical 3D and 2D Models of Pediatric H3.3-Mutated Gliomas Recreate the Patient Tumor Complexity. *Cancers.* 2019;11:1875.
33. Skene PJ, Henikoff JG, Henikoff S. Targeted in situ genome-wide profiling with high efficiency for low cell numbers. *Nat Protoc.* Nature Publishing Group; 2018;13:1006–19.
34. Trollmann R, Gassmann M. The role of hypoxia-inducible transcription factors in the hypoxic neonatal brain. *Brain Dev.* 2009;31:503–9.
35. Bina M, Wyss P, Ren W, Szpankowski W, Thomas E, Randhawa R, et al. Exploring the characteristics of sequence elements in proximal promoters of human genes. *Genomics.* 2004;84:929–40.

36. Mackay A, Burford A, Molinari V, Jones DTW, Izquierdo E, Brouwer-Visser J, et al. Molecular, Pathological, Radiological, and Immune Profiling of Non-brainstem Pediatric High-Grade Glioma from the HERBY Phase II Randomized Trial. *Cancer Cell*. 2018;33:829-842.e5.
37. Gorick CM, Saucerman JJ, Price RJ. Computational model of brain endothelial cell signaling pathways predicts therapeutic targets for cerebral pathologies. *J Mol Cell Cardiol*. 2022;164:17–28.
38. Manoranjan B, Provias JP. β -Catenin marks proliferating endothelial cells in glioblastoma. *J Clin Neurosci*. 2022;98:203–6.
39. Romano FJ, Guadagno E, Solari D, Borrelli G, Pignatiello S, Cappabianca P, et al. ATM and p53 combined analysis predicts survival in glioblastoma multiforme patients: A clinicopathologic study. *J Cell Biochem*. 2018;119:4867–77.
40. Forte IM, Indovina P, Iannuzzi CA, Cirillo D, Di Marzo D, Barone D, et al. Targeted therapy based on p53 reactivation reduces both glioblastoma cell growth and resistance to temozolomide. *Int J Oncol*. 2019;54:2189–99.
41. Renner G, Janouskova H, Noulet F, Koenig V, Guerin E, Bär S, et al. Integrin α 5 β 1 and p53 convergent pathways in the control of anti-apoptotic proteins PEA-15 and survivin in high-grade glioma. *Cell Death Differ*. 2016;23:640–53.
42. Martin S, Janouskova H, Dontenwill M. Integrins and p53 pathways in glioblastoma resistance to temozolomide. *Front Oncol*. 2012;2:157.
43. Castel D, Philippe C, Calmon R, Le Dret L, Truffaux N, Boddaert N, et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol*. 2015;130:815–27.
44. Entz-Werlé N, Poidevin L, Nazarov PV, Poch O, Lhermitte B, Chenard MP, et al. A DNA Repair and Cell Cycle Gene Expression Signature in Pediatric High-Grade Gliomas: Prognostic and Therapeutic Value. *Cancers (Basel)*. 2021;13:2252.
45. Nikolaev A, Fiveash JB, Yang ES. Combined Targeting of Mutant p53 and Jumonji Family Histone Demethylase Augments Therapeutic Efficacy of Radiation in H3K27M DIPG. *Int J Mol Sci*. 2020;21:E490.
46. Cook KM, Shen H, McKelvey KJ, Gee HE, Hau E. Targeting Glucose Metabolism of Cancer Cells with Dichloroacetate to Radiosensitize High-Grade Gliomas. *Int J Mol Sci*. 2021;22:7265.
47. Venkatesh HS, Tam LT, Woo PJ, Lennon J, Nagaraja S, Gillespie SM, et al. Targeting neuronal activity-regulated neuroligin-3 dependency in high-grade glioma. *Nature*. 2017;549:533–7.
48. Izquierdo E, Carvalho DM, Mackay A, Temelso S, Boulton JKR, Pericoli G, et al. DIPG Harbors Alterations Targetable by MEK Inhibitors, with Acquired Resistance Mechanisms Overcome by Combinatorial Inhibition. *Cancer Discov*. 2022;12:712–29.

49. Przystal JM, Cianciolo Cosentino C, Yadavilli S, Zhang J, Laternser S, Bonner ER, et al. Imipridones affect tumor bioenergetics and promote cell lineage differentiation in diffuse midline gliomas. *Neuro Oncol.* 2022;24:1438–51.
50. Pajovic S, Siddaway R, Bridge T, Sheth J, Rakopoulos P, Kim B, et al. Epigenetic activation of a RAS/MYC axis in H3.3K27M-driven cancer. *Nat Commun.* 2020;11:6216.
51. Duchatel RJ, Mannan A, Woldu AS, Hawtrey T, Hindley PA, Douglas AM, et al. Preclinical and clinical evaluation of German-sourced ONC201 for the treatment of H3K27M-mutant diffuse intrinsic pontine glioma. *Neurooncol Adv.* 2021;3:vdab169.
52. Wider G, Dreier L. Measuring Protein Concentrations by NMR Spectroscopy. *J Am Chem Soc. American Chemical Society;* 2006;128:2571–6.
53. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D199-205.
54. Metabolism at a Glance, 4th Edition | Wiley [Internet]. Wiley.com. [cited 2022 Sep 11]. Available from: <https://www.wiley.com/en-us/Metabolism+at+a+Glance%2C+4th+Edition-p-9780470674710>
55. Hainer SJ, Fazio TG. High-Resolution Chromatin Profiling Using CUT&RUN. *Curr Protoc Mol Biol.* 2019;126:e85.
56. Moore DD. Commonly used reagents and equipment. *Curr Protoc Mol Biol.* 2001;Appendix 2:Appendix 2.
57. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal.* 2011;17:10–2.
58. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* Nature Publishing Group; 2012;9:357–9.
59. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25:2078–9.
60. Amemiya HM, Kundaje A, Boyle AP. The ENCODE Blacklist: Identification of Problematic Regions of the Genome. *Sci Rep.* Nature Publishing Group; 2019;9:9354.
61. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 2010;26:841–2.
62. Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, et al. Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. *Molecular Cell.* Elsevier; 2010;38:576–89.
63. Ramírez F, Ryan DP, Grüning B, Bhardwaj V, Kilpert F, Richter AS, et al. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research.* 2016;44:W160–5.

64. Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*. 2016;32:2847–9.
65. Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*. 2012;16:284–7.
66. Machanick P, Bailey TL. MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics*. 2011;27:1696–7.
67. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*. 2013;14:R36.
68. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*. 2010;11:R106.
69. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. Nature Publishing Group; 2012;9:357–9.
70. Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, et al. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res*. 2018;46:D754–61.
71. Foty R. A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *J Vis Exp*. 2011;2720.
72. Cosset E, Locatelli M, Marteyn A, Lescuyer P, Dall Antonia F, Mor FM, et al. Human Neural Organoids for Studying Brain Cancer and Neurodegenerative Diseases. *J Vis Exp*. 2019;
73. Cosset É, Martinez Y, Preynat-Seauve O, Lobrinus J-A, Tapparel C, Cordey S, et al. Human three-dimensional engineered neural tissue reveals cellular and molecular events following cytomegalovirus infection. *Biomaterials*. 2015;53:296–308.
74. Tieng V, Stoppini L, Villy S, Fathi M, Dubois-Dauphin M, Krause K-H. Engineering of midbrain organoids containing long-lived dopaminergic neurons. *Stem Cells Dev*. 2014;23:1535–47.

Figure legends:

Figure 1: HIF-2 α protein status in a cohort of 37 pediatric high-grade gliomas (pHGGs).

Clinical data are detailed in table (A) and observed on tumor slides at diagnosis (B). A positive control (e.g., renal cancer) was used to assess HIF-2 α immunohistochemistry. A summary of analyses as well as correlations with several other biomarkers (C and D), survival outcome (E), MRI parameters (e.g., ADC mean calculation) and SUV analysis on FDG PET-scan (F) are presented. Metabolomic analyses were performed comparing positive immunostaining HIF2 tumors (HIF2 pos) and HIF2 negative (HIF2 neg) group (G) showing a significant association with ADEMA analyses to TCA, glutaminolysis, aminoacid and phospholipid metabolisms.

Figure 2: Spatio-temporal modulation of HIF2 or EPAS1 transcriptomic and proteic expressions in PDCL models deriving from 2 DMGs (BT35 and BT69) and 2 DIPGs (BT68 and BT83).

BT69 is the only one not expressing in its paired diagnostic and relapse tumor samples HIF-2 α . In (A), normalized protein expression on western blot analyses indicating a differential expression comparing 2D and 3D states of the same PDCL. The 3D fate is correlated to a stabilized HIF-2 α expression. (B) Bar graph chart in the upper panel showing the variable expression of HIF-2 α protein based on the brain locations and the later culture passages. The percentage of HIF-2 α positive cells is significantly higher in H3.3 K27M DIPGs ($p=0.0245$). (C) Localization of HIF-2 α protein in the thalamic (example of BT35) and DIPG (example of BT83) cells: cytoplasm versus nucleus and (D) its RNA expression in hypoxic conditions versus normoxia. (E) Exploration of HIF-2 α location in the cells after inhibition with PT2385 compound (partial antagonist) and in western blot analyses. (F) Its RNA expression showing no transcriptomic impact of the inhibitor except for 3D BT83 (*** $p<0.001$). (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $P<0.0001$).

Figure 3: Determination of HIF-2 α transcription factor targets by CUT&RUN technique and analyses in DIPG and DMG cells bearing H3.3 K27M mutation. (A) Heat map showing HIF2 read enrichment at TSS +/- 2KbC in BT35, BT69, BT68 and BT83. (B) Mean profiles of HIF-2 α TSS +/- 2Kb in each line. (C) Comparison of HIF2 peak numbers in the different cell lines. (D) Distribution of binding sites at different genomic regions and their size in bp (base pair). (E) Comparison of functional annotation enrichment with GO Biological Process of BT35, BT68 and BT83. This figure helps understand which functional annotation are shared or unique to the different cell lines. The number below each sample is the total number of genes of that sample that are seen in the different functional annotation gene sets. (F) Examples of binding profiles at the promoters of genes targeted by HIF-2 α in BT68 and BT83 lines where this protein is highly expressed.

Figure 4: Signaling pathways controlled by HIF-2 α . (A) Emapplet analyses from KEGG pathway enrichment approach in thalamic pHGGs (left panel) and in DIPGs (right panel). (B) Proteomic analyses by immunohistochemistry targeting mTor network (phospho-mTor (mTor), pS6-RP and phospho-ERK (p-ERK)) represented in bar graph charts (significant p set at < 0.05). (C) Significant RNA sequencing analyses of the pathways downregulated after HIF-2 α inhibition in PDCLs. (D) Bar graph representation of β catenin expression in cell nuclei (p=0.0351). (E) VEGFA RNA expression in all 2D and 3D PDCLs (* p<0.05, ** p<0.01). (F) Bar graph chart showing EGFR expression in HIF2 neg and HIF2 pos groups. (G) GRM2/3 proteomic expression presented in bar graphs exploring pHGG location (DIPGs vs. thalamic pHGGs vs. hemispheric pHGGs, p=0.0485) and HIF-2 α protein expression (p=0.075).

Figure 5: Metabolic network controlled and modulated by HIF-2 α overexpression. (A) Metabolomics in PDCLs bearing an elevated HIF-2 α comparing cells at 1% of oxygen untreated and treated cells with PT2385 compound. So, data of BT35, BT68 and BT83 are presented differentially from those of BT69 not expressing HIF-2 α . (B) RNA sequencing differential analyses of several metabolic pathways modulated after HIF-2 α inhibition in both cells DIPG vs. thalamic/DMG. (C) Binding profile at the GLUT1/SLC2A1 promoter in BT68 and BT83 and its RNA expression validation by RTqPCR of GLUT1 gene expression. (* p<0.05, ** p<0.01).

Figure 6: Impact of HIF-2 α inhibition by PT2385 compound on DIPG/DMG cell proliferation, invasion and radiosensitization. (A) Proliferation assay in mono-culture showing no significant impact on cell survival. Examples of 2D BT35 and 3D BT68 lines. (B) Migration assay under HIF-2 α inhibition evidencing an impact only in the thalamic DMG represented by BT35 cell line. In (C), the impact on cell migration is detailed based on the increased concentrations of PT2385 compound. (D) The co-culture of PDCL with iPSC derived in neurons in untreated and treated conditions, where we underlined the significant impact of PT2385 on tumor cell proliferation score (**, p<0.01). Example of BT68. (E) PDCL BT68 culture into iPSC-derived engineered neural tissue or “minibrains” impacted significantly by the addition of 20 μ M PT2385 (example of invasion score of BT68 significantly decreasing, * or p<0.05). (F) Radiosensitivity assays comprising : 1) the study of the survival fraction after increased doses of irradiation (left and below panel) separating PDCL into 2 groups and 2) the γ H2AX foci quantification assay combining treatments with a significant impact of PT2385 as a radiosensitizer in the cells highly expressing HIF-2 α . (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** P<0.0001).

Supplemental Figure 1: Data in patient relapses. (A) HIF2 protein expression in patient diagnostic and relapsing specimens with a significant higher proportion in the subgroup of recurrences ($p=0.0290$). (B) MRI parameter (e.g., ADC mean calculation) impact in the 3 groups comparing at diagnosis HIF2 negative (e.g., HIF2 neg) and HIF2 positive (e.g., HIF2 pos) expression subgroups to the recurrence where those values were available. The ADC value in relapsing subgroup is lowering to the level of HIF2 pos group. (C) Metabolomic analyses comparing relapses to their paired diagnostic specimens (total of 8 specimens, where 5/8 were HIF2 negative at diagnosis and at relapse 7/8 were expressing largely HIF2 protein).

Supplemental Figure 2: Complementary data subsequent to CUT&RUN analyses in BT35, BT69, BT68 and BT83 PDCLs. (A) Pie charts showing proportion of genomic regions associated to HIF-2 α peaks in BT68 and BT83 lines. (B) Comparison of functional annotation enrichment with KEGG pathway process of BT35, BT68 and BT83. This figure helps understand which functional annotation are shared or unique to the different cell lines. The numbers below each sample is the total number of genes of that sample that are seen in the different functional annotation gene sets.

Supplemental Figure 3: Analyses of HIF-2 α DNA binding motifs and search of transcriptional cofactors. (A) Significant DNA binding motifs found in a de novo motif discovery approach and compared to known motifs from JASPAR database. Selection based on e-value. (B) Examples of binding profiles at the promoters of potential transcriptional cofactors of HIF-2 α .

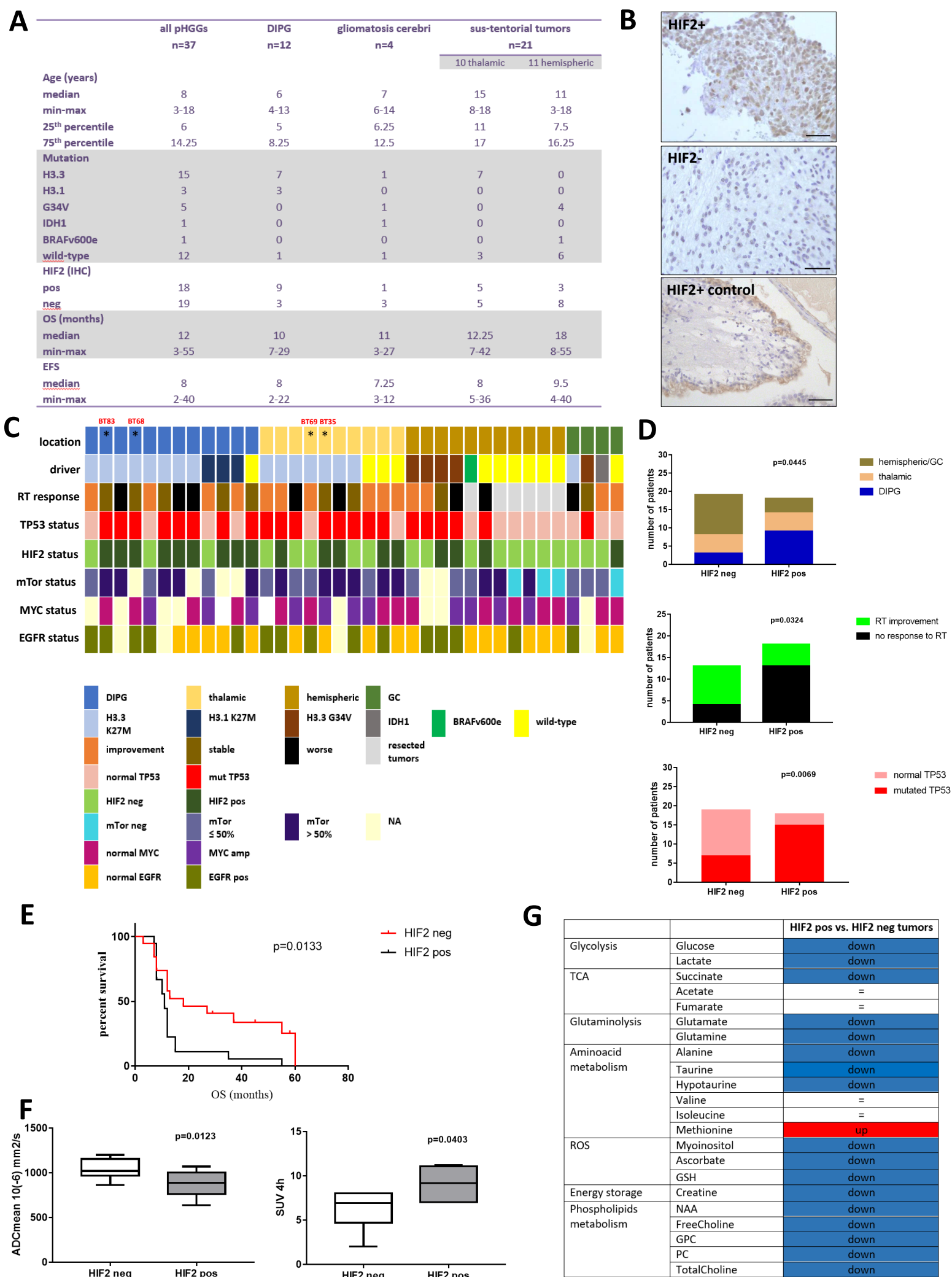
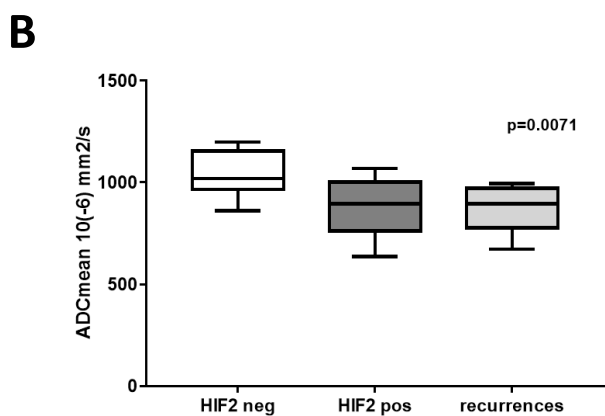
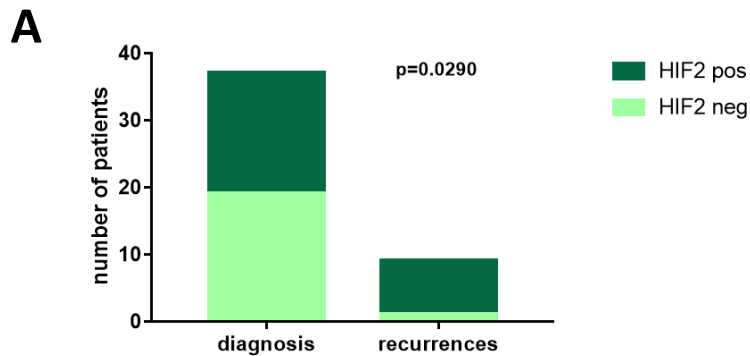


Figure 1 : HIF-2 α protein status in a cohort of 37 pediatric high-grade gliomas (pHGGs).



C

		relapses vs. diagnostic samples
Glycolysis	Glucose	down
	Lactate	down
	Succinate	=
	Acetate	down
	Fumarate	down
Glutaminolysis	Glutamate	down
	Glutamine	down
Aminoacid metabolism (serinolysis)	Alanine	=
	Taurine	down
	Hypotaurine	down
	Valine	=
	Isoleucine	down
	Glycine	down
	Methionine	up
ROS regulation	Myoinositol	down
	Ascorbate	down
	GSH	down
Energy storage	Creatine	down
Phospholipid metabolism	NAA	down
	FreeCholine	down
	GPC	down
	PC	down
	TotalCholine	down

Supplemental Figure 1 : Data in patient relapses.

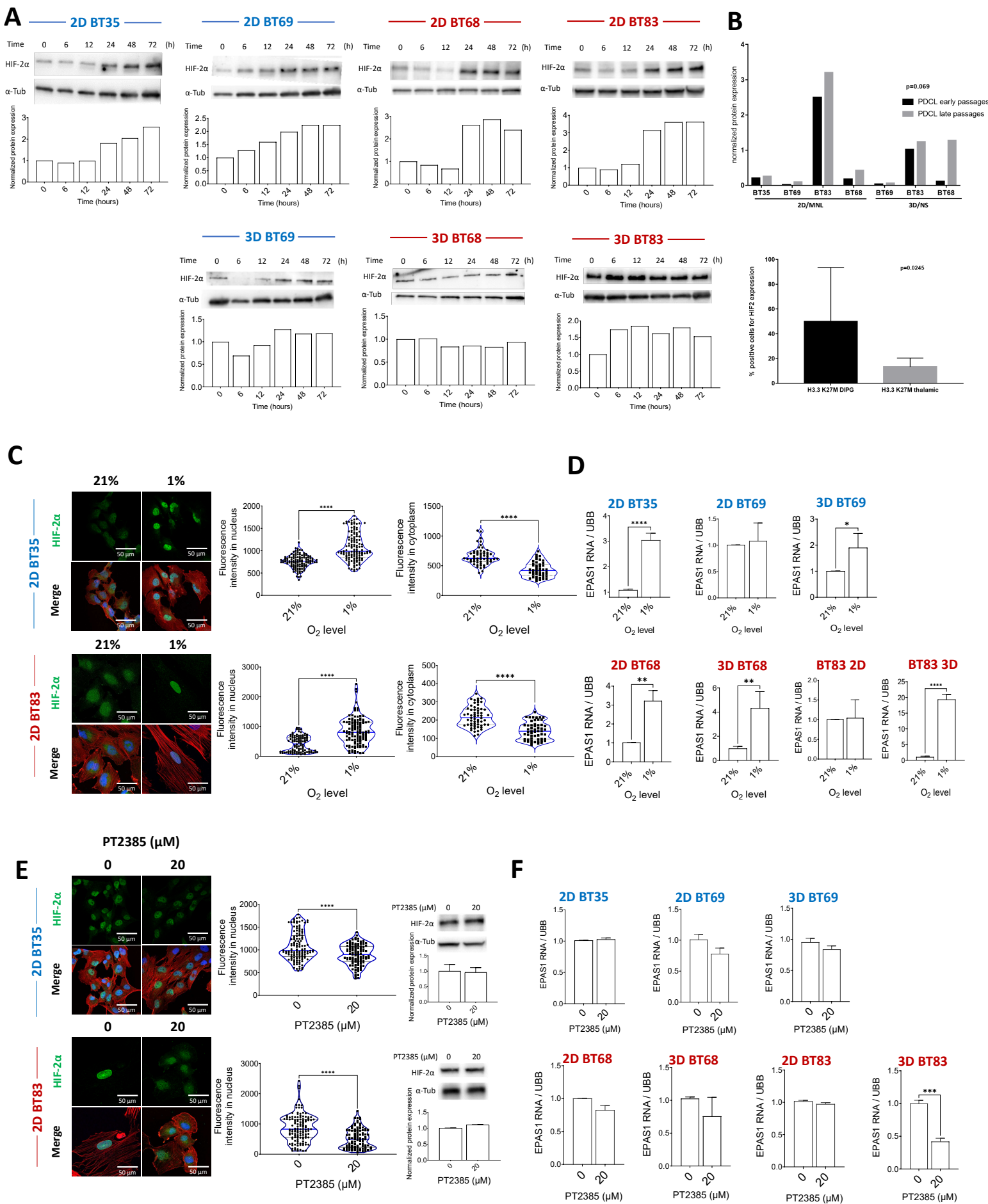


Figure 2 : Spatio-temporal modulation of HIF2 or EPAS1 transcriptomic and protein expressions in PDCL models deriving from 2 DMGs (BT35 and BT69) and 2 DIPGs (BT68 and BT83).

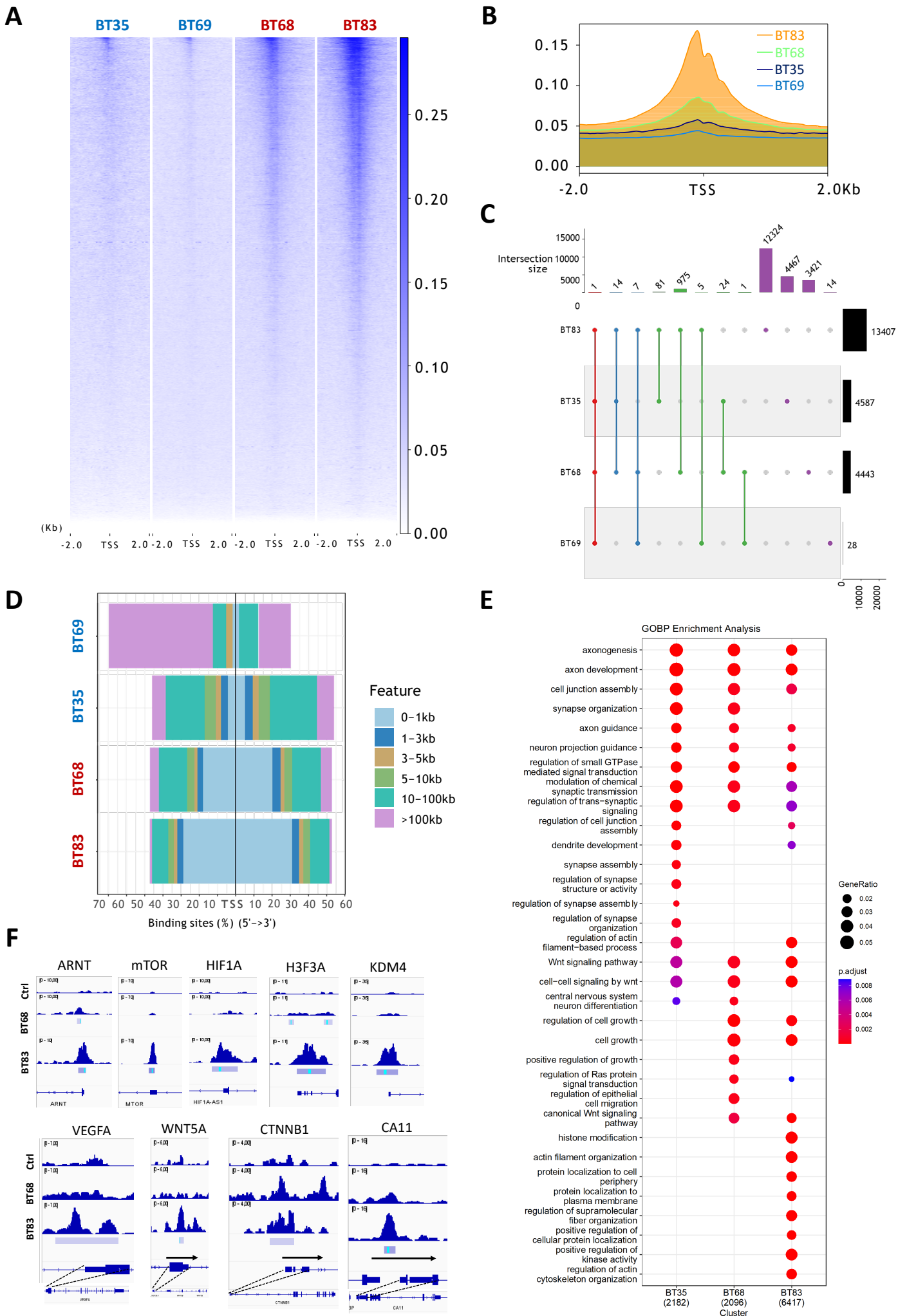
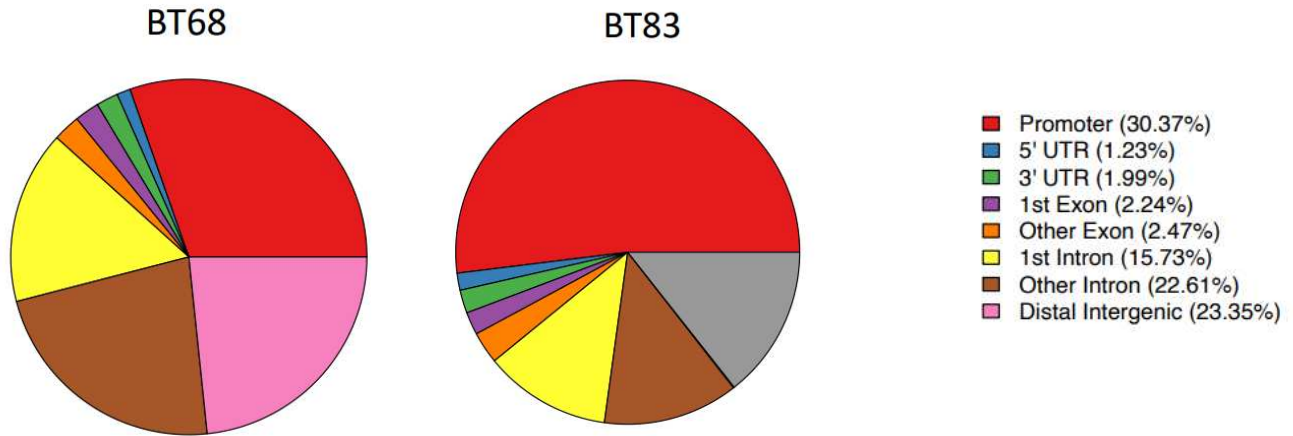
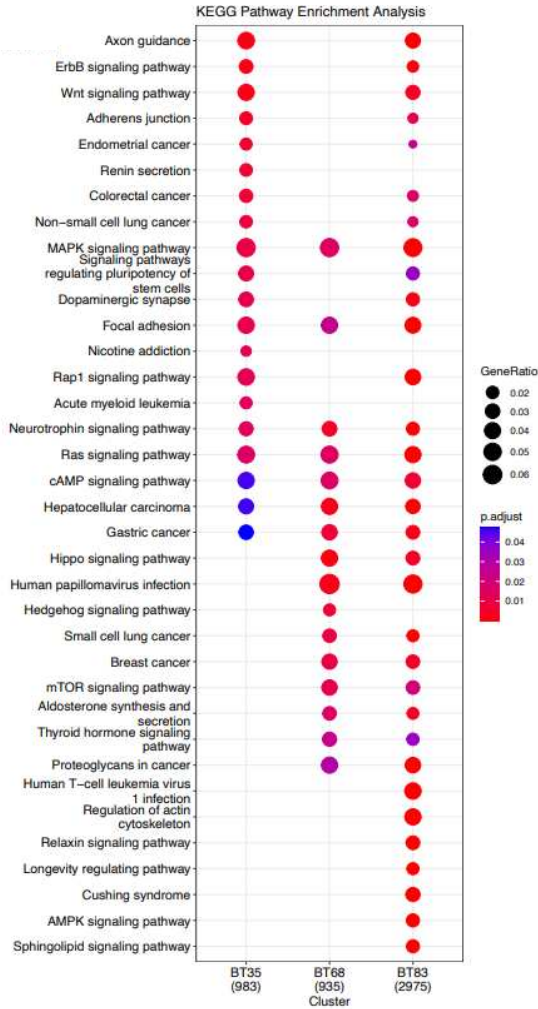


Figure 3: Determination of HIF-2 α transcription factor targets by CUT&RUN technique and analyses in DIPG and DMG cells bearing H3.3 K27M mutation.

A



B



Supplemental Figure 2 : Complementary data subsequent to CUT&RUN analyses in BT35, BT69, BT68 and BT83 PDCLs

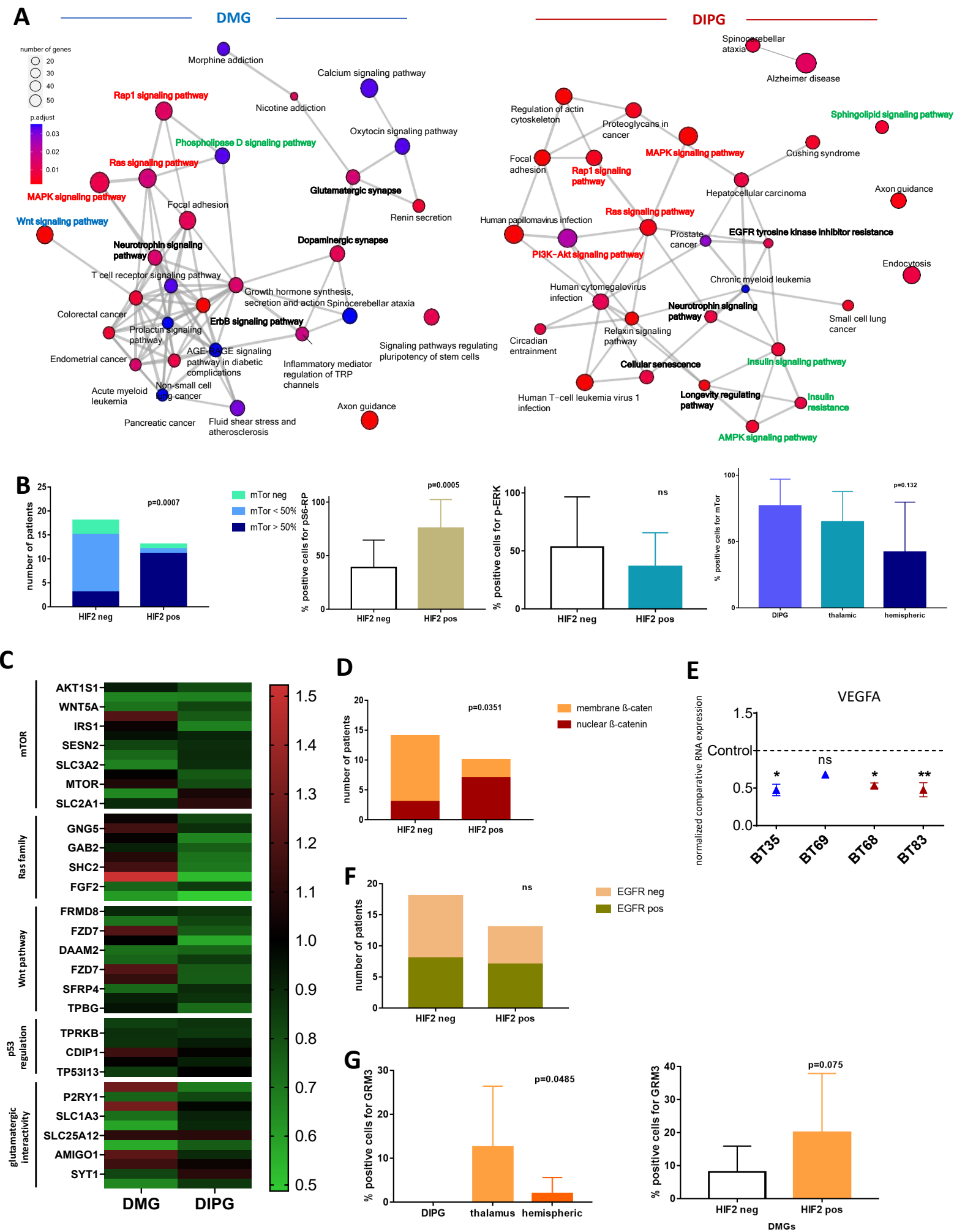
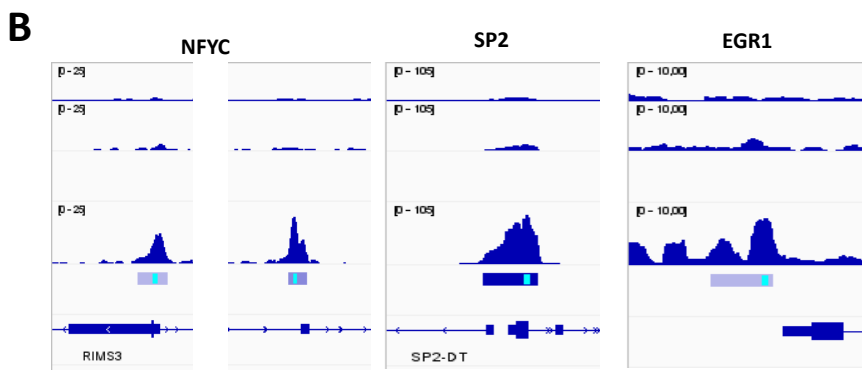
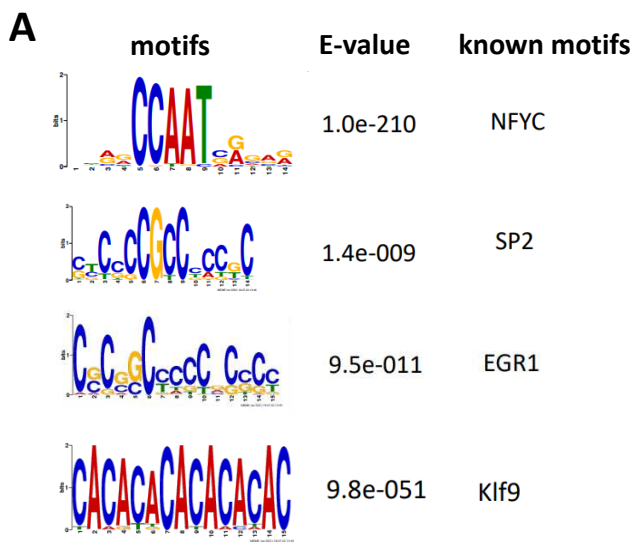


Figure 4: Signaling pathways controlled by HIF-2 α .



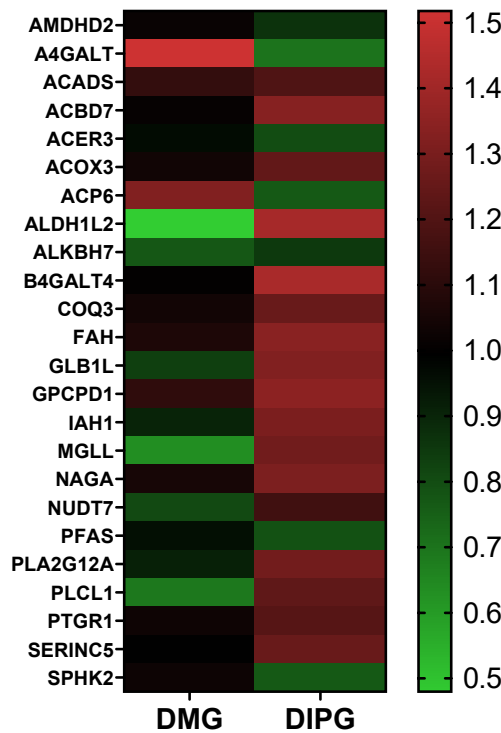
Supplemental Figure 3 : Analyses of HIF-2 α DNA binding motifs and search of transcriptional cofactors.

A

Cells at 1% vs. cells treated with PT2985		HIF2+ PDCLs BT35 - BT68 - BT83	HIF2- PDCL BT69
Glycolysis	Glucose	down	=
	Lactate	down	down
TCA	Succinate	down	down
	Fumarate	=	up
	Acetate	=	down
Glutaminolysis	Glutamate	down	down
	Glutamine	down	down
Aminoacid metabolism	Taurine	down	=
	Methionine	down	=
	Alanine	down	down
	Glycine	down	down
	Valine	=	=
	Isoleucine	=	=
ROS	Myoinositol	down	down
	Ascorbate	down	up
	GSH	down	down
Energy storage	Creatine	down	=
Phospholipids metabolism	NAA	down	down
	FreeCholine	down	down
	GPC	down	up
	PC	down	down
	TotalCholine	down	up

B

metabolic pathway expression



C

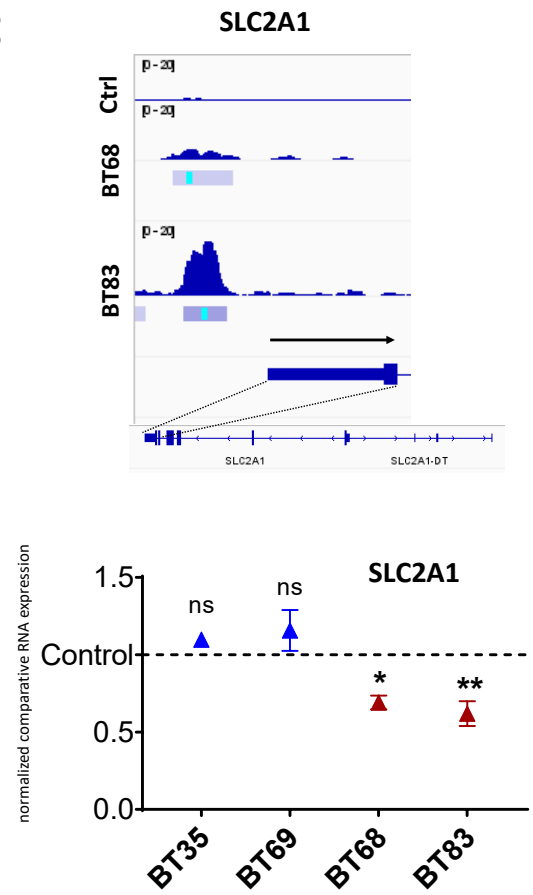


Figure 5: Metabolic network controlled and modulated by HIF-2 α overexpression.

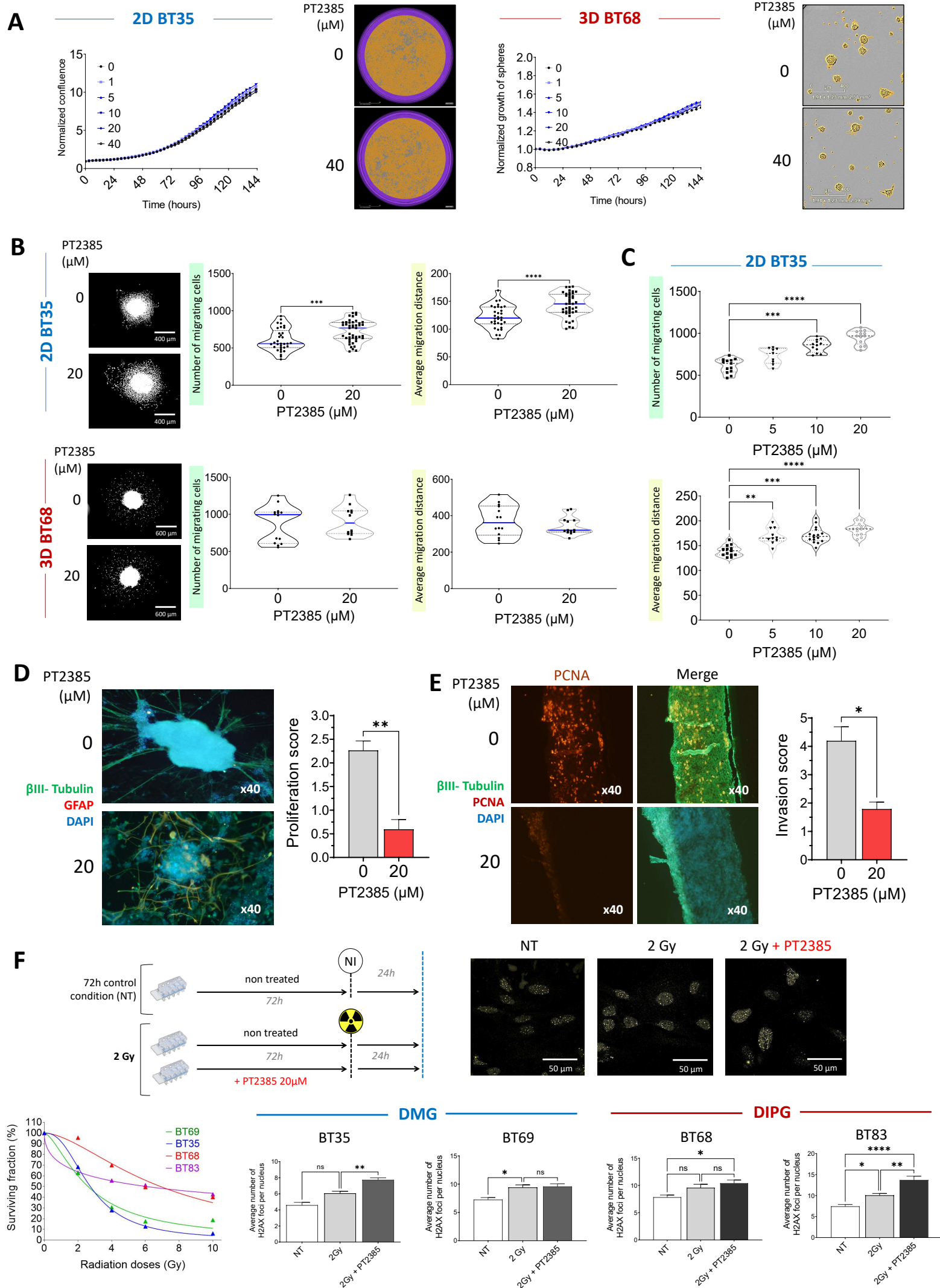


Figure 6 : Impact of HIF-2α inhibition by PT2385 compound on DIPG/DMG cell proliferation, invasion and radiosensitization.

- **Discussion/Perspectives**

Ce travail a permis de mettre en évidence l'implication de HIF-2 α dans le phénotype tumoral et l'agressivité des tumeurs de type DMG et DIPG chez l'enfant. L'hyperexpression de HIF-2 α était particulièrement associée à la mutation driver H3.3, à la mutation TP53 et à une radorésistance des tumeurs. Ces résultats s'inscrivent ainsi dans la continuité de précédents travaux au sein de notre équipe, faisant de HIF-2 α un marqueur de mauvais pronostic dans les GHG pédiatriques. Ils rejoignent sur ce point les études menées dans les GHG adultes et renforcent également l'intérêt d'intégrer HIF-2 α comme un biomarqueur prédictif dans les diagnostics moléculaires des GHG pédiatriques.

Les approches de CUT&RUN ont permis d'identifier des voies de signalisation moléculaires à la fois communes et spécifiques au DMG / DIPG. On retrouve des modulations des voies de la glycolyse, de l'angiogenèse et associées à la prolifération tumorale. Dans les DIPG, la voie mTor et la voie canonique de Wnt semblent particulièrement modulées par HIF-2 α , alors que dans les DMG, ce sont les voies non canoniques de Wnt et celles associées aux interactions glutamatergiques qui semblent le plus impactées. Ces résultats soulignent une disparité moléculaire entre ces entités tumorales à travers les modulations de HIF-2 α et l'implication du microenvironnement cellulaire.

Le rôle de ce microenvironnement cellulaire s'est ensuite confirmé lors des tests de prolifération et d'invasion. L'inhibition fonctionnelle de HIF-2 α par le PT2385 n'a eu globalement aucun effet en monoculture mais a entraîné une nette diminution de la prolifération et/ou de l'invasion des PDCLs lorsque celles-ci ont été placées au sein du microenvironnement cellulaire cérébral reconstitué par les ENTs. Par ailleurs, les résultats préliminaires obtenus dans le cadre de la radiosensibilité des PDCLs soulignent un potentiel effet radiosensibilisateur en réponse à l'inhibition de HIF-2 α et en fait une cible thérapeutique potentielle à utiliser en concomitance à la radiothérapie.

La suite de ce travail consisterait à explorer davantage le rôle de HIF-2 α dans les GHG pédiatriques en incluant notamment des tumeurs avec d'autres mutations *driver* que la mutation H3K27M. On pourrait par exemple inclure des lignées mutées pour BRAFV600E ou des lignées WT qui ont déjà pu être dérivées au laboratoire et comparer les voies de signalisation modulées par HIF-2 α ainsi que les effets thérapeutiques en réponse à une inhibition fonctionnelle de HIF-2 α .

De même, les différents tests de migration en monoculture ont été effectués en 2D. Il serait intéressant d'étudier cette migration au sein d'un environnement 3D en monoculture, à travers l'utilisation de matrices à base d'hydrogel ou de matrigel. Ceci permettrait de mieux reconstituer les contraintes spatiales qui peuvent survenir lors du développement tumoral et d'observer si l'on obtient les mêmes résultats qu'en 2D, à savoir que l'inhibition de HIF-2 α n'a aucun impact sur la migration de cellules tumorales lorsque le microenvironnement neuronal est absent.

A ce jour, les tests de prolifération et d'invasion en coculture avec un microenvironnement neuronal et les ENTs ont été réalisés uniquement sur BT68. De nouveaux essais avec les autres PDCLs que nous avons utilisées sont en cours et permettront de comparer les effets du microenvironnement tumoral et de l'inhibition de HIF-2 α selon différents profils d'expression de HIF-2 α . Si ces approches confirment l'importance du microenvironnement cellulaire dans la réponse tumorale à une inhibition fonctionnelle de HIF-2 α , on pourrait alors envisager à plus long-terme une étude sur des modèles in-vivo.

HIF-1 α and HIF-2 α combinatorial targeting or how to reverse their balanced oncogenic impact

- **Introduction de ce travail**

L'hypoxie et l'activation des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α est un phénomène courant dans les tumeurs solides et contribue à leur développement à leur progression. Ces facteurs de transcription induisent une reprogrammation d'une multitude de gènes favorisant l'angiogenèse, la prolifération, la migration, la survie ou la reprogrammation métabolique des cellules tumorales, créant un environnement favorable à la tumeur. Ces facteurs de transcription sont également présents et actifs dans les GHG pédiatriques, et plus particulièrement dans les DMG et les DIPG. De précédentes études menées au sein de notre équipe ont pu observer une diminution de la progression tumorale en réponse à une inhibition de l'axe mTOR/HIF-1 par des traitements combinant de l'irinotecan et de la rapamycine à faibles doses (Guérin et al., 2012; Jannier et al., 2020). Ce phénomène s'est traduit par une baisse de la progression tumorale chez les patients et une diminution de la prolifération *in vitro* des PDCLs associées à ces tumeurs (Blandin et al., 2019; Jannier et al., 2020; Nguyen et al., 2017). En parallèle, les cellules et les tumeurs résistantes à ces traitements montraient une surexpression de HIF-2 α . D'autres travaux menés au cours de cette thèse et présentés précédemment ont pu souligner le rôle majeur de HIF-2 α dans l'agressivité des DMG et des DIPG et l'intérêt thérapeutique d'une inhibition fonctionnelle de HIF-2 α à l'aide du composé PT2385. Les facteurs HIF-1 α et HIF-2 α semblent alors agir de manière concomitante dans la modulation de l'adaptation tumorale à l'hypoxie. Face à cela, l'intérêt de cette étude consiste à effectuer une inhibition combinée de ces deux sous-unités.

- **Objectifs**

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été d'étudier les expressions respectives de HIF-1 α et HIF-2 α dans une cohorte de GHG pédiatriques et dans des PDCLs dérivées de ces tumeurs et mutées pour H3.3K27M. Il s'agissait ensuite de tenter de mettre en évidence la balance d'expressions protéiques et transcriptomiques des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α et de leurs

gènes respectifs (HIF1A et EPAS1) et d'évaluer les conséquences d'une inhibition combinée de ces deux sous-unités sur le développement et la progression tumorale des DMG et des DIPG.

- **Méthodologie**

De précédentes études menées au sein de notre équipe ont pu montrer la capacité de faibles doses d'irinotecan à inhiber HIF-1 α dans des tumeurs de patients et des PDCLs (Guérin et al., 2012; Nguyen et al., 2017). Par ailleurs, des antagonistes spécifiques de HIF-2 α ont montré leur capacité à inhiber l'activité transcriptionnelle de cette sous-unité en empêchant sa dimérisation avec la sous-unité HIF-1 β (ou ARNT). Les expressions protéiques de HIF-1 α et HIF-2 α ont été étudiés en IHC dans une cohorte de 37 GHG pédiatriques. De même, les expressions des gènes HIF1A et EPAS1 ont été investiguées à travers des bases de données disponibles en libre accès. Dans les PDLCs dérivées de DMG et de DIPG, nous avons ensuite tenté de mettre en évidence la balance d'expression protéique HIF-1 α /HIF-2 α en western-blot et en immunofluorescence, en inhibant sélectivement l'une ou l'autre sous-unité. Ensuite, il s'agissait de développer une stratégie thérapeutique permettant un ciblage simultané de HIF-1 α et HIF-2 α à l'aide d'un traitement combinant de l'irinotecan et du PT2385. Le but était de comparer ses effets sur la progression tumorale (prolifération et invasion) par rapport à ceux d'une inhibition sélective de l'une ou l'autre de ces sous-unités. Cette approche a été réalisée en monoculture ou au sein de tissus neuronaux modifiés (ENTs).

HIF-1 α and HIF-2 α combinatorial targeting or how to reverse their balanced oncogenic impact

Quentin Fuchs¹, Romain Vauchelle¹, Erika Cosset², Lucas Gorke², Benoit Lhermitte³⁻⁴, Petr Nazarov⁵, Eric Van Dyck⁶, Eric Guérin⁷, Clémence Hubsch¹, Youssef Hibaoui², Anis Feki², Thibaut Wolf³, Andres Hugo Coca⁸, Sophie Foppolo¹, Sophie Martin¹, Monique Dontenwill¹, Natacha Entz-Werlé¹⁻⁹

¹ CNRS UMR 7021, Laboratory of Bioimaging and Pathologies, Faculty of Pharmacy, Illkirch, France

²GLIMMER Of lIght (GLIoblastoma MetabolisM, HetERogeneity, and OrganoIds), Cancer Research Centre of Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR 5286, Lyon, France

³Pathology Department, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France

⁴Centres de Ressources Biologiques, University Hospital of Strasbourg, France

⁵Multimomics Data Science, Department of Oncology and Bioinformatics Platform, Quantitative Biology Unit, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg

⁶DNA Repair and Chemoresistance, Department of Oncology, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg

⁷Department of Cancer Molecular Genetics, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, University Hospital of Strasbourg, France

⁸Department of Neurosurgery, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France

⁹Pediatric Onco-hematology Department, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France

*** Corresponding author**

Natacha Entz-Werlé, MD, PhD

Pediatric Onco-Hematology – University Hospital of Strasbourg

1 avenue Molière – Strasbourg – 67098 Cedex

UMR CNRS 7021 – Laboratory of Bioimaging and Pathologies

74 route du Rhin – 67400 – Illkirch

Phone: +33 3 88 12 83 96 – Fax: +33 3 88 12 80 92

Natacha.entz-werle@chru-strasbourg.fr

Abstract

HIF-1 α and HIF-2 α are master regulators operating during tumor hypoxia. Few data are available on their role in pediatric high-grade gliomas (pHGGs), in which recent insights on metabolism and immunotolerance induction through hypoxia-driven mechanisms might opening the path to study further this process and their molecular actors. Our study investigated and confirmed the balanced dependency of both transcription factors in pHGGs at protein levels, but not in their transcriptional reprogramming. We also examined how HIF-1 α and HIF-2 α are operating during acute and chronic hypoxia in a spatiotemporal cell setting. HIF-1 α was clearly correlated within pHGGs samples and models to acute and moderate hypoxia, whereas HIF-2 α was associated to H3.3K27M mutant DIPG and chronic hypoxia. The impact of targeting both transcription factors in patient-derived pHGG models was on cell proliferative and invasive mechanisms, especially when studying this drug testing in engineered neural tissues. We might position those new targets as an innovative way to counterpart their hyperactivation in tumor core hypoxia and to propose them as an innovative approach interfering with cell-to-cell adhesion and synaptic interactions with normal brain cells.

Introduction

Intratumoral hypoxia is one of the mechanisms explaining in cancers their therapeutic failure due usually to the promotion of tumor cell stemness, migration, invasion, angiogenesis and/or metabolic switch (1). In pediatric high-grade gliomas (pHGGs), hypoxia-driven mechanisms were less pushed forward even histological features are outlining the presence of highly frequent hypoxic zones and an abnormal neoangiogenesis. Recently, this process was directly described in pHGG as engaging the tumoral microenvironment through an immunomodulation or shaping cell resistance (2–5). Other recent indirect work was involving epigenetic specificities and metabolisms, hallmark of hypoxic gene regulation, in DIPG (2,6–8). At a mechanistic point of view, the main transcription factors (TF) of this process, HIF-1 α and HIF-2 α , are acting as oxygen sensors that are degraded under normoxic conditions, but under low oxygen concentration, as in tumor core, the levels of HIF proteins are stabilized and increased to bind to their co-factor ARNT (HIF-1 β). Thereafter, those TFs are translocating to the nucleus to initiate gene transcription (9). Our own past preclinical and clinical work in targeting mTor/HIF-1 α revealed its efficacy in pHGGs, but also evidenced mechanisms of potential resistance to this targeting through the balanced expression of HIF-1 α and HIF-2 α (7,10). We already had preliminary data in a small tumor collection where we reported their hyperactivations, but we were not able to estimate this balanced expression and its concomitant role in pHGGs. With the involvement of irinotecan as a HIF-1 α inhibitor when using low doses (10,11) and the recent development of specific HIF-2 α antagonists in clear cell renal carcinomas (12–15), we sought to combine them in preclinical *in vitro* models. So, the purpose of our study is to establish, first, precise data in patient tumors and patient-derived cell lines about HIF-1 α /HIF-2 α balanced expression at proteic and RNA levels and, at the end, how we could extinct and understand both TF activities in pHGGs with two inhibitors (e.g., irinotecan for HIF-1 α inhibition and PT2385/PT2977 compounds for HIF-2 α antagonism).

Material and methods

Patient samples and database

All samples were obtained after the informed consent of parents and patients was given. The study was conducted in accordance with the ethical committee approval (declaration number DC-2017-3090). We investigated retrospectively data from 37 pHGGs (12 diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPGs), 10 diffuse midline gliomas (DMGs), 11 supra-tentorial locations and 4 gliomatosis cerebri) compiled consecutively from our center (University Hospital of Strasbourg, UHS) (Figure 1A) and diagnosed between January 1, 2010, and December 31, 2019. All were screened by Next-Generation Sequencing (NGS) for driver mutations (H3.3 and H3.1K27M, H3.3G34V/R, IDH1R132H and BRAFv600 mutations) (7). All pHGG patients were treated in first line therapy with radiotherapy, which was systematically associated to temozolomide except for DIPGs and 2 GCs. We were able to split 31 patients with MRI visible disease after surgery (biopsy or partial resection) into two groups of response to irradiation (IR): 1) improvement of neurological symptoms and 2) stable or worsening of the neurological symptoms after IR. The RNAsequencing database analyses were performed using data from previously published studies (16,17).

Immunohistochemistry

We used formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) specimens for immunohistochemical analyses stored in the Centre de Ressources Biologiques of UHS. IHC was performed using an automated tissue staining system (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). The HIF-1 α antibody was purchased from Abcam (Paris, France) and HIF-2 α from Cell Signaling Technology (Ozyme, St-Quentin-en-Yvelines, France). Two pathologists analyzed protein expression independently. The positive assessment was set above 5% of positive staining cells in the slide.

Patient-derived cell lines (PDCLs) generation and culture

PDCL were initiated from patient samples and characterized, as described in our previous work (7). PDCLs were routinely cultured in DMEM/F12 GlutaMAX medium (31331-028, Gibco) containing 1% MEM non-essential amino acids (NEAA)(X0557-100, Dutscher). In case of 2D culture or more differentiated cells, the medium was supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) (Dutscher). For 3D or stem-cell culture, the medium was supplemented with 2% B27 (12587010, Gibco), human epithelial growth factor (EGF)(100-008, Reliatech) and human basic-Fibroblast Growth Factor (bFGF) (300-003, Reliatech). Cells were systematically cultured at 1%O₂ in an MCO-5M-PE PHCbi inCusaFe incubator (Panasonic) and passaged with a standard enzymatic procedure using Accutase (A6964, Sigma). BT35 and BT69 were initiated from H3.3K27M mutant DMGs and BT68 and BT83 from H3.3K27M mutant DIPGs.

Compounds for functional assay and drug testing

Irinotecan (Hospira, 20mg/mL) was provided by the Pharmacy Department of UHS and was diluted into 20mM in D-PBS 1X. PT2385 and PT2977 antagonists were obtained from a CDA with Peloton Therapeutics. They were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 20 mM.

RNAsequencing of PDCLs

As already described in our previous published work (7), each PDCL was sequenced at 1%O₂ and in the treated conditions with 20μM PT2385, 20μM PT2977 and with 5 μM Irinotecan. The RNAsequencing analyses were conducted as in those previous publications. For mRNA expression profiling, a significant differential expression was assigned as a 2-fold up and a 2-fold down in comparison with control. Up and down-regulated genes were determined for each

drug versus a control (untreated cell lines) in hypoxic conditions and GSEA preliminary analyses were performed.

Protein isolation and western-blot (WB) analysis

$5 \cdot 10^5$ and 10^6 cells were cultured in 1%O₂, and proteins were extracted after 6, 12, 24, 48, or 72 hours. Electrophoresis was performed on a 4-20% polyacrylamide gel (BioRad) and a dry transfer was done on a 0.2µm polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) (BioRad). Western Blot analyses were performed using standard techniques with the following antibodies of HIF-1α (1:1000, ab51608 Abcam), HIF-2α (1:800 dilution, ab199 Abcam), GAPDH (1:5000, MAB374 Millipore), α-tubulin (1:2000, T9026 Sigma), anti-mouse IgG HRP Conjugate (1:10000, W402B Promega) and anti-rabbit IgG HRP Conjugate (1:10000, W401B Promega). Antibody binding was visualized with the chemiluminescent kit Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad) on the LAS4000 imaging system (GE Healthcare). Quantification was performed with ImageJ software (v1.53) and normalized to the endogenous control.

Immunofluorescent (IF) assessment

30 000 cells/well were seeded onto 12-mm sterilized coverslips and cultured for 72h in 24-well plates in normoxic (21%O₂) or hypoxic (1%O₂) conditions. In hypoxic conditions, cells were treated or not with PT2385 (20µM) and/or with increasing concentrations of Irinotecan (0.25 to 2.5µM). After 72h, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (Electron Microscopy Sciences, Thermo Scientific) and permeabilized for 3 minutes in D-PBS-Triton 0.1%. Immunostaining was performed with primary antibodies against HIF-1α (1:500 Ab51608, Abcam), HIF-2α (1:200, ab109616 Abcam) together with an anti-rabbit Alexa Fluor™ 568 IgG (1:2000, A11011 Invitrogen). Nuclei and cytoskeleton were labeled with DAPI and phalloidin actin 488 (1:2000, Sc3598 and Sc3598, Santa Cruz Biotech). Images were obtained using a

confocal microscope (LEICA TCS SPE II) with an x63 oil immersion objective (NA:1.40-HCX PL APO CS). Fluorescence intensity and location were quantified in ImageJ (v1.53) with a macro developed by our imaging platform.

Proliferation assays

2000 to 6000 cells/well were seeded onto a 96-well plate and cultured in hypoxic conditions for 144h. Treatments with PT2385 (20 μ M) or PT2977 (20 μ M) and/or increasing doses of Irinotecan (0.25 to 100 μ M) occurred immediately after seeding. Cell confluency was followed with an IncuCyte®ZOOM system placed in a HERACell VIOS 250i incubator (Thermo Fischer) maintained at 1%O₂. Normalization was done to the confluency at time zero. IC50 were calculated using the GraphPad Prism9 software and corresponds to 50% of cell survival as compared to the maximal effect of the drugs.

Migration assay

Three-day-old spheroids were seeded into 24-well plates coated with fibronectin (5 μ g/mL, C43-060 Promocell) or Poly-D-Lysine (50 μ g/mL, A3890401, Gibco) and cultured in hypoxic conditions for 96h. Treatment with PT2385 (20 μ M) and/or increasing doses of Irinotecan (0,25 to 10 μ M) occurred immediately at seeding. Spheroids were then fixed and stained with DAPI diluted in 3% BSA D-PBS (1:2000). Images were obtained on an epifluorescence microscope (Axio Zeiss NA 0.3 WD 73) equipped with a camera (Camera Moticam Pro 285D 60N-C 2/3' 0.63x 426113) and a 5x lens (Ph1 Plan-NEOFLUAR 5x/0.15). The number of evading cells and their migration distance were quantified in ImageJ (v1.53).

Co-culture of engineered neural tissue (ENT) and PDCLs

The iPSCs were maintained in StemFlex medium supplemented with its supplement and 1% penicillin/streptomycin. Cells were passaged onto Matrigel (Stemcell Technologies) with a standard enzymatic procedure (Accutase, Invitrogen) and replated with Rho-associated protein Kinase (ROCK) inhibitor (10 μ M Y-27632; Ascent Biosciences) for 24 hours to enhance cell survival. For iPSC-derived ENT, tissues were generated as previously described (18,19) including some modifications. Briefly, iPSC colonies were detached with Accutase and cultured in suspension in ultra-low attachment plates (Corning Costar) for 28 days in two different neural induction media: the neural and dopaminergic induction medium.

Statistical analyses

Statistical significance between groups was evaluated with Kruskal Wallis and/or Dunnett tests and/or Wilcoxon rank signed test. A p-value <0.05 was considered significant and controlled on a confidence interval of 95%. “ns” corresponds to “not significant”. All analyzes were performed and represented using GraphPad Prism v9 software.

Results and discussion

HIF-1 α and HIF-2 α expressions: only protein levels might be balanced in pHGG cohorts

In the 37-pHGG cohort (summarized in Figure 1A), we used immunohistochemistry (IHC) to systematically characterize both TF proteins and checked their concomitant expression in each sample. HIF-1 α was expressed in 27/37 tumors with a positive broad nuclear immunostaining from 20 to 100% (mean of 35%) of the tumor cells, whereas HIF-2 α was present in 18 tumors with a positive nuclear expression from 15 to 100% cells (mean of 25%) (Figures 1B, 1C and 1D). Concomitant hyperexpression of both TFs was only detected within 14 samples, whereas no expression was observed in 6 specimens. A positive and significant correlation was

evidenced between HIF-2 α and DIPGs (present in both H3.3K27M and H3.1K27M mutant specimens, 6 and 2, respectively) ($p=0.045$). No other correlation with driver mutation, nor location was demonstrated, except when considering both concomitant expressions, which was predominantly observed in 8/12 DIPGs ($p=0.025$). Thereafter, to go further in the balance between HIF-1 α and/or HIF-2 α protein expressions, considering each patient, as represented in Figure 1C, statistical tests were performed and exhibited a significant correlation (Wilcoxon rank t test, $p<0.01$). Four patients presented the same percentage of immunostaining positivity for both TFs, whereas 8 tumors had a higher HIF-2 α expression comparatively to the 19 specimens with a HIF-1 α predominant staining. When we searched further for clinical or molecular correlations with those expressions, we also found a statistically significant positive correlation between HIF-2 α positive staining and response to radiotherapy, linking hyperexpression to poor responders.

Based on those results obtained by immunostaining, we sought to leverage several transcriptomic databases previously published and now publicly available (20). We checked the spectrum of variability we might have in HIF1A and EPAS1 expressions and only observed a positive correlation across the entire spectrum of their expression, which conduct not identifying any specific group. All patients bearing an overexpression of EPAS1 presented also a HIF1A overexpression.

So, only a balanced proteic expression might be suspected to sustain their differential roles in pHGGs and specifically in DIPGs, which was more in favor of post-transcriptional induction factors and not as a transcriptional reprogramming (21). Few publications are promoting epigenetic modulation in those processes, but also how tumor cells and their tumor microenvironment can induce a stabilization of those proteins through, for example, glucose availability, spatial hypoxia modulation or tumor cell fate (e.g., differentiation state *vs.* stem cells) (2,22,23). This unique protein balance might also reveal a duality in the hypoxic

microenvironmental regulation, where HIF-1 α is usually associated to an acute and moderate induced chronic hypoxia and HIF-2 α to a more prolonged and profound hypoxia (24). The tumor specimens at surgery time-point cannot answer the question related to this balance dependency based on acute vs. chronic environmental evolution that will be much more approximate in functional experiments. To go further, as we had a statistical correlation between DIPGs and HIF-2 α higher expression, we focused on DIPG and DMG models bearing a unique type of driver that is H3.3K27M mutation.

A unique balanced HIF protein expression based on a spatio-temporal hypoxic environment modulation is present in H3.3K27M mutant DIPG/DMG

To validate then this hypothesis of balanced expression at protein level and investigate the spatiotemporal impact of those TFs, we examined functionally our patient-derived models at protein (WB and IF analyses) and RNA levels. The proteic results are summarized in Figures 2. First, we investigated the evolution of HIF-1 α and HIF-2 α WB expressions in DMG and DIPG cells (Figure 2A) after hypoxic exposure from time 0 to 72 hours. Similarly, in DIPG and DMG cells, HIF-1 α is induced rapidly after exposing cells to 1%O₂ until 24 hours and then, protein concentration is decreasing to its initial level and further down. HIF-2 α is maintaining its initial proteic expression and increased its concentrations just before 24 hours of hypoxia, especially in DIPG cells vs. DMG lines ($p < 0.05$). BT69 had a very low protein expression of HIF-2 α comparatively to its HIF-1 α level, as it was observed in its paired tumor specimen. Globally, those results are confirming HIF-1 α as a crucial TF during the acute phase of hypoxic environment, whereas HIF-2 α might be considered as a master regulator during chronic hypoxia. This latter TF is probably linked when hyperactivated to a more aggressive cell phenotype, as correlated with poor responders to irradiation in the 37-pHGG cohort (25). As

we already know, cancer cells exposed to prolonged hypoxia are usually more aggressive and resistant to radiation due to the differential gene expression contributing to this cell phenotype. We also checked functionally both expressions and their balance using HIF-1 α inhibitor and HIF2 α antagonists, interfering with ARNT heterodimerization (e.g., PT2385 and PT2977). In figures 2B and C, example of PT2385 impact in BT68 cell line. All in vitro cell cultures are expressing a high intensity of HIF-1 α and HIF-2 α proteins with no differences between lines, except for BT69 where HIF-2 α was at the limit of detection with our IF microscope. In the left graph of Figure 2C, HIF-1 α protein level is increasing in cell nuclei of BT35 cells during hypoxia and furthermore when cells are treated with HIF-2 α antagonists ($p < 0.0001$) (no variations between PT2385 or PT2977, data not shown). Similar results were evidenced in all other lines allowing to suggest, as in other cancers, that functional HIF-2 α inhibition is inducing a higher level of HIF-1 α protein to counterbalance the transcriptional deregulation subsequent to HIF-2 α antagonism (22). Furthermore, the IF assay looking to HIF-2 α expression and localization into the cells was showing an increase of HIF-2 α translocation into nuclei (right panel of Figure 2C), whereas its IF intensity is decreasing into the cytoplasm. When using PT2385 (Figure 2C) or PT2977 (data not shown), the HIF-2 α intensity is decreasing into the nuclei to stay into the cell cytoplasm, restoring a situation as in normoxia and conducting to TF destabilization. Since we also have access to a HIF-1 α inhibitor, we examined the same IF assessments regarding HIF-1 α and HIF-2 α intensity levels and cell localization when using Irinotecan at several and increased concentrations (Figure 2D, example of BT35 line IF, witness of all lines except for BT69 regarding HIF-2 α intensity). As expected, HIF-1 α intensities decreased significantly into the cell nuclei and proportionally to the rise of Irinotecan concentrations (left graph of Figure 2E, **** $p < 0.0001$). We observed a downregulation of HIF-1 α protein in the paired WB analyses (left part of the graph in Figure 2F, $p < 0.001$).

Inversely and concomitantly, when Irinotecan is used, HIF-2 α protein intensity is increasing in the cell nuclei, as well as its protein concentration detection by WB analyses (right panel and part of the Figures 2E and 2F). To note, only a low dose of Irinotecan seems necessary to obtain this HIF-1 α inhibition, as previously published (20). The anti-topoisomerase I effect is usually only described at higher Irinotecan doses (above 10 μ M). All those results with Irinotecan revealed and confirmed the balance dependency between these two TFs in DIPG and DMG cells expressing them both. Integrating in our experiments both cultures in 2D and 3D cell, we did not observe any significant differences concerning this balanced dependency based on cell fate.

When interrogating RNAsequencing PDCL results, we did not find any significant transcriptional level differences between the several conditions considering HIF1A and/or EPAS1 fold changes in all lines. We confirmed at a transcriptional level that 2D and 3D BT69 cultures had bearing the lowest EPAS1 expression.

Globally, this dissociation between RNA and protein regulations might be a specific feature of DIPG/DMG hyperexpressing HIF-2 α protein, as in other cancers usually this dissociation is less seen (26). As all those experimental results are consistent with those observed in the 37-pHGG cohort or in pHGG RNAsequencing databases, we next investigated in those *in vitro* models how we might cut down this balanced expression and if, as a therapeutic point of view, this combination might have an interest.

Combining HIF-1 α and HIF-2 α inhibition is impacting cell growth and migration in presence of normal brain neuron environment

First, we investigated during *in vitro* standard monoculture of each PDCL the impact of each inhibitor and when using them in combination under hypoxia 1%O₂. Those results are featured in Figures 3. As all previous results presented above were concordant using PT2385 and

PT2977, we only used PT2385 compound in those further experiments. On graphs, as well as on the pictures of IncuCyte®ZOOM plate-well focus, the figures 3A and 3B are presented the high anti-proliferative impact since very low doses of Irinotecan. Most of the PDCLs had a IC50 as a single Irinotecan approach of 0.59 to 18.11 μ M. The RNAsequencing exploration when treating cells with this drug were showing an impact on proliferation pathways, as well those with GSEA analyses on HIF1 pathway (data not shown and already partially published in Nguyen et al.(20)). When using the combination, as the cell mortality was rapid at very low doses of Irinotecan, we could not correlate any significant effect when administering both compounds (Irinotecan + PT2385) on proliferation. We also performed migration assay based on the fixed spheroids after treatments (Figures 3C, 3D, 3E and 3F) and, using the numbers of migrating cell and the average distance of migration as parameters, we did find a significant correlation ($p < 0.01$ to 0.0001) and impact on the cell migration in DMG and in DIPG cells (examples of 2D BT35 in Figures 3C and 3D and of 3D BT68 in Figures 3E and 3F) when Irinotecan was administered alone. When combo treatment is performed, as in proliferation assay, we do not see any impact of PT2385 in addition to Irinotecan. The explanation is probably the massive impact of Irinotecan on those tumor cells. There were the same conclusions within all lines.

Preliminary data on RNAsequencing analyses after PT2385 or Irinotecan in DIPG/DMG monoculture (data not shown) evidenced an impact on pathways of axon guidance, as well as cell-to-cell adhesion and brain development. To explore then the impact of neuronal and hypoxic environment in our experiments and be able possibly to dissociate the HIF-1 α and HIF-2 α inhibitions, we also tested those compounds in single approach or in combination using ENT for PDCL cultures. In Figure 4A, we performed our drug testing in co-culture with differentiated neurons and showed in our cell lines a significant impact in all therapeutic conditions. The pictures of co-culture BT68/neurons, as an example in Figure 4A, underlined

the effect of irinotecan, PT2385 and their combination on BT68 proliferation. The proliferation scores presented in Figure 4B showed a significant difference with the control (co-culture without any treatment). Surprisingly, even the bar graphs of single drug approaches were significantly different from the control (p from <0.01 to <0.005), the combo treatment was not synergistically impacting the proliferation score. Nevertheless, on the IF pictures on the left and below panel of Figure 4A, a dissociation of the tumors cells, stained in DAPI (blue) seem to be a significant effect when additioning both inhibitors. At the end, using both drugs, we might then not decrease more the proliferation rate of the tumor cells, but helping with PT2385 compound to dissociate the cells reducing the tumor masses. In fact, the RNAsequencing analyses considering HIF-2 α antagonism is additionally to HIF-1 α inhibition acting on cell-to-cell adhesion between tumor cells and/or neurons and synapses (data not shown). These molecular processes and invasion impact were previously suspected in other cancer models treated with PT2385 compound (12,27). To achieve the role on the invasion of the combo treatment, we used a 3D approach to imitate *in vitro* features of tumor/host nervous tissue interaction in an exclusively human environment. So, those 3D “minibrains” were seeded with DIPG/DMG tumor cells and treated as done in mono- and co-cultures (Figure 4C). As detailed, in Figure 4D, comparatively to the untreated control, there was a significant effect on the invasion score due to the Irinotecan treatment, the PT2385 administration and the combination of both. However, the “combo” bar on the graph on the Figure 4D seem to be further down than the single drug approach, but no significant statistical number was supporting this tendency. So, the therapeutic testing combining inhibition concomitantly of both TFs seem to impact through HIF-1 α targeting on proliferation, migration and invasion propensities in DIPG/DMG cells and through HIF-2 α targeting on synaptic interactions (e.g., dopaminergic and glutamatergic synapses as in our RNAsequencing preliminary data) and cell-to-cell adhesions with normal brain cells that are known fueling DIPG cell progression (28).

All those data are providing further interest studying this combo concept on hypoxic master regulators that have been demonstrated having a clear balanced proteic expression especially in DIPGs.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest related to the topic.

Funding supports and acknowledgements

We thank first all children and families affected by pediatric high-grade gliomas for their contributions to this research and their courage.

All experimental work was supported by Enfants Cancer et Santé, LifePink, Ligue contre le Cancer, J'ai demandé la lune, Franck un rayon de soleil grants and subventions. NEW was also supported by a Roche/University of Strasbourg Foundation scholarship from 2015 to 2020 for the PEDIAMODECAN program for PDCL generations and its subprogram named PEDIAGLIO (specific to glioma line generation). The Satt Conectus program also granted partially the initiation of PEDIGLIO program.

We also thank Dr Anne-Florence Blandin, Dr Aurélia Nguyen and Mrs Aurelie Durand initiating with NEW the PEDIAMODECAN global project. We are also highly thankful to Dr Isabelle Lelong-Rebel for cell line development and their improvement.

References

1. Fuchs Q, Pierrevelcin M, Messe M, Lhermitte B, Blandin A-F, Papin C, et al. Hypoxia Inducible Factors' Signaling in Pediatric High-Grade Gliomas: Role, Modelization and Innovative Targeted Approaches. *Cancers (Basel)*. 2020;12:979.
2. Coy S, Wang S, Stopka SA, Lin J-R, Yapp C, Ritch CC, et al. Single cell spatial analysis reveals the topology of immunomodulatory purinergic signaling in glioblastoma. *Nat Commun*. 2022;13:4814.

3. Englinger B, Hack OA, Filbin MG. Into Thin Air: Hypoxia Drives Metabolic and Epigenomic Deregulation of Lethal Pediatric Ependymoma. *Dev Cell*. 2020;54:134–6.
4. Colwell N, Larion M, Giles AJ, Seldomridge AN, Sizzdahkhani S, Gilbert MR, et al. Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells. *Neuro Oncol*. 2017;19:887–96.
5. Samanta D, Semenza GL. Metabolic adaptation of cancer and immune cells mediated by hypoxia-inducible factors. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018;1870:15–22.
6. Bailleul Q, Navarin P, Arcicasa M, Bal-Mahieu C, Carcaboso AM, Le Bourhis X, et al. Evofosfamide Is Effective against Pediatric Aggressive Glioma Cell Lines in Hypoxic Conditions and Potentiates the Effect of Cytotoxic Chemotherapy and Ionizing Radiations. *Cancers (Basel)*. 2021;13:1804.
7. Blandin A-F, Durand A, Litzler M, Tripp A, Guérin É, Ruhland E, et al. Hypoxic Environment and Paired Hierarchical 3D and 2D Models of Pediatric H3.3-Mutated Gliomas Recreate the Patient Tumor Complexity. *Cancers*. 2019;11:1875.
8. Chung C, Sweha SR, Pratt D, Tamrazi B, Panwalkar P, Banda A, et al. Integrated metabolic and epigenomic reprogramming by H3K27M mutations in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Cancer Cell*. 2020;38:334-349.e9.
9. Schito L, Semenza GL. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer*. 2016;2:758–70.
10. Jannier S, Kemmel V, Sebastia Sancho C, Chammas A, Sabo A-N, Pencreach E, et al. SFCE-RAPIRI Phase I Study of Rapamycin Plus Irinotecan: A New Way to Target Intra-Tumor Hypoxia in Pediatric Refractory Cancers. *Cancers (Basel)*. 2020;12:E3051.
11. Guérin E, Raffelsberger W, Pencreach E, Maier A, Neuville A, Schneider A, et al. In vivo topoisomerase I inhibition attenuates the expression of hypoxia-inducible factor 1 α target genes and decreases tumor angiogenesis. *Mol Med*. 2012;18:83–94.
12. Renfrow JJ, Soike MH, West JL, Ramkissoon SH, Metheny-Barlow L, Mott RT, et al. Attenuating hypoxia driven malignant behavior in glioblastoma with a novel hypoxia-inducible factor 2 alpha inhibitor. *Scientific Reports*. 2020;10:15195.
13. Courtney KD, Infante JR, Lam ET, Figlin RA, Rini BI, Brugarolas J, et al. Phase I Dose-Escalation Trial of PT2385, a First-in-Class Hypoxia-Inducible Factor-2 α Antagonist in Patients With Previously Treated Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2018;36:867–74.
14. Choueiri TK, Bauer TM, Papadopoulos KP, Plimack ER, Merchan JR, McDermott DF, et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor-2 α in renal cell carcinoma with belzutifan: a phase 1 trial and biomarker analysis. *Nat Med*. 2021;27:802–5.
15. Stransky LA, Vigeant SM, Huang B, West D, Denize T, Walton E, et al. Sensitivity of VHL mutant kidney cancers to HIF2 inhibitors does not require an intact p53 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119:e2120403119.

16. Castel D, Philippe C, Calmon R, Le Dret L, Truffaux N, Boddaert N, et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol.* 2015;130:815–27.
17. Mackay A, Burford A, Molinari V, Jones DTW, Izquierdo E, Brouwer-Visser J, et al. Molecular, Pathological, Radiological, and Immune Profiling of Non-brainstem Pediatric High-Grade Glioma from the HERBY Phase II Randomized Trial. *Cancer Cell.* 2018;33:829-842.e5.
18. Cosset E, Locatelli M, Marteyn A, Lescuyer P, Dall Antonia F, Mor FM, et al. Human Neural Organoids for Studying Brain Cancer and Neurodegenerative Diseases. *J Vis Exp.* 2019;
19. Tieng V, Stoppini L, Villy S, Fathi M, Dubois-Dauphin M, Krause K-H. Engineering of midbrain organoids containing long-lived dopaminergic neurons. *Stem Cells Dev.* 2014;23:1535–47.
20. Nguyen A, Moussallieh FM, Mackay A, Cicek AE, Coca A, Chenard MP, et al. Characterization of the transcriptional and metabolic responses of pediatric high grade gliomas to mTOR-HIF-1 α axis inhibition. *Oncotarget.* 2017;8:71597–617.
21. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 2012;148:399–408.
22. Smythies JA, Sun M, Masson N, Salama R, Simpson PD, Murray E, et al. Inherent DNA-binding specificities of the HIF-1 α and HIF-2 α transcription factors in chromatin. *EMBO Rep.* 2019;20:e46401.
23. Lee G, Auffinger B, Guo D, Hasan T, Deheeger M, Tobias AL, et al. Dedifferentiation of Glioma Cells to Glioma Stem-like Cells By Therapeutic Stress-induced HIF Signaling in the Recurrent GBM Model. *Mol Cancer Ther.* 2016;15:3064–76.
24. Pietras A, Johnsson AS, Pålman S. The HIF-2 α -driven pseudo-hypoxic phenotype in tumor aggressiveness, differentiation, and vascularization. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;345:1–20.
25. Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist.* 2004;9 Suppl 5:4–9.
26. Ye IC, Fertig EJ, DiGiacomo JW, Considine M, Godet I, Gilkes DM. Molecular Portrait of Hypoxia in Breast Cancer: A Prognostic Signature and Novel HIF-Regulated Genes. *Mol Cancer Res.* 2018;16:1889–901.
27. Arnaiz E, Miar A, Bridges E, Prasad N, Hatch SB, Ebner D, et al. Differential effects of HIF2 α antagonist and HIF2 α silencing in renal cancer and sensitivity to repurposed drugs. *BMC Cancer.* 2021;21:896.
28. Venkatesh HS, Morishita W, Geraghty AC, Silverbush D, Gillespie SM, Arzt M, et al. Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature.* Nature Publishing Group; 2019;573:539–45.

Figure 1: HIF-1 α and HIF-2 α protein expressions in a 37-pHGG (pediatric High-Grade Glioma) cohort established by immunohistochemistry. (A) Summary of clinical and survival characteristics of the patients included in the pHGG cohort (diffuse intrinsic pontine glioma=DIPG) (B) Summary of the HIF-1 α and HIF-2 α positive immunostaining across pHGG subgroup that are DIPG, gliomatosis cerebri, thalamic midline gliomas and hemispheric pHGGs. (C) Heatmap visualizing the percentage of positive immunostained cells in each sample for HIF-1 α and HIF-2 α nuclear staining showing the significant balance for 26 patients ($p<0.01$). (D) Examples of HIF-1 α and HIF-2 α negative and positive stainings in our cohort (scalebar = x40).

Figure 2: HIF-1 α and HIF-2 α protein expression in patient-derived cell lines (PDCLs).

(A) Western blot (WB) analyses pooling HIF-1 α and HIF-2 α protein concentrations after 72 hours of hypoxia exposure (1%O₂) showing an inversely protein modulation. HIF-1 α is presenting a rapid increase followed by a decrease after 24 hours, whereas HIF-2 α is, first stable and then increasing in a sustained manner after 24 hours. (B) Positive immunodetection of HIF-1 α biomarker in green (e.g., from right to left side: at 21%O₂, 1%O₂ and with PT2385 treatment) with confocal microscope (Scalebar=50 μ m) in an example of BT35 line (DAPI in blue and phalloidin in red color). (C) Immunofluorescent quantification of nuclear HIF-1 α and HIF-2 α after PT2385 treatment. (D) Positive immunodetection of HIF-1 α (upper panel) and HIF-2 α (below panel) in green (e.g., from the right to left side: no irinotecan treatment, 1 μ M irinotecan and 2.5 μ M irinotecan in an example of BT35 line (DAPI in blue and phalloidin in red color). (E) Immunofluorescent quantification of nuclear HIF-1 α and HIF-2 α after increasing concentrations of irinotecan. (F) WB analyses of HIF-1 α and HIF-2 α comparing increasing doses of irinotecan and showing a blanced dependency in those transcription factors.

Figure 3: Drug testing using Irinotecan, PT2385 and the combination of both compounds in DIPG/DMG cell monoculture. (A) Example of IC50 graph with Irinotecan and when associated to PT2385 compound in 2D BT35 line on the left panel associated to IncuCyte[®] views from up to down without any compound, with Irinotecan 5 μ M, and with the combination. On the right panel, example of IC50 graph with Irinotecan and when associated to PT2385 compound in 3D BT68 line associated to IncuCyte[®] views from up to down without any compound, with Irinotecan 5 μ M, and with the combination. (C) Table summarizing all testing with Irinotecan and Irinotecan plus PT2385 in all DIPG/DMG lines. (C) Migration 3D spheroid assay in 2D BT35 line treated with increasing doses of Irinotecan (upper panel) and associated to PT2385 (below panel). Scalebar = 400 μ M. (D) Those confocal images with DAPI labeling are allowing the precise measures of evading cells (left panel) and the distance of those migrating cells (right panel) and their comparison in each condition (without or with PT2385 additionally to Irinotecan). (E) Migration 3D spheroid assay in 3D BT68 line : confocal images with DAPI labelling comparing treatment with Irinotecan and Irinotecan+PT2385. Scalebar = 700 μ M. (F) Measures of evading cells on the left panel and the average distance of migration. In the below panel, comparisons of treatments. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.005, **** p<0.0001, ns=no significance

Figure 4: Drug testing targeting HIF-1 α by Irinotecan and HIF-2 α by PT2385 in engineered neural tissues. (A) Co-culture of neuron derivation from iPSC and PDCL (example of 3D BT68). Positive immunodetection of β -III-tubulin in green, GFAP in red and DAPI in blue color for cell nuclei. Magnification 40x. (B) Proliferative score considering residual cells in each condition (control without treatment, Irinotecan 1 μ M, PT2385 20 μ M and the combo. (C) Positive immunodetection as described in A section considering PDCL culture into “*minibrain*”. Sections of PCNA immunodetection and merge. Magnification 40x considering

the control without treatment, Irinotecan 1 μ M, PT2385 20 μ M and the combo. (D) Invasive score in each condition and their significance. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$

A

	all pHGGs n=37	DIPG n=12	gliomatosis cerebri n=4	sus-tentorial tumors n=21	
				10 thalamic	11 hemispheric
Age (years)					
median	8	6	7	15	11
min-max	3-18	4-13	6-14	8-18	3-18
25 th percentile	6	5	6.25	11	7.5
75 th percentile	14.25	8.25	12.5	17	16.25
Mutation					
H3.3	15	7	1	7	0
H3.1	3	3	0	0	0
G34V	5	0	1	0	4
IDH1	1	0	1	0	0
BRAFv600e	1	0	0	0	1
wild-type	12	1	1	3	6
OS (months)					
median	12	10	11	12.25	18
min-max	3-55	7-29	3-27	7-42	8-55
EFS					
median	8	8	7.25	8	9.5
min-max	2-40	2-22	3-12	5-36	4-40

B

	all pHGGs n=37	DIPG n=12	gliomatosis cerebri n=4	sus-tentorial tumors n=21	
				10 thalamic	11 hemispheric
HIF2 (IHC)					
pos	18	9	1	5	3
neg	19	3	3	5	8
HIF1 (IHC)					
pos	27	9	2	7	9
neg	20	3	2	3	2
HIF1+/HIF2-	13	1	2	4	6
HIF1+/HIF2+	14	8	0	3	3
HIF1-/HIF2+	4	1	1	2	0
HIF1-/HIF2-	6	2	1	1	2

C

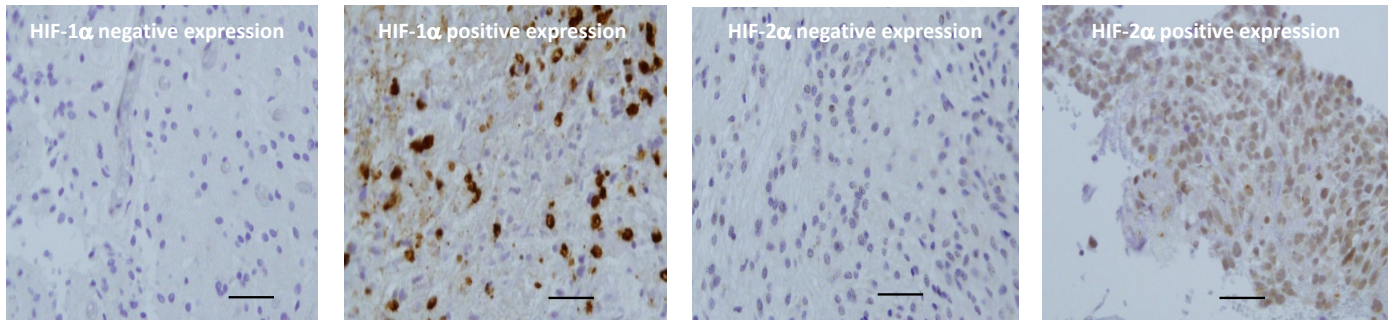
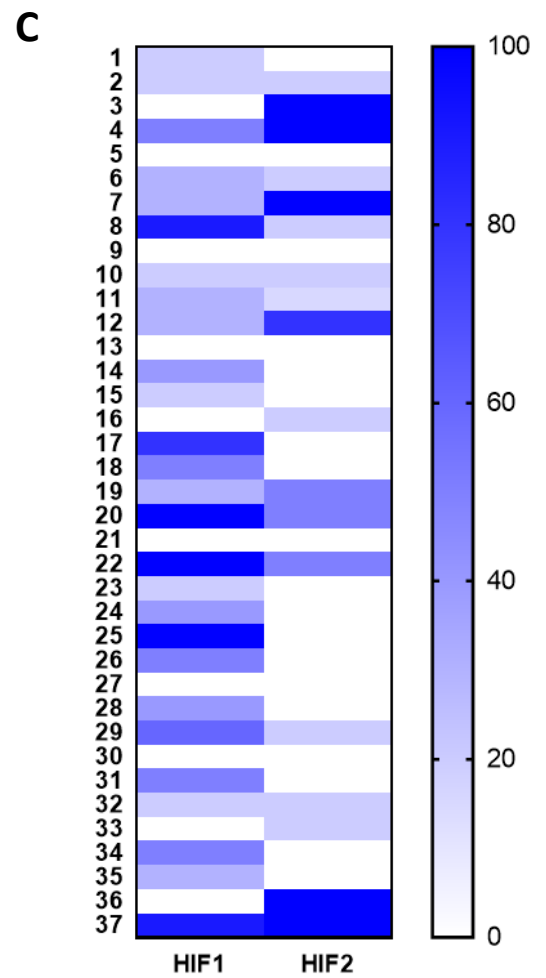


Figure 1 : HIF-1 α and HIF-2 α protein expressions in a 37-pHGG (pediatric High-Grade Glioma) cohort established by immunohistochemistry

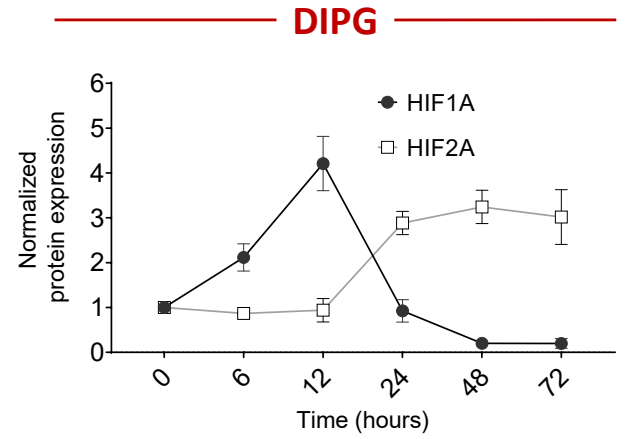
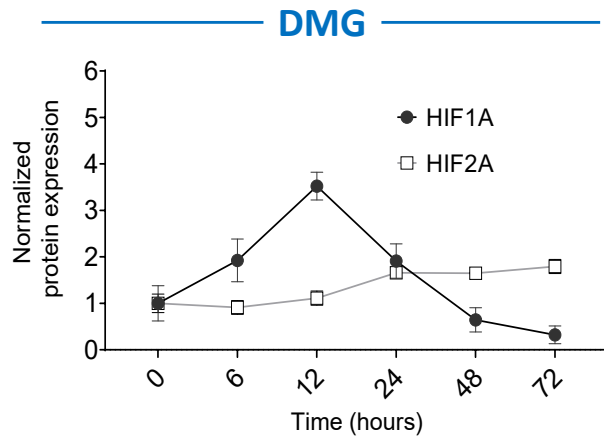
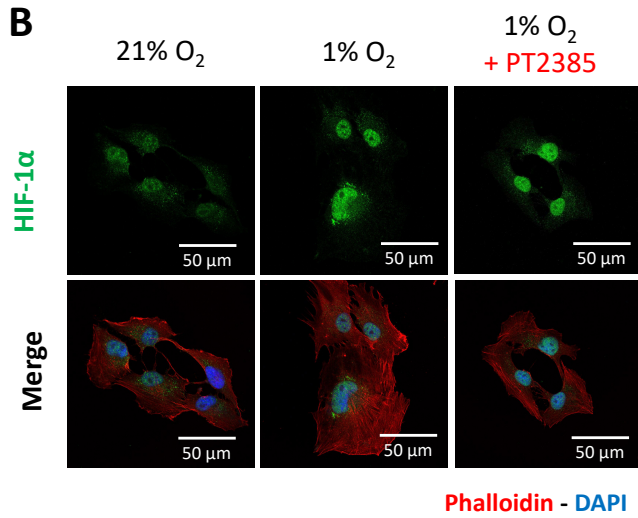
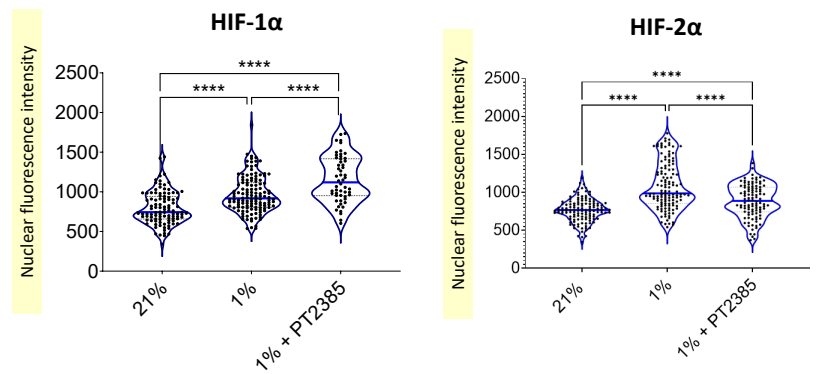
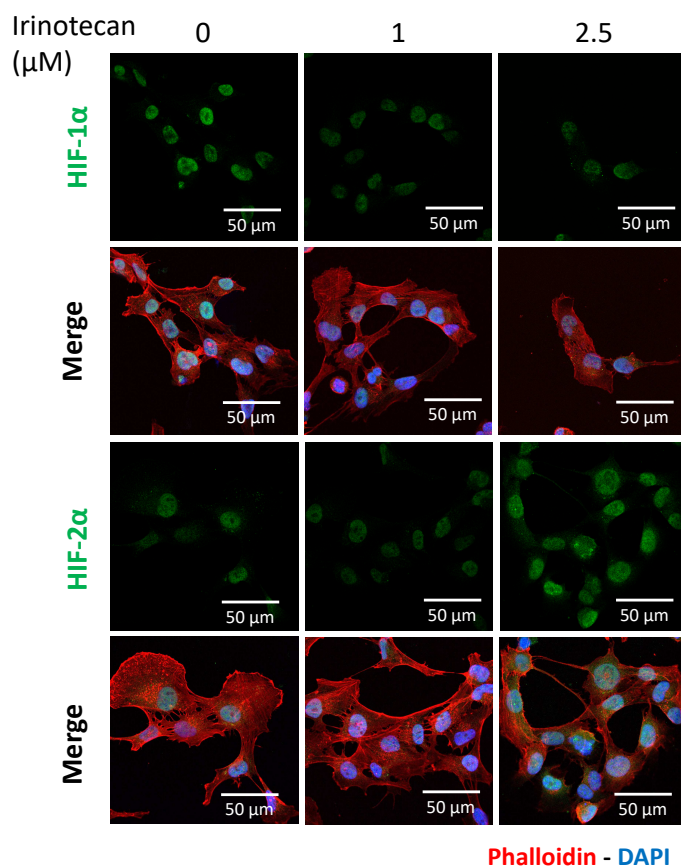
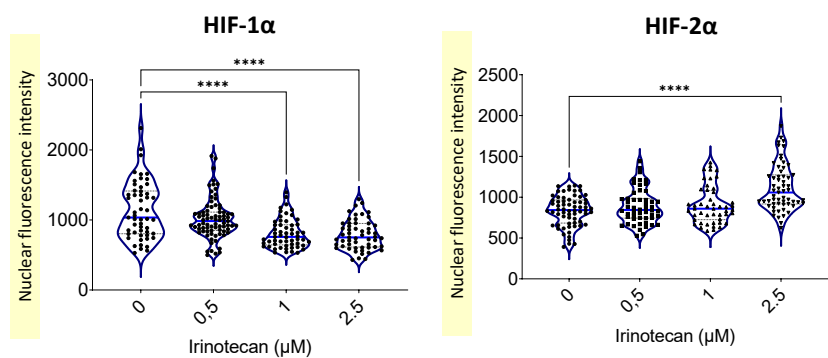
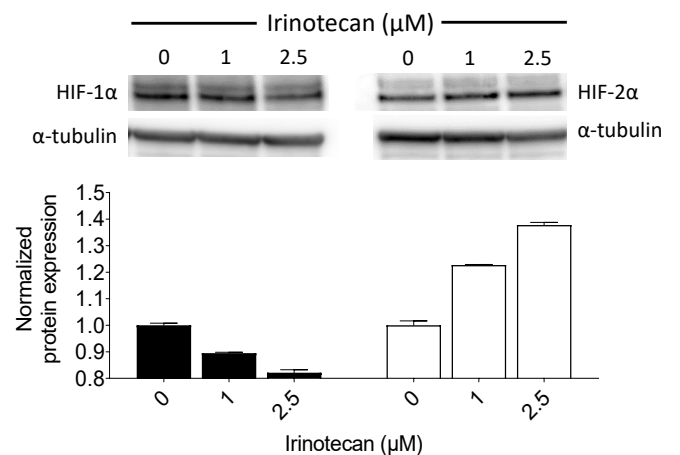
A**B****C****D****E****F**

Figure 2 : HIF-1 α and HIF-2 α protein expression in patient-derived cell lines (PDCLs)

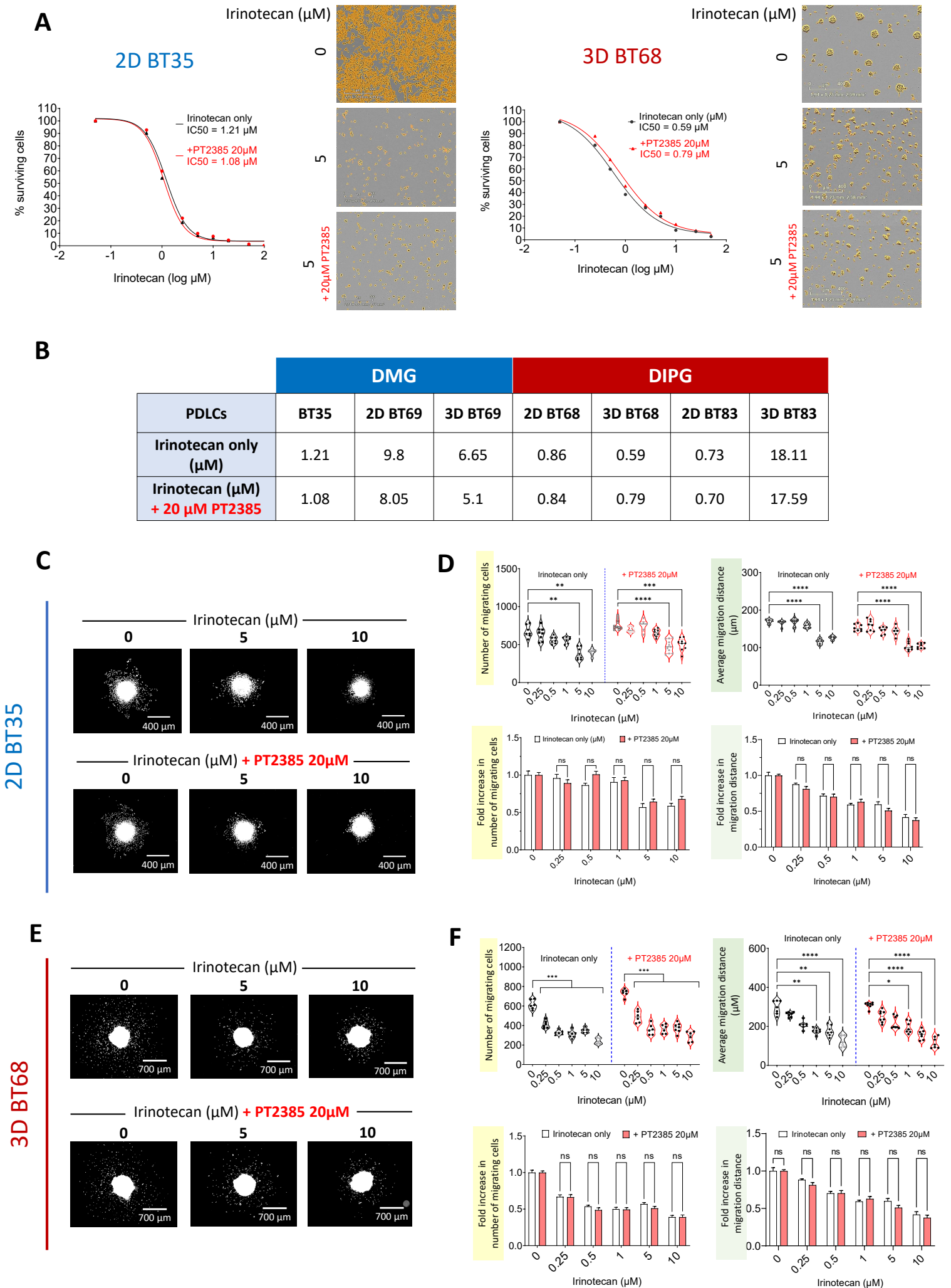


Figure 3 : Drug testing using Irinotecan, PT2385 and the combination of both compounds in DIPG/DMG cell monoculture.

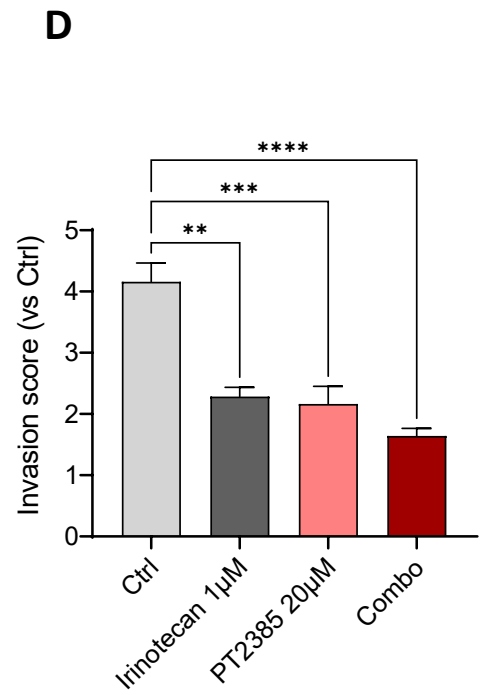
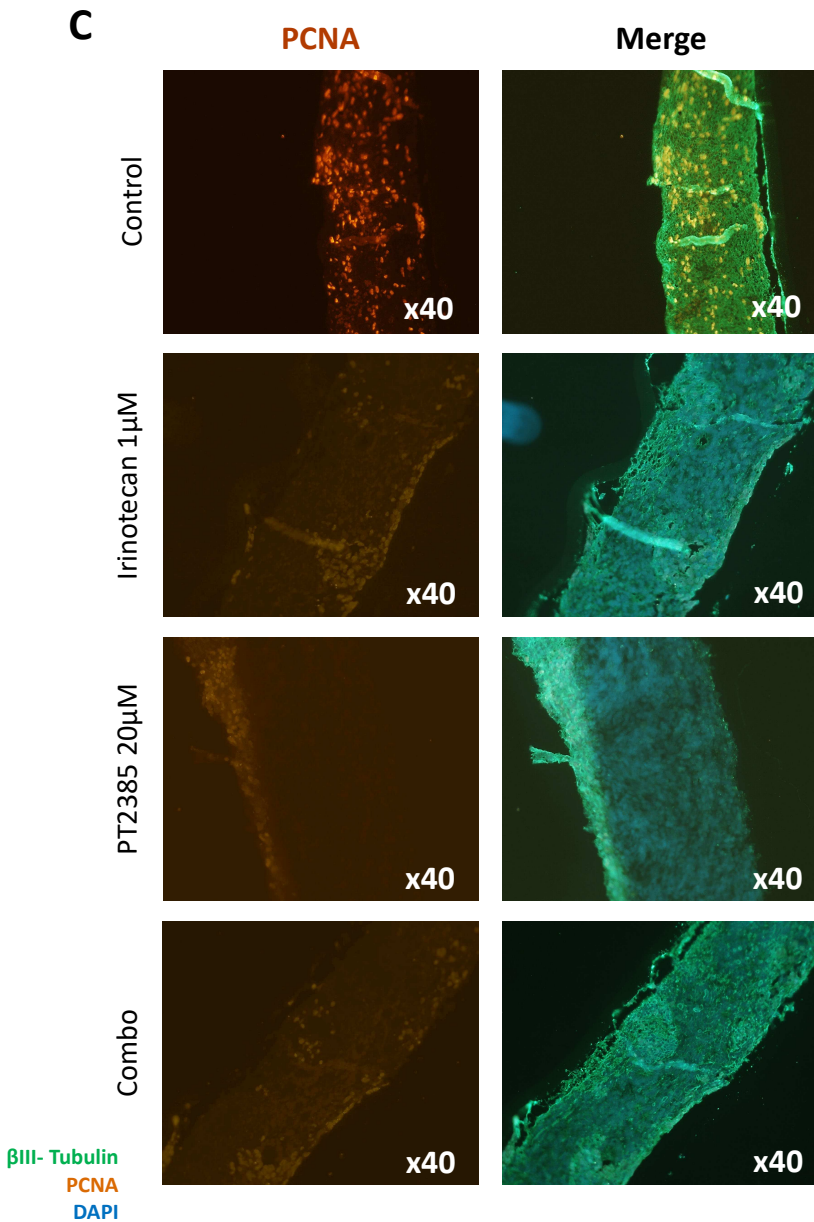
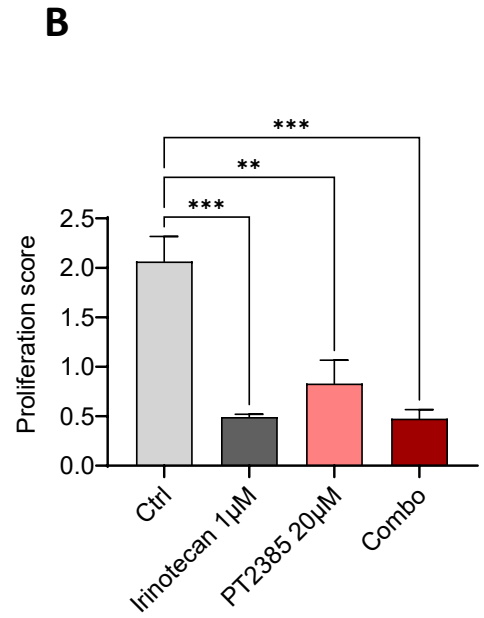
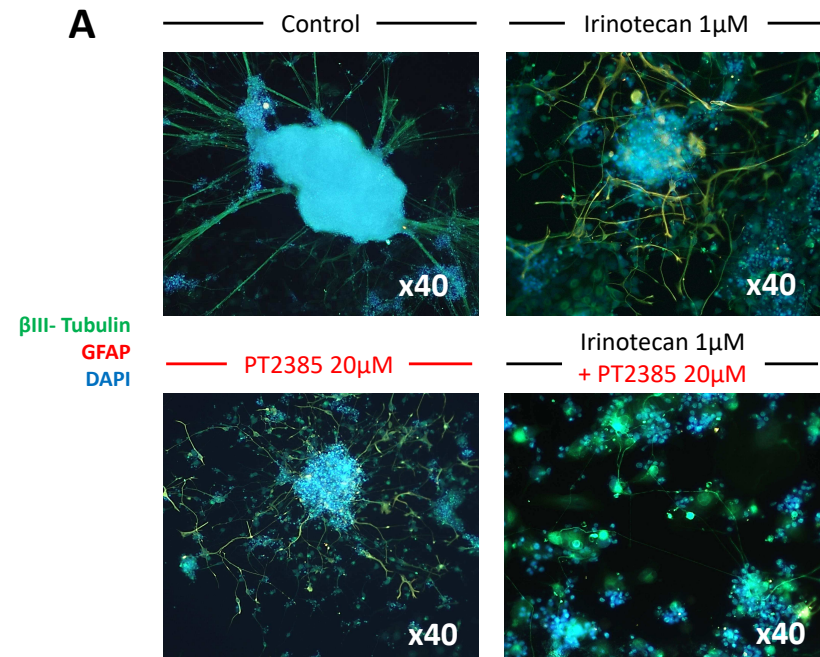


Figure 4 : Drug testing targeting HIF-1α by Irinotecan and HIF-2α by PT2385 in engineered neural tissues.

- **Discussion et perspectives**

Sur la cohorte de 37 GHG pédiatriques étudiés, 73% des tumeurs exprimaient la protéine HIF-1 α et 49% exprimaient la protéine HIF-2 α . Une expression concomitante des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α a été retrouvée dans 14 tumeurs (39%). Des corrélations ont notamment pu être identifiées entre les expressions protéiques de HIF-1 α et HIF-2 α et de mauvaises réponses aux traitements (notamment radiothérapie), ce qui n'a pas été le cas pour l'étude de l'expression des ARN HIF1A et EPAS1. Le rôle de ces facteurs HIF sur la progression et l'agressivité tumorale semble ainsi essentiellement dépendre de leur expression protéique.

L'étude de leurs expressions protéiques dans les PDCLs mutées pour H3.3K27M a notamment permis de rejoindre les données de la littérature associant à HIF-1 α un rôle de modulation d'une hypoxie aigüe et à HIF-2 α le rôle d'une hypoxie chronique. Ces résultats dessinaient alors des expressions concomitantes et potentiellement compensatoires de ces sous-unités au cours du temps. Par ailleurs, lorsque nous avons inhibé sélectivement l'une ou l'autre des sous-unités, nous avons pu observer une augmentation de la concentration nucléaire de la seconde sous-unité protéique, suggérant une activité transcriptionnelle compensatoire en réponse à l'inhibition de son homologue. On peut donc imaginer que les activations des sous-unités HIF-1 α et HIF-2 α sont intimement liées et seraient capables de se compenser l'une et l'autre.

L'inhibition de HIF-1 α par l'irinotecan en monoculture entraîne une diminution de la prolifération et de la migration des PDCLs comme il l'a pu être démontré par de précédentes études. En revanche, le PT2385 seul et sa combinaison à l'irinotecan ne semble avoir aucun impact sur la prolifération et la migration en monoculture. Néanmoins, lorsque les PDCLs ont été placées dans un microenvironnement de type ENTs, le PT2385 et l'irinotecan administrés seuls diminuent tous les deux l'invasion des PDCLs. Leur combinaison semble même accentuer sensiblement leur effet anti-invasif. Ces résultats soulignent l'intérêt thérapeutique d'une inhibition combinée des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α dans le traitement des DMG et des DIPG mutés pour H3.3K27M.

Néanmoins, une seule PDCL a pu être utilisée dans des ENTs à ce jour (BT68). D'autres essais sont en cours avec les autres PDCLs utilisées au cours de cette thèse et permettront de comparer les résultats obtenus à leurs profils d'expression respectifs de HIF-2 α . De même, ces approches pourront être ouvertes à des tumeurs présentant d'autres mutations *driver* telles que

BRAFV600E ou des lignées WT qui ont déjà pu être développées au laboratoire. Il serait ainsi intéressant d'observer l'impact des inhibitions de HIF-1 α et HIF-2 α dans ces autres PDCLs et de déterminer si l'agressivité tumorale associée à leurs activations peut être corrélée à une mutation *driver* particulière.

Par ailleurs, d'autres résultats obtenus au cours de cette thèse ont suggéré un effet radiosensibilisateur en réponse à une inhibition de HIF-2 α . Il serait donc intéressant de tester cette même radiosensibilité en réponse à une inhibition combinée de HIF-1 α et HIF-2 α par des pré-traitements associant l'irinotecan et le PT2385.

Co-culture of Glutamatergic Neurons and Pediatric High-Grade Glioma Cells Into Microfluidic Devices to Assess Electrical Interactions

- **Introduction de ce travail**

L'hypothèse initiale de ce travail visait à répondre au manque actuel de modèles *in-vitro* pertinents dans l'étude des GHG pédiatriques et de leur microenvironnement tumoral. Le choix des modèles d'étude est primordial car celui-ci se doit d'être le plus proche possible de la tumeur originelle du patient si l'on veut générer des résultats pertinents et reproductibles, en vue de potentielles approches thérapeutiques ultérieures. Présentés au cours de l'introduction, différents modèles *in-vitro* sont actuellement utilisés et/ou envisagés dans la recherche sur les tumeurs cérébrales. Ils modélisent chacun des aspects mécanistiques spécifiques à différents niveaux de complexité, en reconstituant des caractéristiques intrinsèques et/ou extrinsèques des tumeurs. Chacun de ces modèles permet d'apporter des informations spécifiques à son échelle mais présente également ses limites. La première étape est le développement de modèles dérivés de tumeurs des patients, visant à reproduire les caractéristiques cellulaires, prolifératives, moléculaires et protéiques de ces tumeurs. Néanmoins, ces modèles cellulaires ne permettent pas d'intégrer des aspects associés au microenvironnement cérébral tel que la proximité de réseaux neuronaux électriquement actifs. Or, comme décrit dans l'introduction, l'activité électrique de ces neurones et plus particulièrement celle des neurones glutamatergiques, semble impacter le développement des GHG pédiatriques (Monje, 2020; Monje et al., 2011; Venkatesh et al., 2015b). A ce jour, aucun modèle *in-vitro* n'a été utilisé pour étudier les interactions électrophysiologiques entre des neurones glutamatergiques et des lignées tumorales dérivées de GHG pédiatriques (PDCLs).

- **Objectifs**

L'objectif de ce travail était de mettre au point et de valider une approche *in-vitro* fonctionnelle et reproductible de coculture permettant d'étudier les interactions électrophysiologiques entre un réseau de neurones glutamatergiques et des lignées de GHG pédiatriques, dans des dispositifs microfluidiques couplés à un réseau de microélectrodes

(MEA). Une première étape devait valider la différenciation et la maturation de neurones glutamatergiques corticaux à partir d'iPSC dans des dispositifs microfluidiques. Dans un second temps, ces mêmes neurones étaient mis en coculture avec des lignées de GHG pédiatriques pour tenter de déterminer si elles pouvaient entrer en interaction avec les neurones et entraîner une modification de l'activité électrique du réseau.

- **Méthodologie**

Les différentes étapes de ce projet ont été réalisées en collaboration avec les équipes de NETRI (Lyon). Les neurones glutamatergiques corticaux ont d'abord été dérivés à partir d'iPSCs et mis en culture au sein de dispositifs microfluidiques couplés à une batterie de micro-électrodes (MEA). Une première étape a permis de suivre et de valider la différenciation et la maturation de ces neurones à travers des marquages Nestin, Sox2, mGluR2 et vGLUT1 réalisés lors des 4^{ème} et 21^{ème} jours. Ensuite, leur activité électrique a été enregistrée une première fois au bout du 21^{ème} jour de culture, lorsque les neurones avaient atteint leur maturation. En parallèle, des lignées de GHG pédiatriques ont été cultivées dans des flasques et ont été mises en co-culture avec les neurones glutamatergiques à l'issue du 1^{er} enregistrement le 21^{ème} jour. Un second enregistrement de l'activité électrique a été réalisé le 23^{ème} jour, soit 2 jours après la mise en co-culture des lignées. Les comparaisons des enregistrements électriques des 23^{ème} et 21^{ème} jours ont tenté d'évaluer l'impact de lignées de GHG pédiatriques sur l'activité électrique du réseau de neurones glutamatergiques.

Co-culture of Glutamatergic Neurons and Pediatric High-Grade Glioma Cells Into Microfluidic Devices to Assess Electrical Interactions

Quentin Fuchs¹, Aurélie Batut², Mélanie Gleyzes², Jessica Rontard², Louise Miny², Margot Libralato², Janaina Vieira², Delphine Debis², Florian Larramendy², Thibault Honegger², Melissa Messe¹, Marina Pierrelcin¹, Benoit Lhermitte^{1,3}, Monique Dontenwill¹, Natacha Entz-Werlé^{1,4}

¹ Team Tumoral signaling and therapeutic targets, UMR CNRS 7021 - Laboratory of Biomedicine and Pathologies ² NETRI ³ Centre de Ressources Biologiques, Pathology department, University Hospital of Strasbourg ⁴ Pediatric Oncohematology unit, University Hospital of Strasbourg

Corresponding Author

Natacha Entz-Werlé
Natacha.entz-werle@chru-strasbourg.fr

Citation

Fuchs, Q., Batut, A., Gleyzes, M., Rontard, J., Miny, L., Libralato, M., Vieira, J., Debis, D., Larramendy, F., Honegger, T., Messe, M., Pierrelcin, M., Lhermitte, B., Dontenwill, M., Entz-Werlé, N. Co-culture of Glutamatergic Neurons and Pediatric High-Grade Glioma Cells Into Microfluidic Devices to Assess Electrical Interactions. *J. Vis. Exp.* (177), e62748, doi:10.3791/62748 (2021).

Date Published

November 17, 2021

DOI

10.3791/62748

URL

joVE.com/video/62748

Abstract

Pediatric high-grade gliomas (pHGG) represent childhood and adolescent brain cancers that carry a rapid dismal prognosis. Since there is a need to overcome the resistance to current treatments and find a new way of cure, modeling the disease as close as possible in an *in vitro* setting to test new drugs and therapeutic procedures is highly demanding. Studying their fundamental pathobiological processes, including glutamatergic neuron hyperexcitability, will be a real advance in understanding interactions between the environmental brain and pHGG cells. Therefore, to recreate neurons/pHGG cell interactions, this work shows the development of a functional *in vitro* model co-culturing human-induced Pluripotent Stem (hiPS)-derived cortical glutamatergic neurons pHGG cells into compartmentalized microfluidic devices and a process to record their electrophysiological modifications. The first step was to differentiate and characterize human glutamatergic neurons. Secondly, the cells were cultured in microfluidic devices with pHGG derived cell lines. Brain microenvironment and neuronal activity were then included in this model to analyze the electrical impact of pHGG cells on these micro-environmental neurons. Electrophysiological recordings are coupled using multielectrode arrays (MEA) to these microfluidic devices to mimic physiological conditions and to record the electrical activity of the entire neural network. A significant increase in neuron excitability was underlined in the presence of tumor cells.

Introduction

Pediatric high-grade gliomas (pHGG) exhibit an extended age, tumor anatomical location and extension, and molecular genotypic and phenotypic diversity depending on patient drivers¹. They are aggressive brain tumors that are poorly

controlled with the currently available treatment options and are the leading cause of death related to brain cancers in children and adolescents². So, more than 80% of patients are relapsing within 2 years after their diagnosis, and their median survival is 9-15 months, depending on brain locations and driver mutations. The absence of curative treatment is the primary urge for laboratory research and highlights the immediate need for new innovative therapeutic approaches. For this purpose, patient-derived cell lines (PDCL) were developed with the hope of providing the pHGG diversity³ in two-dimensional (2D) lines and/or three-dimensional (3D) neurospheres. Nevertheless, those patient-derived *in vitro* cell cultures do not mimic all brain variable situations. These models do not consider the macroscopic and microscopic neuro-anatomical environments typically described in pHGG.

Usually, pHGG in younger children is mainly developing in pontine and thalamic regions, whereas adolescent and young adult's HGG concentrate in the cortical areas, especially in frontotemporal lobes¹. These location-specificities across pediatric ages seem to involve different environments leading to gliomagenesis and an intricated network between tumor cells and specific neuronal activity^{4,5,6}. Although mechanisms are still not identified, pHGG mainly develops from neural precursor cells along the differentiation trajectory of astroglial and oligodendroglial lineages. While the role of these glial lineages has been for long restricted to simple structural support for neurons, it is now clearly established that they integrate entirely into neural circuits and exhibit complex bi-directional glial-neuronal interactions able to reorganize structural regions of the brain and remodel neuronal circuitry^{4,7,8}. Moreover, increasing shreds of evidence indicate that the central nervous system (CNS) plays a critical role in brain cancer initiation and progression. Recent works focused on neuronal activity, which seems

to drive growth and mitosis of glial malignancies through secreted growth factors and direct electrochemical synaptic communications^{6,9}. Reciprocally, high-grade glioma cells seem to influence neuronal function with an increasing glutamatergic neuronal activity and modulate the operation of the circuits into which they are structurally and electrically integrated⁹. So, studies using patient-derived models and novel neuroscience tools controlling neuron action demonstrated a circuit-specific effect of neuronal activity on glioma location, growth, and progression. Most of these neuronal projections involved in gliomas are glutamatergic and communicate through glutamate secretions. Specific glutamatergic biomarkers such as mGluR2 or vGluT1/2 are commonly described⁶.

Interestingly, despite their molecular heterogeneity, pediatric and adult high-grade gliomas show a typical proliferative response to glutamatergic neuronal activity and other secreted factors such as neuroligin-3 or BDNF (brain-derived neurotrophic factor)^{4,6,10,11,12,13}. In cortical regions, pediatric and adult HGGs can induce neuronal hyperexcitability through an increased glutamate secretion and inhibit GABA interneurons leading to gliomas associated with epileptic network activity^{14,15}. On top of that, neural circuits can be remodeled by gliomas pushing specific neurological tasks, for instance, language, and can requisition additional organized neuronal activity⁹.

Based on this rationale, advancing the understanding of bidirectional communications between glioma cells and neurons must be fully elucidated and integrated with the early stages of *in vitro* pHGG approaches. Such innovative modeling is crucial in understanding and measuring the neuronal electrical activity impact during drug testing and anticipating pHGG response

into brain circuitry. Recent developments in neuroscience tools, such as microfluidic devices and pHGG research works, are the bed to develop new modeling approaches and be able now to integrate brain microenvironment in *in vitro* pHGG models^{3,16,17,18,19}. Coupled with electrophysiological recordings using multielectrode arrays (MEA), microfluidic devices^{20,21,22} offer the possibility to mimic physiological conditions while recording the electrical activity of the entire neural network and extract network connectivity parameters under several conditions. This device^{23,24} allows first the precise deposition of cells in a chamber directly on MEA. This technology enables the control of cell seeding density and homogeneity on MEA and the fine control of media exchange, which is a critical step for human neural progenitor differentiation directly into devices. Moreover, the present deposition chamber can be seeded with multiple cells at different time points.

So, this study aimed to develop a functional *in vitro* model co-culturing human Pluripotent Stem (hiPS)-derived cortical glutamatergic neurons and pHGG-derived cells into microfluidic devices and recording their electrical activity to evaluate electrical interactions between both cell populations. First, hiPS-derived cortical glutamatergic neurons were obtained and characterized in microfluidic devices at different stages of culture [day 4 (D4), as hiPS cells, and day 21 (D21) and day 23 (D23), as glutamatergic matured neurons]. For the second step of co-culture, two pHGG models were used: commercialized pediatric UW479 line and pHGG cells initiated from a patient tumor (BT35)³, bearing an H3.3 K27M driver mutation. Finally, we performed electrophysiological recordings of glutamatergic cells at D21 before pHGG cell seeding and D23 after 48 h of co-culture into the same microfluidic device. The interactions between glutamatergic

neurons and pHGG cells were characterized by a significant increase in the recorded electrophysiological activity.

Protocol

For this protocol, the accreditation number related to the use of human materials is DC-2020-4203.

1. Microfluidic device fabrication, preparation and treatment

1. Fabricate SU-8 molds using conventional photolithography techniques¹⁸.

NOTE: For this purpose, two photolithography masks have been designed to construct two layers of photoresist structures on silicon wafer substrate and a thin SU-8 2005 photoresist layer (3.2 μm high and $6 \pm 1 \mu\text{m}$ wide) that defines asymmetric microgrooves under the patterning of main channels made in SU-8 2100 (200 μm high, 1 mm wide, and 13 mm long) (see **Supplemental Figure S1**).

2. Activate the wafer by using a plasma cleaner (5.00e⁻¹ torr, high radio frequency (RF) level) for 1 min and silanize it using 1 mL of (trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane in an aluminum folder into a desiccator for 30 min.
3. Prepare a 10:1 ratio of Polydimethylsiloxane (PDMS), mix the prepolymer with catalyst, pass it in a vacuum desiccator to remove trapped bubbles, and cast it slowly onto the mold before being cured in an oven at 80 °C for 40 min.
4. Cut it after that using a razor at the desired size before peeling off the mold. Punch out the inlet and the outlet zones to obtain 3 mm wide holes, clean the PDMS, and protect it using adhesive tape.

NOTE: The thickness of the final PDMS device is approximately 5 mm.

5. Treat the device using a plasma cleaner (5.00×10^{-1} torr, High RF level during 1 min), assemble it with a polystyrene Petri dish, and expose the vacuum under UV light for 30 min.
6. Fill with a pipette the inlet of the microfluidic device before usage with 70% ethanol and empty it by pipetting aspiration.
7. Wash the microfluidic device by adding inlet reservoirs Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) and empty it by pipetting aspiration three consecutive times.
8. Coat the device using 0.05 mg/mL Poly-D-Lysine and place it into an incubator (37 °C, 5% CO₂). After 24 h, rinse the device by adding into the inlet reservoir the neurobasal medium and empty it by pipetting aspiration three consecutive times.
9. Fill the microfluidic chip with the cell culture medium and let it remain at room temperature until use for a maximum of 2 h.

2. Cell preparation and seeding in the microfluidic device

1. Culture, seeding, and immunofluorescent characterization of human hiPS-derived cortical glutamatergic neurons

NOTE: Carry out experiments with commercialized hiPS-derived cortical glutamatergic neurons (**Figure 1A**). Preserve human-derived materials and handle them with the approval and under the guidelines of legislation.

1. Empty the inlet and outlet reservoirs of the microfluidic device by pipette aspiration before

seeding, letting only the device's channels to be filled with medium.

2. Seed the hiPS cells at Day 0 (D0) by putting 10 μ L of a 6.5×10^6 hiPS cells/mL suspension (e.g., 900 cell/mm² concentration) with the medium, whose composition is given in **Table 1**, and let the device be under the hood (at room temperature) for 15 min to allow cells to attach.
3. After 15 min, fill both inlet and outlet reservoirs with 50 μ L of D4 culture medium, whose entire composition is given in **Table 1**, and transfer the device into the incubator (37 °C, 5% CO₂).
4. Maintain glutamatergic neuron differentiation for 23 days (**Figure 1A(1)**, microscopy) under a controlled environment (37 °C, 5% CO₂) and with a specific cell culture medium, whose composition is described in **Table 1**. Replace the medium regularly as detailed in the next step 5. just below and follow the steps as in **Figure 1B**.
5. Replace the medium every 3 to 4 days following **Table 1** composition. Use seeding medium until D4, D4 medium until D7, D7 medium until D11, and D11 medium for the remaining time of the culture.
6. Take microscopic pictures at D4, D21, and D23 using a standard phase-contrast microscope to assess cell viability and allow cell counting.
7. For characterization, fix the differentiated glutamatergic neurons in 4% paraformaldehyde (PFA) for 30 min at room temperature after medium aspiration and follow the protocol for immunofluorescence staining.

8. Wash cells three times with Phosphate-Buffered Saline (PBS) and permeabilize them for 10 min with 0.1% Triton-X followed by 30 min with 3% Bovine Serum Albumin (BSA). Add primary antibodies and incubate the device overnight at 4 °C.
 9. Rinse the cells three times with PBS and incubate further with the corresponding secondary antibodies for 2 h at room temperature.
NOTE: Immunofluorescent antibodies used in the study are listed in **Table 2**.
 10. Rinse the cells three times with PBS and counterstain with DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) for 10 min at room temperature.
 11. Acquire images with an inverted epifluorescence microscope fitted with a CMOS (Complementary metal-oxide-semiconductor) camera and analyze using appropriate image analysis software.
 12. Open the DAPI stained images and binarize with the thresholding routine in the software. To do this, click on **Image > Adjust > Threshold**, and set the appropriate parameters to distinguish the nucleus from the background. Then, click on **Apply > Process > Watershed** to split the aggregate nucleus.
 13. After that, use the **Analyze Particles** innate software's function to interpret the binary images. To do this, click on **Analyze** and then on **Analyze Particles** and set the appropriate parameters after this: **size** and **circularity filter** (exclude from analysis objects smaller than 7 µm, bigger than 20 µm, or with a circularity smaller than 0.1 µm).
 14. Merge the contour images obtained from DAPI analysis to correspondent immunofluorescent pictures to validate the correct staining.
 15. Finally, save the associated data (number of objects, mean area, % of coverage, etc.) for the different biomarkers and quantify the expression at D4 and/ or D21 using appropriate quantification software.
2. **Cell culture of commercialized pHGG line, UW479, and patient-derived cell line, BT35³**
 1. Culture both cell lines in DMEM/F-12 GlutaMAX supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) in a cell culture flask. Wait for 80% confluence of each cell line as presented in **Figure 1C**.
 2. Maintain these pHGG cells under a controlled environment at 37 °C in normoxic conditions throughout the experiments.

3. Co-culture protocol

1. Adjust the seeding day and concentration for UW479 and BT35 cell lines to reach 80% of confluent cells when co-culture should start, corresponding to 21 days of culture for glutamatergic neurons.
2. Trypsinize UW479 and BT35 cells and seed them on the top of glutamatergic neurons in each dedicated microfluidic device (with a target density of 900 cell/mm² for each cell type) before seeding the pHGG cells into the microfluidic device containing matured glutamatergic neurons.
3. Maintain the co-cultures for 2 days under a controlled environment (37 °C, 5% CO₂) with glutamatergic neuron D11 and onward medium detailed in **Table 1**.

- Count pHGG cells using the microscopic pictures analyzed with an image analysis software to assess their viability. Calculate the percentage of cells.

NOTE: Use the following formula: $100 - ((\text{number of cells at D23} / \text{number of cells at D21}) \times 100)$.

4. Electrophysiological recording

- Perform the electrophysiological recording with a commercial system and commercially available software.

NOTE: The experiments were carried out with a MEA that consisted of 30 μm diameter electrodes spaced by 100 μm .

- Perform a first electrophysiological recording on glutamatergic neurons at D21 before seeding of pHGG cells. Use the differentiated glutamatergic neurons as control and culture them alone in parallel to the co-culture. Do a second recording for both conditions as described in the next step numbered 3.
- Perform a second electrophysiological recording at D23 (after 2 days of co-culture).

5. Electrophysiological data processing

- Filter the raw data with a 2nd order Band-pass Butterworth filter (with passband frequencies of 100 Hz and 2500 Hz).
- For spike detection, compute the root mean square of the signal over the 10 min recording for each electrode and set an amplitude threshold corresponding to eight times this root mean's square value.
- Apply a PTSD (Precision Timing Spike Detection²⁵) algorithm, considering a maximum duration of 2 ms for one action potential.

- Consider as an active electrode, each electrode detecting at least 5 spikes/min. Continue the assay if at least 10% of the recording electrodes are active.
- Divide the number of detected spikes by the time-period of recording to calculate the mean firing rate of each active electrode. Calculate an average mean firing rate for each independent experiment. Ultimately, calculate an average by condition ($\pm\text{SEM}$) and express it as a function on the day of recording.
- Compute a raster plot for each experiment representing the events detected for each active electrode as a function of time. Then, calculate the temporal array-wide firing rates (or instantaneous firing rates) of all the active electrodes, allowing to monitor synchronicity of the neural network activity.
- Finally, generate bar graphs using the quantification software and perform comparisons using Kruskal Wallis tests.

Representative Results

Before studying electrical interactions between glutamatergic neurons and glioma cells, hiPS-derived cortical glutamatergic neurons were characterized to validate the feasibility of culturing them in microfluidic devices (**Figure 1A**). Their characterization was assessed using Nestin, Sox2, mGluR2 (metabotropic Glutamate Receptors 2), and vGLUT1 immunostaining, represented in **Figure 1A(2-7)**. As Nestin is an intermediate filament protein required for survival, renewal and mitogen-stimulated proliferation of neural progenitor cells, it is thus expressed in undifferentiated CNS cells during development. Sox2 is a member of the SRY-like HMG-box gene (SOX) transcription factor family involved in the regulation of embryonic development, and it

is predominantly expressed in immature and undifferentiated cells of the neural epithelium in CNS. mGluR2 is widely distributed throughout the brain, with high expression in the cortex and hippocampus. Usually, it defines the presynaptic cells with their neuronal excitability and synaptic transmission (e.g., the glutamatergic neurons). vGLUT1 is also used as a glutamatergic biomarker. Therefore, **Figure 1** focuses on glutamatergic neurons with Nestin and Sox2 expressions at D4 and D21 to validate their progressive differentiation into the culture conditions (**Figure 1A(2-4)**). Nestin positive cells' percentage decreased from $5.4 \pm 0.4\%$ at D4 to $0.69 \pm 0.3\%$ at D21 ($p < 0.01$, **Figure 1A5**). Similarly, confirming the differentiated state of glutamatergic neurons, the percentage of Sox2 positive cells decreased from $12.2 \pm 2.1\%$ at D4 to $5.5 \pm 1.7\%$ at D21 ($p < 0.05$, see **Figure 1A6**). The expression of mGluR2 was detected in $45.4 \pm 4.7\%$ of glutamatergic cells at D21 (data not shown), and a larger vGLUT1 immunostaining was observed during glutamatergic differentiation at D21. These results demonstrated that the proportion of neural progenitors remained low and that most cells were well differentiated after a 21-day culture in the microfluidic devices. In **Figure 1B**, a general protocol of the multistep co-cultures and electrophysiological recording describes the UW479 or BT35 cell seeding in the microfluidic devices at D21. Those cell lines (**Figure 1C**) were already described and are comparable to the previous observations made by us^{3,19}. In the end, two electrophysiological recordings were obtained: one at D21 before co-culturing and the other at D23 after 48 h of pHGG cell line seeding.

For understanding and following the mobility and viability of BT35, UW479, and glutamatergic neurons during co-cultures, microscopic assessments were regularly performed during the electrophysiological recording period from D21 to D23 and are presented in **Figure 2**. The microscopic

images revealed a progressive extension and particular distribution of glutamatergic neurons across microfluidic devices (**Figure 2A**). The glutamatergic cells form some aggregates progressively in a similar way in co-culture and when cultured alone until D23 (control experiment). In **Figure 2B,C**, when adding BT35 and UW479, it was observed that the floating cells present immediately after glioma cells' seeding at D21 progressively disappeared until D23 and became adherent pHGG cells into the device. This was particularly notable for the UW479 line.

Moreover, there was no increase in floating cells after all electrophysiological recordings at D23 (data not shown). Nevertheless, the percentages of viable cells in **Figure 2D** were estimated at 83.02% and 85.16% for BT35 and UW479, respectively. Both line viabilities were comparable and underlined the fact that patient-derived cell lines can be used appropriately. The technical preparation of microfluidic devices coupled to MEA and cell manipulations does not alter their adhesion capacities. It does not seem to induce cell death or modify their microscopic aspects. BT35 and UW479 cells seem to map the exact locations of glutamatergic neurons in the device, migrating closely to the excitatory neurons.

Figure 3 describes as an example UW479/glutamatergic neuron co-cultures with their spike detection along recording time in **Figure 3A** and its raster plot at D23 in **Figure 3B**, showing increased electrical activity when adding pHGG cells. **Figure 3C** presents the temporal array-wide firing rate in BT35/glutamatergic neuron co-cultures. The differences between the control experiment (culture of glutamatergic neurons) and co-cultures of glutamatergic neurons with pHGG cells are significant when recording D23 electrical

activity, as shown in **Figure 3D**, which indicates an impact of pHGG on neuron excitability.

Components	Seeding medium	D4 medium	D7 medium	D11 and onward medium
DMEM/F-12 Medium	0.5x	0.25x	0.125x	∅
Neurobasal Medium	0.5x	0.25x	0.125x	∅
BrainPhys Medium	∅	0.5x	0.75x	1x
SM1 Supplement	1x	1x	1x	1x
N2 Supplement-A	1x	1x	1x	1x
Ala-Gln (GlutaMax)	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM
BDNF	10 ng/mL	10 ng/mL	10 ng/mL	10 ng/mL
GDNF	10 ng/mL	10 ng/mL	10 ng/mL	10 ng/mL
TGF-β1	1 ng/mL	1 ng/mL	1 ng/mL	1 ng/mL
Geltrex	30 µg/mL	∅	∅	∅
Seeding Supplement	1x	∅	∅	∅
Day 4 Supplement	∅	1x	∅	∅

Table 1: Culture media composition for hiPS-derived glutamatergic neurons.

Antibodies	Stock concentrations	Working dilutions
Nestin	0.5 mg/mL	1:500
		(1 µg/mL)
Sox2	1 mg/mL	1:500
		(2 µg/mL)
mGluR2	0.2 mg/mL	1:50
		(4 µg/mL)
vGlut1	0.25 mg/mL	1:50
		(5 µg/mL)
Donkey anti-rabbit IgG H&L (AF 647)	2 mg/mL	1:1000 to 1:2000
		(1 to 2 µg/mL)
Donkey anti-mouse IgG H&L (AF 555)	2 mg/mL	1:1000
		(2 µg/mL)

Table 2: List of immunofluorescent antibodies.

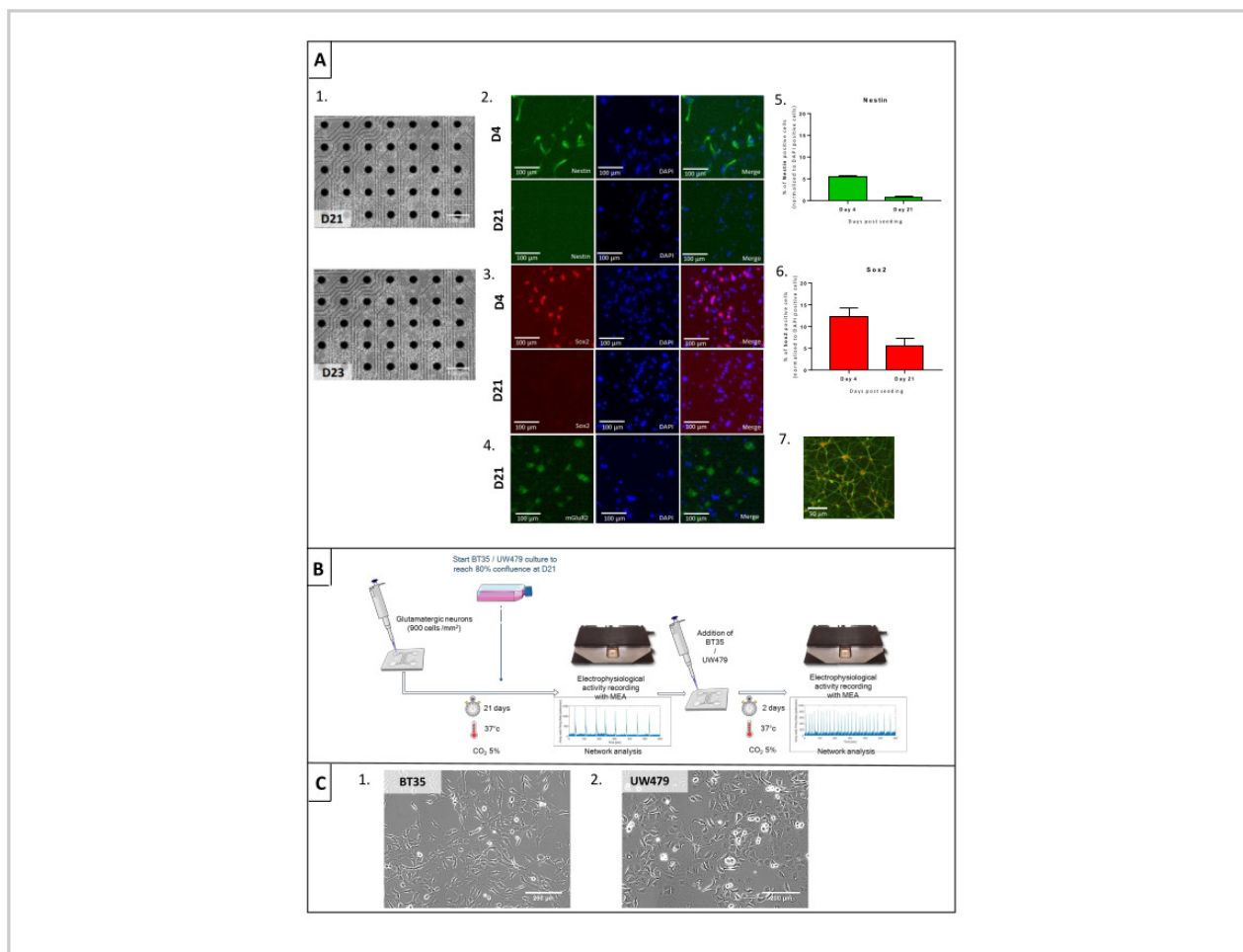


Figure 1: Cell characterization and co-culture protocol of glutamatergic neurons and high-grade pediatric glioma (pHGG) lines. (A) Prerequisite microscopic and immunofluorescent characterization of glutamatergic neurons. (1) Microscopic pictures at day 21 (D21) and day 23 (D23) of glutamatergic neurons. (2) Nestin labeling in green and DAPI in blue at D4 (upper row) and D21 (bottom row). (3) Sox2 labeling in green and DAPI in blue at D4 (upper row) and D21 (bottom row). (4) mGluR2 labeling in green and DAPI in blue at D21. (5 and 6) Statistical comparisons between Nestin and Sox2 labeling at D4 and D21 of culture, demonstrating cell differentiation. (7) vGlut1 staining in green and DAPI in orange at D21. (B) General protocol for electrophysiological recording to study interactions when co-culturing glutamatergic neurons and glioma cells on devices. (C) Prerequisite microscopic aspects of BT35 and UW479 cell lines. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

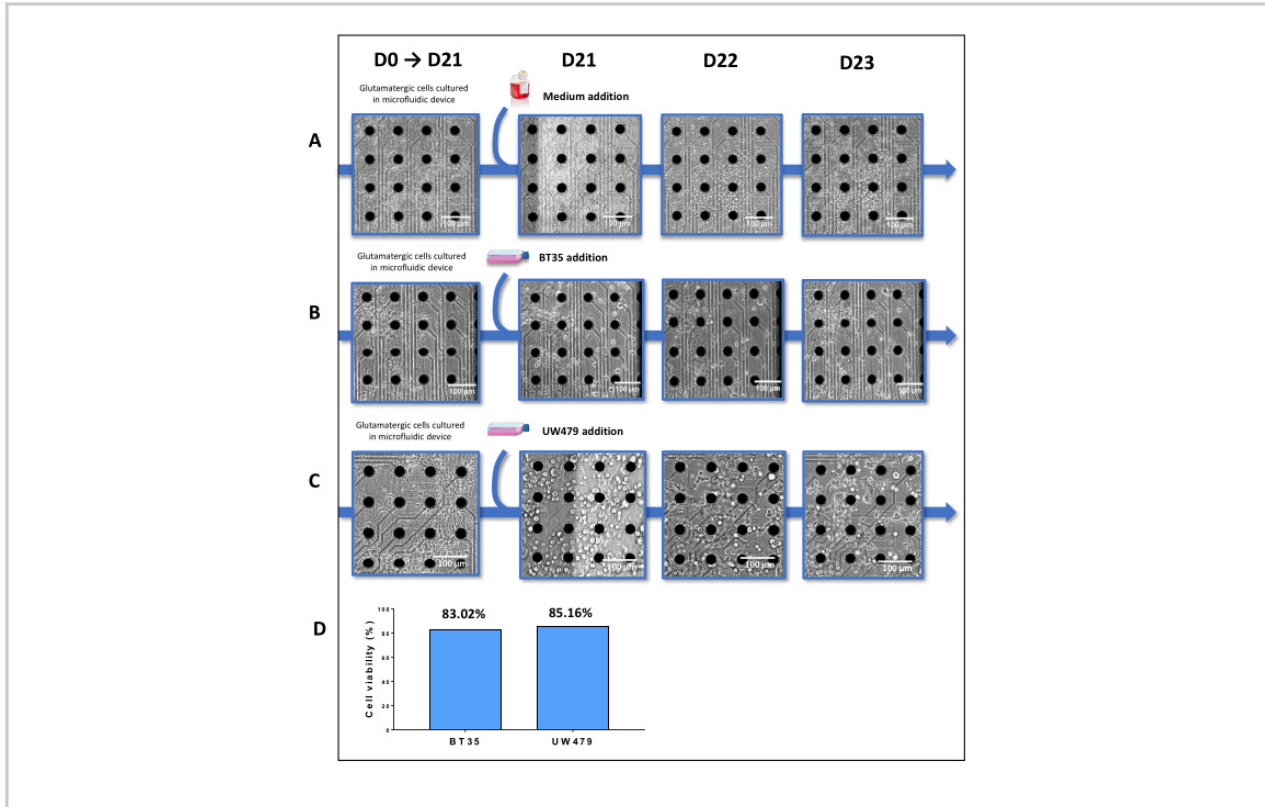


Figure 2: Microscopic images of glutamatergic and glioma cells cultured in microfluidic devices coupled to multielectrode arrays (MEA). Glutamatergic neurons are differentiated and cultured alone in the microfluidic device until day 21 (D21). (A) For this experimental control, only the medium was added to glutamatergic cells at D21, while either BT35 (B) or UW479 (C) cell lines were added in their respective conditions. Images at D22 and D23 were performed before the electrophysiological records for each condition. All the images were obtained using a classical phase-contrast microscope. (D) Tumor cell viability for BT35 and UW479 at D23 was estimated using an automated count with image analysis software. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

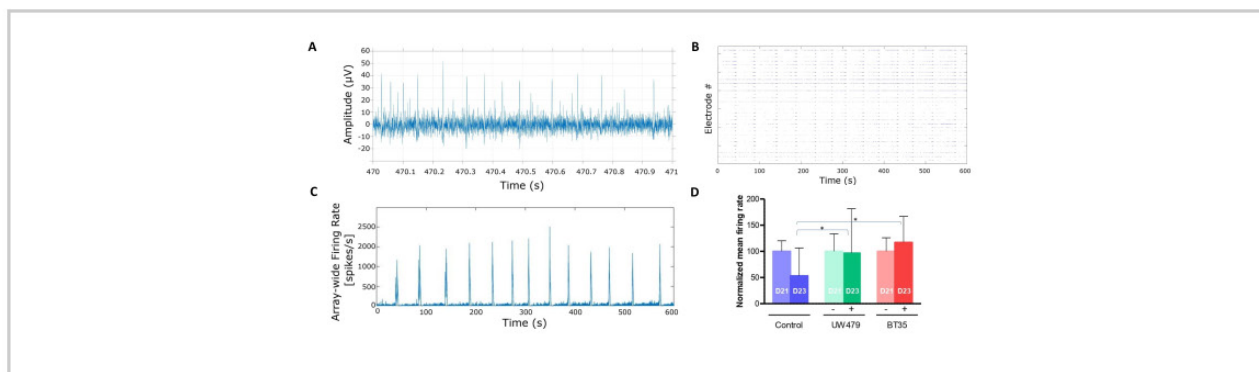


Figure 3: Electrophysiological recording. (A) Spike detection along recording time in UW479/glutamatergic neuron co-cultures. (B) An example of the computed raster plot at D23 represents the events detected for each active electrode as a function of time in UW479/glutamatergic neuron co-cultures. (C) Temporal array-wide firing rate (or instantaneous firing-rate) of all the active electrodes recording electrical activity in BT35/glutamatergic neuron co-cultures, allowing to monitor synchronicity of the neural network activity. (D) Bar charts of mean firing rate in the control condition (e.g., the culture of glutamatergic neurons) and when adding tumoral UW479 cell line (in green) and BT35 cell line (in red). Data are shown as mean \pm SEM. (* $p < 0.05$). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Supplemental Figure S1: 3D (3-dimensional) representation of SU-8 molds. (A) Creation and picturing of SU-8 molds with AutoCAD software. (B) Picture of the SU-molds with the two layers of photoresist structures and four holes of 3 mm width. [Please click here to download this File.](#)

Discussion

This work describes an accurate functional *in vitro* model to evaluate the interaction between human hiPS-derived cortical glutamatergic neurons and brain tumoral cells in microfluidic devices. One of the crucial steps in the present protocol was the hiPS differentiation in glutamatergic neurons, which was confirmed by the decrease of Nestin and Sox2 immunofluorescent staining and simultaneous appearance of mGluR2 and vGLUT1 staining. Nevertheless, few neural progenitors remained as only half of the glutamatergic cells

expressed mGluR2, which means a heterogeneous neuron cell population. Altogether, these results emphasize that particular care must be devoted to glutamatergic cell growth in such devices. Furthermore, the next step studying the electrical behavior of neurons in the presence of pHGG cells was relatively labor-intensive to set up the data processing to optimize the spike detection and interpretation. Nevertheless, as expected and described in other recently published works^{4,5,6,9,10}, the presence of pHGGs and glutamatergic neurons enhances electrical activity confirming the excitatory feature of those neurons.

The major limitation of this modeling might be the heterogeneous distribution of neurons on the MEA itself that can impact electrophysiological recordings. It would require the maintenance of high-density culture in the microfluidic device. For seeding a secondary cell type onto the device, it is

critical to maintain a rapid proliferation and migration initially for 48 h and obtain as for neurons a homogeneous distribution in the 48 h technique for recording. Another limitation is differentiating the different types of cell populations in such devices visually, but new approaches using fluorescent nanoparticles might help following both cell types²⁶. Finally, the performance of this microfluidic approach was only done in two types of pHGG lines and should be extended to more patient-derived cell lines bearing different molecular drivers. Complementary assessments might be done to understand this excitatory effect when co-culturing those cells. Nevertheless, it is feasible with pHGG cells bearing an H3.3 K27M driver mutation, such as in the BT35 line³.

The overall method developed in this work is one of the new approaches to explore the electrical impact. It has shown the capacity of neural network analysis to transduce the interaction between hiPS-derived glutamatergic neurons and pHGG tumoral cell lines in microfluidic culture conditions. This method is helpful for many applications, particularly for functional and mechanistic studies and for analyzing the effects of pharmacological agents that can block pHGG cell migration and interaction with neurons. It emphasizes the use of microfluidic devices, but specifically when experiments might record the electrophysiological activity and can be added to an MEA.

Disclosures

AB, MG, JR, LM, ML, JV, DD are employed by NETRI, FL is Chief Technology Officer at NETRI, and TH is Chief Scientific Officer at NETRI. The other authors have nothing to disclose.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Satt Conectus program, Fondation de l'Université de Strasbourg, «J'ai

demandé la lune», «Une roulade pour Charline», «LifePink», «Franck, Rayon de Soleil» and «Semeurs d'Etoile» associations. We thank the children and families affected by HGGs for their contributions to this research and their support.

References

1. Mackay, A. et al. Integrated molecular meta-analysis of 1,000 pediatric high-grade and diffuse intrinsic pontine glioma. *Cancer Cell*. **32** (4), 520-537 (2017).
2. Ostrom, Q. T. et al. Alex's lemonade stand foundation infant and childhood primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-Oncology*. **16** (Suppl 10), x1-X36 (2015).
3. Blandin, A. F. et al. Hypoxic environment and paired hierarchical 3D and 2D models of pediatric H3.3-mutated gliomas recreate the patient tumor complexity. *Cancers (Basel)*. **11** (12), 1875 (2019).
4. Monje, M. Synaptic communication in brain cancer. *Cancer Research*. **80** (14), 2979-2982 (2020).
5. Mount, C. W., Yalçın, B., Cunliffe-Koehler, K., Sundaresh, S., Monje, M. Monosynaptic tracing maps brain-wide afferent oligodendrocyte precursor cell connectivity. *eLife*. **18** (8), e49291 (2019).
6. Venkatesh, H. S. et al. Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature*. **573** (7775), 539-545 (2019).
7. Blanco-Suárez, E., Caldwell, A. L., Allen, N. J. Role of astrocyte-synapse interactions in CNS disorders. *Journal of Physiology*. **595** (6), 1903-1916 (2017).

8. Nefel, C. et al. An integrative model of cellular states, plasticity, and genetics for glioblastoma. *Cell*. **178** (4), 835-849 (2019).
9. Krishna, S. et al. Glioblastoma remodeling of neural circuits in the human brain decreases survival. *BioRxiv*. (2021).
10. Venkataramani, V. et al. Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression. *Nature*. **573** (7775), 532-538 (2019).
11. Wang, X. et al. Reciprocal signaling between glioblastoma stem cells and differentiated tumor cells promotes malignant progression. *Cell Stem Cell*. **22** (4), 514-528 (2018).
12. Venkatesh, H. S. et al. Targeting neuronal activity-regulated neuroligin-3 dependency in high-grade glioma. *Nature*. **549** (7673), 533-537 (2017).
13. Venkatesh, H. S. et al. Neuronal activity promotes glioma growth through Neuroligin-3 secretion. *Cell*. **161** (4), 803-816 (2015).
14. Buckingham, S. C. et al. Glutamate release by primary brain tumors induces epileptic activity. *Nature Medicine*. **17** (10), 1269-1274 (2011).
15. Campbell, S. L., Buckingham, S. C., Sontheimer, H. Human glioma cells induce hyperexcitability in cortical networks. *Epilepsia*. **53** (8), 1360-1370 (2012).
16. Maisonneuve, B. G. C., Vieira, J., Larramendy, F., Honegger, T. Microchannel patterning strategies for in vitro structural connectivity modulation of neural networks. *BioRxiv*. (2021).
17. Pastore, V. P., Godjowski, A., Martinoia, S., Massobrio, P. SpiCoDyn: A toolbox for the analysis of neuronal network dynamics and connectivity from multi-site spike signal recordings. *Neuroinformatics*. **16** (1), 15-30 (2018).
18. Honegger, T., Thielen, M. I., Feizi, S., Sanjana, N. E., Voldman, J. Microfluidic neurite guidance to study structure-function relationships in topologically-complex population-based neural networks. *Scientific Reports*. **6**, 28384 (2016).
19. Nguyen, A. et al. Characterization of the transcriptional and metabolic responses of pediatric high grade gliomas to mTOR-HIF-1 α axis inhibition. *Oncotarget*. **8** (42), 71597-71617 (2017).
20. Taylor, A. M., Dieterich, D. C., Ito, H. T., Kim, S. A., Schuman, E. M. Microfluidic local perfusion chambers for the visualization and manipulation of synapses. *Neuron*. **66** (1), 57-68 (2010).
21. Cerea, A. et al. Selective intracellular delivery and intracellular recordings combined in MEA biosensors. *Lab on a Chip*. **18** (22), 3492-3500 (2018).
22. Bruno, G. et al. Microfluidic multielectrode arrays for spatially localized drug delivery and electrical recordings of primary neuronal cultures. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **8**, 626 (2020).
23. Park, J. W., Vahidi, B., Taylor, A. M., Rhee, S. W., Jeon, N. L. Microfluidic culture platform for neuroscience research. *Nature Protocols*. **1** (4), 2128-2136 (2006).
24. Maisonneuve, B. G. C. et al. Deposition chamber technology as building blocks for a standardized brain on chip framework. *BioRxiv*. (2021).
25. Maccione, A. et al. A novel algorithm for precise identification of spikes in extracellularly recorded neuronal signals. *Journal of Neuroscience Methods*. **177** (1), 241-249 (2009).

26. Andreiuk, B. et al. Fluorescent polymer nanoparticles for cell barcoding in vitro and in vivo. *Small*. **13** (38) (2017).

Données complémentaires

- **Marquages de cellules vivantes par nanoparticules polymériques fluorescentes**

Notre modèle de coculture dans les dispositifs microfluidiques présentait certaines limites dans la possibilité de discerner les neurones et les PDCLs une fois mis en coculture. En effet, après l'adhérence des PDCLs sur le réseau de neurones glutamatergiques, il était difficile de discriminer les PDCLs et les neurones et de suivre leur viabilité et/ou leur prolifération au cours du temps en simple contraste de phase.

Pour pallier à cette difficulté, une technologie basée sur l'utilisation de nanoparticules fluorescentes (Andreiuk et al., 2017) a été adaptée à notre modèle. Ces nanoparticules polymériques sont intégrées spontanément par les cellules vivantes par des mécanismes d'endocytose et permettent d'effectuer un marquage fluorescent. L'utilisation de particules de longueurs d'onde différentes permettrait alors de distinguer les neurones des PDCLs et de déterminer leurs évolutions respectives en temps réel via la technologie Incucyte®.

Ces nanoparticules ont été synthétisées par Andreas REISCH et Baylar Zarbaliyev au sein de notre laboratoire (UMR 7021), à travers une collaboration avec l'équipe de Nanochimie et Bioimagerie dirigée par le Dr. Andrey KLYMCHENKO. Deux types de nanoparticules ont été utilisées, l'une émettant dans le rouge (DID) et l'autre dans le vert (DIO) (Figure 66). Elles ont toutes les deux été testées sur les neurones glutamatergiques ainsi que sur 3 lignées de GHG pédiatriques : BT35 2D, BT68 2D et BT68 3D.

L'utilisation des nanoparticules fluorescentes a permis de marquer toutes les PDCLs testées (Figure 66, données de BT35 non représentées). Leur intégration par les cellules ne semble pas altérer la viabilité cellulaire et le marquage persiste au moins 10 jours après le traitement. Les deux longueurs d'onde ont été testées avec succès sur chacune des lignées. Cependant, les tentatives de marquages des neurones n'ont pas donné de résultats concluants, quelles que soient les longueurs d'onde utilisées (données non représentées). Ces derniers ne semblent pas avoir intégré les nanoparticules. Il est possible que les mécanismes d'endocytose soient plus limités dans les neurones que dans les PDCLs, ce qui pourrait expliquer l'absence de leur pénétration dans ces cellules. D'autres tentatives devront être effectuées avant de conclure. Néanmoins, le marquage des PDCLs par les nanoparticules et l'absence de marquages des neurones glutamatergiques suffiraient déjà à distinguer les deux types cellulaires.

- **Développement de nouvelles PDCLs**

A l'image des lignées utilisées dans le cadre de ce travail de thèse, de nouvelles PDCLs sont continuellement développées au sein de notre laboratoire à travers une collaboration avec le CHU de Hautepierre à Strasbourg. Ce développement s'effectue dans le contexte des programmes PEDIAGLIO et PEDIAMODECAN (PEDIAtic MODEls for CANcer research). A chaque biopsie, un échantillon est systématiquement transféré dans notre laboratoire et utilisé dans le cadre de la dérivation d'une nouvelle PDCLs. Dans ce contexte, j'ai pu dériver 20 PDCLs issues de GHG pédiatriques tout au long de ma thèse, ce qui nous permet de bénéficier d'une centaine de PDCLs depuis la mise en place de ce protocole en 2011.

- **Différenciation et maturation de neurones glutamatergiques en hypoxie**

Après la publication du papier issu de notre collaboration avec les équipes de NETRI, les expérimentations ont été approfondies au sein de notre laboratoire dans le but de reproduire la différenciation et la maturation de neurones glutamatergiques en condition d'hypoxie. Pour cela, les iPSCs ont été commandées auprès de Brainxell (Madison, USA) et mises en culture selon un protocole similaire à celui utilisé par NETRI dans le cadre des dispositifs microfluidiques, mais en conditions hypoxiques à 1% d'O₂. Les neurones ont été ensemencés avec succès dans des Labteks 8 puits ainsi que dans des plaques 96 puits (TPP) et ont pu être suivis en temps réel grâce au système de microscopie automatisée Incucyte ZOOM[®].

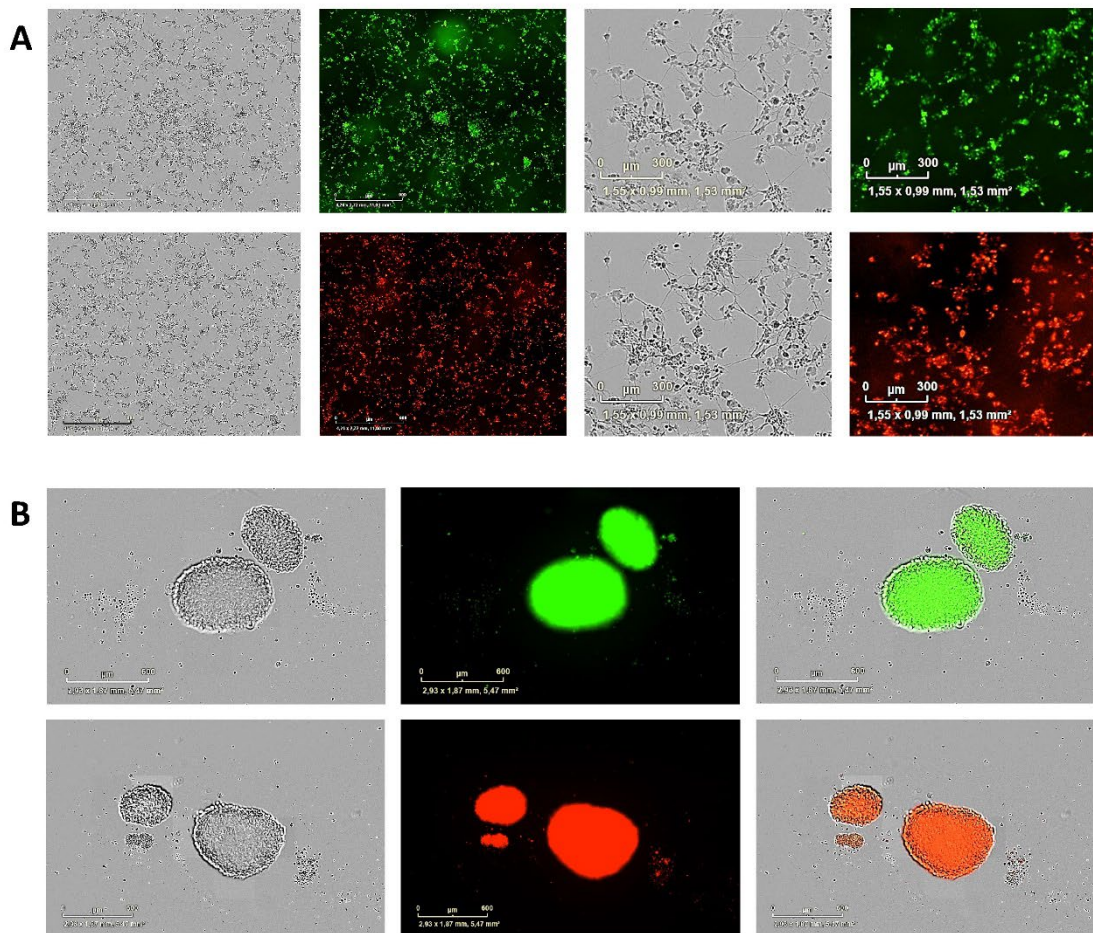


Figure 66 : Marquages de PDCLs (BT68) avec des nanoparticules polymériques fluorescentes émettant dans le vert ou dans le rouge. (A) Exemple de la lignée BT68 2D observée à l'aide de l'Incucyte® ZOOM, en contraste de phase (photos en nuances de gris) et après marquage aux nanoparticules rouges et vertes (photos sur fond noir). (B) Exemple de la lignée BT68 2D observée à l'aide de l'Incucyte® ZOOM, en contraste de phase (photos en nuances de gris) et après marquages aux nanoparticules rouge et vertes (photos sur fond noir). Les images ont été obtenues 10 jours après le traitement initial.

A

Lignée	Diagnostic initial	Date de prélèvement	Mise en culture	Passages
BT107	DIPG H3.3K27M	28/01/2019	29/01/2019	10
BT108	Médulloblastome	05/02/2019	06/02/2019	5
BT109	Ependymome groupe A	13/03/2019	14/03/2019	6
BT110	Syndrome de Rasmussen	07/05/2019	11/05/2019	5
BT112	Gangliogliome de grade 3 BRAFV600E+	01/10/2019	02/10/2019	7
BT113	Gliome de grade 2 BRAFV600E+	27/11/2019	29/11/2019	6
BT114	Médulloblastome	19/12/2019	24/12/2019	5
BT115	Xanthoastrocytome pilomyxoïde grade 3	20/01/2020	21/01/2020	4
BT117	Astrocytome pilocytique de la fosse postérieure	12/05/2020	14/05/2020	6
BT118	Gliome de haut grade wild-type hémisphérique	02/06/2020	03/06/2020	6
BT119	ATRT	04/06/2020	05/06/2020	5
BT120	Ependymome groupe A	17/07/2020	21/07/2020	5
BT121	Médulloblastome	21/09/2020	25/09/2020	5
BT123	Ependymome groupe A	01/01/2021	05/01/2021	5
BT124	Médulloblastome	28/04/2021	04/05/2021	5
BT125	Gangliogliome BRAFV600E+	20/05/2021	25/05/2021	6
BT126	Tumeur cérébrale pinéale DICER1+	17/06/2021	23/06/2021	5
BT127	Médulloblastome	22/07/2021	28/07/2021	6
BT129	Xanthoastrocytome pilomyxoïde grade 3 récidive	27/01/2022	01/02/2022	4
BT130	DMG H3.3 K27M	03/02/2022	10/02/2022	5

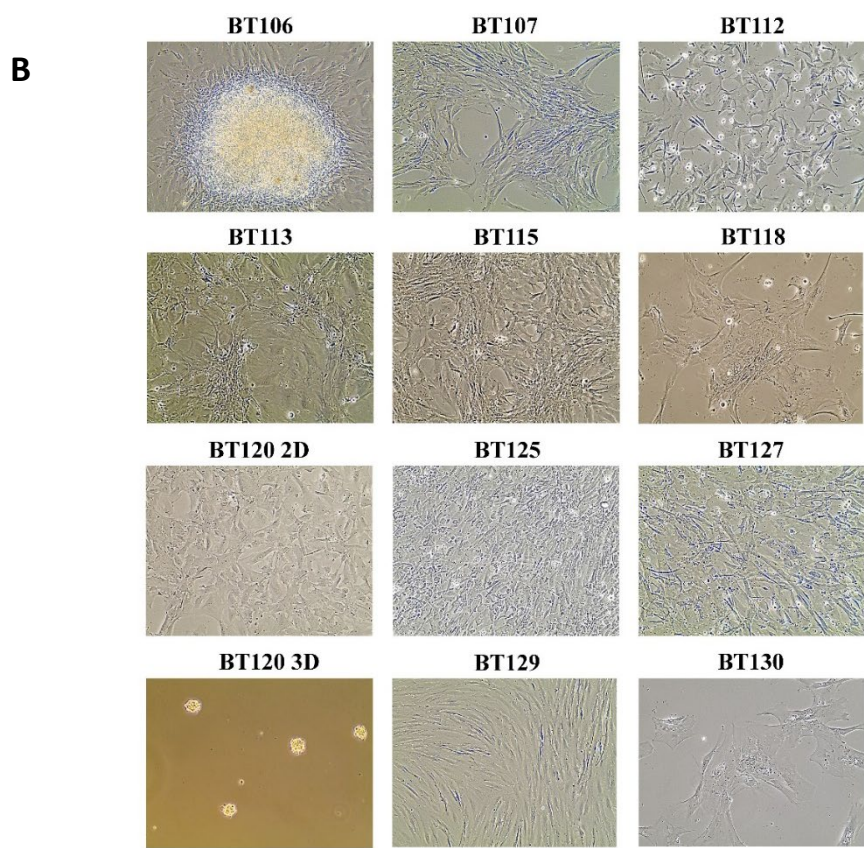


Figure 67 : Développement de nouveaux modèles de PDCLs à partir de biopsies de patients atteints de GHG pédiatriques. (A) Tableau récapitulatif des différentes lignées dérivées depuis mon arrivée au laboratoire associées à leurs diagnostics. (B) Images de PDCLs observées au microscope optique inversé (Grossissement 200X).

- **Discussion et perspectives**

Ce travail a permis de développer et de valider la compatibilité d'un modèle in-vitro microfluidique pour l'étude des interactions fonctionnelles entre un réseau de neurones glutamatergiques et des lignées tumorales dérivées de patients atteints de GHG pédiatriques. Ces dispositifs microfluidiques semblent compatibles avec le développement et la maturation de neurones glutamatergiques corticaux dérivés à partir d'IPSCs. La diminution progressive des marqueurs Nestin et Sox2 et l'apparition progressive de mGluR2 et vGlut1 témoignaient bien d'une différenciation progressive des neurones et de leur spécialisation glutamatergique. Leur maturation s'est également illustrée par une augmentation et une synchronicité progressives de leur activité électrique. La mise en contact de ces neurones avec des lignées tumorales de GHG pédiatriques a entraîné une augmentation de leur activité électrique, et reflète sur ce point des interactions fonctionnelles qui ont été particulièrement décrites dans les GHG pédiatriques par de précédentes études (Blanco-Suárez et al., 2017; Monje, 2020; Venkatesh et al., 2019). Ce phénomène a pu être observé aussi bien avec une lignée commerciale (UW479) qu'avec une PDCL dérivée d'un patient atteint d'un DMG et développée au sein de notre laboratoire (BT35).

L'approche novatrice développée dans ce travail a ainsi montré sa capacité à déceler et analyser des modifications fonctionnelles d'un réseau de neurones en présence de lignées de GHG pédiatriques. Nous avons tout de même rencontré quelques difficultés dans la différenciation et la maturation des neurones glutamatergiques. Dans certains cas, près de la moitié des neurones ne présentaient pas les marqueurs mGluR2 et vGlut1 et ne pouvaient donc pas être considérés comme des neurones glutamatergiques. Les conditions de culture des neurones peuvent encore être améliorées dans le but d'obtenir une population cellulaire plus homogène.

La capacité des nanoparticules décrites précédemment à marquer les PDCLs ouvre la voie à une application ultérieure dans ces dispositifs microfluidiques, dans le but de les distinguer des neurones. D'autres PDCLs pourront être testées ultérieurement pour confirmer leur compatibilité avec les nanoparticules. De plus, si l'incapacité des nanoparticules à marquer les neurones se confirmait lors de prochains essais, une autre alternative pourrait être l'utilisation de neurones couplés à la GFP (Green Fluorescent Protein).

D'autres PDCLs pourront également être testées dans les dispositifs microfluidiques, notamment celles développées au laboratoire dans le cadre du programme PEDIAMODECAN (Figure 67).

Enfin, les précédents travaux présentés dans cette thèse ont souligné la modulation par HIF-2 des voies associées aux interactions glutamatergiques, en particulier dans les DMG. Ainsi, ce modèle microfluidique couplé à un dispositif d'enregistrement et aux nanoparticules pourrait permettre d'étudier, simultanément et en temps réel, les effets d'une inhibition des facteurs HIF-1 α et/ou HIF-2 α sur la prolifération des PDCLs et leurs interactions avec un réseau de neurones glutamatergiques.

Conclusion générale

Les gliomes de haut-grade et plus particulièrement les DMG et les DIPG mutés pour H3.3K27M sont des tumeurs particulièrement agressives, qui se développent au niveau de la ligne médiane et restent à ce jour la première cause de mortalité liée au cancer chez l'enfant. La localisation de ces tumeurs dans des zones cérébrales sensibles rend impossible toute résection chirurgicale et ces tumeurs sont particulièrement résistantes aux chimiothérapies et aux thérapies ciblées testées à ce jour. Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace pour lutter contre ces tumeurs et l'espérance de vie des patients au moment du diagnostic est de 12 à 15 mois.

Cette agressivité tumorale peut être associée à différentes altérations moléculaires intrinsèques de ces tumeurs, entraînant une activation aberrante de voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la survie ou la différenciation cellulaire. La résistance et l'agressivité de ces tumeurs sont également sous la gouverne de facteurs environnementaux et notamment de l'hypoxie intratumorale. L'activation des facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α permettent une adaptation cellulaire et métabolique favorable au développement de la tumeur.

L'implication de ces facteurs de transcription, et en particulier de HIF-2 α dans l'agressivité des GHG pédiatriques et leur mauvais pronostic avait été suggérée par de précédents travaux menés au sein de notre équipe. Néanmoins, aucune donnée ne permettait de déterminer clairement les voies de signalisation modulées par HIF-2 α et son rôle dans le développement et la progression de ces tumeurs. A travers ce travail de thèse, nous avons pu précisément associer HIF-2 α à une plus forte agressivité tumorale et une diminution de la survie des patients, faisant de la sous-unité HIF-2 α un nouveau biomarqueur pronostique à intégrer dans le diagnostic de ces tumeurs. En combinant la méthode de CUT&RUN, le séquençage de l'ARN et la métabolomique, nous avons profilé le paysage des promoteurs et des voies régulées par HIF-2 α dans les DIPG et les DMG où les mutations H3.3K27M et TP53 sont associées. L'élucidation des gènes en aval de HIF-2 α distingue des voies liées aux DIPG (mTor et signalisation Wnt canonique) et aux DMG (interactions glutamatergiques et signalisation Wnt non canonique). La mise en évidence de voies liées aux interactions glutamatergiques a été d'autant plus intéressante que l'inhibition fonctionnelle de HIF-2 α montre un effet antiprolifératif et anti-invasif uniquement lorsque les PDCLs sont intégrées au sein d'un

microenvironnement cérébral de type ENT. Ainsi, nous avons mis en évidence HIF-2 α comme une nouvelle cible thérapeutique et nos résultats préliminaires en RT ouvrent la voie à son utilisation en concomitance à l'irradiation. Sur ce point, HIF-2 α pourrait représenter un potentiel biomarqueur prédictif de la réponse tumorale à la radiothérapie.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont également pu démontrer l'importance, non seulement de la sous-unité HIF-2 α , mais des expressions concomitantes des protéines HIF-1 α et HIF-2 α , qui semblent moduler l'agressivité tumorale à travers une balance d'expressions protéiques inter-régulées. Notre étude a confirmé la dépendance équilibrée des deux facteurs de transcription dans les pHGG au niveau protéique, mais pas dans leur reprogrammation transcriptionnelle. Là encore, l'inhibition de ces deux facteurs de transcription a entraîné des effets antiprolifératifs et anti-invasifs accentués lorsque les PDCLs étaient mises au contact de tissus neuronaux. En association avec les précédents résultats obtenus sur HIF-2 α , ces observations renforcent l'idée d'un rôle pro-oncogénique des facteurs HIF dans les DMG et DIPG à travers les communications cellulaires et les interactions synaptiques avec les cellules cérébrales normales. Cet aspect peut être particulièrement intéressant dans la mesure où les DMG et DIPG semblent se développer dans un contexte spatio-temporel particulier de maturation et de myélinisation neuronales post-natales. Celles-ci mettent justement en jeu des interactions électrochimiques entre des cellules gliales progénitrices et les neurones, notamment glutamatergiques.

La troisième approche de ce travail de thèse consistait alors à développer un modèle d'étude in-vitro permettant d'évaluer les interactions électrophysiologiques entre des lignées de GHG pédiatriques et un réseau de neurones glutamatergiques. Des dispositifs microfluidiques couplés à des réseaux d'électrodes et à un dispositif d'enregistrement ont permis de montrer un impact de la présence des PDCLs sur l'activité électrique de ces neurones. Les interactions entre ces populations cellulaires suggérées par nos précédents résultats ont ainsi pu être modélisées plus concrètement à travers ce modèle fonctionnel. Par ailleurs, des améliorations techniques à travers l'utilisation de nanoparticules fluorescentes ont été apportées depuis et permettront de suivre la viabilité et/ou la prolifération des cellules en temps réel. Ainsi, ce modèle pourra être couplé aux approches pharmacologiques développées au cours de cette thèse et permettra d'apporter des réponses supplémentaires sur la nature des interactions neurones – PDCLs sous la modulation des facteurs HIF. On pourrait notamment envisager de tester les interactions électriques entre les neurones et les PDCLs en réponse à des traitements à l'irinotecan et/ou au PT2385.

Pour conclure, l'ensemble des résultats présentés tout au long de cette thèse souligne l'intérêt de considérer les facteurs HIF-1 α et HIF-2 α comme des biomarqueurs pertinents à intégrer aux diagnostics des DMG et des DIPG mutés pour H3.3K27M. Ils sont associés à des résistances aux traitements et à un mauvais pronostic pour le patient. Leur ciblage et leur inhibition fonctionnelle constituent de nouvelles stratégies thérapeutiques prometteuses dans le but d'améliorer la prise en charge des patients. Cette étude s'est focalisée sur des tumeurs de type DMG et DIPG porteurs de la mutation H3.3K27M, mais les approches expérimentales qui ont été développées pourront s'ouvrir à d'autres types de tumeurs. Au sein même du laboratoire, de nouvelles PDCLs sont systématiquement dérivées à partir de biopsies de patients dans le cadre des programmes PEDIAGLIO et PEDIAMODECAN.

Bibliographie

- Aimone, J.B., Li, Y., Lee, S.W., Clemenson, G.D., Deng, W., and Gage, F.H. (2014). Regulation and Function of Adult Neurogenesis: From Genes to Cognition. *Physiol Rev* 94, 991–1026. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2014>.
- Amemiya, H.M., Kundaje, A., and Boyle, A.P. (2019). The ENCODE Blacklist: Identification of Problematic Regions of the Genome. *Sci Rep* 9, 9354. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45839-z>.
- Andreiuk, B., Reisch, A., Lindecker, M., Follain, G., Peyri ras, N., Goetz, J.G., and Klymchenko, A.S. (2017). Fluorescent Polymer Nanoparticles for Cell Barcoding In Vitro and In Vivo. *Small* 13. <https://doi.org/10.1002/smll.201701582>.
- Antin, C., Tauzi de-Espariat, A., Debily, M.-A., Castel, D., Grill, J., Pag s, M., Ayrault, O., Chrétien, F., Gareton, A., Andreiuolo, F., et al. (2020). EZHIP is a specific diagnostic biomarker for posterior fossa ependymomas, group PFA and diffuse midline gliomas H3-WT with EZHIP overexpression. *Acta Neuropathologica Communications* 8, 183. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01056-8>.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22, 208–215. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01349-6).
- Argersinger, D.P., Rivas, S.R., Shah, A.H., Jackson, S., and Heiss, J.D. (2021). New Developments in the Pathogenesis, Therapeutic Targeting, and Treatment of H3K27M-Mutant Diffuse Midline Glioma. *Cancers (Basel)* 13, 5280. <https://doi.org/10.3390/cancers13215280>.
- Ballabio, C., Anderle, M., Giancesello, M., Lago, C., Miele, E., Cardano, M., Aiello, G., Piazza, S., Caron, D., Gianno, F., et al. (2020). Modeling medulloblastoma in vivo and with human cerebellar organoids. *Nat Commun* 11, 583. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13989-3>.
- Bang, S., Na, S., Jang, J.M., Kim, J., and Jeon, N.L. (2016). Engineering-Aligned 3D Neural Circuit in Microfluidic Device. *Adv Healthc Mater* 5, 159–166. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500397>.
- Bar, E.E., Lin, A., Mahairaki, V., Matsui, W., and Eberhart, C.G. (2010). Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am J Pathol* 177, 1491–1502. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091021>.
- Barateiro, A., Brites, D., and Fernandes, A. (2016). Oligodendrocyte Development and Myelination in Neurodevelopment: Molecular Mechanisms in Health and Disease. *Curr Pharm Des* 22, 656–679. <https://doi.org/10.2174/1381612822666151204000636>.
- Barritault, M., Poncet, D., Meyronet, D., Vasiljevic, A., Lopez, J., Descotes, F., Mottolese, C., Basle, A., Benoit-Janin, M., Pissaloux, D., et al. (2021). NTRK2 gene fusion and resistance mutation: Seventeen-year course of a paediatric glioma. *Pediatr Blood Cancer* 68, e29114. <https://doi.org/10.1002/pbc.29114>.
- von Bartheld, C.S., Bahney, J., and Herculano-Houzel, S. (2016). The Search for True Numbers of Neurons and Glial Cells in the Human Brain: A Review of 150 Years of Cell Counting. *J Comp Neurol* 524, 3865–3895. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>.
- Batra, V., Sands, S.A., Holmes, E., Geyer, J.R., Yates, A., Becker, L., Burger, P., Gilles, F., Wisoff, J., Allen, J.C., et al. (2014). Long-term survival of children less than six years of age enrolled on the CCG-945

phase III trial for newly-diagnosed high-grade glioma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 61, 151–157. <https://doi.org/10.1002/psc.24718>.

Bauchet, L., Rigau, V., Mathieu-Daudé, H., Figarella-Branger, D., Hugues, D., Palusseau, L., Bauchet, F., Fabbro, M., Campello, C., Capelle, L., et al. (2007). French brain tumor data bank: Methodology and first results on 10,000 cases. *J Neurooncol* 84, 189–199. <https://doi.org/10.1007/s11060-007-9356-9>.

Bax, D.A., Mackay, A., Little, S.E., Carvalho, D., Viana-Pereira, M., Tamber, N., Grigoriadis, A.E., Ashworth, A., Reis, R.M., Ellison, D.W., et al. (2010). A distinct spectrum of copy number aberrations in pediatric high-grade gliomas. *Clin Cancer Res* 16, 3368–3377. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0438>.

Behjati, S., Tarpey, P.S., Presneau, N., Scheipl, S., Pillay, N., Van Loo, P., Wedge, D.C., Cooke, S.L., Gundem, G., Davies, H., et al. (2013). Distinct H3F3A and H3F3B driver variants define chondroblastoma and giant cell tumour of bone. *Nat Genet* 45, 10.1038/ng.2814. <https://doi.org/10.1038/ng.2814>.

Bender, S., Tang, Y., Lindroth, A.M., Hovestadt, V., Jones, D.T.W., Kool, M., Zapatka, M., Northcott, P.A., Sturm, D., Wang, W., et al. (2013). Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell* 24, 660–672. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.10.006>.

Bento, C.F., Fernandes, R., Ramalho, J., Marques, C., Shang, F., Taylor, A., and Pereira, P. (2010). The Chaperone-Dependent Ubiquitin Ligase CHIP Targets HIF-1 α for Degradation in the Presence of Methylglyoxal. *PLOS ONE* 5, e15062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015062>.

Bergles, D.E., and Richardson, W.D. (2015). Oligodendrocyte Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, a020453. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020453>.

Bian, S., Repic, M., Guo, Z., Kavirayani, A., Burkard, T., Bagley, J.A., Krauditsch, C., and Knoblich, J.A. (2018). Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation. *Nat Methods* 15, 631–639. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0070-7>.

Birner, P., Gatterbauer, B., Oberhuber, G., Schindl, M., Rössler, K., Prodinger, A., Budka, H., and Hainfellner, J.A. (2001a). Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer* 92, 165–171. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20010701\)92:1<165::aid-cnrcr1305>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010701)92:1<165::aid-cnrcr1305>3.0.co;2-f).

Birner, P., Schindl, M., Obermair, A., Breitenacker, G., and Oberhuber, G. (2001b). Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 7, 1661–1668. .

Bjerke, L., Mackay, A., Nandhabalan, M., Burford, A., Jury, A., Popov, S., Bax, D.A., Carvalho, D., Taylor, K.R., Vinci, M., et al. (2013). Histone H3.3 mutations drive paediatric glioblastoma through upregulation of MYCN. *Cancer Discov* 3, 512–519. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0426>.

Blanco-Suárez, E., Caldwell, A.L.M., and Allen, N.J. (2017). Role of astrocyte–synapse interactions in CNS disorders. *J Physiol* 595, 1903–1916. <https://doi.org/10.1113/JP270988>.

Blandin, A.-F., Durand, A., Litzler, M., Guerin, E., Jacques Namer, I., Guenot, D., and Entz-Werle, N. (2017). HGG-12. HYPOXIA SEEMS TO BE FREQUENTLY UPREGULATED IN THE PEDIATRIC HIGH GRADE GLIOMA AND DIPG. *Neuro Oncol* 19, iv25. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox083.101>.

Blandin, A.-F., Durand, A., Litzler, M., Tripp, A., Guérin, É., Ruhland, E., Obrecht, A., Keime, C., Fuchs, Q., Reita, D., et al. (2019). Hypoxic Environment and Paired Hierarchical 3D and 2D Models of Pediatric H3.3-Mutated Gliomas Recreate the Patient Tumor Complexity. *Cancers* *11*, 1875. <https://doi.org/10.3390/cancers11121875>.

Blionas, A., Giakoumettis, D., Klonou, A., Neromyliotis, E., Karydakis, P., and Themistocleous, M.S. (2018). Paediatric gliomas: diagnosis, molecular biology and management. *Ann Transl Med* *6*, 251. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.05.11>.

Booth, R., and Kim, H. (2012). Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (μ BBB). *Lab Chip* *12*, 1784–1792. <https://doi.org/10.1039/c2lc40094d>.

Boulevard, W., Rowinski, E., Louati, S., Sotton, S., Wozny, A.-S., Moreno-Acosta, P., Mery, B., Rodriguez-Lafresse, C., and Magne, N. (2021). A Review of the Role of Hypoxia in Radioresistance in Cancer Therapy. *Med Sci Monit* *27*, e934116-1-e934116-7. <https://doi.org/10.12659/MSM.934116>.

Brabetz, S., Leary, S.E.S., Gröbner, S.N., Nakamoto, M.W., Şeker-Cin, H., Girard, E.J., Cole, B., Strand, A.D., Bloom, K.L., Hovestadt, V., et al. (2018). A biobank of patient-derived pediatric brain tumor models. *Nat Med* *24*, 1752–1761. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0207-3>.

Branco-Price, C., Zhang, N., Schnelle, M., Evans, C., Katschinski, D.M., Liao, D., Ellies, L., and Johnson, R.S. (2012). Endothelial cell HIF-1 α and HIF-2 α differentially regulate metastatic success. *Cancer Cell* *21*, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.017>.

Braunstein, S., Raleigh, D., Bindra, R., Mueller, S., and Haas-Kogan, D. (2017). Pediatric high-grade glioma: current molecular landscape and therapeutic approaches. *J Neurooncol* *134*, 541–549. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2393-0>.

Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Nounshmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., et al. (2013). The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* *155*, 462–477. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>.

Britton, H.M., Levine, A.B., Shen, Y., Mungall, K., Serrano, J., Snuderl, M., Pleasance, E., Jones, S.J.M., Laskin, J., Marra, M.A., et al. (2021). NTRK2 Fusion driven pediatric glioblastoma: Identification of oncogenic Drivers via integrative Genome and transcriptome profiling. *Clinical Case Reports* *9*, 1472–1477. <https://doi.org/10.1002/ccr3.3804>.

Brotelle, T., and Bay, J.-O. (2016a). La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR : description, développement thérapeutique, résistances, marqueurs prédictifs/pronostiques et applications thérapeutiques en cancérologie. *Bulletin du Cancer* *103*, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2015.09.011>.

Brotelle, T., and Bay, J.-O. (2016b). La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR : description, développement thérapeutique, résistances, marqueurs prédictifs/pronostiques et applications thérapeutiques en cancérologie. *Bulletin du Cancer* *103*, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2015.09.011>.

Brown, J.M., and Wilson, W.R. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* *4*, 437–447. <https://doi.org/10.1038/nrc1367>.

Buccoliero, A.M., Giunti, L., Moscardi, S., Castiglione, F., Provenzano, A., Sardi, I., Scagnet, M., Genitori, L., and Caporalini, C. (2022). Pediatric High Grade Glioma Classification Criteria and Molecular Features of a Case Series. *Genes (Basel)* *13*, 624. <https://doi.org/10.3390/genes13040624>.

Buckingham, S.C., Campbell, S.L., Haas, B.R., Montana, V., Robel, S., Ogunrinu, T., and Sontheimer, H. (2011). Glutamate release by primary brain tumors induces epileptic activity. *Nat Med* *17*, 1269–1274. <https://doi.org/10.1038/nm.2453>.

Buczakowicz, P., Hoeman, C., Rakopoulos, P., Pajovic, S., Letourneau, L., Dzamba, M., Morrison, A., Lewis, P., Bouffet, E., Bartels, U., et al. (2014). Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nat Genet* *46*, 451–456. <https://doi.org/10.1038/ng.2936>.

Burnside, E.R., and Bradbury, E.J. (2014). Manipulating the extracellular matrix and its role in brain and spinal cord plasticity and repair. *NeuroPathol Appl Neurobiol* *40*, 26–59. <https://doi.org/10.1111/nan.12114>.

Butler, D.E., Marlein, C., Walker, H.F., Frame, F.M., Mann, V.M., Simms, M.S., Davies, B.R., Collins, A.T., and Maitland, N.J. (2017). Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway activates autophagy and compensatory Ras/Raf/MEK/ERK signalling in prostate cancer. *Oncotarget* *8*, 56698–56713. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18082>.

Campbell, S.L., Buckingham, S.C., and Sontheimer, H. (2012). Human glioma cells induce hyperexcitability in cortical networks. *Epilepsia* *53*, 1360–1370. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03557.x>.

Campenot, R.B. (1977). Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *74*, 4516–4519. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.10.4516>.

Caragher, S., Chalmers, A.J., and Gomez-Roman, N. (2019). Glioblastoma's Next Top Model: Novel Culture Systems for Brain Cancer Radiotherapy Research. *Cancers (Basel)* *11*, E44. <https://doi.org/10.3390/cancers11010044>.

Carles, C., Esquirol, Y., Turuban, M., Piel, C., Migault, L., Pouchieu, C., Bouvier, G., Fabbro-Peray, P., Lebaillly, P., and Baldi, I. (2020). Residential proximity to power lines and risk of brain tumor in the general population. *Environmental Research* *185*, 109473. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109473>.

Castaño-Vinyals, G., Sadetzki, S., Vermeulen, R., Momoli, F., Kundi, M., Merletti, F., Maslanyj, M., Calderon, C., Wiart, J., Lee, A.-K., et al. (2022). Wireless phone use in childhood and adolescence and neuroepithelial brain tumours: Results from the international MOBI-Kids study. *Environ Int* *160*, 107069. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.107069>.

Castel, D., Philippe, C., Calmon, R., Le Dret, L., Truffaux, N., Boddaert, N., Pagès, M., Taylor, K.R., Saulnier, P., Lacroix, L., et al. (2015). Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol* *130*, 815–827. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1478-0>.

Cervós-Navarro, J., and Diemer, N.H. (1991). Selective vulnerability in brain hypoxia. *Crit Rev Neurobiol* *6*, 149–182. .

Ceschin, R., Kocak, M., Vajapeyam, S., Pollack, I.F., Onar-Thomas, A., Dunkel, I.J., Poussaint, T.Y., and Panigrahy, A. (2019). Quantifying radiation therapy response using apparent diffusion coefficient (ADC) parametric mapping of pediatric diffuse intrinsic pontine glioma: a report from the pediatric brain tumor consortium. *J Neurooncol* *143*, 79–86. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03133-y>.

Chan, K.-M., Fang, D., Gan, H., Hashizume, R., Yu, C., Schroeder, M., Gupta, N., Mueller, S., James, C.D., Jenkins, R., et al. (2013). The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev* 27, 985–990. <https://doi.org/10.1101/gad.217778.113>.

Chassot, A., Canale, S., Varlet, P., Puget, S., Roujeau, T., Negretti, L., Dhermain, F., Rialland, X., Raquin, M.A., Grill, J., et al. (2012). Radiotherapy with concurrent and adjuvant temozolomide in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma. *J Neurooncol* 106, 399–407. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0681-7>.

Chen, L., Feng, P., Li, S., Long, D., Cheng, J., Lu, Y., and Zhou, D. (2009). Effect of hypoxia-inducible factor-1alpha silencing on the sensitivity of human brain glioma cells to doxorubicin and etoposide. *Neurochem Res* 34, 984–990. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9864-9>.

Chen, R., Lai, U.H., Zhu, L., Singh, A., Ahmed, M., and Forsyth, N.R. (2018). Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors. *Front Cell Dev Biol* 6, 132. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00132>.

Chen, W., Hill, H., Christie, A., Kim, M.S., Holloman, E., Pavia-Jimenez, A., Homayoun, F., Ma, Y., Patel, N., Yell, P., et al. (2016). Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature* 539, 112–117. <https://doi.org/10.1038/nature19796>.

Chen, Y.-J., Hakin-Smith, V., Teo, M., Xinarianos, G.E., Jellinek, D.A., Carroll, T., McDowell, D., MacFarlane, M.R., Boet, R., Baguley, B.C., et al. (2006). Association of mutant TP53 with alternative lengthening of telomeres and favorable prognosis in glioma. *Cancer Res* 66, 6473–6476. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0910>.

Cho, H., and Kaelin, W.G. (2016). Targeting HIF2 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 81, 113–121. <https://doi.org/10.1101/sqb.2016.81.030833>.

Chonan, Y., Taki, S., Sampetean, O., Saya, H., and Sudo, R. (2017). Endothelium-induced three-dimensional invasion of heterogeneous glioma initiating cells in a microfluidic coculture platform. *Integr Biol (Camb)* 9, 762–773. <https://doi.org/10.1039/c7ib00091j>.

Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Ramanathan, A., Gerszten, R.E., Wei, R., Fleming, M.D., Schreiber, S.L., and Cantley, L.C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452, 230–233. <https://doi.org/10.1038/nature06734>.

Chung, C., Sweha, S.R., Pratt, D., Tamrazi, B., Panwalkar, P., Banda, A., Bayliss, J., Hawes, D., Yang, F., Lee, H.-J., et al. (2020). Integrated metabolic and epigenomic reprogramming by H3K27M mutations in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Cancer Cell* 38, 334–349.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.07.008>.

Chwalek, K., Sood, D., Cantley, W.L., White, J.D., Tang-Schomer, M., and Kaplan, D.L. (2015). Engineered 3D Silk-collagen-based Model of Polarized Neural Tissue. *J Vis Exp* 52970. <https://doi.org/10.3791/52970>.

Clark, M.J., Homer, N., O'Connor, B.D., Chen, Z., Eskin, A., Lee, H., Merriman, B., and Nelson, S.F. (2010). U87MG Decoded: The Genomic Sequence of a Cytogenetically Aberrant Human Cancer Cell Line. *PLOS Genetics* 6, e1000832. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000832>.

Cohen, K.J., Pollack, I.F., Zhou, T., Buxton, A., Holmes, E.J., Burger, P.C., Brat, D.J., Rosenblum, M.K., Hamilton, R.L., Lavey, R.S., et al. (2011). Temozolomide in the treatment of high-grade gliomas in

children: a report from the Children's Oncology Group. *Neuro Oncol* 13, 317–323. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noq191>.

Coletti, A.M., Singh, D., Kumar, S., Shafin, T.N., Briody, P.J., Babbitt, B.F., Pan, D., Norton, E.S., Brown, E.C., Kahle, K.T., et al. (2018). Characterization of the ventricular-subventricular stem cell niche during human brain development. *Development* 145, dev170100. <https://doi.org/10.1242/dev.170100>.

Collura, A., Lefevre, J.H., Svrcek, M., Tougeron, D., Zaanani, A., and Duval, A. (2019). Instabilité des microsatellites et cancer - De l'instabilité du génome à la médecine personnalisée. *Med Sci (Paris)* 35, 535–543. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019093>.

Courtney, K.D., Infante, J.R., Lam, E.T., Figlin, R.A., Rini, B.I., Brugarolas, J., Zojwalla, N.J., Lowe, A.M., Wang, K., Wallace, E.M., et al. (2018). Phase I Dose-Escalation Trial of PT2385, a First-in-Class Hypoxia-Inducible Factor-2 α Antagonist in Patients With Previously Treated Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 36, 867–874. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.2627>.

Crabtree, H.G., Cramer, W., and Murray, J.A. (1933). The action of radium on cancer cells. II.—Some factors determining the susceptibility of cancer cells to radium. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 113, 238–250. <https://doi.org/10.1098/rspb.1933.0044>.

Crespo*, S., Kind*, M., and Arcaro, A. (2016). The role of the PI3K/AKT/mTOR pathway in brain tumor metastasis. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* 2, 80–89. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2015.72>.

D'Alessio, A., Proietti, G., Lama, G., Biamonte, F., Lauriola, L., Moscato, U., Vescovi, A., Mangiola, A., Angelucci, C., and Sica, G. (2016). Analysis of angiogenesis related factors in glioblastoma, peritumoral tissue and their derived cancer stem cells. *Oncotarget* 7, 78541–78556. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12398>.

Dang, C.V. (2012). MYC on the path to cancer. *Cell* 149, 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.003>.

Darlix, A., Zouaoui, S., Rigau, V., Bessaoud, F., Figarella-Branger, D., Mathieu-Daudé, H., Trétarre, B., Bauchet, F., Duffau, H., Taillandier, L., et al. (2017). Epidemiology for primary brain tumors: a nationwide population-based study. *J. Neurooncol.* 131, 525–546. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2318-3>.

Das, B., Yeger, H., Tsuchida, R., Torkin, R., Gee, M.F.W., Thorner, P.S., Shibuya, M., Malkin, D., and Baruchel, S. (2005). A hypoxia-driven vascular endothelial growth factor/Flt1 autocrine loop interacts with hypoxia-inducible factor-1 α through mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neuroblastoma. *Cancer Res* 65, 7267–7275. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4575>.

Das, B., Pal, B., Bhuyan, R., Li, H., Sarma, A., Gayan, S., Talukdar, J., Sandhya, S., Bhuyan, S., Gogoi, G., et al. (2019). MYC Regulates the HIF2 α Stemness Pathway via Nanog and Sox2 to Maintain Self-Renewal in Cancer Stem Cells versus Non-Stem Cancer Cells. *Cancer Research* 79, 4015–4025. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2847>.

Daumas-Duport, C., Koziak, M., Miquel, C., Nataf, F., Jouvét, A., and Varlet, P. (2005). Classification des oligodendrogliomes de l'hôpital sainte-anne: Mise au point à l'usage des études retrospectives. *Neurochirurgie* 51, 247–253. [https://doi.org/10.1016/S0028-3770\(05\)83485-X](https://doi.org/10.1016/S0028-3770(05)83485-X).

Deng, H., Zeng, J., Zhang, T., Gong, L., Zhang, H., Cheung, E., Jones, C., and Li, G. (2018). Histone H3.3K27M Mobilizes Multiple Cancer/Testis (CT) Antigens in Pediatric Glioma. *Mol Cancer Res* 16, 623–633. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0460>.

Dings, J., Meixensberger, J., Jäger, A., and Roosen, K. (1998). Clinical experience with 118 brain tissue oxygen partial pressure catheter probes. *Neurosurgery* 43, 1082–1095. <https://doi.org/10.1097/00006123-199811000-00045>.

Doll, R., and Wakeford, R. (1997). Risk of childhood cancer from fetal irradiation. *Br J Radiol* 70, 130–139. <https://doi.org/10.1259/bjr.70.830.9135438>.

Dong, G., Lin, X.-H., Liu, H.-H., Gao, D.-M., Cui, J.-F., Ren, Z.-G., and Chen, R.-X. (2019). Intermittent hypoxia alleviates increased VEGF and pro-angiogenic potential in liver cancer cells. *Oncol Lett* 18, 1831–1839. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10486>.

El-Ayadi, M., Ansari, M., Sturm, D., Gielen, G.H., Warmuth-Metz, M., Kramm, C.M., and von Bueren, A.O. (2017). High-grade glioma in very young children: a rare and particular patient population. *Oncotarget* 8, 64564–64578. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18478>.

El-Khouly, F.E., Veldhuijzen van Zanten, S.E.M., Santa-Maria Lopez, V., Hendrikse, N.H., Kaspers, G.J.L., Loizos, G., Sumerauer, D., Nysom, K., Pruunsild, K., Pentikainen, V., et al. (2019). Diagnostics and treatment of diffuse intrinsic pontine glioma: where do we stand? *J Neurooncol* 145, 177–184. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03287-9>.

Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M.H., Plas, D.R., Zhuang, H., Cinalli, R.M., Alavi, A., Rudin, C.M., et al. (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 64, 3892–3899. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2904>.

Emery, B. (2010). Regulation of Oligodendrocyte Differentiation and Myelination. *Science* 330, 779–782. <https://doi.org/10.1126/science.1190927>.

Englinger, B., Hack, O.A., and Filbin, M.G. (2020). Into Thin Air: Hypoxia Drives Metabolic and Epigenomic Deregulation of Lethal Pediatric Ependymoma. *Developmental Cell* 54, 134–136. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.06.020>.

Entz-Werle, N., Chammas, A., Ruhland, E., Sebastia, C., Gabor, F., Durand, A., Guerin, E., Kremer, S., Namer, I.J., and Dontenwill, M. (2018). HGG-28. INTEGRATIVE ANALYSES OF MRI PARAMETERS, METABOLOMICS AND HYPOXIC BIOMARKERS ARE SHOWING PREDICTIVE CORRELATION WITH PATIENT CHARACTERISTICS AND OUTCOME. *Neuro-Oncology* 20, i95. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy059.300>.

Entz-Werlé, N., Poidevin, L., Nazarov, P.V., Poch, O., Lhermitte, B., Chenard, M.P., Burckel, H., Guérin, E., Fuchs, Q., Castel, D., et al. (2021). A DNA Repair and Cell Cycle Gene Expression Signature in Pediatric High-Grade Gliomas: Prognostic and Therapeutic Value. *Cancers (Basel)* 13, 2252. <https://doi.org/10.3390/cancers13092252>.

Estlin, E.J., Lashford, L., Ablett, S., Price, L., Gowing, R., Gholkar, A., Kohler, J., Lewis, I.J., Morland, B., Pinkerton, C.R., et al. (1998). Phase I study of temozolomide in paediatric patients with advanced cancer. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *Br J Cancer* 78, 652–661. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.555>.

Fangusaro, J. (2012). Pediatric high grade glioma: a review and update on tumor clinical characteristics and biology. *Front Oncol* 2, 105. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00105>.

Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C., and de Boer, J. (2013). Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol* 31, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.003>.

Ferguson, S., and Lesniak, M.S. (2005). Percival Bailey and the classification of brain tumors. *Neurosurg Focus* 18, e7. <https://doi.org/10.3171/foc.2005.18.4.8>.

Filbin, M., and Monje, M. (2019). Developmental origins and emerging therapeutic opportunities for childhood cancer. *Nat Med* 25, 367–376. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0383-9>.

Fine, H.A., Dear, K.B., Loeffler, J.S., Black, P.M., and Canellos, G.P. (1993). Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 71, 2585–2597. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930415\)71:8<2585::aid-cnrcr2820710825>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930415)71:8<2585::aid-cnrcr2820710825>3.0.co;2-s).

Fontebasso, A.M., Schwartzenruber, J., Khuong-Quang, D.-A., Liu, X.-Y., Sturm, D., Korshunov, A., Jones, D.T.W., Witt, H., Kool, M., Albrecht, S., et al. (2013). Mutations in SETD2 and genes affecting histone H3K36 methylation target hemispheric high-grade gliomas. *Acta Neuropathol* 125, 659–669. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1095-8>.

Fortin, J., Tian, R., Zarrabi, I., Hill, G., Williams, E., Sanchez-Duffhues, G., Thorikay, M., Ramachandran, P., Siddaway, R., Wong, J.F., et al. (2020). Mutant ACVR1 Arrests Glial Cell Differentiation to Drive Tumorigenesis in Pediatric Gliomas. *Cancer Cell* 37, 308–323.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.02.002>.

Foty, R. (2011). A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *J Vis Exp* 2720. <https://doi.org/10.3791/2720>.

Friedmann-Morvinski, D., Bushong, E.A., Ke, E., Soda, Y., Marumoto, T., Singer, O., Ellisman, M.H., and Verma, I.M. (2012). Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science* 338, 1080–1084. <https://doi.org/10.1126/science.1226929>.

Fuchs, Q., Pierrevelcin, M., Messe, M., Lhermitte, B., Blandin, A.-F., Papin, C., Coca, A., Dontenwill, M., and Entz-Werlé, N. (2020). Hypoxia Inducible Factors' Signaling in Pediatric High-Grade Gliomas: Role, Modelization and Innovative Targeted Approaches. *Cancers (Basel)* 12, 979. <https://doi.org/10.3390/cancers12040979>.

Fuchs, Q., Batut, A., Gleyzes, M., Rontard, J., Miny, L., Libralato, M., Vieira, J., Debis, D., Larramendy, F., Honegger, T., et al. (2021). Co-culture of Glutamatergic Neurons and Pediatric High-Grade Glioma Cells Into Microfluidic Devices to Assess Electrical Interactions. *J Vis Exp* <https://doi.org/10.3791/62748>.

Fujii, M., Ichikawa, M., Iwatate, K., Bakhit, M., Yamada, M., Kuromi, Y., Sato, T., Sakuma, J., Sato, H., Kikuta, A., et al. (2020). Secondary brain tumors after cranial radiation therapy: A single-institution study. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy* 25, 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2020.01.009>.

Funato, K., Major, T., Lewis, P.W., Allis, C.D., and Tabar, V. (2014). Use of human embryonic stem cells to model pediatric gliomas with H3.3K27M histone mutation. *Science* 346, 1529–1533. <https://doi.org/10.1126/science.1253799>.

Gambella, A., Senetta, R., Collemi, G., Vallero, S.G., Monticelli, M., Cofano, F., Zeppa, P., Garbossa, D., Pellerino, A., Rudà, R., et al. (2020). NTRK Fusions in Central Nervous System Tumors: A Rare, but Worthy Target. *Int J Mol Sci* 21, E753. <https://doi.org/10.3390/ijms21030753>.

- Gargallo, P., Yáñez, Y., Segura, V., Juan, A., Torres, B., Balaguer, J., Oltra, S., Castel, V., and Cañete, A. (2020). Li-Fraumeni syndrome heterogeneity. *Clin Transl Oncol* 22, 978–988. <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02236-2>.
- Gaspar, N., Marshall, L., Perryman, L., Bax, D.A., Little, S.E., Viana-Pereira, M., Sharp, S.Y., Vassal, G., Pearson, A.D.J., Reis, R.M., et al. (2010). MGMT-independent temozolomide resistance in pediatric glioblastoma cells associated with a PI3-kinase-mediated HOX/stem cell gene signature. *Cancer Res* 70, 9243–9252. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1250>.
- Gatenby, R.A., and Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4, 891–899. <https://doi.org/10.1038/nrc1478>.
- Gaustad, J.-V., Simonsen, T.G., Roa, A.M.A., and Rofstad, E.K. (2013). Tumors exposed to acute cyclic hypoxia show increased vessel density and delayed blood supply. *Microvasc Res* 85, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2012.11.002>.
- Gee, J.R., and Keller, J.N. (2005). Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1145–1150. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.10.004>.
- Geoerger, B., Kieran, M.W., Grupp, S., Perek, D., Clancy, J., Krygowski, M., Ananthakrishnan, R., Boni, J.P., Berkenblit, A., and Spunt, S.L. (2012). Phase II trial of temsirolimus in children with high-grade glioma, neuroblastoma and rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer* 48, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.09.021>.
- Gerges, N., Fontebasso, A.M., Albrecht, S., Faury, D., and Jabado, N. (2013). Pediatric high-grade astrocytomas: a distinct neuro-oncological paradigm. *Genome Med* 5, 66. <https://doi.org/10.1186/gm470>.
- Gibson, E.M., Purger, D., Mount, C.W., Goldstein, A.K., Lin, G.L., Wood, L.S., Inema, I., Miller, S.E., Bieri, G., Zuchero, J.B., et al. (2014). Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science* 344, 1252304. <https://doi.org/10.1126/science.1252304>.
- Golden, P.L., and Pollack, G.M. (2003). Blood-brain barrier efflux transport. *J Pharm Sci* 92, 1739–1753. <https://doi.org/10.1002/jps.10424>.
- Gong, F., and Miller, K.M. (2019). Histone methylation and the DNA damage response. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 780, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.09.003>.
- Gore, L., Trippett, T.M., Katzenstein, H.M., Boklan, J., Narendran, A., Smith, A., Macy, M.E., Rolla, K., Pediatric Oncology Experimental Therapeutics Investigators' Consortium (POETIC), Narashimhan, N., et al. (2013). A multicenter, first-in-pediatrics, phase 1, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of ridaforolimus in patients with refractory solid tumors. *Clin Cancer Res* 19, 3649–3658. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3166>.
- Gottschalk, S., Anderson, N., Hainz, C., Eckhardt, S.G., and Serkova, N.J. (2004). Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia BCR-ABL-positive cells. *Clin Cancer Res* 10, 6661–6668. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0039>.
- Grill, J., Puget, S., Andreiuolo, F., Philippe, C., MacConaill, L., and Kieran, M.W. (2012). Critical oncogenic mutations in newly diagnosed pediatric diffuse intrinsic pontine glioma. *Pediatric Blood & Cancer* 58, 489–491. <https://doi.org/10.1002/pbc.24060>.

Grill, J., Massimino, M., Bouffet, E., Azizi, A.A., McCowage, G., Cañete, A., Saran, F., Le Deley, M.-C., Varlet, P., Morgan, P.S., et al. (2018). Phase II, Open-Label, Randomized, Multicenter Trial (HERBY) of Bevacizumab in Pediatric Patients With Newly Diagnosed High-Grade Glioma. *J Clin Oncol* *36*, 951–958. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.0611>.

Gu, Y.Z., Moran, S.M., Hogenesch, J.B., Wartman, L., and Bradfield, C.A. (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* *7*, 205–213. .

Gu, Z., Eils, R., and Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* *32*, 2847–2849. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>.

Guérin, E., Raffelsberger, W., Pencreach, E., Maier, A., Neuville, A., Schneider, A., Bachellier, P., Rohr, S., Petitprez, A., Poch, O., et al. (2012). In vivo topoisomerase I inhibition attenuates the expression of hypoxia-inducible factor 1 α target genes and decreases tumor angiogenesis. *Mol Med* *18*, 83–94. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00120>.

Hainer, S.J., and Fazio, T.G. (2019). High-Resolution Chromatin Profiling Using CUT&RUN. *Curr Protoc Mol Biol* *126*, e85. <https://doi.org/10.1002/cpmb.85>.

Hankinson, T.C., Campagna, E.J., Foreman, N.K., and Handler, M.H. (2011). Interpretation of magnetic resonance images in diffuse intrinsic pontine glioma: a survey of pediatric neurosurgeons: Clinical article. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* *8*, 97–102. <https://doi.org/10.3171/2011.4.PEDS1180>.

Hardell, L., and Moskowitz, J.M. (2022). A critical analysis of the MOBI-Kids study of wireless phone use in childhood and adolescence and brain tumor risk. *Rev Environ Health* <https://doi.org/10.1515/reveh-2022-0040>.

Harris, A.L. (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* *2*, 38–47. <https://doi.org/10.1038/nrc704>.

Harrison, R.A., and de Groot, J.F. (2017). Cell Signaling Pathways in Brain Tumors. *Topics in Magnetic Resonance Imaging* *26*, 15–26. <https://doi.org/10.1097/RMR.000000000000112>.

Hashizume, R., Andor, N., Ihara, Y., Lerner, R., Gan, H., Chen, X., Fang, D., Huang, X., Tom, M.W., Ngo, V., et al. (2014). Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat Med* *20*, 1394–1396. <https://doi.org/10.1038/nm.3716>.

Hayashi, Y., Yokota, A., Harada, H., and Huang, G. (2019). Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer. *Cancer Science* *110*, 1510–1517. <https://doi.org/10.1111/cas.13990>.

He, C., Xu, K., Zhu, X., Dunphy, P.S., Gudenas, B., Lin, W., Twarog, N., Hover, L.D., Kwon, C.-H., Kasper, L.H., et al. (2021). Patient-derived models recapitulate heterogeneity of molecular signatures and drug response in pediatric high-grade glioma. *Nat Commun* *12*, 4089. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24168-8>.

Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y.C., Laslo, P., Cheng, J.X., Murre, C., Singh, H., and Glass, C.K. (2010). Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. *Molecular Cell* *38*, 576–589. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.004>.

Helena, J.M., Joubert, A.M., Grobbelaar, S., Nolte, E.M., Nel, M., Pepper, M.S., Coetzee, M., and Mercier, A.E. (2018). Deoxyribonucleic Acid Damage and Repair: Capitalizing on Our Understanding of the Mechanisms of Maintaining Genomic Integrity for Therapeutic Purposes. *International Journal of Molecular Sciences* *19*, 1148. <https://doi.org/10.3390/ijms19041148>.

Hemmati, H.D., Nakano, I., Lazareff, J.A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D.H., Bronner-Fraser, M., and Kornblum, H.I. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 15178–15183. <https://doi.org/10.1073/pnas.2036535100>.

Hengst, U., Deglincerti, A., Kim, H.J., Jeon, N.L., and Jaffrey, S.R. (2009). Axonal elongation triggered by stimulus-induced local translation of a polarity complex protein. *Nat Cell Biol* *11*, 1024–1030. <https://doi.org/10.1038/ncb1916>.

Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* *62*, 1377–1391. <https://doi.org/10.1002/glia.22683>.

Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., and Kunz-Schughart, L.A. (2010). Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology* *148*, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.012>.

Hoffman, L.M., Geller, J., Leach, J., Boue, D., Drissi, R., Chen, L., Krailo, M., Panandiker, A.P., Chow, L., Haas-Kogan, D., et al. (2015). TR-14A FEASIBILITY AND RANDOMIZED PHASE II STUDY OF VORINOSTAT, BEVACIZUMAB, OR TEMOZOLOMIDE DURING RADIATION FOLLOWED BY MAINTENANCE CHEMOTHERAPY IN NEWLY-DIAGNOSED PEDIATRIC HIGH-GRADE GLIOMA: CHILDREN'S ONCOLOGY GROUP STUDY ACNS0822. *Neuro Oncol* *17*, iii39–iii40. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov061.159>.

Hoffman, L.M., Veldhuijzen van Zanten, S.E.M., Colditz, N., Baugh, J., Chaney, B., Hoffmann, M., Lane, A., Fuller, C., Miles, L., Hawkins, C., 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. *JCO* *36*, 1963–1972. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.9308>.

Holmquist-Mengelbier, L., Fredlund, E., Löfstedt, T., Noguera, R., Navarro, S., Nilsson, H., Pietras, A., Vallon-Christersson, J., Borg, Å., Gradin, K., et al. (2006). Recruitment of HIF-1 α and HIF-2 α to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 α promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* *10*, 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.026>.

Houghton, P.J., Morton, C.L., Kolb, E.A., Gorlick, R., Lock, R., Carol, H., Reynolds, C.P., Maris, J.M., Keir, S.T., Billups, C.A., et al. (2008). Initial testing (stage 1) of the mTOR inhibitor rapamycin by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* *50*, 799–805. <https://doi.org/10.1002/pbc.21296>.

Huang, W., Ding, X., Ye, H., Wang, J., Shao, J., and Huang, T. (2018). Hypoxia enhances the migration and invasion of human glioblastoma U87 cells through PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α pathway. *Neuroreport* *29*, 1578–1585. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001156>.

Hubert, C.G., Rivera, M., Spangler, L.C., Wu, Q., Mack, S.C., Prager, B.C., Couce, M., McLendon, R.E., Sloan, A.E., and Rich, J.N. (2016). A Three-Dimensional Organoid Culture System Derived from Human Glioblastomas Recapitulates the Hypoxic Gradients and Cancer Stem Cell Heterogeneity of Tumors Found In Vivo. *Cancer Res* *76*, 2465–2477. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2402>.

Huillard, E., Hashizume, R., Phillips, J.J., Griveau, A., Ihrie, R.A., Aoki, Y., Nicolaides, T., Perry, A., Waldman, T., McMahon, M., et al. (2012). Cooperative interactions of BRAFV600E kinase and CDKN2A

locus deficiency in pediatric malignant astrocytoma as a basis for rational therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 8710–8715. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117255109>.

Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D., and Steindler, D.A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* *39*, 193–206. <https://doi.org/10.1002/glia.10094>.

Jacob, F., Salinas, R.D., Zhang, D.Y., Nguyen, P.T.T., Schnoll, J.G., Wong, S.Z.H., Thokala, R., Sheikh, S., Saxena, D., Prokop, S., et al. (2020). A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell* *180*, 188-204.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.036>.

Jakacki, R.I., Cohen, K.J., Buxton, A., Krailo, M.D., Burger, P.C., Rosenblum, M.K., Brat, D.J., Hamilton, R.L., Eckel, S.P., Zhou, T., et al. (2016). Phase 2 study of concurrent radiotherapy and temozolomide followed by temozolomide and lomustine in the treatment of children with high-grade glioma: a report of the Children's Oncology Group ACNS0423 study. *Neuro Oncol* *18*, 1442–1450. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now038>.

Jannier, S., Kemmel, V., Sebastia Sancho, C., Chammas, A., Sabo, A.-N., Pencreach, E., Farace, F., Chenard, M.P., Lhermitte, B., Geoerger, B., et al. (2020a). SFCE-RAPIRI Phase I Study of Rapamycin Plus Irinotecan: A New Way to Target Intra-Tumor Hypoxia in Pediatric Refractory Cancers. *Cancers (Basel)* *12*, E3051. <https://doi.org/10.3390/cancers12103051>.

Jannier, S., Kemmel, V., Sebastia Sancho, C., Chammas, A., Sabo, A.-N., Pencreach, E., Farace, F., Chenard, M.P., Lhermitte, B., Geoerger, B., et al. (2020b). SFCE-RAPIRI Phase I Study of Rapamycin Plus Irinotecan: A New Way to Target Intra-Tumor Hypoxia in Pediatric Refractory Cancers. *Cancers (Basel)* *12*, 3051. <https://doi.org/10.3390/cancers12103051>.

Jansen, M.H.A., Lagerweij, T., Sewing, A.C.P., Vugts, D.J., van Vuurden, D.G., Molthoff, C.F.M., Caretti, V., Veringa, S.J.E., Petersen, N., Carcaboso, A.M., et al. (2016). Bevacizumab Targeting Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: Results of ⁸⁹Zr-Bevacizumab PET Imaging in Brain Tumor Models. *Mol Cancer Ther* *15*, 2166–2174. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0558>.

Jennings, M.T., Sposto, R., Boyett, J.M., Vezina, L.G., Holmes, E., Berger, M.S., Bruggers, C.S., Bruner, J.M., Chan, K.-W., Dusenbery, K.E., et al. (2002). Preradiation chemotherapy in primary high-risk brainstem tumors: phase II study CCG-9941 of the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* *20*, 3431–3437. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.04.109>.

Jenseit, A., Camgöz, A., Pfister, S.M., and Kool, M. (2022). EZHIP: a new piece of the puzzle towards understanding pediatric posterior fossa ependymoma. *Acta Neuropathol* *143*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02382-4>.

Jensen, R.L., Mumert, M.L., Gillespie, D.L., Kinney, A.Y., Schabel, M.C., and Salzman, K.L. (2014). Preoperative dynamic contrast-enhanced MRI correlates with molecular markers of hypoxia and vascularity in specific areas of intratumoral microenvironment and is predictive of patient outcome. *Neuro Oncol* *16*, 280–291. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not148>.

Jeuken, J., van den Broecke, C., Gijsen, S., Boots-Sprenger, S., and Wesseling, P. (2007). RAS/RAF pathway activation in gliomas: the result of copy number gains rather than activating mutations. *Acta Neuropathol* *114*, 121–133. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0239-0>.

Johansson, E., Grassi, E.S., Pantazopoulou, V., Tong, B., Lindgren, D., Berg, T.J., Pietras, E.J., Axelson, H., and Pietras, A. (2017). CD44 Interacts with HIF-2 α to Modulate the Hypoxic Phenotype of

Perinecrotic and Perivascular Glioma Cells. *Cell Rep* 20, 1641–1653. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.049>.

Johnson, A., Severson, E., Gay, L., Vergilio, J.-A., Elvin, J., Suh, J., Daniel, S., Covert, M., Frampton, G.M., Hsu, S., et al. (2017). Comprehensive Genomic Profiling of 282 Pediatric Low- and High-Grade Gliomas Reveals Genomic Drivers, Tumor Mutational Burden, and Hypermutation Signatures. *Oncologist* 22, 1478–1490. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0242>.

Jones, C., and Baker, S.J. (2014). Unique genetic and epigenetic mechanisms driving paediatric diffuse high-grade glioma. *Nat Rev Cancer* 14, 651–661. <https://doi.org/10.1038/nrc3811>.

Jones, C., Karajannis, M.A., Jones, D.T.W., Kieran, M.W., Monje, M., Baker, S.J., Becher, O.J., Cho, Y.-J., Gupta, N., Hawkins, C., et al. (2017a). Pediatric high-grade glioma: biologically and clinically in need of new thinking. *Neuro Oncol* 19, 153–161. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now101>.

Jones, C., Karajannis, M.A., Jones, D.T.W., Kieran, M.W., Monje, M., Baker, S.J., Becher, O.J., Cho, Y.-J., Gupta, N., Hawkins, C., et al. (2017b). Pediatric high-grade glioma: biologically and clinically in need of new thinking. *Neuro Oncol* 19, 153–161. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now101>.

Katagiri, T., Tsukamoto, S., Nakachi, Y., and Kuratani, M. (2018). Recent Topics in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. *Endocrinol Metab (Seoul)* 33, 331–338. <https://doi.org/10.3803/EnM.2018.33.3.331>.

Kaur, B., Khwaja, F.W., Severson, E.A., Matheny, S.L., Brat, D.J., and Van Meir, E.G. (2005). Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-Oncol* 7, 134–153. <https://doi.org/10.1215/S1152851704001115>.

Keith, B., Johnson, R.S., and Simon, M.C. (2011). HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progression. *Nat Rev Cancer* 12, 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc3183>.

Kelm, J.M., Timmins, N.E., Brown, C.J., Fussenegger, M., and Nielsen, L.K. (2003). Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 83, 173–180. <https://doi.org/10.1002/bit.10655>.

Kerman, B.E., Kim, H.J., Padmanabhan, K., Mei, A., Georges, S., Joens, M.S., Fitzpatrick, J.A.J., Jappelli, R., Chandross, K.J., August, P., et al. (2015). In vitro myelin formation using embryonic stem cells. *Development* 142, 2213–2225. <https://doi.org/10.1242/dev.116517>.

Kernohan, J.W., and Mabon, R.F. (1949). A simplified classification of the gliomas. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 24, 71–75. .

Khuong-Quang, D.-A., Buczkowicz, P., Rakopoulos, P., Liu, X.-Y., Fontebasso, A.M., Bouffet, E., Bartels, U., Albrecht, S., Schwartzenuber, J., Letourneau, L., et al. (2012). K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol* 124, 439–447. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-0998-0>.

Kim, Y.Z. (2014). Altered histone modifications in gliomas. *Brain Tumor Res Treat* 2, 7–21. <https://doi.org/10.14791/btrt.2014.2.1.7>.

Knickmeyer, R.C., Gouttard, S., Kang, C., Evans, D., Wilber, K., Smith, J.K., Hamer, R.M., Lin, W., Gerig, G., and Gilmore, J.H. (2008). A Structural MRI Study of Human Brain Development from Birth to 2 Years. *J Neurosci* 28, 12176–12182. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3479-08.2008>.

- Koh, M.Y., Darnay, B.G., and Powis, G. (2008). Hypoxia-Associated Factor, a Novel E3-Ubiquitin Ligase, Binds and Ubiquitinates Hypoxia-Inducible Factor 1 α , Leading to Its Oxygen-Independent Degradation. *Molecular and Cellular Biology* 28, 7081–7095. <https://doi.org/10.1128/MCB.00773-08>.
- Koh, M.Y., Lemos, R., Jr, Liu, X., and Powis, G. (2011). The Hypoxia-Associated Factor Switches Cells from HIF-1 α - to HIF-2 α -Dependent Signaling Promoting Stem Cell Characteristics, Aggressive Tumor Growth and Invasion. *Cancer Research* 71, 4015–4027. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4142>.
- Kondo, K., Kim, W.Y., Lechpammer, M., and Jr, W.G.K. (2003). Inhibition of HIF2 α Is Sufficient to Suppress pVHL-Defective Tumor Growth. *PLOS Biology* 1, e83. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000083>.
- Korshunov, A., Capper, D., Reuss, D., Schrimpf, D., Ryzhova, M., Hovestadt, V., Sturm, D., Meyer, J., Jones, C., Zheludkova, O., et al. (2016). Histologically distinct neuroepithelial tumors with histone 3 G34 mutation are molecularly similar and comprise a single nosologic entity. *Acta Neuropathol* 131, 137–146. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1493-1>.
- Kronblad, A., Jirström, K., Rydén, L., Nordenskjöld, B., and Landberg, G. (2006). Hypoxia inducible factor-1 α is a prognostic marker in premenopausal patients with intermediate to highly differentiated breast cancer but not a predictive marker for tamoxifen response. *Int J Cancer* 118, 2609–2616. <https://doi.org/10.1002/ijc.21676>.
- Kuczynski, E.A., Patten, S.G., and Coomber, B.L. (2011). VEGFR2 expression and TGF- β signaling in initial and recurrent high-grade human glioma. *Oncology* 81, 126–134. <https://doi.org/10.1159/000332849>.
- Lacoste, N., and Côté, J. (2003). Le code épigénétique des histones. *Med Sci (Paris)* 19, 955–959. <https://doi.org/10.1051/medsci/20031910955>.
- Lafaye, P., Lesuisse, D., and Declèves, X. (2019). Améliorer le ciblage tissulaire des anticorps thérapeutiques par de nouveaux formats - L'exemple de la barrière hémato-encéphalique. *Med Sci (Paris)* 35, 1106–1112. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019223>.
- Lam, D., Enright, H.A., Cadena, J., Peters, S.K.G., Sales, A.P., Osburn, J.J., Soccia, D.A., Kulp, K.S., Wheeler, E.K., and Fischer, N.O. (2019). Tissue-specific extracellular matrix accelerates the formation of neural networks and communities in a neuron-glia co-culture on a multi-electrode array. *Sci Rep* 9, 4159. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40128-1>.
- Lan, F., Qin, Q., Yu, H., and Yue, X. (2019). Effect of glycolysis inhibition by miR-448 on glioma radiosensitivity. *Journal of Neurosurgery* 1, 1–9. <https://doi.org/10.3171/2018.12.JNS181798>.
- Lancaster, M.A., and Knoblich, J.A. (2014). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 9, 2329–2340. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.158>.
- Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurles, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., and Knoblich, J.A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373–379. <https://doi.org/10.1038/nature12517>.
- Land, S.C., and Tee, A.R. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 α is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem* 282, 20534–20543. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611782200>.

Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9, 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.

Larson, J.D., Kasper, L.H., Paugh, B.S., Jin, H., Wu, G., Kwon, C.-H., Fan, Y., Shaw, T.I., Silveira, A.B., Qu, C., et al. (2019). Histone H3.3 K27M Accelerates Spontaneous Brainstem Glioma and Drives Restricted Changes in Bivalent Gene Expression. *Cancer Cell* 35, 140-155.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.11.015>.

Lashford, L.S., Thiesse, P., Jouvett, A., Jaspan, T., Couanet, D., Griffiths, P.D., Doz, F., Ironside, J., Robson, K., Hobson, R., et al. (2002). Temozolomide in malignant gliomas of childhood: a United Kingdom Children's Cancer Study Group and French Society for Pediatric Oncology Intergroup Study. *J Clin Oncol* 20, 4684–4691. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.08.141>.

Laurenti, E., Wilson, A., and Trumpp, A. (2009). Myc's other life: stem cells and beyond. *Curr Opin Cell Biol* 21, 844–854. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.09.006>.

Lebel, C., Gee, M., Camicioli, R., Wieler, M., Martin, W., and Beaulieu, C. (2012). Diffusion tensor imaging of white matter tract evolution over the lifespan. *Neuroimage* 60, 340–352. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.11.094>.

Lee, J.H., Lee, J.E., Kahng, J.Y., Kim, S.H., Park, J.S., Yoon, S.J., Um, J.-Y., Kim, W.K., Lee, J.-K., Park, J., et al. (2018). Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature* 560, 243–247. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0389-3>.

Lee, K., Zhang, H., Qian, D.Z., Rey, S., Liu, J.O., and Semenza, G.L. (2009). Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17910–17915. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909353106>.

Lewis, P.W., Müller, M.M., Koletsky, M.S., Cordero, F., Lin, S., Banaszynski, L.A., Garcia, B.A., Muir, T.W., Becher, O.J., and Allis, C.D. (2013). Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science* 340, 857–861. <https://doi.org/10.1126/science.1232245>.

Li, Z., and Langhans, S.A. (2021). In Vivo and Ex Vivo Pediatric Brain Tumor Models: An Overview. *Frontiers in Oncology* 11. .

Li, G., Liu, J., Guan, Y., and Ji, X. (2021). The role of hypoxia in stem cell regulation of the central nervous system: From embryonic development to adult proliferation. *CNS Neurosci Ther* 27, 1446–1457. <https://doi.org/10.1111/cns.13754>.

Li, P., Zhou, C., Xu, L., and Xiao, H. (2013). Hypoxia Enhances Stemness of Cancer Stem Cells in Glioblastoma: An In Vitro Study. *International Journal of Medical Sciences* 10, 399–407. <https://doi.org/10.7150/ijms.5407>.

Li, X., Wu, C., Chen, N., Gu, H., Yen, A., Cao, L., Wang, E., and Wang, L. (2016). PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget* 7, 33440–33450. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7961>.

Li, Y., Sun, X.-X., Qian, D.Z., and Dai, M.-S. (2020). Molecular Crosstalk Between MYC and HIF in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8. .

Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R.E., et al. (2009a). Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. *Cancer Cell* 15, 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.018>.

Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R.E., et al. (2009b). Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. *Cancer Cell* 15, 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.018>.

Lin, F., de Gooijer, M.C., Hanekamp, D., Chandrasekaran, G., Buil, L.C.M., Thota, N., Sparidans, R.W., Beijnen, J.H., Würdinger, T., and van Tellingen, O. (2017). PI3K-mTOR Pathway Inhibition Exhibits Efficacy Against High-grade Glioma in Clinically Relevant Mouse Models. *Clin Cancer Res* 23, 1286–1298. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1276>.

Lin, Q., Cong, X., and Yun, Z. (2011). Differential hypoxic regulation of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha. *Mol Cancer Res* 9, 757–765. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0053>.

Linkous, A., Balamatsias, D., Snuderl, M., Edwards, L., Miyaguchi, K., Milner, T., Reich, B., Cohen-Gould, L., Storaska, A., Nakayama, Y., et al. (2019). Modeling Patient-Derived Glioblastoma with Cerebral Organoids. *Cell Rep* 26, 3203-3211.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.063>.

Liu, J., Lichtenberg, T., Hoadley, K.A., Poisson, L.M., Lazar, A.J., Cherniack, A.D., Kovatich, A.J., Benz, C.C., Levine, D.A., Lee, A.V., et al. (2018). An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics. *Cell* 173, 400-416.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.052>.

Liu, L., Ning, X., Sun, L., Zhang, H., Shi, Y., Guo, C., Han, S., Liu, J., Sun, S., Han, Z., et al. (2008). Hypoxia-inducible factor-1 alpha contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer. *Cancer Sci* 99, 121–128. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00643.x>.

Loboda*, A., Jozkowicz, A., and Dulak*, and J. (2010). HIF-1 and HIF-2 Transcription Factors - Similar but Not Identical. *Molecules and Cells* 29, 435–442. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0067-2>.

Long, W., Yi, Y., Chen, S., Cao, Q., Zhao, W., and Liu, Q. (2017). Potential New Therapies for Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front Pharmacol* 8, 495. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00495>.

Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131, 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.

Louis, D.N., Wesseling, P., Aldape, K., Brat, D.J., Capper, D., Cree, I.A., Eberhart, C., Figarella-Branger, D., Fouladi, M., Fuller, G.N., et al. (2020). cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathol* 30, 844–856. <https://doi.org/10.1111/bpa.12832>.

Louis, D.N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D.J., Cree, I.A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H.K., Pfister, S.M., Reifenberger, G., et al. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology* 23, 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>.

Lowe, B.R., Maxham, L.A., Hamey, J.J., Wilkins, M.R., and Partridge, J.F. (2019a). Histone H3 Mutations: An Updated View of Their Role in Chromatin Dereglulation and Cancer. *Cancers (Basel)* 11, 660. <https://doi.org/10.3390/cancers11050660>.

Lowe, B.R., Maxham, L.A., Hamey, J.J., Wilkins, M.R., and Partridge, J.F. (2019b). Histone H3 Mutations: An Updated View of Their Role in Chromatin Dereglulation and Cancer. *Cancers (Basel)* 11. <https://doi.org/10.3390/cancers11050660>.

- Lubetzki, C., Sol-Foulon, N., and Desmazières, A. (2020). Nodes of Ranvier during development and repair in the CNS. *Nat Rev Neurol* 16, 426–439. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0375-x>.
- Lundgaard, I., Luzhynskaya, A., Stockley, J.H., Wang, Z., Evans, K.A., Swire, M., Volbracht, K., Gautier, H.O.B., Franklin, R.J.M., Charles Ffrench-Constant, et al. (2013). Neuregulin and BDNF induce a switch to NMDA receptor-dependent myelination by oligodendrocytes. *PLoS Biol* 11, e1001743. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001743>.
- Luo, W., Zhong, J., Chang, R., Hu, H., Pandey, A., and Semenza, G.L. (2010). Hsp70 and CHIP Selectively Mediate Ubiquitination and Degradation of Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 α but Not HIF-2 α . *Journal of Biological Chemistry* 285, 3651–3663. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068577>.
- Lv, D., Yu, S.-C., Ping, Y.-F., Wu, H., Zhao, X., Zhang, H., Cui, Y., Chen, B., Zhang, X., Dai, J., et al. (2016). A three-dimensional collagen scaffold cell culture system for screening anti-glioma therapeutics. *Oncotarget* 7, 56904–56914. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10885>.
- Machanic, P., and Bailey, T.L. (2011). MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics* 27, 1696–1697. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr189>.
- Mackay, A., Burford, A., Carvalho, D., Izquierdo, E., Fazal-Salom, J., Taylor, K.R., Bjerke, L., Clarke, M., Vinci, M., Nandhabalan, M., et al. (2017). Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* 32, 520-537.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.08.017>.
- MacKenzie, D.J. (1926). A Classification of the Tumours of the Glioma Group on a Histogenetic Basis With a Correlated Study of Prognosis. *Can Med Assoc J* 16, 872. .
- Mahon, P.C., Hirota, K., and Semenza, G.L. (2001). FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 15, 2675–2686. <https://doi.org/10.1101/gad.924501>.
- Majumder, P.K., Febbo, P.G., Bikoff, R., Berger, R., Xue, Q., McMahon, L.M., Manola, J., Brugarolas, J., McDonnell, T.J., Golub, T.R., et al. (2004). mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat Med* 10, 594–601. <https://doi.org/10.1038/nm1052>.
- Marmorstein, R. (2001). Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 422–432. <https://doi.org/10.1038/35073047>.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal* 17, 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
- Mashiyama, S., Katakura, R., Takahashi, K., Kitahara, M., Suzuki, J., and Sasaki, T. (1989). [Enhancement of the effect of X-irradiation against cultured human glioblastoma cells by pretreatment with ACNU]. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 29, 1070–1077. <https://doi.org/10.2176/nmc.29.1070>.
- Mehta, G., Hsiao, A.Y., Ingram, M., Luker, G.D., and Takayama, S. (2012). Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release* 164, 192–204. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.045>.
- Mendichovszky, I., and Jackson, A. (2011). Imaging hypoxia in gliomas. *Br J Radiol* 84, S145–S158. <https://doi.org/10.1259/bjr/82292521>.

- Métais, A., and Rousseau, A. (2021). Le diagnostic histo-moléculaire des tumeurs gliales et glioneuronales. *Annales de Pathologie* 41, 137–153. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2020.12.008>.
- Michealraj, K.A., Kumar, S.A., Kim, L.J.Y., Cavalli, F.M.G., Przelicki, D., Wojcik, J.B., Delaidelli, A., Bajic, A., Saulnier, O., MacLeod, G., et al. (2020). Metabolic Regulation of the Epigenome Drives Lethal Infantile Ependymoma. *Cell* 181, 1329–1345.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.047>.
- Miklja, Z., Pasternak, A., Stallard, S., Nicolaidis, T., Kline-Nunnally, C., Cole, B., Beroukhir, R., Bhandopadhyay, P., Chi, S., Ramkissoon, S.H., et al. (2019). Molecular profiling and targeted therapy in pediatric gliomas: review and consensus recommendations. *Neuro-Oncology* 21, 968–980. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz022>.
- Mizobuchi, H., García-Castellano, J.M., Philip, S., Healey, J.H., and Gorlick, R. (2008). Hypoxia markers in human osteosarcoma: an exploratory study. *Clin Orthop Relat Res* 466, 2052–2059. <https://doi.org/10.1007/s11999-008-0328-y>.
- Mohammad, F., Weissmann, S., Leblanc, B., Pandey, D.P., Højfeldt, J.W., Comet, I., Zheng, C., Johansen, J.V., Rapin, N., Porse, B.T., et al. (2017). EZH2 is a potential therapeutic target for H3K27M-mutant pediatric gliomas. *Nat Med* 23, 483–492. <https://doi.org/10.1038/nm.4293>.
- Mohlin, S., Hamidian, A., von Stedingk, K., Bridges, E., Wigerup, C., Bexell, D., and Pählman, S. (2015). PI3K-mTORC2 but not PI3K-mTORC1 regulates transcription of HIF2A/EPAS1 and vascularization in neuroblastoma. *Cancer Res* 75, 4617–4628. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0708>.
- Monje, M. (2020). Synaptic Communication in Brain Cancer. *Cancer Res* 80, 2979–2982. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0646>.
- Monje, M., Mitra, S.S., Freret, M.E., Raveh, T.B., Kim, J., Masek, M., Attema, J.L., Li, G., Haddix, T., Edwards, M.S.B., et al. (2011). Hedgehog-responsive candidate cell of origin for diffuse intrinsic pontine glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4453–4458. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101657108>.
- Monje, M., Borniger, J.C., D’Silva, N., Deneen, B., Dirks, P.B., Fattahi, F., Frenette, P.S., Garzia, L., Gutmann, D.H., Hanahan, D., et al. (2020). Roadmap for the Emerging Field of Cancer Neuroscience. *Cell* 181, 219–222. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.034>.
- Monteiro, A.R., Hill, R., Pilkington, G.J., and Madureira, P.A. (2017). The Role of Hypoxia in Glioblastoma Invasion. *Cells* 6. <https://doi.org/10.3390/cells6040045>.
- Moore, D.D. (2001). Commonly used reagents and equipment. *Curr Protoc Mol Biol Appendix 2, Appendix 2*. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mba02s35>.
- Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., and Azab, A.K. (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)* 3, 83–92. <https://doi.org/10.2147/HP.S93413>.
- Narayana, A., Kunnakkat, S., Chacko-Mathew, J., Gardner, S., Karajannis, M., Raza, S., Wisoff, J., Weiner, H., Harter, D., and Allen, J. (2010). Bevacizumab in recurrent high-grade pediatric gliomas†. *Neuro-Oncology* 12, 985–990. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noq033>.
- Nauta, T.D., van den Broek, M., Gibbs, S., van der Pouw-Kraan, T.C.T.M., Oudejans, C.B., van Hinsbergh, V.W.M., and Koolwijk, P. (2017). Identification of HIF-2 α -regulated genes that play a role in human microvascular endothelial sprouting during prolonged hypoxia in vitro. *Angiogenesis* 20, 39–54. <https://doi.org/10.1007/s10456-016-9527-4>.

- Nayak, B.K., Feliars, D., Sudarshan, S., Friedrichs, W.E., Day, R.T., New, D.D., Fitzgerald, J.P., Eid, A., DeNapoli, T., Parekh, D.J., et al. (2013). Stabilization of HIF-2 α through redox regulation of mTORC2 activation and initiation of mRNA translation. *Oncogene* 32, 3147–3155. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.333>.
- Nguyen, A., Moussallieh, F.M., Mackay, A., Cicek, A.E., Coca, A., Chenard, M.P., Weingertner, N., Lhermitte, B., Letouzé, E., Guérin, E., et al. (2017). Characterization of the transcriptional and metabolic responses of pediatric high grade gliomas to mTOR-HIF-1 α axis inhibition. *Oncotarget* 8, 71597–71617. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16500>.
- Obermeier, B., Daneman, R., and Ransohoff, R.M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med* 19, 1584–1596. <https://doi.org/10.1038/nm.3407>.
- Ogawa, J., Pao, G.M., Shokhirev, M.N., and Verma, I.M. (2018). Glioblastoma Model Using Human Cerebral Organoids. *Cell Rep* 23, 1220–1229. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.105>.
- Olins, D.E., and Olins, A.L. (2003). Chromatin history: our view from the bridge. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 809–814. <https://doi.org/10.1038/nrm1225>.
- Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010). TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001008. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001008>.
- Ortiz-Prado, E., Dunn, J.F., Vasconez, J., Castillo, D., and Viscor, G. (2019). Partial pressure of oxygen in the human body: a general review. *Am J Blood Res* 9, 1–14. .
- Osaki, T., Sivathanu, V., and Kamm, R.D. (2018). Engineered 3D vascular and neuronal networks in a microfluidic platform. *Sci Rep* 8, 5168. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23512-1>.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Liao, P., Rouse, C., Chen, Y., Dowling, J., Wolinsky, Y., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J. (2014). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro Oncol* 16, iv1–iv63. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou223>.
- Panatier, A., and Robitaille, R. (2012). L'astrocyte, un partenaire clé des neurones au cours de la transmission synaptique de base. *Med Sci (Paris)* 28, 582–584. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012286009>.
- Pandey, N., and Black, B.E. (2021). Rapid Detection and Signaling of DNA Damage by PARP-1. *Trends in Biochemical Sciences* 46, 744–757. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.014>.
- Pasqual, E., Castaño-Vinyals, G., Thierry-Chef, I., Kojimahara, N., Sim, M.R., Kundi, M., Krewski, D., Momoli, F., Lacour, B., Remen, T., et al. (2020). Exposure to Medical Radiation during Fetal Life, Childhood and Adolescence and Risk of Brain Tumor in Young Age: Results from The MOBI-Kids Case-Control Study. *Neuroepidemiology* 54, 343–355. <https://doi.org/10.1159/000506131>.
- Paugh, B.S., Qu, C., Jones, C., Liu, Z., Adamowicz-Brice, M., Zhang, J., Bax, D.A., Coyle, B., Barrow, J., Hargrave, D., et al. (2010). Integrated Molecular Genetic Profiling of Pediatric High-Grade Gliomas Reveals Key Differences With the Adult Disease. *JCO* 28, 3061–3068. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.7252>.
- Pećina-Šlaus, N., Kafka, A., Salamon, I., and Bukovac, A. (2020). Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences* 7. .

- Pedersen, H., Schmiegelow, K., and Hamerlik, P. (2020). Radio-Resistance and DNA Repair in Pediatric Diffuse Midline Gliomas. *Cancers* 12, 2813. <https://doi.org/10.3390/cancers12102813>.
- Pencreach, E., Guérin, E., Nicolet, C., Lelong-Rebel, I., Voegeli, A.-C., Oudet, P., Larsen, A.K., Gaub, M.-P., and Guenot, D. (2009). Marked activity of irinotecan and rapamycin combination toward colon cancer cells in vivo and in vitro is mediated through cooperative modulation of the mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor-1alpha axis. *Clin Cancer Res* 15, 1297–1307. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0889>.
- Persson, C.U., von Stedingk, K., Fredlund, E., Bexell, D., Pålman, S., Wigerup, C., and Mohlin, S. (2020). ARNT-dependent HIF-2 transcriptional activity is not sufficient to regulate downstream target genes in neuroblastoma. *Experimental Cell Research* 111845. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111845>.
- Petroff, O.A.C. (2002). GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist* 8, 562–573. <https://doi.org/10.1177/1073858402238515>.
- Pierrevelcin, M., Fuchs, Q., Lhermitte, B., Messé, M., Guérin, E., Weingertner, N., Martin, S., Lelong-Rebel, I., Nazon, C., Dontenwill, M., et al. (2020). Focus on Hypoxia-Related Pathways in Pediatric Osteosarcomas and Their Druggability. *Cells* 9, E1998. <https://doi.org/10.3390/cells9091998>.
- Platt, S.R. (2007). The role of glutamate in central nervous system health and disease--a review. *Vet J* 173, 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.11.007>.
- Plessier, A., Le Dret, L., Varlet, P., Beccaria, K., Lacombe, J., Mériaux, S., Geffroy, F., Fiette, L., Flamant, P., Chrétien, F., et al. (2017). New in vivo avatars of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) from stereotactic biopsies performed at diagnosis. *Oncotarget* 8, 52543–52559. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15002>.
- Prabhu, V.V., Morrow, S., Rahman Kawakibi, A., Zhou, L., Ralff, M., Ray, J., Jhaveri, A., Ferrarini, I., Lee, Y., Parker, C., et al. (2020). ONC201 and imipridones: Anti-cancer compounds with clinical efficacy. *Neoplasia* 22, 725–744. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.09.005>.
- Preston, D.L., Ron, E., Yonehara, S., Kobuke, T., Fujii, H., Kishikawa, M., Tokunaga, M., Tokuoka, S., and Mabuchi, K. (2002). Tumors of the nervous system and pituitary gland associated with atomic bomb radiation exposure. *J Natl Cancer Inst* 94, 1555–1563. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.20.1555>.
- Puget, S., Blauwblomme, T., and Grill, J. (2012a). Is Biopsy Safe in Children with Newly Diagnosed Diffuse Intrinsic Pontine Glioma? *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 629–633. https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2012.32.59.
- Puget, S., Philippe, C., Bax, D.A., Job, B., Varlet, P., Junier, M.-P., Andreiuolo, F., Carvalho, D., Reis, R., Guerrini-Rousseau, L., et al. (2012b). Mesenchymal transition and PDGFRA amplification/mutation are key distinct oncogenic events in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *PLoS One* 7, e30313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030313>.
- Puget, S., Beccaria, K., Blauwblomme, T., Roujeau, T., James, S., Grill, J., Zerah, M., Varlet, P., and Sainte-Rose, C. (2015). Biopsy in a series of 130 pediatric diffuse intrinsic Pontine gliomas. *Childs Nerv Syst* 31, 1773–1780. <https://doi.org/10.1007/s00381-015-2832-1>.
- Purkait, S., Jha, P., Sharma, M.C., Suri, V., Sharma, M., Kale, S.S., and Sarkar, C. (2013). CDKN2A deletion in pediatric versus adult glioblastomas and predictive value of p16 immunohistochemistry. *Neuropathology* 33, 405–412. <https://doi.org/10.1111/neup.12014>.

- Quinlan, A.R., and Hall, I.M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26, 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>.
- Rajshekhar, V., and Moorthy, R.K. (2010). Status of Stereotactic Biopsy in Children with Brain Stem Masses: Insights from a Series of 106 Patients. *SFN* 88, 360–366. <https://doi.org/10.1159/000319044>.
- Rakotomalala, A., Bailleul, Q., Savary, C., Arcicasa, M., Hamadou, M., Huchedé, P., Hochart, A., Restouin, A., Castellano, R., Collette, Y., et al. (2021). H3.3K27M Mutation Controls Cell Growth and Resistance to Therapies in Pediatric Glioma Cell Lines. *Cancers* 13, 5551. <https://doi.org/10.3390/cancers13215551>.
- Ramachandran, A., Mehić, M., Wasim, L., Malinova, D., Gori, I., Blaszczyk, B.K., Carvalho, D.M., Shore, E.M., Jones, C., Hyvönen, M., et al. (2021). Pathogenic ACVR1R206H activation by Activin A-induced receptor clustering and autophosphorylation. *EMBO J* 40, e106317. <https://doi.org/10.15252/emj.2020106317>.
- Ramírez, F., Ryan, D.P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A.S., Heyne, S., Dündar, F., and Manke, T. (2016). deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research* 44, W160–W165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw257>.
- Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Scudiero, D.A., Selby, M., Sausville, E.A., Shoemaker, R.H., and Melillo, G. (2002). Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res* 62, 4316–4324. .
- Ratcliffe, P.J. (2007). HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J. Clin. Invest.* 117, 862–865. <https://doi.org/10.1172/JCI31750>.
- Renfrow, J.J., Soike, M.H., Debinski, W., Ramkissoon, S.H., Mott, R.T., Frenkel, M.B., Sarkaria, J.N., Lesser, G.J., and Strowd, R.E. (2018). Hypoxia-inducible factor 2 α : a novel target in gliomas. *Future Med Chem* 10, 2227–2236. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0163>.
- Renfrow, J.J., Soike, M.H., West, J.L., Ramkissoon, S.H., Metheny-Barlow, L., Mott, R.T., Kittel, C.A., D’Agostino, R.B., Tatter, S.B., Laxton, A.W., et al. (2020). Attenuating hypoxia driven malignant behavior in glioblastoma with a novel hypoxia-inducible factor 2 alpha inhibitor. *Scientific Reports* 10, 15195. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72290-2>.
- Reuss, D.E., Kratz, A., Sahm, F., Capper, D., Schrimpf, D., Koelsche, C., Hovestadt, V., Bewerunge-Hudler, M., Jones, D.T.W., Schittenhelm, J., et al. (2015a). Adult IDH wild type astrocytomas biologically and clinically resolve into other tumor entities. *Acta Neuropathol* 130, 407–417. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1454-8>.
- Reuss, D.E., Mamatjan, Y., Schrimpf, D., Capper, D., Hovestadt, V., Kratz, A., Sahm, F., Koelsche, C., Korshunov, A., Olar, A., et al. (2015b). IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol* 129, 867–873. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1438-8>.
- Rofstad, E.K., Gaustad, J.-V., Egeland, T.A.M., Mathiesen, B., and Galappathi, K. (2010). Tumors exposed to acute cyclic hypoxic stress show enhanced angiogenesis, perfusion and metastatic dissemination. *Int J Cancer* 127, 1535–1546. <https://doi.org/10.1002/ijc.25176>.
- Rong, Y., Durden, D.L., Meir, E.G.V., and Brat, D.J. (2006a). FPseudopalisading` Necrosis in Glioblastoma: A Familiar Morphologic Feature That Links Vascular Pathology, Hypoxia, and Angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 11. .

Rong, Y., Durden, D.L., Van Meir, E.G., and Brat, D.J. (2006b). 'Pseudopalisading' Necrosis in Glioblastoma: A Familiar Morphologic Feature That Links Vascular Pathology, Hypoxia, and Angiogenesis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 65, 529–539. <https://doi.org/10.1097/00005072-200606000-00001>.

Ruiz-Garcia, H., Alvarado-Estrada, K., Schiapparelli, P., Quinones-Hinojosa, A., and Trifiletti, D.M. (2020). Engineering Three-Dimensional Tumor Models to Study Glioma Cancer Stem Cells and Tumor Microenvironment. *Front Cell Neurosci* 14, 558381. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.558381>.

Sances, S., Ho, R., Vatine, G., West, D., Laperle, A., Meyer, A., Godoy, M., Kay, P.S., Mandefro, B., Hatata, S., et al. (2018). Human iPSC-Derived Endothelial Cells and Microengineered Organ-Chip Enhance Neuronal Development. *Stem Cell Reports* 10, 1222–1236. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.02.012>.

Scheuermann, T.H., Li, Q., Ma, H.-W., Key, J., Zhang, L., Chen, R., Garcia, J.A., Naidoo, J., Longgood, J., Frantz, D.E., et al. (2013a). Allosteric inhibition of hypoxia inducible factor-2 with small molecules. *Nat Chem Biol* 9, 271–276. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1185>.

Scheuermann, T.H., Li, Q., Ma, H.-W., Key, J., Zhang, L., Chen, R., Garcia, J.A., Naidoo, J., Longgood, J., Frantz, D.E., et al. (2013b). Allosteric Inhibition of Hypoxia Inducible Factor-2 with Small Molecules. *Nat Chem Biol* 9, 271–276. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1185>.

Scheuermann, T.H., Stroud, D., Sleet, C.E., Bayeh, L., Shokri, C., Wang, H., Caldwell, C.G., Longgood, J., MacMillan, J.B., Bruick, R.K., et al. (2015). Isoform-Selective and Stereoselective Inhibition of Hypoxia Inducible Factor-2. *J. Med. Chem.* 58, 5930–5941. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00529>.

Schwartzentruber, J. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. 8. .

Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.-Y., Jones, D.T.W., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A.M., Quang, D.-A.K., Tönjes, M., et al. (2012a). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 482, 226–231. <https://doi.org/10.1038/nature10833>.

Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.-Y., Jones, D.T.W., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A.M., Quang, D.-A.K., Tönjes, M., et al. (2012b). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 482, 226–231. <https://doi.org/10.1038/nature10833>.

Sears, S.M., and Hewett, S.J. (2021). Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance. *Exp Biol Med (Maywood)* 246, 1069–1083. <https://doi.org/10.1177/1535370221989263>.

Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721–732. <https://doi.org/10.1038/nrc1187>.

Semenza, G.L. (2013a). HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest* 123, 3664–3671. <https://doi.org/10.1172/JCI67230>.

Semenza, G.L. (2013b). Cancer-stromal cell interactions mediated by hypoxia-inducible factors promote angiogenesis, lymphangiogenesis, and metastasis. *Oncogene* 32, 4057–4063. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.578>.

Semenza, G.L., and Wang, G.L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12, 5447–5454. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.12.5447-5454.1992>.

Syedmirzaei, H., Shobeiri, P., Turgut, M., Hanaei, S., and Rezaei, N. (2021). VEGF levels in patients with glioma: a systematic review and meta-analysis. *Reviews in the Neurosciences* 32, 191–202. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2020-0062>.

Sievers, P., Sill, M., Schimpf, D., Stichel, D., Reuss, D.E., Sturm, D., Hench, J., Frank, S., Krskova, L., Vicha, A., et al. (2021). A subset of pediatric-type thalamic gliomas share a distinct DNA methylation profile, H3K27me3 loss and frequent alteration of EGFR. *Neuro Oncol* 23, 34–43. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa251>.

Sim, J., Cowburn, A.S., Palazon, A., Madhu, B., Tyrakis, P.A., Macías, D., Bargiela, D.M., Pietsch, S., Gralla, M., Evans, C.E., et al. (2018). The Factor Inhibiting HIF Asparaginyl Hydroxylase Regulates Oxidative Metabolism and Accelerates Metabolic Adaptation to Hypoxia. *Cell Metabolism* 27, 898–913.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.020>.

Simons, M., and Nave, K.-A. (2016). Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, a020479. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020479>.

Singh, A.M., and Dalton, S. (2009). THE CELL CYCLE AND MYC INTERSECT WITH MECHANISMS FOR PLURIPOTENCY AND REPROGRAMMING. *Cell Stem Cell* 5, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.07.003>.

Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63, 5821–5828. .

Skuli, N., Monferran, S., Delmas, C., Favre, G., Bonnet, J., Toulas, C., and Moyal, E.C.-J. (2009). $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ Integrins-FAK-RhoB: A Novel Pathway for Hypoxia Regulation in Glioblastoma. *Cancer Res* 69, 3308–3316. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2158>.

Smith, L.H., and DeMyer, W.E. (2003). Anatomy of the brainstem. *Seminars in Pediatric Neurology* 10, 235–240. [https://doi.org/10.1016/S1071-9091\(03\)00076-7](https://doi.org/10.1016/S1071-9091(03)00076-7).

Solomon, D.A., Wood, M.D., Tihan, T., Bollen, A.W., Gupta, N., Phillips, J.J.J., and Perry, A. (2015). Diffuse Midline Gliomas with Histone H3-K27M Mutation: A Series of 47 Cases Assessing the Spectrum of Morphologic Variation and Associated Genetic Alterations. *Brain Pathol* 26, 569–580. <https://doi.org/10.1111/bpa.12336>.

Song, I., and Dityatev, A. (2018). Crosstalk between glia, extracellular matrix and neurons. *Brain Res Bull* 136, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.03.003>.

Sood, D., Tang-Schomer, M., Pouli, D., Mizzoni, C., Raia, N., Tai, A., Arkun, K., Wu, J., Black, L.D., Scheffler, B., et al. (2019). 3D extracellular matrix microenvironment in bioengineered tissue models of primary pediatric and adult brain tumors. *Nat Commun* 10, 4529. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12420-1>.

Sourty, B., and Rousseau, A. (2020). Prédilection héréditaire aux tumeurs des systèmes nerveux central et périphérique. *Annales de Pathologie* 40, 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2020.02.019>.

- Srikanthan, D., Taccone, M.S., Van Ommeren, R., Ishida, J., Krumholtz, S.L., and Rutka, J.T. (2021a). Diffuse intrinsic pontine glioma: current insights and future directions. *Chinese Neurosurgical Journal* 7, 6. <https://doi.org/10.1186/s41016-020-00218-w>.
- Srikanthan, D., Taccone, M.S., Van Ommeren, R., Ishida, J., Krumholtz, S.L., and Rutka, J.T. (2021b). Diffuse intrinsic pontine glioma: current insights and future directions. *Chinese Neurosurgical Journal* 7, 6. <https://doi.org/10.1186/s41016-020-00218-w>.
- Sturm, D., Bender, S., Jones, D.T.W., Lichter, P., Grill, J., Becher, O., Hawkins, C., Majewski, J., Jones, C., Costello, J.F., et al. (2014a). Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer* 14, 92–107. <https://doi.org/10.1038/nrc3655>.
- Sturm, D., Bender, S., Jones, D.T.W., Lichter, P., Grill, J., Becher, O., Hawkins, C., Majewski, J., Jones, C., Costello, J.F., et al. (2014b). Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer* 14, 92–107. <https://doi.org/10.1038/nrc3655>.
- Sturm, D., Pfister, S.M., and Jones, D.T.W. (2017). Pediatric Gliomas: Current Concepts on Diagnosis, Biology, and Clinical Management. *Journal of Clinical Oncology* <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.73.0242>.
- Sufit, A., Donson, A.M., Birks, D.K., Knipstein, J.A., Fenton, L.Z., Jedlicka, P., Hankinson, T.C., Handler, M.H., and Foreman, N.K. (2012). Diffuse intrinsic pontine tumors: a study of primitive neuroectodermal tumors versus the more common diffuse intrinsic pontine gliomas: Laboratory investigation. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* 10, 81–88. <https://doi.org/10.3171/2012.3.PEDS11316>.
- Sun, C., Fu, J., Qu, Z., Li, D., Si, P., Qiao, Q., Zhang, W., Xue, Y., Zhen, J., and Wang, W. (2019). Chronic mild hypoxia promotes hippocampal neurogenesis involving Notch1 signaling in epileptic rats. *Brain Res* 1714, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.02.011>.
- Sun, Y., Bailey, C.P., Sadighi, Z., Zaky, W., and Chandra, J. (2020a). Pediatric high-grade glioma: aberrant epigenetics and kinase signaling define emerging therapeutic opportunities. *J Neurooncol* 150, 17–26. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03546-0>.
- Sun, Z., Zhang, Y., Jia, J., Fang, Y., Tang, Y., Wu, H., and Fang, D. (2020b). H3K36me3, message from chromatin to DNA damage repair. *Cell & Bioscience* 10, 9. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-0374-Z>.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Swartling, F.J., Savov, V., Persson, A.I., Chen, J., Hackett, C.S., Northcott, P.A., Grimmer, M.R., Lau, J., Chesler, L., Perry, A., et al. (2012). Distinct Neural Stem Cell Populations Give Rise to Disparate Brain Tumors in Response to N-MYC. *Cancer Cell* 21, 601–613. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.012>.
- Takeshita, I., Takaki, T., Kuramitsu, M., Nagasaka, S., Machi, T., Ogawa, H., Egami, H., Mannoji, H., Fukui, M., and Kitamura, K. (1987). Characteristics of an established human glioma cell line, KNS-42. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 27, 581–587. <https://doi.org/10.2176/nmc.27.581>.
- Tang, N., Wang, L., Esko, J., Giordano, F.J., Huang, Y., Gerber, H.-P., Ferrara, N., and Johnson, R.S. (2004). Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell* 6, 485–495. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.026>.

- Tang-Schomer, M.D., Chandok, H., Wu, W.-B., Lau, C.C., Bookland, M.J., and George, J. (2022). 3D patient-derived tumor models to recapitulate pediatric brain tumors In Vitro. *Translational Oncology* 20, 101407. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101407>.
- Taylor, K.R., Mackay, A., Truffaux, N., Butterfield, Y.S., Morozova, O., Philippe, C., Castel, D., Grasso, C.S., Vinci, M., Carvalho, D., et al. (2014). Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Genet* 46, 457–461. <https://doi.org/10.1038/ng.2925>.
- Thirant, C., Bessette, B., Varlet, P., Puget, S., Cadusseau, J., Tavares, S.D.R., Studler, J.-M., Silvestre, D.C., Susini, A., Villa, C., et al. (2011). Clinical Relevance of Tumor Cells with Stem-Like Properties in Pediatric Brain Tumors. *PLOS ONE* 6, e16375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016375>.
- Thomas, G.V., Tran, C., Mellinghoff, I.K., Welsbie, D.S., Chan, E., Fueger, B., Czernin, J., and Sawyers, C.L. (2006). Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat Med* 12, 122–127. <https://doi.org/10.1038/nm1337>.
- Thomlinson, R.H., and Gray, L.H. (1955). The Histological Structure of Some Human Lung Cancers and the Possible Implications for Radiotherapy. *Br J Cancer* 9, 539–549. .
- Tian, H., McKnight, S.L., and Russell, D.W. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11, 72–82. <https://doi.org/10.1101/gad.11.1.72>.
- Toda, T., Parylak, S., Linker, S.B., and Gage, F.H. (2019). The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. *Mol Psychiatry* 24, 67–87. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0036-2>.
- Toschi, A., Lee, E., Gadir, N., Ohh, M., and Foster, D.A. (2008). Differential Dependence of Hypoxia-inducible Factors 1 α and 2 α on mTORC1 and mTORC2 *. *Journal of Biological Chemistry* 283, 34495–34499. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800170200>.
- Tsoli, M., Liu, J., Franshaw, L., Shen, H., Cheng, C., Jung, M., Joshi, S., Ehteda, A., Khan, A., Montero-Carcabosso, A., et al. (2018). Dual targeting of mitochondrial function and mTOR pathway as a therapeutic strategy for diffuse intrinsic pontine glioma. *Oncotarget* 9, 7541–7556. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24045>.
- Tung, Y.-C., Hsiao, A.Y., Allen, S.G., Torisawa, Y., Ho, M., and Takayama, S. (2011). High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* 136, 473–478. <https://doi.org/10.1039/c0an00609b>.
- Tuveson, D., and Clevers, H. (2019). Cancer modeling meets human organoid technology. *Science* 364, 952–955. <https://doi.org/10.1126/science.aaw6985>.
- Um, J.H., Kang, C.D., Bae, J.H., Shin, G.G., Kim, D.W., Kim, D.W., Chung, B.S., and Kim, S.H. (2004). Association of DNA-dependent protein kinase with hypoxia inducible factor-1 and its implication in resistance to anticancer drugs in hypoxic tumor cells. *Exp Mol Med* 36, 233–242. <https://doi.org/10.1038/emm.2004.32>.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324, 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>.

- Venkatesh, H.S., Johung, T.B., Caretti, V., Noll, A., Tang, Y., Nagaraja, S., Gibson, E.M., Mount, C.W., Polepalli, J., Mitra, S.S., et al. (2015a). Neuronal Activity Promotes Glioma Growth through Neuroligin-3 Secretion. *Cell* 161, 803–816. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.012>.
- Venkatesh, H.S., Johung, T.B., Caretti, V., Noll, A., Tang, Y., Nagaraja, S., Gibson, E.M., Mount, C.W., Polepalli, J., Mitra, S.S., et al. (2015b). Neuronal Activity Promotes Glioma Growth through Neuroligin-3 Secretion. *Cell* 161, 803–816. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.012>.
- Venkatesh, H.S., Tam, L.T., Woo, P.J., Lennon, J., Nagaraja, S., Gillespie, S.M., Ni, J., Dubeau, D.Y., Morris, P.J., Zhao, J.J., et al. (2017). Targeting neuronal activity-regulated neuroligin-3 dependency in high-grade glioma. *Nature* 549, 533–537. <https://doi.org/10.1038/nature24014>.
- Venkatesh, H.S., Morishita, W., Geraghty, A.C., Silverbush, D., Gillespie, S.M., Arzt, M., Tam, L.T., Espenel, C., Ponnuswami, A., Ni, L., et al. (2019). Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature* 573, 539–545. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1563-y>.
- Waker, C., Shahin, M., Kamian, A., Lober, Z., and Lober, R. (2017). DIPG-30. DIFFERENTIAL HYPOXIC RESPONSE IN HUMAN DIPG CELL LINES. *Neuro Oncol* 19, iv11. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox083.045>.
- Wallace, E. (2016). PT2385: HIF-2 α Antagonist for the Treatment of VHL Mutant ccRCC. 5. .
- Wallace, E.M., Rizzi, J.P., Han, G., Wehn, P.M., Cao, Z., Du, X., Cheng, T., Czerwinski, R.M., Dixon, D.D., Goggin, B.S., et al. (2016). A Small-Molecule Antagonist of HIF2 α Is Efficacious in Preclinical Models of Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 76, 5491–5500. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0473>.
- Wang, C., Tong, X., and Yang, F. (2014). Bioengineered 3D brain tumor model to elucidate the effects of matrix stiffness on glioblastoma cell behavior using PEG-based hydrogels. *Mol Pharm* 11, 2115–2125. <https://doi.org/10.1021/mp5000828>.
- Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269–270. .
- Webster, H. deF, and Aström, K.E. (2009). Gliogenesis: historical perspectives, 1839-1985. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 202, 1–109. .
- Weiswald, L.-B., Bellet, D., and Dangles-Marie, V. (2015). Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* 17, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004>.
- Welby, J.P., Kaptzan, T., Wohl, A., Peterson, T.E., Raghunathan, A., Brown, D.A., Gupta, S.K., Zhang, L., and Daniels, D.J. (2019). Current Murine Models and New Developments in H3K27M Diffuse Midline Gliomas. *Front Oncol* 9, 92. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00092>.
- Werbrouck, C., Evangelista, C.C.S., Lobón-Iglesias, M.-J., Barret, E., Le Teuff, G., Merlevede, J., Brusini, R., Kergrohen, T., Mondini, M., Bolle, S., et al. (2019). TP53 Pathway Alterations Drive Radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG). *Clin Cancer Res* 25, 6788–6800. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0126>.
- Wider, G., and Dreier, L. (2006). Measuring Protein Concentrations by NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 2571–2576. <https://doi.org/10.1021/ja055336t>.
- Wiese, M., Schill, F., Sturm, D., Pfister, S., Hulleman, E., Johnsen, S.A., and Kramm, C.M. (2016). No Significant Cytotoxic Effect of the EZH2 Inhibitor Tazemetostat (EPZ-6438) on Pediatric Glioma Cells

with Wildtype Histone 3 or Mutated Histone 3.3. *Klin Padiatr* 228, 113–117. <https://doi.org/10.1055/s-0042-105292>.

Wigerup, C., Pålman, S., and Bexell, D. (2016). Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacology & Therapeutics* 164, 152–169. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.009>.

Wolkenstein, P. (2001). La neurofibromatose 1. *Med Sci (Paris)* 17, 1158–1167. <https://doi.org/10.1051/medsci/200117111158>.

Worthington, P., Drake, K.M., Li, Z., Napper, A.D., Pochan, D.J., and Langhans, S.A. (2017). Beta-hairpin hydrogels as scaffolds for high-throughput drug discovery in three-dimensional cell culture. *Anal Biochem* 535, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.024>.

Wu, G., Broniscer, A., McEachron, T.A., Lu, C., Paugh, B.S., Becksfors, J., Qu, C., Ding, L., Huether, R., Parker, M., et al. (2012). Somatic Histone H3 Alterations in Paediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas and Non-Brainstem Glioblastomas. *Nat Genet* 44, 251–253. <https://doi.org/10.1038/ng.1102>.

Wu, G., Diaz, A.K., Paugh, B.S., Rankin, S.L., Ju, B., Li, Y., Zhu, X., Qu, C., Chen, X., Zhang, J., et al. (2014). The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet* 46, 444–450. <https://doi.org/10.1038/ng.2938>.

Xu, H., Rahimpour, S., Nesvick, C.L., Zhang, X., Ma, J., Zhang, M., Zhang, G., Wang, L., Yang, C., Hong, C.S., et al. (2015a). Activation of hypoxia signaling induces phenotypic transformation of glioma cells: implications for bevacizumab antiangiogenic therapy. *Oncotarget* 6. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3592>.

Xu, H., Li, Z., Yu, Y., Sizardkhani, S., Ho, W.S., Yin, F., Wang, L., Zhu, G., Zhang, M., Jiang, L., et al. (2016). A dynamic in vivo-like organotypic blood-brain barrier model to probe metastatic brain tumors. *Sci Rep* 6, 36670. <https://doi.org/10.1038/srep36670>.

Xu, J., Margol, A., Asgharzadeh, S., and Erdreich-Epstein, A. (2015b). Pediatric Brain Tumor Cell Lines. *Journal of Cellular Biochemistry* 116, 218–224. <https://doi.org/10.1002/jcb.24976>.

Xu, R., Wang, K., Rizzi, J.P., Huang, H., Grina, J.A., Schlachter, S.T., Wang, B., Wehn, P.M., Yang, H., Dixon, D.D., et al. (2019). 3-[(1S,2S,3R)-2,3-Difluoro-1-hydroxy-7-methylsulfonylindan-4-yl]oxy-5-fluorobenzonitrile (PT2977), a Hypoxia-Inducible Factor 2 α (HIF-2 α) Inhibitor for the Treatment of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J. Med. Chem.* 62, 6876–6893. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00719>.

Yang, B., Ren, B.X., and Tang, F.R. (2017). Prenatal irradiation-induced brain neuropathology and cognitive impairment. *Brain and Development* 39, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2016.07.008>.

Yeom, K.W., Lober, R.M., Nelson, M.D., Panigrahy, A., and Blüml, S. (2015). Citrate concentrations increase with hypoperfusion in pediatric diffuse intrinsic pontine glioma. *J Neurooncol* 122, 383–389. <https://doi.org/10.1007/s11060-015-1726-0>.

Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y., and He, Q.-Y. (2012). clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* 16, 284–287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>.

Zhang, C., Liu, J., Wang, J., Zhang, T., Xu, D., Hu, W., and Feng, Z. (2021). The Interplay Between Tumor Suppressor p53 and Hypoxia Signaling Pathways in Cancer. *Front Cell Dev Biol* 9, 648808. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.648808>.

Zhao, C., Deng, W., and Gage, F.H. (2008). Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell* 132, 645–660. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033>.

Zhou, B., Zuo, Y.-X., and Jiang, R.-T. (2019). Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci Ther* 25, 665–673. <https://doi.org/10.1111/cns.13123>.

Zhou, Y.-H., Hess, K.R., Liu, L., Linskey, Mark.E., and Yung, W.K.A. (2005). Modeling prognosis for patients with malignant astrocytic gliomas: Quantifying the expression of multiple genetic markers and clinical variables. *Neuro Oncol* 7, 485–494. <https://doi.org/10.1215/S1152851704000730>.

Zhu, H., Chen, X.P., Luo, S.F., Guan, J., Zhang, W.G., and Zhang, B.X. (2005). Involvement of hypoxia-inducible factor-1-alpha in multidrug resistance induced by hypoxia in HepG2 cells. *J Exp Clin Cancer Res* 24, 565–574. .

Zitzmann, K., Rüden, J. von, Brand, S., Göke, B., Lichtl, J., Spöttl, G., and Auernhammer, C.J. (2010). Compensatory activation of Akt in response to mTOR and Raf inhibitors - a rationale for dual-targeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease. *Cancer Lett* 295, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.02.018>.

Zlotecki, R.A., Baxter, L.T., Boucher, Y., and Jain, R.K. (1995). Pharmacologic modification of tumor blood flow and interstitial fluid pressure in a human tumor xenograft: network analysis and mechanistic interpretation. *Microvasc Res* 50, 429–443. <https://doi.org/10.1006/mvre.1995.1069>.

Zong, H., Parada, L.F., and Baker, S.J. (2015). Cell of Origin for Malignant Gliomas and Its Implication in Therapeutic Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020610. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020610>.

ANNEXES

Article scientifique publié dans *Cancers*

Hypoxic Environment and Paired Hierarchical 3D and 2D Models of Pediatric H3.3-Mutated Gliomas Recreate the Patient Tumor Complexity

Ce travail a consisté à caractériser les PDCLs qui ont ensuite été utilisées dans le cadre de cette thèse, à savoir les lignées BT35, BT68, BT69 et BT83. Elles ont été notamment développées sous des formes adhérentes (MNL) et de neurosphères (NS), mimant des états plus ou moins différenciés des cellules. Différents aspects ont été explorés tels que leurs capacités prolifératives, migratoires, leur clonogénicité, leurs profils d'expressions géniques ou encore leurs profils métaboliques.

Lors de mon arrivée au laboratoire, j'ai pu contribuer à la caractérisation de ces lignées en effectuant notamment des tests de sensibilités au Témzolomide (TMZ) et en développant des premières approches de cocultures entre les formes MNL et NS des lignées.

Article

Hypoxic Environment and Paired Hierarchical 3D and 2D Models of Pediatric *H3.3*-Mutated Gliomas Recreate the Patient Tumor Complexity

Anne-Florence Blandin ^{1,*}, Aurélie Durand ¹, Marie Litzler ¹, Aurélien Tripp ¹, Éric Guérin ¹ , Elisa Ruhland ², Adeline Obrecht ³, Céline Keime ⁴, Quentin Fuchs ⁵, Damien Reita ^{1,5} , Benoit Lhermitte ^{5,6,7}, Andres Coca ⁸, Chris Jones ⁹, Isabelle Lelong Rebel ⁵, Pascal Villa ³ , Izzie Jacques Namer ³, Monique Dontenwill ⁵, Dominique Guenot ¹  and Natacha Entz-Werle ^{5,10,*}

¹ Laboratory EA3430. Progression tumorale et microenvironnement, Approches Translationnelles et Epidémiologie, University of Strasbourg, 3 avenue Molière, 67000 Strasbourg, France; aurelie.durand@unistra.fr (A.D.); marie.litzler@gmail.com (M.L.); aurelien.tripp@gmail.com (A.T.); eric.guerin@chru-strasbourg.fr (E.G.); damien.reita@chru-strasbourg.fr (D.R.); dominique.guenot@unistra.fr (D.G.)

² Department of Nuclear Medicine, University Hospital of Strasbourg, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg, France; eruhland@live.fr

³ PCBIS Plate-forme de chimie biologique intégrative de Strasbourg, UMS 3286, CNRS, Université de Strasbourg, Labex Medalis, 300 boulevard Sebastien Brant, F-67000 Strasbourg, France; aobrecht@unistra.fr (A.O.); pvilla@unistra.fr (P.V.); izziejacques.namer@chru-strasbourg.fr (I.J.N.)

⁴ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 7104, Inserm U964, 1 rue Laurent Fries, 67400 Illkirch, France; keime@igbmc.fr

⁵ UMR CNRS 7021, Laboratory Bioimaging and Pathologies, Tumoral Signaling and Therapeutic Targets, Faculty of Pharmacy, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France; Quentin.fuchs@unistra.fr (Q.F.); benoit.lhermitte@chru-strasbourg.fr (B.L.); isabelle.lelong-rebel@unistra.fr (I.L.R.); monique.dontenwill@unistra.fr (M.D.)

⁶ Pathology Department, University Hospital of Strasbourg, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg, France

⁷ Centre de Ressources Biologiques, CRB, University Hospital of Strasbourg, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg, France

⁸ Neurosurgery, University Hospital of Strasbourg, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg, France; hugoandres.coca@chru-strasbourg.fr

⁹ The Institute of Cancer Research, 15 Cotswold Road, Sutton, Surrey SW7 3RP, UK; chris.jones@icr.ac.uk

¹⁰ Pediatric Onco-Hematology Department, Pediatrics, University hospital of Strasbourg, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg, France

* Correspondence: anneflorence.blandin@gmail.com (A.-F.B.); Natacha.entz-werle@chru-strasbourg.fr (N.E.-W.); Tel.: +33-3-88-12-83-96 (N.E.-W.); Fax: +33-3-88-12-80-92 (N.E.-W.)

Received: 16 September 2019; Accepted: 15 November 2019; Published: 26 November 2019



Abstract: Background: Pediatric high-grade gliomas (pHGGs) are facing a very dismal prognosis and representative pre-clinical models are needed for new treatment strategies. Here, we examined the relevance of collecting functional, genomic, and metabolomics data to validate patient-derived models in a hypoxic microenvironment. Methods: From our biobank of pediatric brain tumor-derived models, we selected 11 pHGGs driven by the histone *H3.3K28M* mutation. We compared the features of four patient tumors to their paired cell lines and mouse xenografts using NGS (next generation sequencing), aCGH (array comparative genomic hybridization), RNA sequencing, WES (whole exome sequencing), immunocytochemistry, and HRMAS (high resolution magic angle spinning) spectroscopy. We developed a multicellular in vitro model of cell migration to mimic the brain hypoxic microenvironment. The live cell technology Incucyte[®] was used to assess drug responsiveness in variable oxygen conditions. Results: The concurrent 2D and 3D cultures generated

from the same tumor sample exhibited divergent but complementary features, recreating the patient intra-tumor complexity. Genomic and metabolomic data described the metabolic changes during pHGG progression and supported hypoxia as an important key to preserve the tumor metabolism in vitro and cell dissemination present in patients. The neurosphere features preserved tumor development and sensitivity to treatment. Conclusion: We proposed a novel multistep work for the development and validation of patient-derived models, considering the immature and differentiated content and the tumor microenvironment of pHGGs.

Keywords: models; pediatric high-grade glioma; hypoxia; intra-tumor heterogeneity; tumor and cell metabolism

1. Background

Pediatric high-grade gliomas (pHGGs), including diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG), are devastating diseases [1]. They are the leading cause of mortality in pediatric oncology. These tumors exhibit progression after current treatments, with more than 90% of children relapsing within two years of diagnosis [2,3]. Since 2010, the histone *H3.3* and *H3.1 K28M* mutations have been reported as recurrent driver events in midline pHGGs. The significance and function of these aberrations have not been clearly established, but are now diagnostic tools for pHGGs [4,5]. The identification of new effective therapies is challenging, currently relying on low or large-throughput screens in the laboratories and the lack of in vitro models entirely recapitulating the pHGG tumor diversity [6,7].

Therefore, patient-derived tumor cell line (PDCL) models in pHGGs are becoming the new standard for the preclinical drug testing and biomarkers' discovery at diagnosis or on autopsy specimens [8,9]. In addition to traditional 2D monolayer (MNL) cell cultures, the 3D models, such as neurospheres (NS), multicellular tumor spheroids, and organoids, are valuable for studying brain tumors, as they contain several cell types and harbor a more complex 3D anatomy [9–12]. Recent publications have mainly investigated the efficacy of new targeted therapies in 3D PDCLs and/or in patient-derived xenografts (PDX) [8,13–15].

As presented in a recent paper [16], the pHGG bearing the *H3.3 K28M* mutation mainly contains an oligodendrocyte-like signature and more differentiated malignant cells, including differentiated astrocytic-like cells. Therefore, we believe that the isolation of those cell types (2D and 3D cultures) from the same tumor patient might accurately recreate the multilineage organization of the pHGGs to study the drug response in vitro. This will take into account the differentiation hierarchies of tumor cells involved in tumor development and in drug resistance [16–20].

Since 2010, our laboratory initiated the PEDIAMODECAN (PEDIAtic MODEls for CANcer research) program to develop and characterize novel patient-derived models from several pediatric brain tumor types. Here, we propose a detailed characterization of the 3D and paired 2D cellular models derived from midline pHGGs, driven by the histone *H3.3K28M* mutation. We looked at comprehensive genome profiling, as well as neural/glial components in 2D/3D PDCLs and patient tumors. Metabolomic characteristics were evaluated using HRMAS (high resolution magic angle spinning) analysis in our PDCLs models maintained in hypoxia (5% O₂) and in a cohort of *H3.3-K28M*-mutated pHGGs. We developed a hypoxic (1% O₂) spheroid model to mimic the cell dissemination from a tumor mass observed during patient tumor progression. We also performed intracranial xenografts of 3D and 2D PDCLs in immunocompromised mice. Finally, we exposed all cell lines to low and high level of oxygen, and treated them with the standard alkylating agent temozolomide, as no innovative drugs are currently efficient against those pHGGs.

This study sought to classify 2D/MNL PDCLs, as immature differentiated astrocytic cells, as being able to participate in slow tumor growth and cell migration, and the paired 3D/NS PDCLs cultures, as tumor initiating-like cells, as being able to restart tumors in case of minimal residual cells. The final

goal was to propose a standardized method to develop pHGGs models for drug testing and recreate an accurate brain environment in vitro.

2. Results

2.1. Clinical Features of the H3.3-K28M-Mutated High-Grade Gliomas

Among patients included in the PEDIAMODECAN program (seven DIPGs and four tHGGs (thalamic high-grade gliomas)), we selected four cases that were mismatch repair proficient and harboring the driver histone mutation *H3.3 K28M*. We were able to derive four PDCLs out of seven DIPGs and two PDCLs out of four tHGGs. Among the four DIPG PDCLs, we had only two *H3.3-K28M*-mutated tumors. The patient ages ranged from 9 to 18 years old. The clinical reports, including immunohistochemistry results, are summarized in Table 1. MRI radiological data showed that DIPGs and tHGGs invaded the pons or thalamus, respectively, at diagnosis, with a localized tumor enhancement after gadolinium injection on T1-weighted and T2-weighted FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) sequences. The immunohistochemical analyses were performed for Ki67, GFAP (glial fibrillary acidic protein), p53, EGFR (epidermal growth factor receptor), PTEN (phosphatase and tensin homolog), Olig2 (oligodendrocyte transcription factor 2), and HIF-1 α (hypoxia inducible factor 1 alpha) biomarkers.

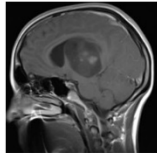
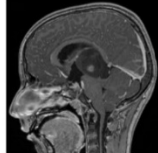
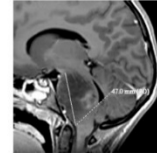
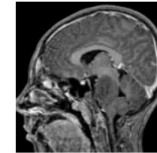
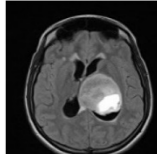
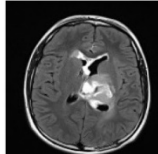
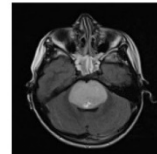
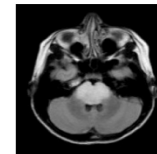
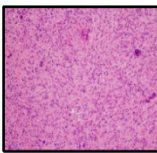
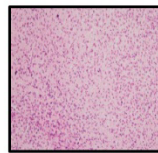
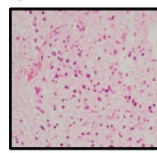
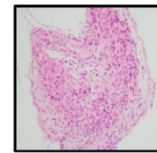
2.2. Early-Passage Culture of PDCLs Preserved the Genotype and Phenotype of Primary High-Grade Gliomas

Upon receipt of the fresh tumor material of each patient, we generated concomitantly 3D/NS and 2D/MNL cell cultures from BT68, BT69, and BT83 tumors. BT35 cells grew only in a 2D/MNL line. To assess whether the PDCLs features matched to the patient tumor, we first performed comprehensive genome profiling. The targeted-sequencing analyses showed the maintenance of the somatic driver *H3.3 K28M* in all MNL and NS PDCLs for all passages (Figure 1a,b). The VAF (variant allele frequency) of the heterozygous histone mutation *H3.3 K28M* increased in cell lines compared to the paired patient tumor, suggesting the in vitro expansion of PDCL-selected mutated tumor cell populations. As genetic drifts in culture have long been documented, we performed whole-exome sequencing for early passages (<10) in the cell lines and compared them to the patient tumors. The numbers of DNA alterations increased in both 2D and 3D lines compared to the tumor sample after multiple passages (Figure 1c, Figures S1 and S2a). Nevertheless, PDCLs preserved the main genomic aberrations found in patient tumors, including histone, *ATRX* (alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) mutations, and *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) homozygous deletion. The expression of the tumor glial marker GFAP and the neural marker Nestin were maintained in MNL and NS cultures for early passages, while long-term cell expansion partially lost the markers' expression (Figure 1d). In the data in Figure S2b,c, we report the persistent expression of stem-cell marker SOX2 (SRY-Box2), CD133, and OCT4 (octamer-binding transcription factor 4), the neuron-specific progenitor marker MAP2 (microtubule associated protein 2), and the oligodendroglial markers O4 or Olig2 in NS PDCLs, characterizing the immature neuronal potential of the NS cells with an oligodendroglial-like pattern. Olig2 decreased in the tumor relapses for BT35 and BT69 (Table 1), as in the corresponding cell lines. The MNL lines mostly preserved more mature astrocytic markers, like GFAP and the mesenchymal marker CD105.

We next considered how the growth condition related to genetic heterogeneity. As expected, CNV (copy number variation) analyses did not reveal unique genetic imbalance signatures for 2D/MNL or 3D/NS in the examples BT69 and BT83 (Figure S3). We noticed that the MNL culture mostly led to a gain in chromosome alleles (extra-chromosomal abnormalities 1, 7, 9, 11, and 12 in BT69 MNL and extra material of chromosome 16 in BT83 MNL) (Figure S3). The NS culture harbored predominantly chromosomal losses (loss of material on chromosomes 10, 15, and 18 in BT69 NS and interstitial loss on chromosome 1 in BT83 NS). Overall, BT35 MNL harbored gains of genetic material compared to the original tumor, while BT69 NS presented similar CNVs to the patient tumor (Figure S2a).

Table 1. Clinical characteristics of four pediatric *H3F3A-K28M*-mutated high-grade gliomas. BT: brain tumors; HGG: grade IV glioma; DIPG: diffuse intrinsic pontine glioma; Iri/Beva: Irinotecan/Bevacizumab; ADC: apparent diffusion coefficient measured within T2-weighted injected sequences. Ki67, HIF1 (hypoxia inducible factor 1), GFAP (glial fibrillary acidic protein), EGFR (epidermal growth factor receptor), PTEN, and Olig2 stainings (% of positive cells in tumor specimen) were used. Tumors for which analyses were unavailable are designated NA (not available).* Stupp protocol with a total of 12 courses of temozolomide was used in post-radiotherapy.

Patients	BT35	BT69	BT68	BT83
Sample	Relapse	Relapse	Diagnosis	Diagnosis
Location	Thalamic	Thalamic	Pons	Pons
Age (years)	18	14	9	13
Diagnosis	HGG	HGG	DIPG	DIPG
1st line therapy	Stupp protocol	Stupp protocol	RT + cilengitide	RT + dasatinib
2nd line therapy	RT + Iri/Beva	RAPIRI protocol	No treatment	RAPIRI protocol
Survival (months)	12	17	10	9

	Imaging			
Contrast-enhanced T1-weighted MRI				
ADC (mm ² /s)	1047	1029	945	1068
T2-weighted FLAIR MRI				
	Histology (diagnosis)			
H&E				
IHC				
Ki67 (%)	50–80	20–25	15	10–15
GFAP	pos	pos	pos	pos
p53	pos	neg	pos	pos
EGFR	neg	pos	pos	pos
PTEN	pos	pos	NA	pos
HIF-1 α (%)	20	50	50	20
Olig2 (%)	70	100	10	50
Olig2 (%) at relapse	30	50	NA	NA

All those results confirmed our choice to work with both MNL and NS PDCLs for early passages (less than 10). They were appropriately matching to the genomic properties and protein markers of the patient tumor.

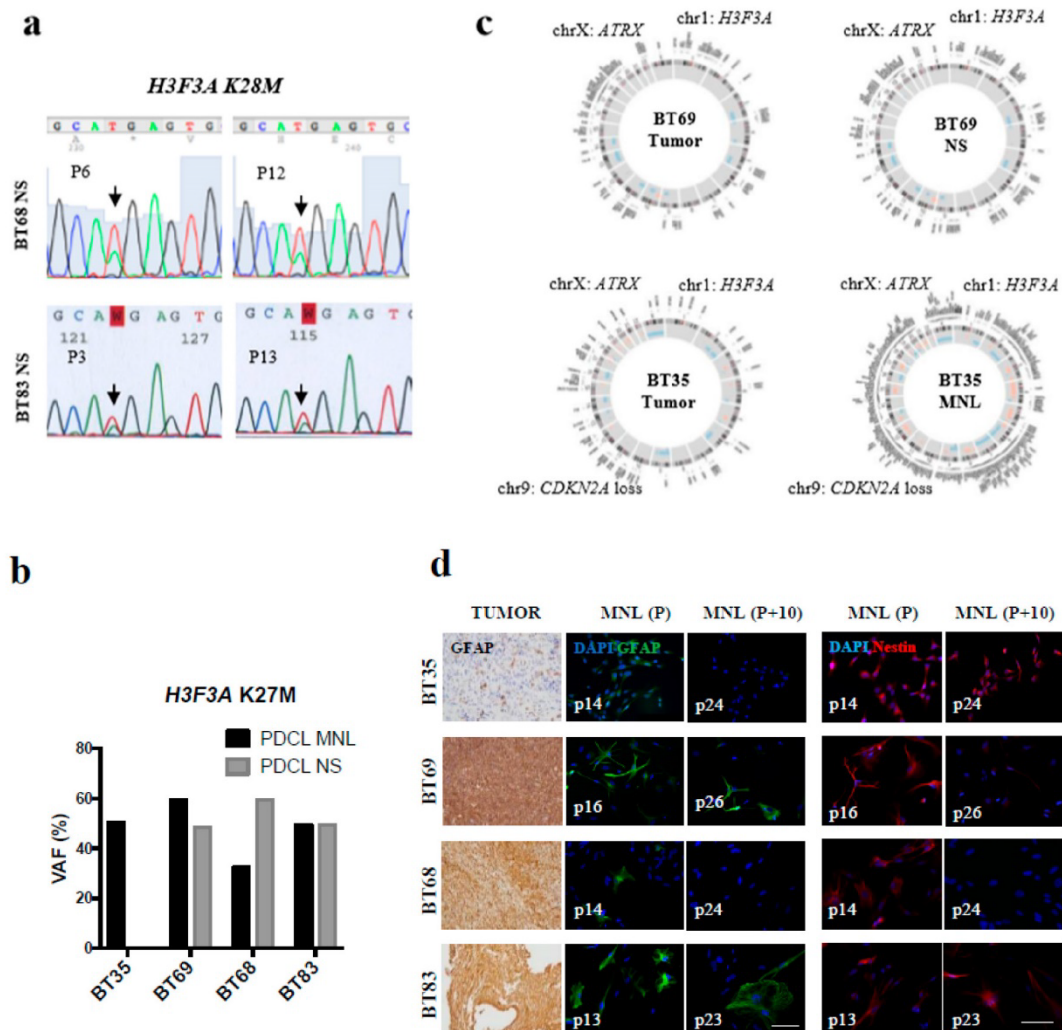


Figure 1. Patient-derived tumor cell lines (PDCLs) preserved genomic drivers and neural/glial markers' heterogeneity observed in pediatric HGG, while long-term cell culture often lacked these markers. **(a)** Sanger sequencing at different culture passages (BT68 and BT83), illustrating the *H3F3A* mutation maintenance (arrows). **(b)** Allele frequencies of the heterozygous *H3F3A* mutation (Chr1: 226252135A > T; NM_002107: exon2: c.83A > T; p.K 28M) in the four PDCLs cultured as monolayer (MNL) and neurosphere (NS) (passages < 10). The variant allele frequency (VAF) was confirmed using two variant callers VarScan and gatkUG. **(c)** Circos plots of genetic alterations in patient tumors and the paired PDCLs. Point mutations, chromosome labels, cytoband information, and copy number variations (CNV) are shown from outer to inner circles. Deleted regions are depicted in blue and amplified regions are shown in orange. **(d)** Left panel: GFAP expression in thalamic high-grade gliomas (tHGGs; BT35 and BT69) and diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPGs; BT68 and BT83) and the corresponding adherent cell lines at early (P) and late passages (P+10). Right panel: Immunodetection of Nestin. Scalebar—100 μ m.

2.3. Importance of In Vitro Hypoxia to Mimic the Metabolic Changes During H3K28M-Mutated pHGG Progression

To go further and choose the more accurate culture environment, we explored the metabolomic profiles of our cell lines and tumor collections using HRMAS NMR spectroscopy. The tumor collection included six tHGGs and four DIPGs. All six tHGGs matched with their relapse samples. Two tHGGs were previously included to the PEDIAMODECAN program but we did not have a paired PDCL.

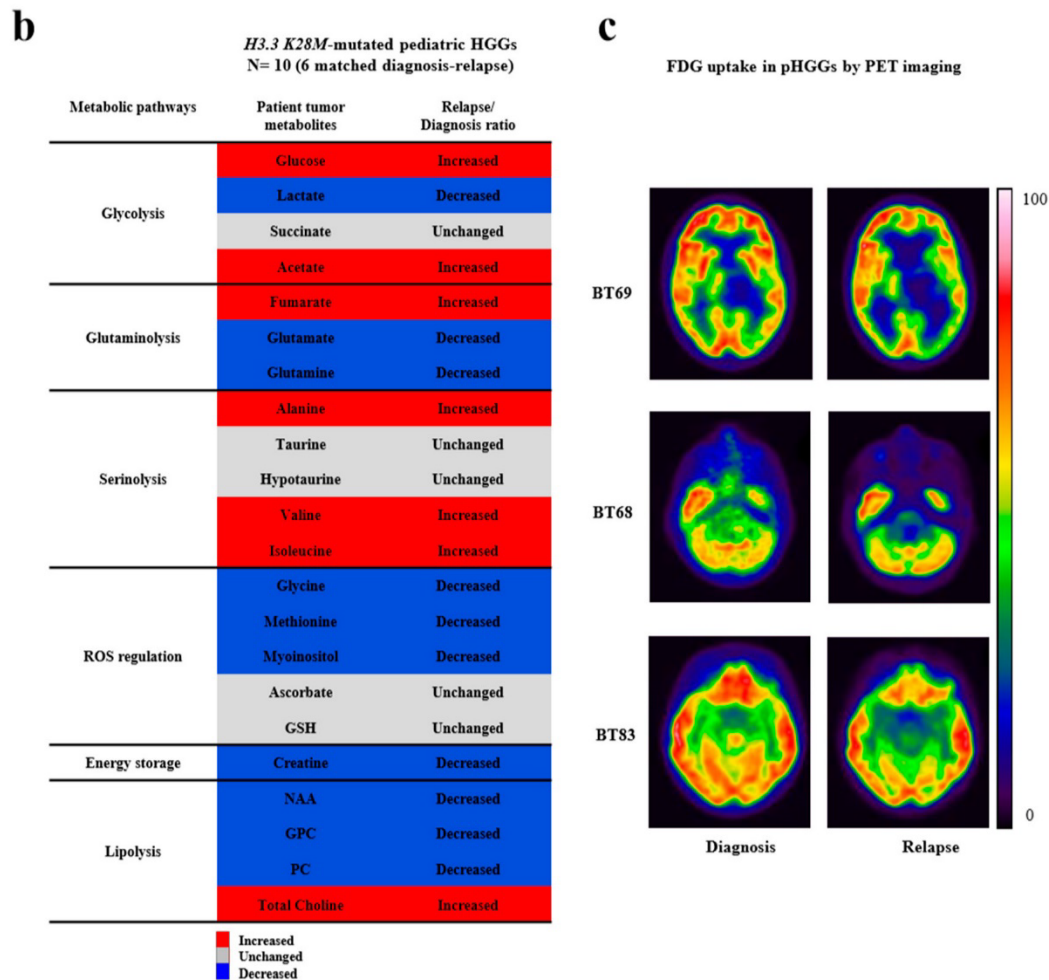


Figure 2. Ex vivo high-resolution magic angle spinning (HRMAS) of pediatric high-grade gliomas (pHGGs) and the impact of oxygen level on the paired-PDCL metabolisms. (a) ADEMA (Algorithm to Determine Expected Metabolite Level Alterations Using Mutual Information) analyses to compare metabolite concentrations in *H3.3-K28M*-mutated samples (relapse versus diagnostic), and BT69, BT68, and BT83 PDCLs (hypoxic versus normoxic environment). (b) Metabolites' modulation in 6 relapses versus 10 diagnostic pHGGs bearing an *H3.3 K28M* driver mutation. (c) PET (positron emission tomography) scans at diagnosis and relapse in BT69, BT68, and BT83 patients. 2HG: 2-hydroxyglutarate; GABA: gamma-aminobutyric acid; GPC: glycerophosphocholine; GSH: glutathione; PC: phosphocholine; FDG: fluorodesoxyglucose); ROS: reactive oxygen species.

The metabolic profile of BT35 MNL in the hypoxia condition also matched the BT35 tumor metabolic profile at relapse (Figure S6) and was significantly different from the diagnostic tumor. Nevertheless, this PDCL model was significantly different from the others (ADEMA analyses in Figure 2a), as its metabolism was more in favor of lipolysis and a less active amino acid metabolism (Figures S5 and S6).

Global metabolomic profiles showed that the two cell lines BT35 and BT69, derived from tHGGs ($R^2Y = 0.95$; $Q^2 = 0.85$), and the two cell lines BT68 and BT83, derived from DIPGs ($R^2Y = 0.99$; $Q^2 = 0.90$), were clearly separated by a two-component PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) analysis of the global metabolite profiles (Figure S5a). Nevertheless, the specific metabolism changes in cell lines with 5% O_2 was similar to the paired tumor (Figure 2b) and the PET-scans (Figure 2c), confirming the major impact of hypoxia (5% O_2) on cell cultures.

2.4. In Vitro Modeling of Cell Migration from Hypoxic PDCL Spheroids' Recapitulated Tumor Cell Dissemination in Patients

To mimic the different tumor areas (regions that were well-oxygenated close to the perivascular space and the hypoxic regions distal to this neovasculature), we investigated PDCL cellular changes occurring in response to a strong decrease in oxygen level (from 21% to 5% and 1% O₂). Following the deprivation of oxygen, we showed a progressive cellular detachment of the semi-adherent BT68 NS and the HIF-1 α expression increase (Figure 3a). In BT68, the expression of HIF-1 α was transiently upregulated after 48 h of low oxygen exposure compared to the UW479 control line (Figure S7a). All cell lines highly expressed HIF-1 α at 1% O₂ at 48 h (Figure S7b), but surprisingly, the cell phenotypes of BT35 MNL, BT69 NS, and BT83 NS were not modulated under hypoxia.

Transcriptomic analyses identified a seven-gene hypoxia signature in PDCLs exposed to 1% O₂ ($p < 0.01$ and log₂ fold change > 2) (Figure 3b). The hierarchical clustering revealed only an increased expression of these genes in NS cultures, suggesting that the 3D/NS culture better reflected the pathological hypoxic gradient of brain tumors. CA9 (carbonic anhydrase IX) and VEGFA (vascular endothelial growth factor A) are well-known markers of hypoxia. For the other biomarkers, AK4 (adenylate kinase 4), PDK1 (pyruvate deshydrogenase kinase 1), and HK2 (hexokinase 2) are metabolic enzymes involved in glycolytic pathways. mir210HG and BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19-kD interacting protein 3) are usually expressed in hypoxic conditions [21].

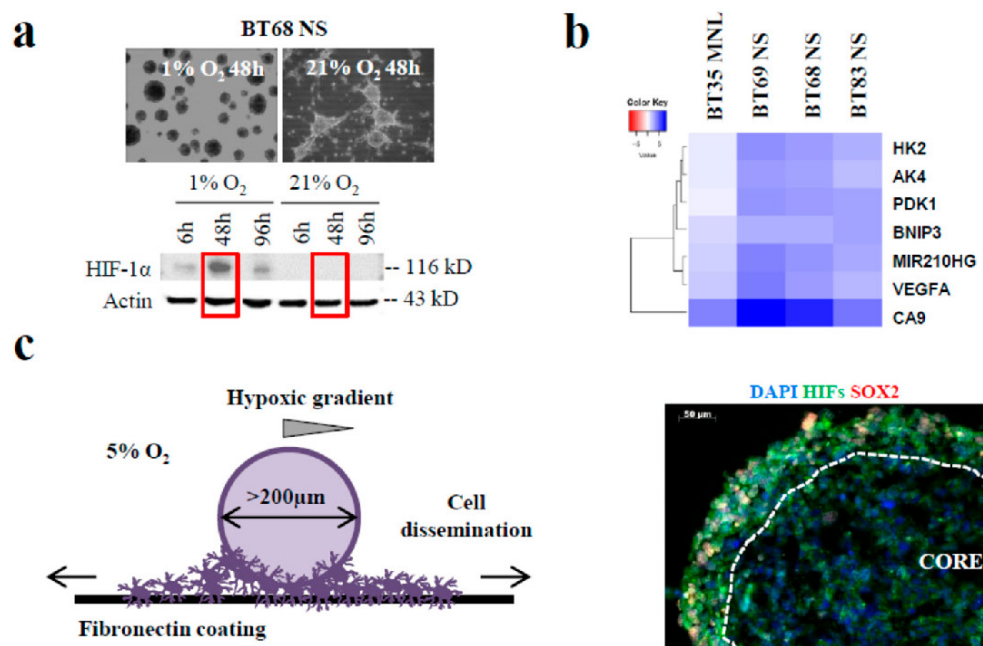


Figure 3. Cont.

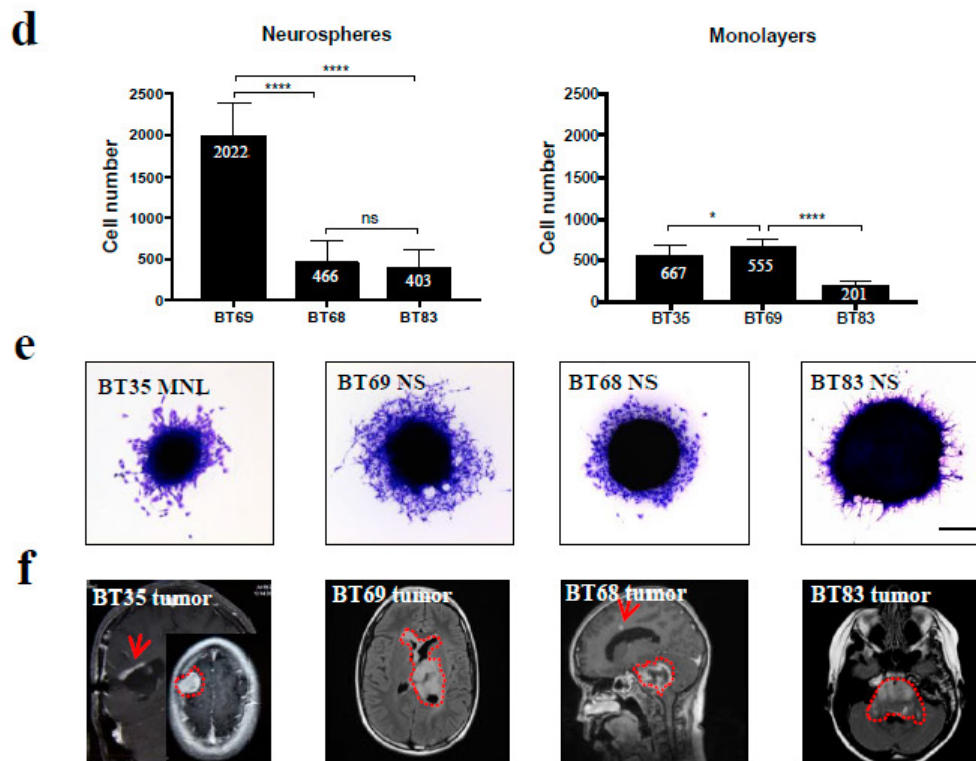


Figure 3. In vitro modeling of cell dissemination from hypoxic PDCL spheroids to recapitulate tumor progression in a patient (a) Phase-contrast images and HIF-1 α expression of BT68 NS in normoxic and hypoxic conditions at the indicated times. (b) Significant differential expression of seven genes involved in the hypoxia signaling pathway in cells exposed to 21% O₂ versus 1% O₂. (c) Diagram depicting a model of the cell dissemination from hypoxic spheroids and the immunofluorescent staining of HIFs and SOX2 (SRY-Box2) in the core and the periphery of the spheroid. (d) Quantification of the number of migrating cells. (e) Phase-contrast micrographs of PDCL migration following crystal violet staining. (f) Injected T1-weighted magnetic resonance images of patient tumors at relapse. Red arrows—distant metastasis. **** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$. Scalebar—200 μ m. DAPI: 4',6-diamidino-2-phénylindole.

To understand the invasiveness of PDCLs in the hypoxic brain environment, we developed a spheroid in vitro model (Figure 3c) recapitulating hypoxia observed in patient brain tumors. Because the oxygen diffusion ranged from 70 μ m to 200 μ m in tumors and normal tissue, respectively [21], we generated spheroids (from early passages (<10) of paired MNL and NS lines) with diameters above 200 μ m to create a hypoxic gradient from the periphery to the core and expanded them at 5% O₂. We showed that the expression of the stem cell marker SOX2 was restricted to the periphery of the spheroid, while HIF-1 α was expressed from the core to the periphery of the spheroid. We confirmed the co-expression of HIF-2 α /HIF-1 α and SOX2 observed in HGGs (Figure 3c). Furthermore, previous studies, comparing gene expressions in HGGs versus normal brain parenchyma, identified the extracellular matrix protein fibronectin as one of the most over-expressed gene in HGGs [22]. Then, to more carefully recreate the biology of the patient's tumors, we immobilized the spheroids onto a fibronectin coating. The quantification of cells evading from the spheroid and the distance of migration showed that cell dissemination was slower in MNL than in their corresponding NS lines (Figure 3d). In addition, the invasiveness of each patient tumor during its progression or relapse was comparable to the migration profiles in MNL- and NS-derived spheroids (Figure 3e). As shown on MRI, the highly diffusive BT69 tumor relapse in the left thalamic initial site and in the contralateral anterior ventricle was similar to the highly invasive profile of the BT69 spheroid (Figure 3e,f). The localized BT83 tumor at relapse was comparable to the low diffusive BT83 spheroid (Figure 3e). Similar comparisons could be performed for BT68 and BT35. The SUV (standardized uptake

value) on PET scans decreased in proportion to the increase of cell migration potential in the spheroid models (Figure 2c). This approach seems to confirm the importance of oxygen level variations to study in vitro cell behavior and migration.

2.5. Both 2D/MNL and 3D/NS Cell Cultures Mimic the Hierarchical pHGG Development and Patient Drug Sensitivity

To go further in the comparison of NS and MNL features and to understand the functional impact of hypoxia, we performed a proliferation assay using the IncuCyte® system. In all PDCLs, the MNL cells harbored a significantly longer doubling time than the corresponding NS populations in both normoxic and hypoxic environments (Figure 4a). The proliferation was slightly higher in hypoxia with an average doubling time ranging between 3 and 18 days in normoxia and between 1.6 and 17 days in hypoxia. Surprisingly, the doubling time of BT35 adherent cells was similar to cells growing as NSs. We then investigated the PDCLs clonogenic potential (Figure 4b) and showed that only NS cultures formed colonies (plating efficiency: 11%, 17%, and 12% in BT69, BT68, and BT83, respectively). By contrast, 2D/MNL cultures failed to form colonies, except for BT35 cells, which developed diffuse colonies (plating efficiency: 11%).

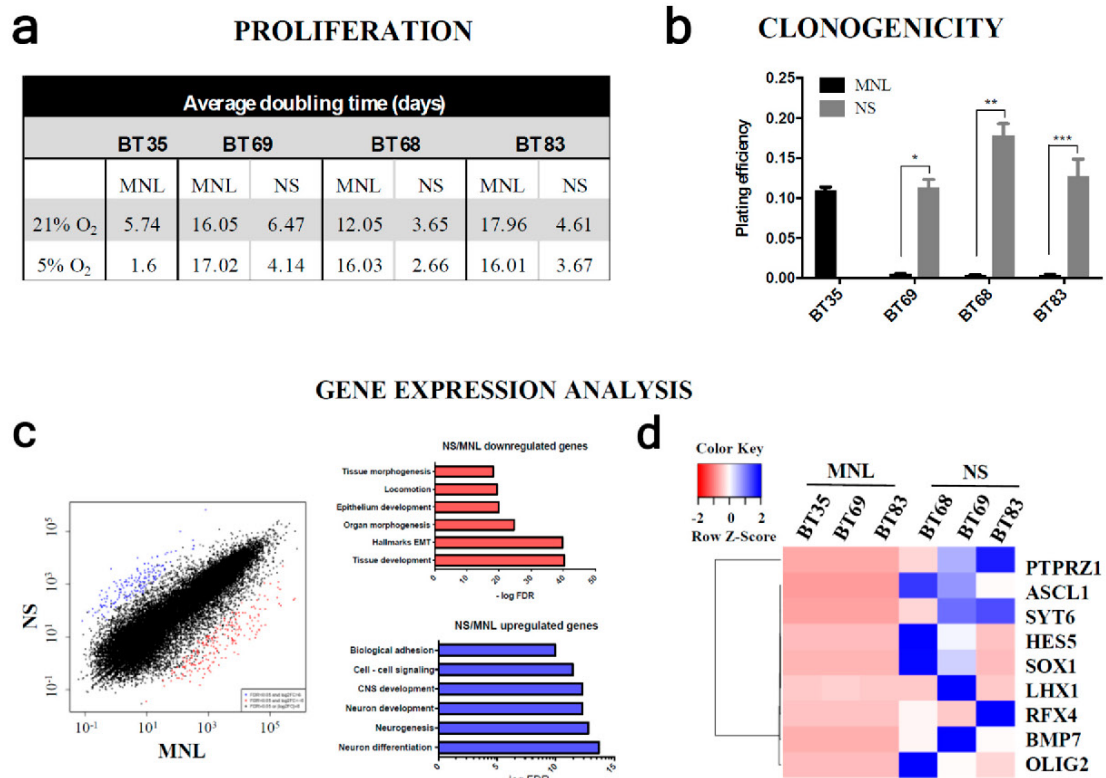


Figure 4. Cont.

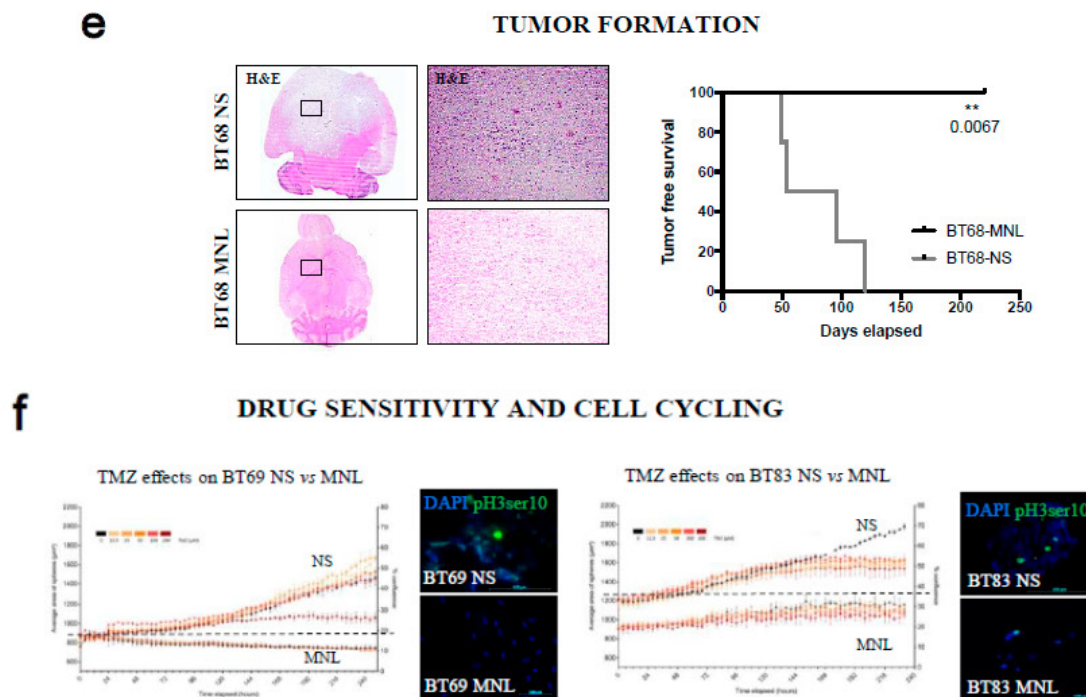


Figure 4. In vitro and in vivo growth advantage and drug sensitivity of a neurospheres culture compared to the paired monolayers. (a) Evaluation of the PDCL doubling time at 21% and 5% oxygen. (b) Quantification of colony counts in PDCLs. (c) Scatter plot showing upregulated genes in blue and downregulated genes in red, in NS compared to MNL cells (\log_2 fold change $>$ or $<$ 6) and the corresponding functional annotation. (d) An unsupervised hierarchical clustering from all PDCLs samples according to a gene set implicated in stem-like cells potential was calculated using the UPGMA algorithm (unweighted pair group method with arithmetic mean) with the SERE (simple error ratio estimate) coefficient as the distance measure. (e) Hematoxylin & Eosine staining and survival curves of immunodeficient mice injected with BT68 MNL and BT68 NS cells. (f) Evaluation of the BT69 and BT83 responses to temozolomide (TMZ) using the IncuCyte[®] system. Scalebar—100 μ m. MNL: monolayer, NS: neurosphere. Data are the mean \pm s.e.m. of three independent experiments. *** $p < 0.0001$; ** $p < 0.001$; * $p < 0.05$. PTPRZ1: receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta; SYT6: synaptotagmin 6; HES5: hes family bHLH transcription factor 5; SOX1: SRY-box transcription factor 1; LHX1: LIM homeobox 1; RFX4: regulatory factor X4; BMP7: bone morphogenetic protein 7; OLIG2: oligodendrocyte transcription factor 2.

In order to understand why 2D/MNL PDCL cannot form colonies, we compared the gene expression profiles of MNL and the paired NS using RNA sequencing. We identified 452 genes that were differentially expressed. A total of 200 genes were upregulated (FDR (false discovery rate) $>$ 0.05) and 252 were downregulated (FDR $<$ 0.05) more than 3-fold (Figure 4c). Functional annotations of the upregulated gene set using GSEA (gene set enrichment analysis) identified significantly enriched biological processes in NSs (involved in central nervous system development, neurogenesis, and cell–cell adhesion) (q -values ranged from 8.7×10^{-11} to 1.7×10^{-14}). The most downregulated genes in NS cells were implicated in extracellular matrix organization, tissue development, and differentiation (q -values ranged from 3.9×10^{-19} to 8.9×10^{-41}). In addition, we isolated nine significant upregulated genes that are well-known to be involved in stem-like cell potential only in 3D/NS cultures (Figure 4d).

We then explored the tumor initiation properties of each cell line in NSG (NOD scid gamma) mice. We showed that NS PDCLs led to tumor development by an average of 80 days following the intracranial injection. We did not observe tumor formation from any MNL PDCLs (Figure 4e). The tumor mass histology recapitulated the hallmarks of the tumor patient. GFAP-positive cells were

invading the mouse brain parenchyma at the periphery of the tumor mass (Figure S8a). Targeted sequencing confirmed the presence of the *H3.3 K28M* histone mutation in all NS xenografts (Figure S8b). Histological analyses might be a limited methodology to detect early tumor formation or disseminated single cells [23]. To improve the detection of PDCL infiltrating cells within mouse brain, we quantified the human-specific *Alu* repeats expressed in mouse brain tissue at the injection site (Figure S8c). We quantified 0.2%, 22.2%, and 100% of *Alu* sequences in BT69, BT83, and BT68 NS, respectively. We confirmed that mice injected with MNL cells did not exhibit any tumor development, even BT35, harboring clonogenic properties and a high proliferation rate.

We then compared the sensitivity of the 2D and 3D models to temozolomide (TMZ), a chemotherapeutic agent targeting cycling cells and used in the past for pHGG treatments (Figure 4f and Figure S9). At 21% O₂, all NS PDCLs were sensitive to TMZ after long-term exposure (120 hours for BT69, 152 hours for BT83, and 135 hours for BT68), whereas the paired-MNL lines were completely resistant. We also showed that a large proportion of NSs expressed the mitotic marker phospho-H3ser10, while MNL poorly expressed it, which is consistent with the higher proliferative rate observed in NSs. This might partially explain the absence of MNL response to TMZ. As expected, PDCLs derived from HGG were resistant to TMZ, but we showed that, surprisingly, hypoxia increased the 3D/NS response to high doses of TMZ (Figure S9a,b). Indeed, the IC₅₀ of BT83 and BT69 were lower at 5% O₂ than 21% O₂ (BT83 IC₅₀^(5%O₂) = 74 μM at 96 h; BT83 IC₅₀^(21%O₂) > 200 μM at 96 h; BT69 IC₅₀^(5%O₂) = 148 μM at 48 h; BT69 IC₅₀^(21%O₂) = 200 μM at 48 h) (Figure S9c,d). The BT35 cell line was completely resistant in all conditions. Those observations in hypoxia were confirmed in clinic as the patient BT69 responded to TMZ for 12 months. Nevertheless, it also confirmed that it is possible a part of pHGG tumors depicted by MNL PDCLs were completely resistant from diagnostic to this alkylating agent and might be tested systematically.

3. Discussion

Research on pHGG models are now a priority as there is clearly a lack of in vitro models entirely recapitulating the pHGG tumor diversity. For this purpose, here we are proposing a standardization of patient-derived cell lines to integrate tumor characteristics, as well as part of the brain microenvironment (Figure 5a).

The first step was to establish the optimal culture conditions. We expanded the 2D cells by plating them on a laminin coating substrate in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)/F12 GlutaMAX medium supplemented with serum. The increase of serum from 1% to 10% did not change the 2D characteristics, but that helped to expand the 2D cultures above 15 passages. We tested the laminin coating alone without serum and the cells stopped growing. We expanded the 3D culture using a standard combination of DMEM/F12 GlutaMAX medium supplemented with B27, human Fibroblast Growth Factor-basic (bFGF) and recombinant human epidermal growth factor (EGFR).

In those conditions, both the 2D and 3D PDCLs early passages preserved the genomic drivers and neural/glial components observed in pHGGs, while long-term cell cultures often lacked these features. Both MNL and NS models might be used for drug screening purposes. They are capable of representing all tumor cell subclones, combining self-renewal and tumor growth properties (Figure 5b) [24]. To go further, we developed a concomitant 2D/3D culture that preserved the differentiated and stem-like subpopulations after 10 passages (Figure 5c). We will next generate xenograft models with this co-culture, as suggested by Wang et al. [19] for adult HGGs [16].

Our metabolic analyses and spheroid modeling also confirmed that a hypoxia environment closely reflected the metabolic reprogramming of a patient tumor and their progression, and might be a key component of in vitro models to more closely resemble the state of the patient (Figure 5a). To our knowledge, HGG-derived cell lines are always expanded in a controlled well-oxygenated environment (21% O₂), which does not reflect the oxygen level of the brain microenvironment [25]. Indeed, pHGGs are highly hypoxic tumors (1% O₂) and the oxygen pressure of the normal brain is above 35 mmHg, corresponding to 5% oxygen. Therefore, drug screening performed at 21% O₂ probably underestimates

the microenvironment impact. Here we described that BT lines grew faster at 5% O₂ than under the usual normoxic atmosphere. Cell growth determines the response to cell-cycling-targeted therapy. Therefore, expanding pHGG-derived cell lines at 5% O₂ might mimic the cell growth in the patient more closely (Figure 5a). The hypoxia also induced an altered metabolism, which is considered a feature of adult glioblastoma progression, but the mechanisms by which it contributes to oncogenicity are still unknown, especially in pediatric patients. We [26] and others [27–30] described this HGG metabolic heterogeneity and how it might impact the response to therapeutic drugs. Our data also explored the process of compensatory metabolism in pHGG tumors and the paired-cellular models. We described a metabolic switch between the tumor at diagnosis and the matched tumor at relapse (decrease of glycolysis and increase of lipolysis, serinolysis, and glutaminolysis). We demonstrated that growing cells at 1% O₂ more closely reflected this patient tumor metabolism than cells expanded in normoxia.

In addition, for drug testing, most of the studies in the literature focused on 3D/NS PDCLs, which were considered the gold standard cultures to preserve stem-like features [31] and resistance to therapy. Some other publications supported an equivalence of 2D and 3D cultures for modeling drug response [17,32]. Other articles described the genomic differences of paired adult HGG NSs and MNLs, as observed in our experiments, and how the collaboration between subclonal cell populations determines drug response [18,19,33,34]. We demonstrated here that 3D/NS were sensitive to a high dose of TMZ, while the paired-MNL cells were totally resistant to this drug. Those results might be explained by our functional and genomic data identifying 2D/MNL as immature differentiated cells with a low in vitro expansion and 3D/NS as a progenitor-like subset of cells with a high proliferation rate. The argument of previous studies to prioritize 3D models was also in terms of the ability to restart tumors in animal models. We showed also that only 3D/NS models led to tumor development in mice brains, but this limited in vivo model will not be able to entirely describe the pHGG cellular complexity [35,36].

To understand how the oxygen level might interfere with drug testing, we chose a standard drug used in the past, as no innovative drugs, for instance, are efficient against those pHGGs. We assessed the 2D and 3D paired lines response to the alkylating agent TMZ in normoxia and hypoxia. Surprisingly, a complete resistance of 2D PDCL was observed in all cell lines in both oxygen environments. By contrast, 3D cells were differentially sensitive in normoxic and hypoxic environments, highlighting a low level of oxygen as a key in the modeling of pHGGs resistance/sensitivity.

We already knew that the real benefit of TMZ treatment was limited by acquired resistance, especially in DIPGs and more recently in thalamic pHGGs [2,37]. In the last decade, many publications have explored resistance mechanisms to TMZ, including the tumor heterogeneity, MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase), and mismatch repair status, but these processes have not completely explained this lack of sensitivity in pediatric patients. Therefore, the 2D/3D cell model and the oxygen modulation might help us to understand the drug resistance mechanisms and pave the way for new therapies in pHGGs.

In conclusion, our in vitro and in vivo data classified 2D/MNL PDCLs, as immature differentiated astrocytic cells, as being able to participate in the slow tumor growth and cell migration, and paired 3D/NS PDCLs cultures, as tumor initiating-like cells, as being able to restart tumors in the case of there being minimal residual cells. Combining the data of 2D and 3D PDCLs of the same patient, a pHGG might preserve the tumor hierarchy and complexity. It will also guide new aspects in preclinical drug screening concomitantly with the hypoxic microenvironment.

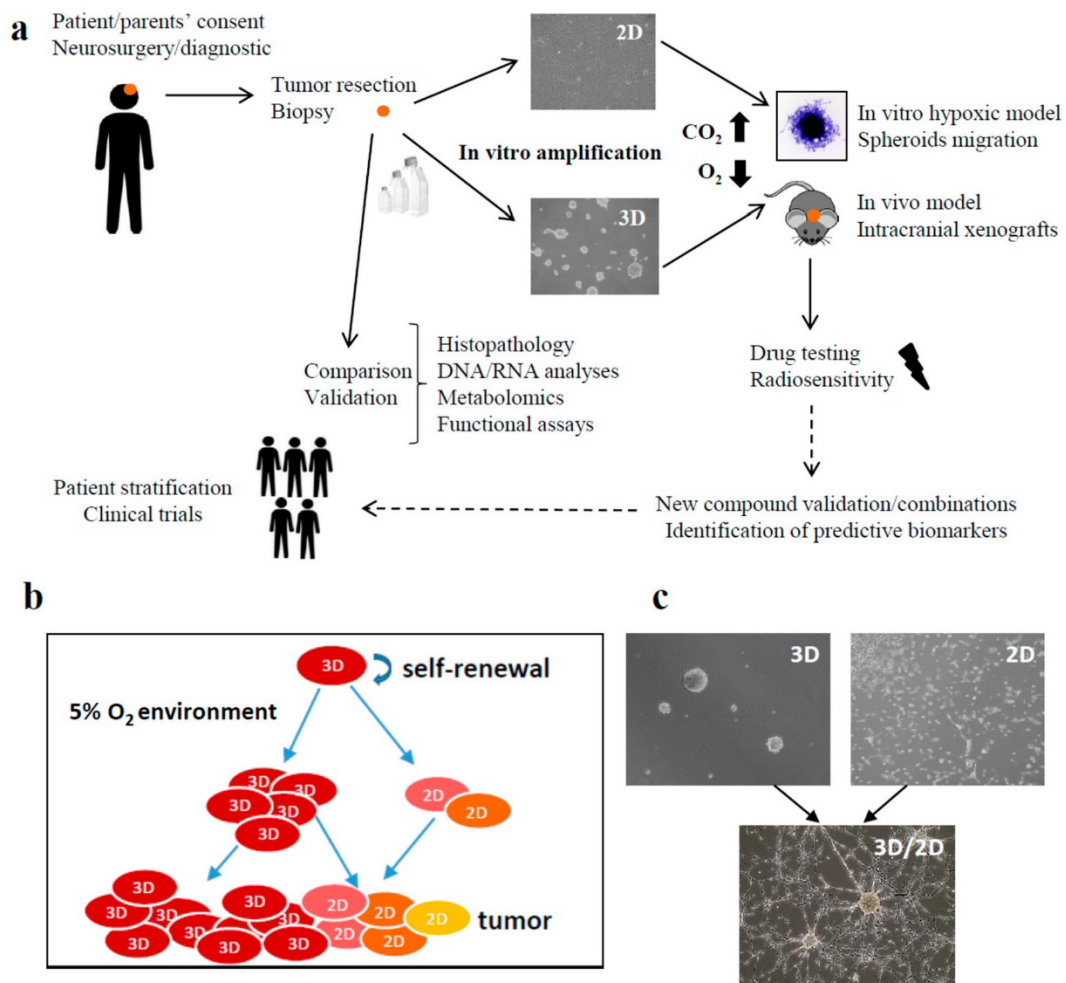


Figure 5. Standardized hypoxic PDCL approach. **(a)** Strategy for pre-clinical drug testing using patient-derived models. **(b)** Proposed hierarchical model of patient-derived cell expansion. **(c)** Co-cultures of 3D and paired 2D cell line. Phase contrast images of BT83 3D culture, 2D culture, and 3D/2D co-cultures expanded for 20 days ($\times 100$).

4. Methods

4.1. Patient Tumors and Derived-Cell Cultures

All samples were obtained after the informed consent of parents and patients was given. Specimens were anonymized for their analyses. This study was conducted in accordance with the ethical committee approval. Patients' characteristics of BT35, BT68, BT69, and BT83 are in Table 1. Biopsies were cut into 1 mm³ pieces and dissociated using a GentleMACS dissociator (Miltenyi Biotec, Paris, France). Cell suspensions were treated with Red Blood Cell Lysis solution (130-094-183, Miltenyi Biotec). For the NS/3D culture, cells were plated in DMEM/F12 GlutaMAX medium supplemented with B27 (Gibco, Fisher Scientific, Illkirch, France), human Fibroblast Growth Factor-basic (bFGF, Millipore, Fontenay sous Bois, France), and recombinant human Epidermal Growth Factor (HuEGF, Gibco). MNL culture was established by plating glioma cells on a laminin coating substrate in DMEM/F12 GlutaMAX medium supplemented with 10% serum. Combined 2D/3D cultures were based on DMEM/F12 GlutaMAX with HuEGF and bFGF, as well as FBS (fetal bovine serum) 4% and B27 2%. The hypoxic conditions were set up in an incubator Sanyo MCO 18M.

4.2. Next Generation Sequencing (NGS) Analyses

DNA extractions from patients' tumors, cultured cells, and stereotaxic xenograft frozen tissues ($50 \mu\text{m} \times 5$) were quantified using a fluorimetric method (Qubit dsDNA BR Assay, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) and qualified using real-time PCR (FFPE QC Kit, Illumina, San Diego, CA, USA). Mutation screening was performed using next generation sequencing on a MiSeq Illumina platform, using a Tumor Hotspot MASTR Plus assay (Multiplicom-Agilent, Santa Clara, CA, USA). A total of 26 gene mutations (hotspots) were screened, including H3F3A. Sequencing data were aligned to human hg19 using BWA-MEME algorithm (Burrows-Wheeler aligner-maximal exact matches). The minimum coverage per base (DP depth) and the minimum variant allelic frequency (VAF) were fixed at 500-fold and 5%, respectively. Data were visualized using Integrative Genomics Viewer (Broad Institute, USA). For BT35, BT68, BT69, and BT83, we also performed exome sequencing analyses using the SureSelect Human All Exon capture sets V4 (Agilent, Santa Clara, CA, USA), and paired-end sequenced on an Illumina HiSeq2000 with a 100 bp read length (median coverage = $100\times$).

4.3. Immunocytochemistry

A density of 2×10^4 2D cells/well were seeded onto glass coverslips (Thermo Fisher Scientific). Floating 3D/NS were embedded in optimal cutting temperature (OCT) mounting media (Sakura Tissue-Tek, Alphen aan den Rijn, The Netherlands). Cryosections ($7 \mu\text{m}$) were cut using a Leica CM3050S microtome (Leica Biosystems, Nanterre, France). Sections were stained with anti-Nestin Mouse (1:200, MAB5326 Millipore), anti-Nestin human (1:500, ABD69 Millipore), anti-GFAP (1:500 837,201, BioLegend, London, UK), anti- β III tubulin (1:200, ab18207 Abcam, Paris, France), anti-O4 (1:100, 07, 139 Sigma, St. Quentin Fallavier, France), anti-MAP2 (1:500, AB5622 Millipore), anti-SOX2 (1:200, MAB2018, R&D System, Abingdom, UK), anti-phospho-histone H3 Ser10 (1:200, 06, 570 Millipore), together with an anti-mouse or anti-rabbit Alexa Fluor 488 and anti-rabbit Cy3 secondary antibodies (Abcam), using routine protocols.

4.4. Immunohistochemistry (IHC)

IHC was performed using an automated tissue staining system (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA) on $4\text{-}\mu\text{m}$ -thick paraffin-embedded sections with an OptiView DAB IHC Detection Kit (detecting mouse IgG, mouse IgM and rabbit primary antibodies, Roche Diagnostics, Meylan, France). The primary antibodies were Ki67 (clone MIB-1, Dako, Santa Clara, CA, USA), GFAP (clone 6F2, Dako), p53 (clone BP53-12, Zytomed Systems, Berlin Germany), PTEN (138G6, Cell Signaling Technology, Ozyme, St-Quentin-en-Yvelines, France), EGFR (clone E30, Dako), HIF-1 α (Abcam), and Olig2 (Abcam).

4.5. Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) Analyses

aCGH was performed using Agilent Human Genome G3 SurePrint CGH microarrays $4 \times 180\text{K}$ (Agilent Technologies), following the manufacturer's instructions. After all DNA extractions, $0.5 \mu\text{g}$ of sample DNA, along with reference DNA of the similar sex (Promega, Charbonnieres-les-Bains, France), was fragmented and labeled with a fluorescent tag, using the SureTag Complete Labeling Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The array slides were scanned at a $3 \mu\text{m}$ resolution on a Agilent Microarray Scanner System (Agilent Technologies). Agilent's Feature Extraction software (V.1.5.1.0) extracted the data, which were analyzed with Agilent CytoGenomics software (v3.0.5.1) (Agilent Technologies).

4.6. Sample Preparations for NMR (Nuclear Magnetic Resonance) Measurements

Two-day-old cell cultures were incubated in a hypoxic (1% O_2) or normoxic atmospheres (21% O_2) for 48 hours. After dissociation, the cell suspension was washed with PBS to remove metabolites from the medium culture. Cell pellets of 1×10^6 cells or fresh tumor samples (20 ng with $\geq 50\%$ tumor cells)

were collected into a 25 μ L insert (B4494, Cortecnet, Brooklyn, NY, USA), frozen on dry ice, and stored at -80°C until high-resolution magic angle spinning (HRMAS) analyses were performed. The tumor collection comprised 10 H3.3 K28M tumors at diagnosis and their 6 paired relapses. To provide a lock frequency for the NMR spectrometer, 10 μ L of D_2O was added to the insert. HRMAS NMR spectra were analyzed on a 500 MHz Bruker Avance III spectrometer (Bruker BioSpin, Billerica, MA). Data acquisition and spectra processing were performed as previously described [38]. A 1D proton spectrum was acquired for each sample. The chemical shift was referenced to the peak of the methyl proton of L-lactate at 1.33 ppm. The quantification procedure was based on the pulse-length-based concentration measurement (PULCON). Spectra were normalized according to each sample weight and calibrated using the signal intensity of a 3 μ mol reference solution of lactate. Quantification results were expressed as nmol/mg of tissue.

4.7. RNA Sequencing Analyses

MNL and NS cell cultures were exposed to hypoxia, 1% O_2 , or maintained in normoxic atmosphere (21% O_2) for 48 hours. Total RNAs were extracted from cell lines using a Trizol reagent (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Libraries suitable for high throughput sequencing were generated from 500 ng of total RNA using TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit (Illumina, Part Numbers RS-122-2101/RS-122-2102). DNA libraries were checked for quality and quantified using a Fragment Analyzer automated CE system (Advanced Analytical Technologies, Inc., Bath, UK). The libraries were sequenced on the Illumina HiSeq4000 system as single-end 1 \times 50-base reads following Illumina's instructions. Image analyses and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14 (Illumina, San Diego, CA, USA). Reads were mapped onto the hg38 assembly of the human genome using TopHat2 pipeline [39] with the bowtie v2.1.0 (written in C++) aligner [40]. Gene expression was quantified using HTSeq v0.6.1 [41] and gene annotations from Ensembl release 87 [42]. Read counts were normalized across libraries with the method proposed by Anders et al. [43]. The data were published on the Gene Expression Omnibus website (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) with the following accession number: GSE101799.

4.8. Western Blot Analysis

Two-day-old MNL and NS cell cultures were maintained at 21% O_2 or at 1% O_2 for 48 hours. Cells were lysed and subjected to an SDS-PAGE gradient. Immunoblots were probed with primary antibodies against HIF-1 α (1:1000, ab51608 Abcam) and Actine (1:15000, MAB1501 Millipore) and anti-mouse or anti-rabbit (1:5000 NXA931, NA934V, GE Healthcare, Diegum, Belgium) secondary antibodies. Immunoblots were quantified with GeneTools analysis software (Syngene, Cambridge, UK).

4.9. Spheroid Migration Assay

Two-day-old spheroids (6000 cells/spheroid) were seeded onto fibronectin coating as previously described [10] and were transferred to the incubator with 5% O_2 . Twenty hours later, cells were fixed and stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Images of each well were acquired using a Zeiss microscope (Axio Zoom V16, Munich, Germany). The number of evading cells was quantified with a home-made macro using ImageJ software (Java-based image processing program, NIH).

4.10. Doubling Time

MNL and NS cell lines were dissociated and plated in a regular 96-well plate or a U-bottom 96-well plate (Greiner Cellstar U-bottom culture plate), respectively (100 μ L, 2000 cells). Fresh medium was added every week. Cell growth was followed for 15 days using IncuCyte[®] Live Cell technology (Essen BioScience, Hertfordshire, UK) Pictures were automatically acquired over time and quantified using ImageJ software. Cell population doubling time was determined using the following equation: doubling time (days) = $\ln 2(t-t_0)/\ln(N_t/N_0)$, where $t - t_0$ is the time for exponential growth, and N_t

and N_0 are cell numbers at time t and t_0 , respectively, for 2D lines. For 3D lines, N_t and N_0 are the neurosphere surfaces quantified by ImageJ software at time t and t_0 .

4.11. Clonogenic Assay

Cells were seeded onto six-well ultra-low attachment plates (500 cells/well) for 20 days. Floating formed colonies were immobilized onto a poly-L-lysine coating (19321-B, EMS, Hatfield, PA, USA) for 30 min at 37 °C and fixed in paraformaldehyde. Images of each well were acquired using a Zeiss microscope (Axio Zoom V16). Colonies were manually counted using ImageJ software.

4.12. Intracranial Injections

Animal experiments were conducted in accordance with French guidelines for animal care and have been approved by the animal research committee (APAFIS #2017021410378167). A total of 300,000 cells resuspended in 2 μ L PBS were injected into the left striatum of NSG (NOD Scid Gamma) mice. Animals were sacrificed at the onset of symptoms. Brains were excised to routine histological analysis.

4.13. Quantitative PCR (qPCR) of Human Alu Repeats

Genomic DNA was extracted from OCT sections localized at the injection sites (50 μ m \times 5). We used primers, which were specific for the Alu-J subfamily (sequences: F: 5'-CACCTGTAATCCCAGCACTTT-3', R: 5'-CCCAGGCTGGAGTGCAGT-3'). qPCR was performed using the QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and the LightCycler system (Roche Life Science). Quantification of human DNA in murine tissue was based on a standard curve established from PDCL DNA. The linearity of standard curve ranged from 1 ng to 0.5 pg of human DNA. A detection of human DNA <0.5 pg was extrapolated and associated to background signal from human contaminations.

4.14. Drug Testing

Cells were plated in 96-well flat bottom plates (5000 cells/well). Cell confluency (% of occupied area) was imaged with an IncuCyte™ ZOOM cell imaging system (Essen BioScience) for 11 days and analyzed using Incucyte Zoom software. Temozolomide was used over a concentration range of 12.5 μ M to 200 μ M in comparison with controls and testing was done in triplicate for all cell lines.

4.15. Statistical Analyses

GraphPad Prism 6 software (GraphPad software, Inc.) was used for bar graph generation showing the mean \pm s.e.m. Comparisons between cell lines were performed using the non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. The paired-sample (MNL versus NS) comparisons were performed using a two-tailed t -test. A p -value < 0.05 was considered statistically significant and n.s. was reported for non-statistically significant results ($p > 0.05$).

Statistical comparisons from RNA sequencing data were performed using the method proposed by Love et al. [44] implemented in the DESeq2 Bioconductor library (v1.6.3) (Bioconductor). Adjustments for multiple testing was performed with the Benjamini and Hochberg method [45]. Functional annotation of the upregulated and downregulated gene sets was performed by Gene Set Enrichment Analysis (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>), as described in Subramanian et al. [46]. Complementary analyses were done using IPA® (Ingenuity Pathway Analysis) software (Qiagen).

For metabolomics analyses, a multivariate network-based method, the algorithm to determine expected metabolite level alterations using mutual information (ADEMA), was used to statistically assess the changes in metabolite concentrations for all samples. We determined the relevant metabolites and grouped them using the metabolic network topology provided in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [47,48] and the metabolic atlas by Selway et al [49]. The data set of the cell analyses was exported and analyzed into SIMCA P (version 13.0.3, Umetrics AB, Umea, Sweden) for a

PLS-DA analysis. Two measurements were reported for the PLS-DA model: $R^2Y > 0.7$ and $Q^2 > 0.5$ for predicting the quality of the spectra and repeatability, respectively.

5. Conclusions

Collectively, our results highlight the importance of developing the early-passage of concomitant MNL and NS culture under the deprivation of oxygen to preserve divergent but complementary genomic drivers and neural/glia markers observed in pHGGs. This study provides evidence that hypoxic environment contributes to the maintenance of the original patient tumor metabolism and features. This is the first study combining protein expression, genomic, metabolism, and functional data as complementary criteria for characterizing patient-derived models. This multi-step work can be considered as a standard to develop clinically relevant model that faithfully recapitulates the human disease in pHGGs.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/12/1875/s1>, Figure S1: Circos plots depicting genomic aberrations in patient tumors and the paired PDCLs, Figure S2: Neurosphere culture might more closely reflect the genomic profile and the lineage markers of high-grade gliomas, Figure S3: Significant copy number variations between patient-derived neurosphere and the paired-monolayer, Figure S4: Global metabolic profiles of the BT69 tumors (diagnosis and relapse) and the effect of oxygen deprivation in the corresponding cell line, Figure S5: Metabolism assessment in cell lines established from *H3.3-K28M*-mutated HGGs using ¹H-HRMAS NMR spectroscopy and RNA sequencing, Figure S6: Global metabolic profiles of the BT35 tumors (diagnosis and relapse) and the effect of oxygen deprivation in the corresponding cell line, Figure S7: HIF-1 α expression in normoxic and hypoxic cultures of patient-derived HGGs, Figure S8: Tumor development following intracranial xenografts of neurosphere-patient derived cell lines, Figure S9: Oxygen-mediated response of PDCLs to temozolomide.

Author Contributions: A.-F.B., M.D., D.G. and N.E.-W. designed research and wrote the manuscript. A.-F.B., A.D., M.L., A.T., E.R., A.O., I.L.R., and Q.F. completed the research. A.-F.B., N.E.-W., A.D., É.G., Q.F., A.O., C.K., P.V., and I.J.N. analyzed the data. N.E.-W., D.R., C.K., A.C., É.G., B.L., C.J., and Q.F. contributed to new protocols, algorithms, and/or samples. N.E.-W. initiated the PEDIAMODECAN program in 2010. All authors approved the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from Satt Conectus program, Fondation de l'Université de Strasbourg, "J'ai demandé la lune," "Une roulade pour Charline," "Franck Rayon de Soleil," and "Semeurs d'Etoile" associations. We are very thankful for this financial support and their help with this study.

Acknowledgments: We thank the children and families affected by HGGs for their contributions to this research and their support.

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

References

1. Bondy, M.L.; Scheurer, M.E.; Malmer, B.; Barnholtz-Sloan, J.S.; Davis, F.G.; Il'yasova, D.; Kruchko, C.; McCarthy, B.J.; Rajaraman, P.; Schwartzbaum, J.A.; et al. Brain tumor epidemiology: Consensus from the brain tumor epidemiology consortium. *Cancer* **2008**, *113*, 1953–1968. [[CrossRef](#)]
2. Grill, J.; Massimino, M.; Bouffet, E.; Azizi, A.A.; McCowage, G.; Cañete, A.; Saran, F.; Le Deley, M.C.; Varlet, P.; Morgan, P.S.; et al. Phase II, open-label, randomized, multicenter trial (HERBY) of bevacizumab in pediatric patients with newly diagnosed high-grade glioma. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 951–958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hoffman, L.M.; Veldhuijzen van Zanten, S.E.M.; Colditz, N.; Baugh, J.; Chaney, B.; Hoffmann, M.; Lane, A.; Fuller, C.; Miles, L.; Hawkins, C.; et al. 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. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 1963–1972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Bax, D.A.; Mackay, A.; Little, S.E.; Carvalho, D.; Viana-Pereira, M.; Tamber, N.; Grigoriadis, A.E.; Ashworth, A.; Reis, R.M.; Ellison, D.W.; et al. A distinct spectrum of copy number aberrations in paediatric high grade gliomas. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 3368–3377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Harttrampf, A.C.; Lacroix, L.; Deloger, M.; Deschamps, F.; Puget, S.; Auger, N.; Vielh, P.; Varlet, P.; Balogh, Z.; Abbou, S.; et al. Molecular screening for cancer treatment optimization (MOSCATO-01) in pediatric patients: A single-institutional prospective molecular stratification trial. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 6101–6112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Sahm, F.; Schrimpf, D.; Jones, D.T.W.; Meyer, J.; Kratz, A.; Reuss, D.; Capper, D.; Koelsche, C.; Korshunov, A.; Wiestler, B.; et al. Next-generation sequencing in routine brain tumor diagnostics enables an integrated diagnosis and identifies actionable targets. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 903–910. [[CrossRef](#)]
8. Mount, C.W.; Majzner, R.G.; Sundares, S.; Arnold, E.P.; Kadapakkam, M.; Haile, S.; Hulleman, E.; Woo, P.J.; Rietberg, S.P.; Vogel, H.; et al. Potent antitumor efficacy of anti-GD2 CAR T-cells in H3K27M+ diffuse midline gliomas. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 572–579. [[CrossRef](#)]
9. Plessier, A.; Le Dret, L.; Varlet, P.; Beccaria, K.; Lacombe, J.; Mériaux, S.; Geffroy, F.; Fiette, L.; Flamant, P.; Chrétien, F.; et al. New in vivo avatars of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) from stereotactic biopsies performed at diagnosis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 52543. [[CrossRef](#)]
10. Blandin, A.F.; Noulet, F.; Renner, G.; Mercier, M.C.; Choulier, L.; Vauchelles, R.; Ronde, P.; Carreiras, F.; Etienne-Selloum, N.; Vereb, G.; et al. Glioma cell dispersion is driven by $\alpha 5$ integrin-mediated cell–matrix and cell–cell interactions. *Cancer Lett.* **2016**, *376*, 328–338. [[CrossRef](#)]
11. Gencoglu, M.F.; Barney, L.E.; Hall, C.L.; Brooks, E.A.; Schwartz, A.D.; Corbett, D.C.; Stevens, K.R.; Peyton, S.R. Comparative study of multicellular tumor spheroid formation methods and implications for drug screening. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4*, 410–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Hubert, C.G.; Rivera, M.; Spangler, L.C.; Wu, Q.; Mack, S.C.; Prager, B.C.; Couce, M.; McLendon, R.E.; Sloan, A.E.; Rich, J.N. A three-dimensional organoid culture system derived from human glioblastomas recapitulates the hypoxic gradients and cancer stem cell heterogeneity of tumors found in vivo. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 2465–2477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Grasso, C.S.; Tang, Y.; Truffaux, N.; Berlow, N.E.; Liu, L.; Debily, M.A.; Quist, M.J.; Davis, L.E.; Huang, E.C.; Woo, P.J.; et al. Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 555–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hennika, T.; Hu, G.; Olaciregui, N.G.; Barton, K.L.; Ehteda, A.; Chitranjan, A.; Gifford, A.J.; Tsoli, M.; Ziegler, D.S.; Carcaboso, A.M.; et al. Pre-clinical study of panobinostat in xenograft and genetically engineered murine diffuse intrinsic pontine glioma models. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Taylor, K.R.; Mackay, A.; Truffaux, N.; Butterfield, Y.; Morozova, O.; Philippe, C.; Castel, D.; Grasso, C.S.; Vinci, M.; Carvalho, D.; et al. Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 457–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Filbin, M.G.; Tirosh, I.; Hovestadt, V.; Shaw, M.L.; Escalante, L.E.; Mathewson, N.D.; Neftel, C.; Frank, N.; Pelton, K.; Hebert, C.M.; et al. Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq. *Science* **2018**, *360*, 331–335. [[CrossRef](#)]
17. Gomez-Roman, N.; Stevenson, K.; Gilmour, L.; Hamilton, G.; Chalmers, A.J. A novel 3D human glioblastoma cell culture system for modeling drug and radiation responses. *Neuro-Oncology* **2017**, *19*, 229–241. [[CrossRef](#)]
18. Meel, M.H.; Sewing, A.C.P.; Waranecki, P.; Metselaar, D.S.; Wedekind, L.E.; Koster, J.; van Vuurden, D.G.; Kaspers, G.J.L.; Hulleman, E. Culture methods of diffuse intrinsic pontine glioma cells determine response to targeted therapies. *Exp. Cell Res.* **2017**, *360*, 397–403. [[CrossRef](#)]
19. Vinci, M.; Burford, A.; Molinari, V.; Kessler, K.; Popov, S.; Clarke, M.; Taylor, K.R.; Pemberton, H.N.; Lord, C.J.; Gutteridge, A.; et al. Functional diversity and cooperativity between subclonal populations of pediatric glioblastoma and diffuse intrinsic pontine glioma cells. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1204–1215. [[CrossRef](#)]
20. Wang, X.; Prager, B.C.; Wu, Q.; Kim, L.J.Y.; Gimple, R.C.; Shi, Y.; Yang, K.; Morton, A.R.; Zhou, W.; Zhu, Z.; et al. Reciprocal signaling between glioblastoma stem cells and differentiated tumor cells promotes malignant progression. *Cell Stem Cell* **2018**, *22*, 514–528. [[CrossRef](#)]
21. Brahimi-Horn, M.C.; Pouysegur, J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3582–3591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Lal, A.; Lash, A.E.; Altschul, S.F.; Velculescu, V.; Zhang, L.; McLendon, R.E.; Marra, M.A.; Prange, C.; Morin, P.J.; Polyak, K.; et al. A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 5403–5407. [[PubMed](#)]

23. Schneider, T.; Osl, F.; Friess, T.; Stockinger, H.; Scheuer, W.V. Quantification of human Alu sequences by real-time PCR—an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants. *Clin. Exp. Metastasis* **2002**, *19*, 571–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chang, C.-H.; Liu, W.-T.; Hung, H.-C.; Gean, C.-Y.; Tsai, H.-M.; Su, C.-L.; Gean, P.W. Synergistic inhibition of tumor growth by combination treatment with drugs against different subpopulations of glioblastoma cells. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Carreau, A.; Hafny-Rahbi, B.E.; Matejuk, A.; Grillon, C.; Kieda, C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J. Cell Mol. Med.* **2011**, *15*, 1239–1253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Nguyen, A.; Moussalieh, F.M.; Mackay, A.; Cicek, A.E.; Coca, A.; Chenard, M.P.; Weingertner, N.; Lhermitte, B.; Letouzé, E.; Guérin, E.; et al. Characterization of the Transcriptional and Metabolic Responses of Pediatric High Grade Gliomas to mTOR-HIF-1 α Axis Inhibition. Available online: [http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=16500&pubmed-linkout=1](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=16500&pubmed-linkout=1) (accessed on 19 June 2017).
27. Grande, S.; Palma, A.; Ricci-Vitiani, L.; Luciani, A.M.; Buccarelli, M.; Biffoni, M.; Molinari, A.; Calcabrini, A.; D’Amore, E.; Guidoni, L.; et al. Metabolic Heterogeneity Evidenced by MRS Among Patient-Derived Glioblastoma Multiforme Stem-Like Cells Accounts for Cell Clustering and Different Responses to Drugs. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5835274/> (accessed on 4 April 2018).
28. Zhao, H.; Heimberger, A.B.; Lu, Z.; Wu, X.; Hodges, T.R.; Song, R.; Shen, J. Metabolomics profiling in plasma samples from glioma patients correlates with tumor phenotypes. *Oncotarget* **2016**, *7*, 20486–20495. [[CrossRef](#)]
29. Maudsley, A.A.; Gupta, R.K.; Stoyanova, R.; Parra, N.A.; Roy, B.; Sherif, S.; Hussain, N.; Behari, S. Mapping of glycine distributions in Gliomas. *Am. J. Neuroradiol.* **2014**, *35*, S31–S36. [[CrossRef](#)]
30. Chinnaiyan, P.; Kensicki, E.; Bloom, G.; Prabhu, A.; Sarcar, B.; Kahali, S.; Eschrich, S.; Qu, X.; Forsyth, P.; Gillies, R. The metabolomic signature of malignant glioma reflects accelerated anabolic metabolism. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 5878–5888. [[CrossRef](#)]
31. Wenger, A.; Larsson, S.; Danielsson, A.; Elbæk, K.J.; Kettunen, P.; Tisell, M.; Sabel, M.; Lannering, B.; Nordborg, C.; Schepke, E.; et al. Stem cell cultures derived from pediatric brain tumors accurately model the originating tumors. *Oncotarget* **2017**, *8*, 18626–18639. [[CrossRef](#)]
32. Rahman, M.; Reyner, K.; Deleyrolle, L.; Millette, S.; Azari, H.; Day, B.W.; Stringer, B.W.; Boyd, A.W.; Johns, T.G.; Blot, V.; et al. Neurosphere and adherent culture conditions are equivalent for malignant glioma stem cell lines. *Anat. Cell Biol.* **2015**, *48*, 25–35. [[CrossRef](#)]
33. Bradshaw, A.; Wickremsekera, A.; Tan, S.T.; Peng, L.; Davis, P.F.; Itinteang, T. Cancer stem cell hierarchy in glioblastoma multiforme. *Front. Surg.* **2016**, *3*, 21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zhao, X.; Zhao, Y.-J.; Lin, Q.; Yu, L.; Liu, Z.; Lindsay, H.; Kogiso, M.; Rao, P.; Li, X.N.; Lu, X. Cytogenetic landscape of paired neurospheres and traditional monolayer cultures in pediatric malignant brain tumors. *Neuro-Oncology* **2015**, *17*, 965–977. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mack, S.C.; Hubert, C.G.; Miller, T.E.; Taylor, M.D.; Rich, J.N. An epigenetic gateway to brain tumor cell identity. *Nat. Neurosci.* **2016**, *19*, 10–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Schneider, M.; Ströbele, S.; Nonnenmacher, L.; Siegelin, M.D.; Tepper, M.; Stroh, S.; Hasslacher, S.; Enzenmüller, S.; Strauss, G.; Baumann, B.; et al. A paired comparison between glioblastoma “stem cells” and differentiated cells. *Int. J. Cancer* **2016**, *138*, 1709–1718. [[CrossRef](#)]
37. Chassot, A.; Canale, S.; Varlet, P.; Puget, S.; Roujeau, T.; Negretti, L.; Dhermain, F.; Rialland, X.; Raquin, M.A.; Grill, J.; et al. Radiotherapy with concurrent and adjuvant temozolomide in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma. *J. Neuro Oncol.* **2012**, *106*, 399–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Moussalieh, F.-M.; Elbayed, K.; Chanson, J.; Rudolf, G.; Piotto, M.; De Seze, J.; Namer, I.J. Serum analysis by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy: A new tool for distinguishing neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* **2014**, *20*, 558–565. [[CrossRef](#)]
39. Kim, D.; Perteau, G.; Trapnell, C.; Pimentel, H.; Kelley, R.; Salzberg, S.L. TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **2013**, *14*, R36. [[CrossRef](#)]
40. Anders, S.; Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **2010**, *11*, R106. [[CrossRef](#)]

41. Langmead, B.; Salzberg, S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*. **2012**, *9*, 357–359. [[CrossRef](#)]
42. Zerbino, D.R.; Achuthan, P.; Akanni, W.; Amode, M.R.; Barrell, D.; Bhai, J.; Billis, K.; Cummins, C.; Gall, A.; Irón, C.G.; et al. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D754–D761. [[CrossRef](#)]
43. Anders, S.; Pyl, P.T.; Huber, W. HTSeq - A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. **2015**, *31*, 166–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-seq Data with DESeq2. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4302049/> (accessed on 5 December 2014).
45. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **1995**, *57*, 289–300. [[CrossRef](#)]
46. Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V.K.; Mukherjee, S.; Ebert, B.L.; Gillette, M.A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S.L.; Golub, T.R.; Lander, E.S.; et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15545–15550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kanehisa, M.; Goto, S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 27–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Kanehisa, M.; Goto, S.; Sato, Y.; Kawashima, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M. Data, information, knowledge and principle: Back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D199–D205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Selway, J.G. *Metabolism at a Glance*, 3rd ed.; Blackwell Publishing: Malden, MI, USA, 2014.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Annexe 2

Article scientifique publié dans Cancers

**A DNA Repair and Cell Cycle Gene Expression Signature in
Pediatric High-Grade Gliomas: Prognostic and Therapeutic Value**

Article

A DNA Repair and Cell Cycle Gene Expression Signature in Pediatric High-Grade Gliomas: Prognostic and Therapeutic Value

Natacha Entz-Werlé ^{1,2,*}, Laetitia Poidevin ³, Petr V. Nazarov ⁴, Olivier Poch ³, Benoit Lhermitte ⁵, Marie Pierre Chenard ^{5,6}, Hélène Burckel ⁷, Eric Guérin ⁸, Quentin Fuchs ¹, David Castel ⁹, Georges Noel ⁷, Laurence Choulier ¹, Monique Dontenwill ¹ and Eric Van Dyck ^{10,*}



Citation: Entz-Werlé, N.; Poidevin, L.; Nazarov, P.V.; Poch, O.; Lhermitte, B.; Chenard, M.P.; Burckel, H.; Guérin, E.; Fuchs, Q.; Castel, D.; et al. A DNA Repair and Cell Cycle Gene Expression Signature in Pediatric High-Grade Gliomas: Prognostic and Therapeutic Value. *Cancers* **2021**, *13*, 2252. <https://doi.org/10.3390/cancers13092252>

Academic Editor: Felice Giangaspero

Received: 1 March 2021

Accepted: 30 April 2021

Published: 7 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright:   2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ UMR CNRS 7021, Laboratory Bioimaging and Pathologies, Tumoral Signaling and Therapeutic Targets, Faculty of Pharmacy, 67401 Illkirch, France; quentin.fuchs2@etu.unistra.fr (Q.F.); laurence.choulier@unistra.fr (L.C.); monique.dontenwill@unistra.fr (M.D.)
- ² Pediatric Onco-Hematology Unit, University Hospital of Strasbourg, 67098 Strasbourg, France
- ³ ICube-UMR7357, CSTB, Centre de Recherche en Biom edecine de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France; lpoidevin@unistra.fr (L.P.); olivier.poch@unistra.fr (O.P.)
- ⁴ Multiomics Data Science Research Group, Quantitative Biology Unit, Department of Oncology and Bioinformatics Platform, Luxembourg Institute of Health, L-1445 Luxembourg, Luxembourg; petr.nazarov@lih.lu
- ⁵ Pathology Department, University Hospital of Strasbourg, 67098 Strasbourg, France; benoit.lhermitte@chru-strasbourg.fr (B.L.); Marie-Pierrette.Chenard@chru-strasbourg.fr (M.P.C.)
- ⁶ Centre de Ressources Biologiques, University Hospital of Strasbourg, 67098 Strasbourg, France
- ⁷ Paul Strauss Comprehensive Cancer Center, Radiobiology Laboratory, ICANS (Institut de Canc erologie Strasbourg Europe), University of Strasbourg, Unicancer, 67200 Strasbourg, France; h.burckel@icans.eu (H.B.); g.noel@icans.eu (G.N.)
- ⁸ Oncobiology Platform, Laboratory of Biochemistry, University Hospital of Strasbourg, 67098 Strasbourg, France; Eric.guerin@chru-strasbourg.fr
- ⁹ Team Genomics & Oncogenesis of Pediatric Brain Tumors, Inserm U981, Gustave Roussy Institute, 94805 Villejuif, France; david.castel@gustaveroussy.fr
- ¹⁰ DNA Repair and Chemoresistance, Department of Oncology, Luxembourg Institute of Health, L-1526 Luxembourg, Luxembourg
- * Correspondence: Natacha.entz-werle@chru-strasbourg.fr (N.E.-W.); Eric.VanDyck@lih.lu (E.V.D.); Tel.: +33-3-88-12-83-96 (N.E.-W.); +352-26970-239 (E.V.D.)

Simple Summary: Pediatric high-grade gliomas are incurable brain tumors for which there is a critical need for new therapeutic strategies as well as treatment-predictive biomarkers. This study examined the expression of DNA repair and cell cycle genes in pediatric high-grade gliomas with distinct driving mutations. The aim is to propose a novel classification of these tumors based on sub-groups exposing therapeutic vulnerabilities. Several DNA repair factors were identified that might become new diagnostic markers.

Abstract: Background: Pediatric high-grade gliomas (pHGGs) are the leading cause of mortality in pediatric neuro-oncology, displaying frequent resistance to standard therapies. Profiling DNA repair and cell cycle gene expression has recently been proposed as a strategy to classify adult glioblastomas. To improve our understanding of the DNA damage response pathways that operate in pHGGs and the vulnerabilities that these pathways might expose, we sought to identify and characterize a specific DNA repair and cell-cycle gene expression signature of pHGGs. Methods: Transcriptomic analyses were performed to identify a DNA repair and cell-cycle gene expression signature able to discriminate pHGGs (n = 6) from low-grade gliomas (n = 10). This signature was compared to related signatures already established. We used the pHGG signature to explore already transcriptomic datasets of DIPGs and sus-tentorial pHGGs. Finally, we examined the expression of key proteins of the pHGG signature in 21 pHGG diagnostic samples and nine paired relapses. Functional inhibition of one DNA repair factor was carried out in four patients who derived H3.3 K27M mutant cell lines. Results: We identified a 28-gene expression signature of DNA repair and cell cycle that clustered pHGGs cohorts, in particular sus-tentorial locations, in two groups. Differential protein expression levels of PARP1 and XRCC1

were associated to *TP53* mutations and *TOP2A* amplification and linked significantly to the more radioresistant pHGGs displaying the worst outcome. Using patient-derived cell lines, we showed that the PARP-1/XRCC1 expression balance might be correlated with resistance to PARP1 inhibition. Conclusion: We provide evidence that PARP1 overexpression, associated to XRCC1 expression, *TP53* mutations, and *TOP2A* amplification, is a new theranostic and potential therapeutic target.

Keywords: pediatric high-grade gliomas; DNA damage repair; prognostic clustering; PARP1; XRCC1

1. Introduction

Despite their low incidence, pediatric high-grade gliomas (pHGGs), including diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPGs), are the leading cause of mortality in pediatric neuro-oncology. Resistance to standard therapies is a frequent occurrence in pHGGs [1–3]. Recurrent, mutually exclusive mutations affecting K27 (K27M) and G34 (G34R/V) in the N-terminal tail of histones H3.3 and H3.1 act as key biological drivers of pHGGs. These mutations lead to distinct epigenetic reprogramming, telomere maintenance mechanisms, and oncogenesis scenarios, resulting in distinct subgroups of patients characterized by differences in tumor localization, clinical outcome, as well as concurrent epigenetic and genetic alterations [4]. However, contrasting with our understanding of the molecular biology of pHGGs, there has been little improvement in the treatment of pHGGs, for which genotoxic chemotherapy and ionizing radiation (IR) remain mainstays of therapy [1–3,5]. In supratentorial locations, radiotherapy follows surgical resection, which tends to be extensive, and is associated at least with DNA alkylating agents like temozolomide (TMZ) [6]. In thalamic pHGGs and DIPG, targeted therapies are nowadays proposed concomitantly to irradiation and prolonged until progression [1–3,5,7]. Preventing resistance to chemoradiation through the targeting of the underlying pathways is crucial to improve the efficiency of the current treatments. Tumor resistance to irradiation and DNA alkylating agents are promoted in part by complex DNA repair mechanisms orchestrated by the DNA damage response (DDR). These include O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) which removes O⁶-methylguanine (O⁶-meG), the most cytotoxic lesion induced by TMZ, in a direct, suicidal reaction resulting in the transfer of the methyl group to a cysteine residue in the active site of MGMT [8]. Unrepaired O⁶-meG lesions ultimately lead to replication fork collapse and double-stranded DNA breaks (DSBs). As in adult glioblastoma (aGBM) [9], MGMT expression is a crucial biomarker of response to TMZ in pHGG patients [10]. Other DNA repair mechanisms include direct repair mechanisms mediated by the oxidative demethylases ALKBH2/3, as well as the base excision repair (BER) pathway, the mismatch repair (MMR) pathway, and pathways that repair DSBs by homologous recombination (HR) or non-homologous end-joining (NHEJ). These pathways are paramount to preserve genetic integrity and cell survival [11–13]. Thus, a hypermutator phenotype resulting from mutations in DNA polymerase genes and defective MMR was found to act as a driving force in a subset of pHGGs [14,15]. MMR defects were also observed following treatment of adult and pediatric HGGs displaying specific gene promoter methylation patterns [16]. Recent studies have associated alterations in DNA damage (DD) repair control with histones and/or p53 mutations. Histone post-translational modifications (PTMs) constitute an important epigenetic determinant of the structure and function of chromatin. Such histone PTMs appear to modulate the DDR [17]. In H3.3 K27M DIPG, radioresistance was found to be driven by *TP53* mutations and could be prevented by RNAi-mediated depletion of the serine/threonine-protein kinase CHK1 required for checkpoint-mediated cell cycle arrest and activation of DNA repair in response to DD or unrepaired DNA [18]. In those DIPG, histone H3 demethylase inhibition using GSK-14 enhanced the efficiency of IR by inhibiting DSB repair by HR [19]. In contrast, H3.3 G34 mutants were found to display increased genomic instability and replicative stress, as well as a defective HR-mediated repair [20,21]. In aGBM, a novel classification was recently achieved using unique DNA

repair and cell cycle gene expression signatures exposing vulnerabilities to DNA damaging agents and inhibitors of the DNA damage response [22]. The evidence therefore suggests that targeting DD repair components might contribute to the prevention of therapeutic resistance while offering new therapeutic approaches against pHGGs.

Here, to improve our understanding of the DDR pathways that operate in pHGGs and the vulnerabilities that these pathways might expose, we first challenged gene expression datasets from pHGG cohorts, including DIPG and sus-tentorial tumors, with the DNA repair and cell cycle gene expression signatures initially identified in aGBMs [23]. Through comparison with low-grade pilocytic astrocytomas (LGG), we next identified a novel and specific DNA repair and cell cycle gene expression signature of 28 genes (hereafter referred to as the pHGG signature) that segregated pHGGs from LGGs. Notably, this signature shared key components of the DDR with the aGBM signature. Analysis of selected genes of the pHGG signature at the gene and protein expression levels revealed its correlation to *TP53* mutation and highlighted high PARP1 and XRCC1 protein expressions as immunohistochemical theranostic biomarkers of worst therapeutic response in pHGGs. Finally, we used primary patient-derived cell lines to correlate the PARP-1/XRCC1 expression balance with resistance to PARP1 inhibition.

2. Materials and Methods

2.1. Pediatric High-Grade Gliomas' Collection

Twenty-one pHGGs (3 DIPGs, 8 supra-tentorial, and 10 thalamic locations) were collected and included in the study after obtaining written informed consents from parents and patients. Aged from 7 to 19 years, pHGGs were followed from January 2008 to January 2016 at the University Hospital of Strasbourg (UHS). The research protocol was validated by the local institutional ethics committee. They were all screened by Next-Generation Sequencing (NGS) for driver mutations including H3.3 and H3.1 *K27M*, H3.3 *G34V/R*, *IDH1R132H*, and *BRAFv600* mutations as already described [19]. We also explored *TP53* mutations, as well as *PARP1* and *TOP2A* amplifications. Fresh-frozen and paraffin-embedded specimens were obtained from the Centre de Ressources Biologiques of UHS (declaration number DC-2017-3090). MMR deficient patients and gliomatosis cerebri were not included in this cohort. We used formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) specimens for the tissue-microarray (TMA) construction comprising the 21 diagnostic samples and 9 paired relapses. Six out of the 21 fresh frozen diagnostic tissues were provided for transcriptomic analyses. Ten pilocytic astrocytomas (PAs) treated in our Strasbourg's center were also selected for omics comparison. All pHGG patients were treated in first line therapy with IR, which was systematically associated to temozolomide except for DIPGs.

For the statistical analyses, we defined 3 classes in our 21-pHGG population, based on the clinical evolution of patients: (1) group 1 comprised patients with a very early relapse, where the progression/relapse was observed within 5 months of diagnosis in DIPG and within 9 months in thalamic and sus-tentorial locations, (2) group 2 comprised patients where the progression/relapse occurred after 6 or 9 months depending on the same respective locations, and (3) group 3 comprised patients with a long-term survival above 36 months.

2.2. Patient-Derived Cell Lines (PDCL) Generation

As already described in our previous publication [23], we generated different cell lines from patient biopsies at diagnosis. All lines (BT35, BT69, BT68, and BT83) harbor the H3.3 *K27M* mutation and were derived from 2 thalamic pHGGs and 2 DIPGs, respectively. BT68 and BT69 are cultures as neurospheres and BT35 and BT83 as a monolayer cell line. We also used a commercialized cell line, which is UW479.

2.3. Transcriptomics and Biostatistical Analyses

Total RNA was prepared from the 6 pHGG diagnostic samples, 10 Pas, and 4 PDCLs using Trizol reagent (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). RNA concentrations

were quantified on a NanoDrop™ 3300 fluorospectrometer (ThermoFischer scientific, Waltham, MA, USA). Gene expression analysis was performed using Affymetrix U133 Plus 2.0 chips. Data were read with the *affy* package and normalized with RMA. Gene expression was annotated with Ensembl genes from build 37 assembly 71. We also used already published DIPG and sus-tentorial pHGGs' RNA datasets [24,25].

Gene expression analyses were carried out in multiple steps. First, we performed hierarchical clustering on gene-scaled data using *heatmap* R package with Euclidian distance as a similarity measure. To predict the G1/G3 proliferation status of the pHGG samples, we first combined the aGBM dataset from the Köln cohort [22] (hereby called reference aGBM dataset) with each pHGG dataset, using *ComBat* from *sva* package [26] for batch correction. We then trained a random forest classifier on the G1 and G3 groups of the Köln dataset and verified that it reproduced the tumor classification of our aGBM dataset previously obtained [22]. Finally, we predicted groups for the combined dataset and visualized probabilities generated by a random forest. We compared the performance of our signatures using well-established gene signatures of cell cycle and DNA repair from MsigDB (Cell cycle GSEA (170 genes, https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/CELL_CYCLE_PHASE (accessed on 6 April 2021)), DNA repair GSEA (150 genes, https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/HALLMARK_DNA_REPAIR (accessed on 6 April 2021)), Reactome_DNA_repair GSEA (332 genes, https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/cards/REACTOME_DNA_REPAIR (accessed on 6 April 2021)), as well as the biological process terms "DNA repair" and "cell cycle" from Gene Ontology (GO). We also considered the union of cell cycle and DNA repair signatures as well as DDR-specific subsets included in cell cycle signatures. As an additional approach, we used unsupervised consensus independent component analysis (ICA). Here, the components are defined as statistically-independent signals in the space of genes, whose biological relevance can be assessed using standard functional annotation (e.g., enrichment analysis) [27]. ICA presents the advantage that it simultaneously corrects for confounding factors such as platform effect and disentangles cell type heterogeneity and intra/inter-tumor heterogeneity, thus resulting in clear biological signals. ICA requires larger datasets to be properly applied, therefore we combined presented data with publically available data from TCGA (GBM and LGG cohorts).

To identify a DNA repair and cell cycle gene expression signature of pHGG, a differential analysis was done between the 6 pHGGs of our patient collection and 10 pilocytic astrocytomas. First, principal component analysis (PCA) was performed to assess the consistency of the data. Then, a relative intensity analysis (pHGGs/pilocytic astrocytomas) was performed to obtain fold change (FC). Only genes with higher than 1.3 or lower than -1.3 were considered to have a significant difference. Finally, a gene ontology enrichment analysis was performed using Panther (PANTHER—Gene List Analysis (pantherdb.org)) to detect the underlying biological processes. The pHGG signature was challenged with the various pHGG and PDCL datasets using the analytic approaches described for the aGBM signatures.

2.4. TOP2A and PARP1 Gene Expression

Total RNA was prepared from the 21 pHGG specimens studied by IHC using the RNeasy Plus Universal Tissue Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). The mRNA expression levels of *TOP2A* and *PARP1* was then measured by quantitative RT-PCR using the SYBR Green Master I technology on a LightCycler (Roche, France). The results were expressed as $2^{-\Delta\text{Ct sample}} / 2^{-\Delta\text{Ct control}} = 2^{-(\Delta\text{Ct sample} - \Delta\text{Ct control})} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. *PBGD* (Cy5-labelled forward primer 5'-CTGGTAACGGCAATGCGGCT-3' and reverse primer 5'-GCAGATGGCTCCGATGGTGA-3' (amplified product of 328 bp on cDNA)) was used as reference gene [28] and a calibrating pool of normal brain tissue RNA (10 hippocampal scleroses) was used to assess the normal ranges of each gene expression. The primers were targeting mRNA of PARP-1 [29] and *TOP2A* (Cy5-labelled forward primer 5'-GCCATTGGCTGTGGTATTG-3' and *TOP2A* reverse primer 5'-GAGAAGCTTCTCGAACATTGAG-3').

2.5. TMA Constitution and Immunohistochemistry (IHC)

FFPE tumor samples from patients were gathered on a TMA block using a tissue arrayer (MTA BOOSTER 01 V2.04, Excilone, Elancourt, France) with 3 representative areas selected per tumor. IHC was performed using an automated tissue staining system (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). The APE1, MPG, XRCC11, RAD51, PARP1, and p53 antibodies were purchased from Abcam (Paris, France) and Ki67 from Dako (clone MIB-1, Dako, Santa Clara, CA, USA). Two pathologists analyzed protein expression independently.

2.6. Cell line Characterization, Drug Testing, and Irradiation

PDCL BT35, BT68, BT83, and BT69 were plated in 96-well flat bottom plates (5000 cells/well) in normoxic conditions at 21% of oxygen. Cell growth (% of occupied area) was imaged with an IncuCyte™ ZOOM cell imaging system (Essen BioScience, Ann Arbor, MI, USA) for 10 days and analyzed using the Incucyte Zoom software. Olaparib was used over a concentration range of 0.1 to 100 μ M. All drug testing experiments were done in duplicate.

2.7. IHC Statistical Analyses and Correlations with Outcome

The GraphPad Prism 7 software was used for box plots generation showing the mean \pm s.e.m. Comparisons between 2 groups were performed using the non-parametric Mann–Whitney test. Comparisons between the 3 groups of therapeutic response were done using the non-parametric Kruskal–Wallis test. Drug inhibition curves and a 50% inhibitory concentration (IC50) calculation were generated with the GraphPad software for all cell lines at 96 h.

SPSS 11.5 was used for Kaplan Meier survival analyses. A p -value of <0.05 was considered statistically significant and n.s. was reported for non-statistically significant results ($p > 0.05$). We also did a multivariate comparison of prognostic biomarkers using a Cox regression models.

A heatmap was generated using the Excel software with all tumor characteristics and protein expressions.

3. Results

3.1. Stratification of Pediatric High-Grade Glioma (pHGG) Using Adult Glioblastoma (aGBM) DNA Damage (DD) Repair Signature

We previously described unique DNA repair and cell cycle gene expression signatures that resulted in the classification of aGBM specimens into two major groups (G1 and G3) displaying inverse expression profiles, and a third less-defined group (G2). Specifically, we originally identified a 52-gene signature that could be refined into a 27-gene signature able to reproduce the initial classification (Figure S1). Of note, our 27-gene signature contained important effectors and regulators of the cell cycle, chromosome segregation, and mitosis (e.g., AURKA, AURKB, CCNA2, CCNB1, CDC25C, CDC6, CDK1, CENPA, CENPE, MKI67, KIAA0101/PCLAF, PLK1, PTTG1, TOP2A), all up-regulated in G3 specimens compared to G1 specimens. It also contained genes encoding crucial HR factors such as the RAD51 recombinase, the chromatin remodelers RAD54B and RAD54L, and enzymes involved in Holliday junction resolution (EME1/MUS81 complex) and/or NER (ERCC3 (XPB), ERCC4 (XPF)). Also in the signature were genes encoding the DNA glycosylase NEIL3, Fanconi Anemia factors (FANCD2, UBE2T), the ubiquitin protein ligase UBE3B, and two specialized DNA polymerases, POLM and POLQ, involved in the non-homologous end-joining (NHEJ) pathways of DSB repair. Consistent with the upregulation of the cell cycle gene component of the 27-gene signature, G3 tumors were highly proliferative compared to G1 tumors. Furthermore, Gene Ontology (GO) analysis of the biological processes that distinguished the G1 and G3 groups indicated that G3 group tumors developed cellular programs to sustain high proliferation (e.g., cell cycle and cell division, chromosome organization and segregation, DNA replication and repair, chromatin assembly). In contrast, G1 tumors

engaged critical survival processes (e.g., apoptosis and autophagy, cellular adhesion, response to stress).

As a first step to investigate whether our signatures could shed new light in the classification of pHGGs, we studied a minimal set of six pHGG patients composed of wild-type (*wt*) or H3.3 K27M thalamic tumors, as well as *wt* or *BRAFv600e* mutated frontal tumors. To this end, and with the goal of exploiting as much as information as possible, we used the 52-gene signature. Indeed, this signature is composed of two components of similar size displaying co- or anti-expression regulation, respectively, in the G1 and G3 groups. As shown in Figure 1A, we observed clusters of samples displaying different profiles of our 52-gene signature. We next predicted the G1/G2/G3 status of the pHGG specimens following combination of the pHGG dataset with our reference aGBM dataset and Random Forest analysis. Our signature predicted robustly pHGG specimens with G1 or G3 status as well as less-defined tumors (G2) (Figure 1B,C). However, no correlation could be established between this status and the H3.3/BRAF mutational status as G1 tumors comprised *wt* thalamic ($n = 1$) or frontal mutated BRAF ($n = 1$), while G3 tumors were *wt* frontal ($n = 2$) or thalamic mutated H3.3 ($n = 1$) (Figure 1C). With the caveat that this is a small dataset, these observations suggest that the 52-gene expression signature established in aGBMs can indeed capture features related to cell cycle and DNA repair in pHGG tumors. However, the observed segregation does not correlate with underlying driver mutations affecting histones or BRAF, neither with treatment response groups as defined in Section 2.1.

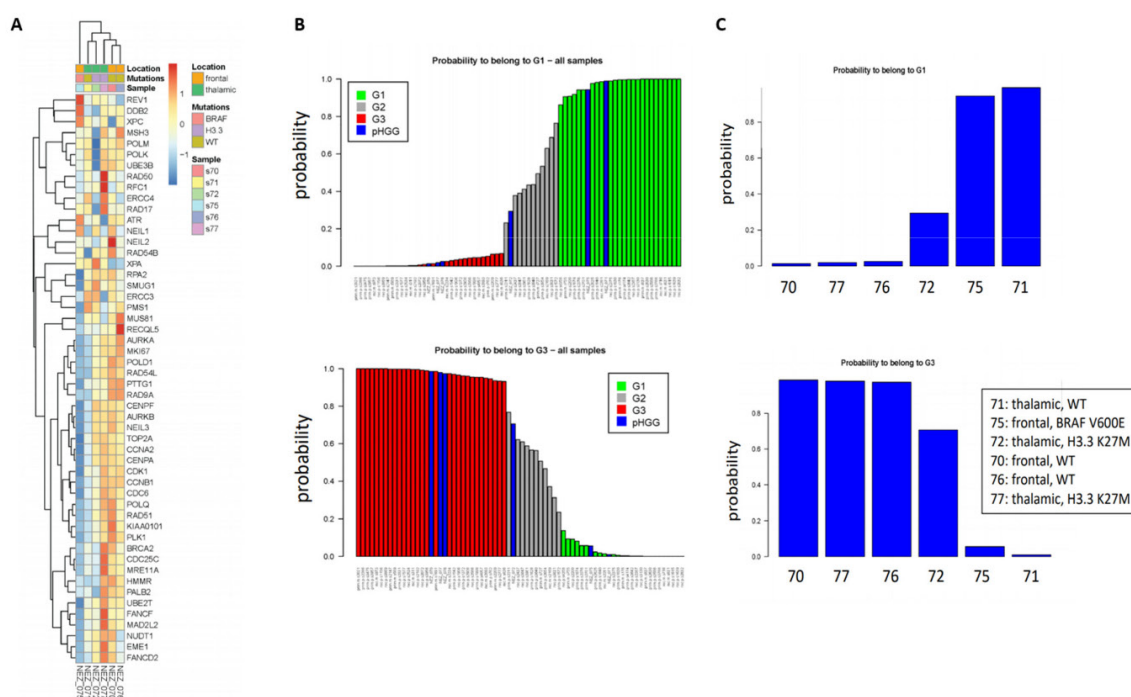


Figure 1. Clustering of pHGG (pediatric high-grade gliomas) using aGBM (adult glioblastoma) DNA repair and cell cycle gene expression signatures. **(A)** Segregation of the indicated pHGG specimens obtained with the 52 gene signature of aGBMs. **(B,C)** Prediction of the proliferation status of the pHGG specimens following random forest analysis using the “Köln” cohort of aGBMs of Gobin et al. [22] as training dataset. Green and red bars indicate G1 (less proliferative) and G3 (more proliferative) aGBM samples, respectively. These groups display opposite profiles of the gene expression signature. Grey bars indicate undefined tumors, referred to as G2 in Gobin et al. Following combination with the training dataset **(B)**, the probability of each pHGG specimens (indicated by blue bars) to belong to the G1 or G3 group was assessed **(C)**.

We next considered a cohort of DIPG specimens with either H3.1 *K27M* or H3.3 *K27M* mutations [24]. As seen with the previous small pHGG cohort, Random Forest analysis identified G1, G2, and G3 specimens (Figure 2A). However, H3.1 and H3.3 mutant tumors could not be segregated into two separate groups based on our DNA repair and cell cycle gene expression signature (Figure 2B, see also Figure S2A for a heatmap based on the aGBM signature). This observation suggests that the H3.1/H3.3 mutant status is not a determinant of this classification and that the impact of the *K27M* mutation on cell cycle and DNA repair might be similar irrespective of the nature of the histone that carries it (H3.1 or H3.3). To ascertain this notion, we verified that well-characterized signatures of cell cycle and/or DNA repair (see Section 2.3 of Materials and Methods for a description) also failed to distinguish H3.1 from H3.3 mutant tumors (data not shown). We then used ICA. We first combined the H3.1/H3.3 dataset with a TCGA dataset comprising adult GBM (171 samples) and low-grade gliomas (LGGs, 530 samples) to allow a sample size affording robust analysis. We then examined the ability of the “cell cycle component” of ICA to segregate H3.1 and H3.3 tumors into separate groups. However, confirming our previous approaches, no segregation of mutant H3.1 and H3.3 specimens was observed (Figure S2B,C).

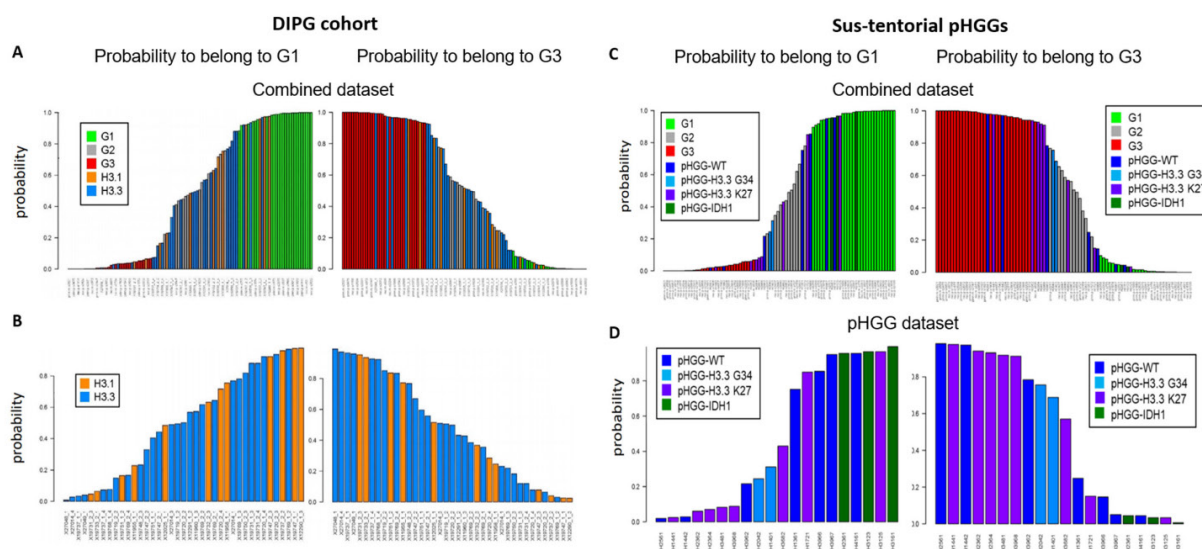


Figure 2. Group prediction in larger cohorts of pHGG using adult DD repair and cell cycle signature. Prediction of the G1, G2, and G3 status of the indicated specimens from a cohort of DIPG (A,B) or sus-tentorial pHGGs (C,D). Predictions were obtained by random forest analysis using the Köln cohort of aGBMs as training dataset, as in Figure 1.

We next characterized a cohort of 20 specimens comprising sus-tentorial or thalamic tumors [25]. This pHGG group includes wt pHGGs ($n = 7$), as well as tumors harboring H3.3 *G34R* ($n = 2$), H3.3 *K27M* ($n = 8$), or mutant *IDH1* ($n = 3$). Again, we were able to assign a G1 or G3 status to most tumors while also identifying less-defined tumors (Figure 2C). Notably, all three *IDH1* mutant specimens were G1, whereas a majority of H3.3 *K27M* tumors were G3 (4/7) and the two H3.3 *G34R* tumors had an ill-defined G2 status (Figure 2D). However, wt tumors and to a certain extent H3.3 *K27M* tumors were distributed among the three groups. A heatmap illustrating the segregation of the sus-tentorial specimens based on the aGBM DNA repair and cell cycle gene expression signature is shown in Figure S3.

3.2. Stratification of Thalamic and Hemispheric pHGGs with a Pediatric Specific 28-Gene Expression Signature of DNA Repair and Cell Cycle

As the DNA repair and cell cycle gene expression signatures established in aGBM did not afford segregation of mutant H3.1 and H3.3 specimens, we next sought to determine whether a specific pHGG signature could be identified that afforded such segregation. As a first step to identify a signature of pHGGs, we compared transcriptomic datasets from pHGGs to that of a cohort of low-grade gliomas composed of pilocytic astrocytomas (PAs). Using PCA, we were able to segregate the two populations of tumors based on principal component 1 (PC1) (Figure 3A). Of note, the first two PCs accounted for approximately 45% of the total variance. PAs formed a more compact group than pHGGs, suggesting that the pHGG group was more heterogeneous, in line with the driver heterogeneity in such tumors and the phenotypic diversity. We next identified a list of 185 genes that displayed a 1.3-fold over-expression in pHGGs compared to PAs. GO enrichment analysis of this list revealed major statistical enrichments in GO modules corresponding to cell cycle and DDR processes. We noted the presence in this list of a set of 28 DNA repair and cell cycle genes, hereafter referred to as 28-DD repair genes (Figure 3B). Among this signature were genes involved in cell cycle (AURKA, CCNB1, CDC25C, CDC45, CDK1, CDKN3A, DTL, FOXM1, KIAA0101/PCLAF, MCM10, MCM4, PMAIP1, TOP2A, TRIP13), as well as genes bridging cell proliferation to DD response promotion (CHEK1, E2F7, E2F8, GSTE1), and key components of various DNA repair pathways (EXO1, RAD51, RAD51AP1, PARPBP, FANCI, FANCD2, UBE2T, BRIP1, NEIL3). Notably, this signature shared 10 genes with the aGBM signatures (AURKA, CCNB1, CDC24C, CDK1, KIAA0101/PCLAF, TOP 2A, RAD51, NEIL3, FANCD2, and UBE2T) (Figure 3C).

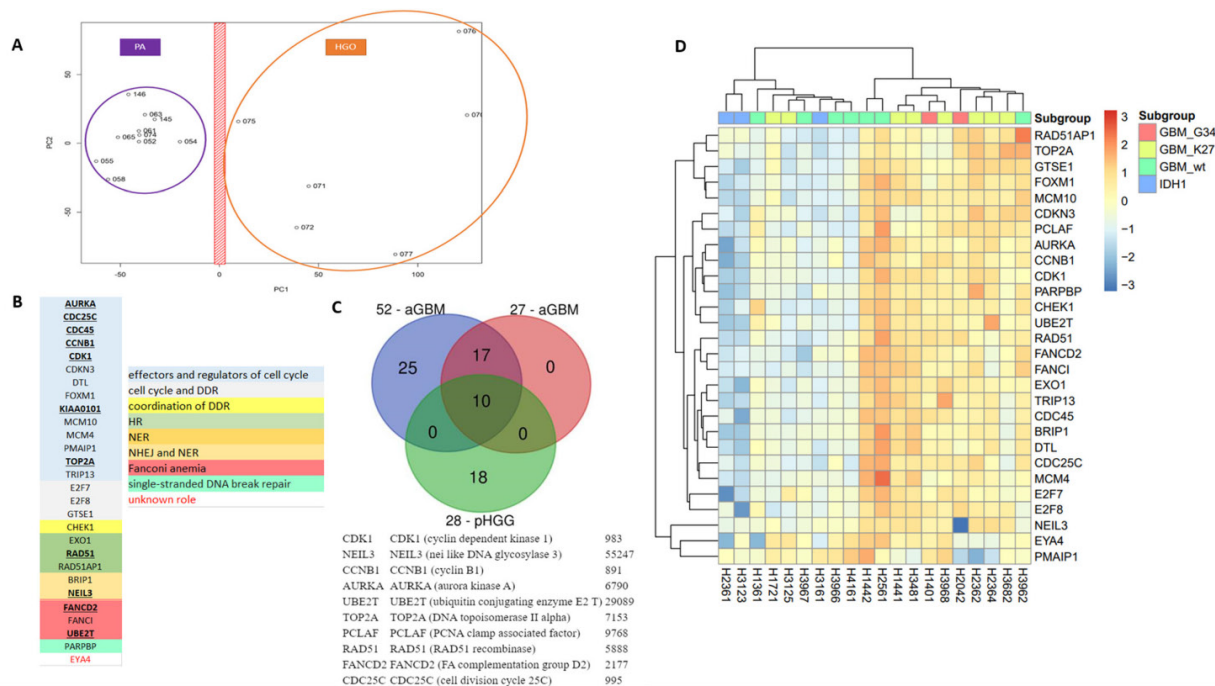


Figure 3. A specific 28-gene DNA repair and cell cycle gene expression signature distinguishes pHGGs from pediatric low-grade gliomas. (A) Principal component analysis score plot for pilocytic astrocytoma (PA) samples and pHGG specimens. (B) Identity and features of the 28 DNA repair and cell cycle genes composing the signature of pHGGs. Underlined genes are also present in the aGBM signatures of Gobin et al. (C) Venn diagram showing how the 28-gene pHGG signature overlaps with the 52- and 27-gene aGBM signatures, and list of the 10 genes shared by these signatures. (D) Heatmap illustrating the segregation of sus-tentorial pHGG specimens into 2 groups based on the pediatric DDR gene signature.

To validate the novel signature and evaluate its prognostic and therapeutic value, we then carried out hierarchical clustering in cohorts of sus-tentorial/thalamic or DIPG pHGGs described above. Importantly, as shown in the heatmap of Figure 3D, the 28-gene DDR repair signature clustered clearly the thalamic and hemispheric tumors in two groups characterized by the relative overexpression or downregulation of its gene components. These groups were reminiscent of the G3 (more proliferative) and G1 (less proliferative) groups identified with aGBM signature. Of note, the G3-like group comprised most of the hemispheric tumors with mutant H3.3 histone, whereas wild-type, *BRAF*, and *IDH1* mutated pHGGs were in the G1-like subgroup. Supporting its relevance for the classification of sus-tentorial/thalamic tumors, none of the well-characterized signatures of cell cycle and/or DNA repair described in Materials and Methods provided a better segregation pattern than our 28-gene signature, resulting instead in more heterogeneous grouping (data not shown). When the DIPG cohort was considered, the pHGG signature again identified G1-like and G3-like groups (this latter comprising a little more H3.3 K27M mutated tumors), as well as a third group of tumors displaying a less defined gene expression profile, reminiscent of the G2 group identified in aGBM (Figure S4).

3.3. DNA Repair Pathways Have a Prognostic Impact in pHGG

As our pHGG gene signature confirmed the predominant involvement of several DDR pathways in clustering groups of pHGGs, we set out to validate a selection of its components at the protein level, using the cohort of pHGGs described in Table 1, for which we also determined key molecular drivers. Based on time to relapse, we generated three subgroups of pHGGs comprising, respectively, 13 patients presenting a very early relapse, four patients presenting “standard” relapse times, and four patients considered as long-term survivors (above two years) (Figure 4A). The long-term survivors either bore the *BRAFv600e* mutation (one patient) or displayed LGG-like omic expression (three patients) (data not shown). This clinical subgrouping based on sensitivity to first line therapy was significantly linked to overall survivals (OS curves in Figure 4A, $p = 0.006$). Using TMA slides from this cohort, we analyzed the protein expression levels of components of the HR, BER, NHEJ, and DNA single-strand break (SSB) repair pathways (e.g., RAD51, MPG, XRCC1, APE1, and PARP1). We choose those markers as they are used in routine setting in pathology departments and were linked to the DNA repair pathways exposed in both pediatric and adult signatures. We also examined the proliferation marker KI67 and combined those analyses to *TP53* status, as well as *TOP2A* amplification. The clinical, protein, and molecular results obtained with this pHGG cohort are summarized in Figure 4A and Table 1.

Among DNA repair proteins, RAD51, MPG, and APE1 were consistently hyper-expressed in all pHGG tumors, both at diagnosis and relapse (Figure 4A,B). Statistically significant differences were observed when the expression levels of these three proteins were compared with that of XRCC1 and PARP1 (Figure 4B, $p = 0.001$ and $p = 0.006$, respectively). Representative immunostainings are presented in Figure S5. Notably, our analysis of XRCC1 and PARP1 suggested the existence of two groups of patients with low or high expression of these proteins. We then did comparative analyses using non-parametric Kruskal–Wallis tests (Figure 4C) to compare XRCC1 and PARP1 expression levels in the three subgroups of our cohort. Notably, PARP1 and XRCC1, as well as KI67, were significantly overexpressed in the subgroup displaying very early relapse and this high expression correlated with a worst OS (Figure 4C). Upregulation of PARP1 in this subgroup was also observed at the mRNA level, as assessed by RT-qPCR (data not shown). Of note, *TP53* mutation was present in 10/21 pHGGs and was significantly associated with a worst outcome and hyper-expression of XRCC1, MPG, KI67, and PARP1 (Figure 5A,B).

Table 1. Patients' clinical and theranostic characteristics.

Patients' Characteristics	Numbers
Age (years)	
mean	12.09
range	8–18
Sex	
female	12
male	9
DIPG	3
thalamic pHGG	10
sus-tentorial pHGG	8
frontal	3
parietal	4
occipital	1
Histone status	
<i>wild type (wt)</i>	8
<i>H3.3 K27M</i>	9
<i>H3.1 K27M</i>	2
<i>H3.3 G34V</i>	1
<i>BRAFv600e</i>	1
TP53 mutated tumors	10
Classification based on treatment response	
very early relapse (group1)	13
"standard" relapse (group 2)	4
long-term survivors (group 3)	4
EFS (event-free survival) (month)	
median	7
range	1–77
OS (overall survival) (months)	
median	18
range	1–102
Deceased	18
Alive	3

On the other hand, PARP1 protein expression was also correlated to *TOP2A* amplification ($p = 0.0392$) and high KI67 expression levels (upper 20%) in Figure 5B ($p = 0.001$). Furthermore, high PARP1 expression level (upper 50%) was the unique biomarker associated to histone mutated tumors (Figure 5B, $p = 0.0012$). Additionally, the presence of a *TOP2A* amplification was linked to a worst outcome (Figure 5C). Finally, in multivariate analyses, *TP53* mutation and PARP1 protein expression remained significant ($p = 0.0556$, HR: 0.64, CI95%: 0.320–0.855; $p = 0.014$, HR: 0.67, CI95%: 0.26–0.671).

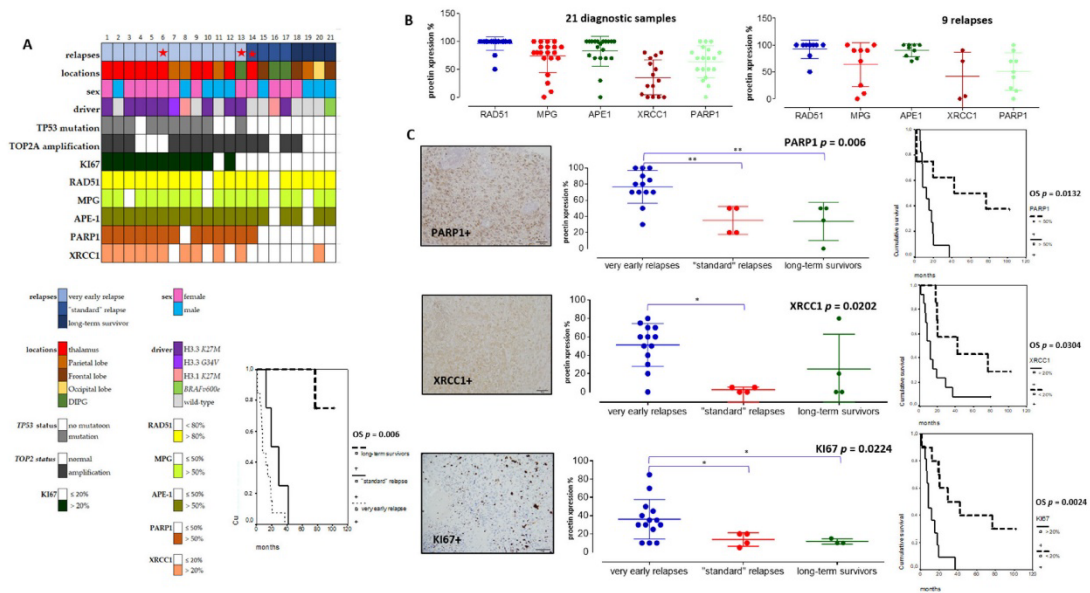


Figure 4. Immunohistochemical analyses in a tissue-microarray collection of 21 pHGGS and their significant correlations with relapses and overall survival (OS). (A) Heatmap of clinical, molecular, and protein expressions in the 21 pHGGS associated to a Kaplan Meier analysis of the overall survival discriminating the different subgroups (based on relapsing time). (B) Analyses of RAD51, MPG, APE1, XRCC1, and PARP1 protein expressions in 21 pHGGS diagnostic samples and 9 paired relapses. (C) Comparative analyses of PARP1, XRCC1, and KI67 expressions within each treatment response group, together with an example of their histological immunostaining and Kaplan Meier analyses illustrating their significant impact on overall survival (OS). * and ** signs are underlining statistical significances with a p below 0.05.

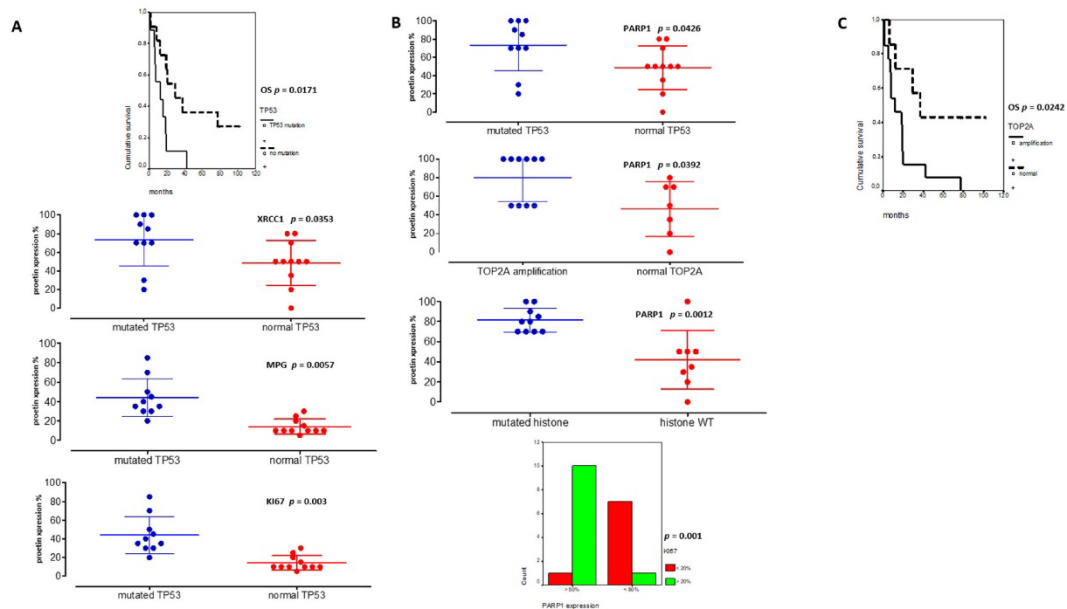


Figure 5. TP53 and PARP1 are major theranostic markers in pHGGS. (A) Significant associations between TP53 mutated pHGGS and DD repair protein hyper-expressions (%) (XRCC1, MPG and KI67) and their significant involvement on worst overall survival (OS). (B) Significant correlations between PARP1 hyper-expression and TP53 mutation, TOP2A amplification, histone mutations, and KI67 expression (above 20%). (C) Kaplan Meier curves reporting the significant impact of TOP2A amplification on pHGGS OS.

3.4. PARP1 as a Novel Theranostic and Therapeutic Target in Histone Mutated pHGGs

Our TMA analyses identified PARP1 and XRCC1 as theranostic markers linked to a worst outcome and a particularly de novo IR-resistant subgroup (displaying a very early relapsing time). As PARP1 overexpression was associated to histone mutated pHGGs, we next characterized four H3.3 K27M mutation-bearing PDCLs generated from tumor collection and a more recent diagnosis (BT83). The BT35, BT69, and BT68 PDCLs are indicated by a red star in the upper panel of Figure 4A. They were representative of PARP-expression groups 1 and 2. BT83 patient is part of group 1. A heatmap of the 4PDCL's RNA sequencing is presented in Figure 6A and is showing standardized profiles of the pHGG signature. BT83 is the cell line, where we have a majority of pHGG signature gene under-expression. Of note, all cell lines showed high PARP1 protein (Figure 4A or Figure 6B) and RNA expression levels (Figure 6C). In contrast, no correlation between mRNA and protein expression levels was observed for XRCC1 as illustrated by the fact that XRCC1 mRNA was not present in BT68 (Figure 6B) although it displayed the highest XRCC1 protein expression level (Figure 6C). We examined the cellular response of these cell lines to the PARP1 inhibitor Olaparib, using automated microscopic assessment (IncuCyte®) at 96 h of culture. BT83, in which the level of expression of the genes from the pHGG signature was the lowest and where little or no XRCC1 mRNAs were detected, displayed the greatest sensitivity to Olaparib, with a IC50 (half maximal inhibitory concentration) <2 μM. In contrast, the other cell lines showed a higher IC50 ranging from 3.2 to 24.85 μM (Figure 6D), which correlated in part with the co-expression of PARP1/XRCC1 proteins. We also explored the UW479 commercialized cell line where the absence of PARP1 expression previously described explained its resistance to Olaparib treatment [30].

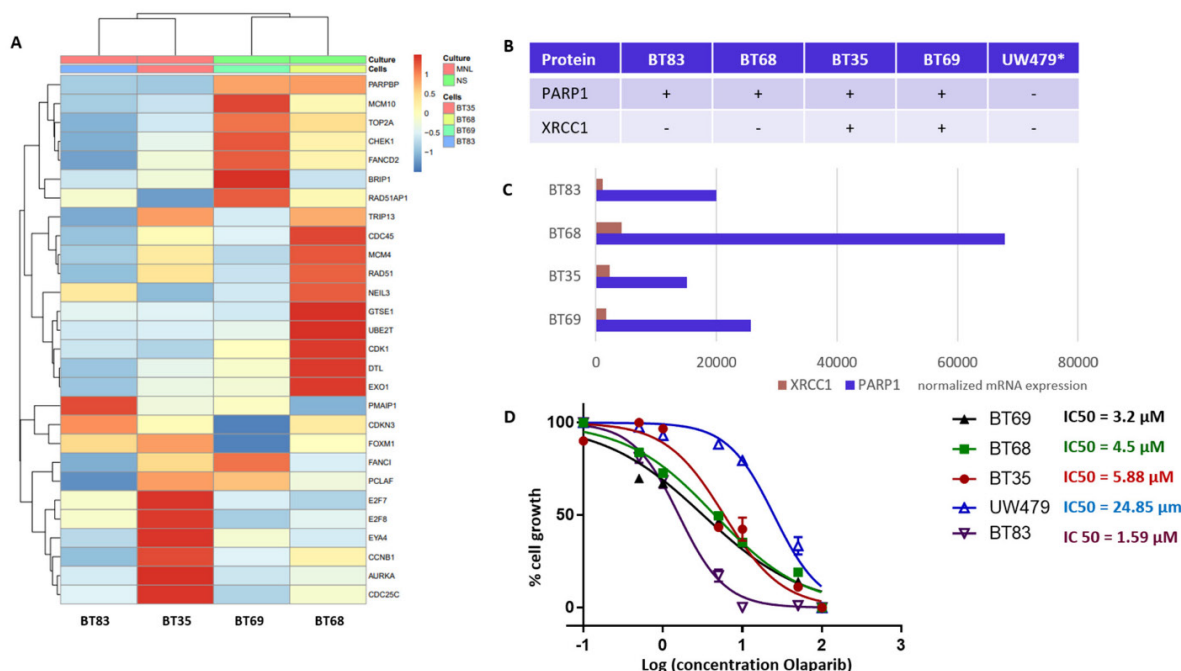


Figure 6. DNA repair and cell cycle gene deregulation studied in patient-derived cell lines (PDCL) and PARP1 functional inhibition. **(A)** Heatmap of standardized gene expression for BT83, BT35, BT69, and BT68 cell lines, based on the pHGG gene signature. **(B)** Basal levels of protein expression detected by immunohistochemical analyses in the PDCL paired tumors and in the UW479 cell line (*, based on previous publication [30]) in absence of Olaparib treatment. **(C)** Normalized mRNA expression levels of XRCC1 and PARP1 in each cell line in the absence of Olaparib, as assessed by RNA sequencing. **(D)** Response of each cell line to Olaparib as determined by a 96 h growth assay, and related IC50 calculations.

4. Discussion

pHGGs are inevitably recurring leading to a fatal issue due to de novo and/or acquired therapeutic resistance. Most pHGGs carry well-identified mutational drivers and up to 60% of all pHGG harbor a somatic heterozygous mutation in histone proteins, a percentage that varies according to the tumor exact location. Given the high chemo- and radioresistance of pHGG tumors, past and recent publications have addressed the links between alterations in DNA repair pathways and pHGG cell behavior [11,12,17–19], revealing that DNA damage repair dysregulations were a significant feature of several subgroups of pHGG, including DIPGs. Similar observations were done in adult glioblastomas. In this context, we reasoned that predictive signatures might afford the characterization of pHGG subgroups based on DNA repair and cell cycle gene expression variations [12,17]. We started with previously established signatures of adult glioblastomas, composed of key effectors of the cell cycle as well as components of crucial DNA repair factors [22]. Although our data show that the signatures established in aGBMs can indeed capture features related to cell cycle and DNA repair in pHGG tumors, the observed segregation did not correlate with underlying driver mutations affecting histones, as shown in previous studies [18,20,21,31–33]. Our efforts to identify a specific DNA repair and cell cycle gene expression signature of pHGGs led to a 28-gene expression signature that was able to cluster the supratentorial and thalamic pHGG group effectively. Of note, we were able to link histone mutated tumors to a more proliferative group displaying upregulation of the gene components of our signature. Previous studies have shown that the H3.3 G34 mutations impact several aspects of the DDR [20,21,34]. Intriguingly, we could not segregate H3.3- and H3.1-mutated DIPG. Nevertheless, as previously described in Werbrouck et al., 2019, when changes in protein expression levels were investigated, we were able to segregate the population based on DNA repair protein expression and *TP53* mutations. In particular, we noted that PARP1 and XRCC1 protein expression levels as well as alterations in two factors involved in cell cycle modulation were associated to diagnostic and recurrent pHGGs. Several publications [11,35–37] have uncovered DDR dysregulations associated to deregulations of DNA repair and chromatin factors like PPM1D or BMI-1. On the other hand, functional studies have revealed that depletion of either component of the H3K36me3: p75 axis could affect the balance between the HR and NHEJ DSB repair pathways [34,38]. This phenotypic diversity could explain in part why H3.3 and H3.1 mutated DIPG could not be segregated as, globally, our cohort contained more histone mutated tumors with potential DDR deregulations comparatively to wild-type, *BRAFv600*, or *IDH1* mutants. In wild-type tumors as well as other driver mutants and certain types of histone mutated pHGG, where the DNA repair genes appear to be comparatively downregulated, it is possible that some of the genes of our signature undergo transient upregulation in response to standard therapy like IR. Finally, other determinants may underlie the segregation seen with our cohorts. Indeed, alterations in DNA repair gene expression have recently been associated to glycolytic metabolism and mTor signaling, which is frequently upregulated in all pHGGs [39].

Our results also demonstrate that PARP1 plays a key role in the very early relapse patients in addition to XRCC1. In addition to being a theranostic and prognostic pHGG marker, PARP1 might also constitute a therapeutic target, e.g., for inhibition by Olaparib. Our results confirmed previous preclinical work in DIPG [33,34], as the preclinical activity of Olaparib in thalamic and DIPG H3.3 mutated tumors demonstrated an efficient response ($IC_{50} < 2 \mu M$) only in the cell line where the genes of our pHGG signature displayed important overall down-regulation. The balance between PARP1 and XRCC1 expression might modulate response to PARP1. Previous studies in other cancer types have reported the efficient targeting of PARP1 in XRCC1 deficient lines [40–42]. In our study, the most sensitive cell to PARP1 blockade, e.g., BT83, displayed PARP1 expression and concomitant absence of XRCC1 protein/mRNA expressions. Thus, single targeted therapy trials may only encompass a minority of pHGG and combination therapies should be considered in tumors displaying deregulated DDR.

Finally, a recent study [33] has revealed the association of various DNA repair vulnerabilities in DIPG with the inhibition of intra-tumor immune cells. The DD repair studies in pHGG evidence the transversal role of its deregulation in de novo therapeutic resistance, as well as its impact on pHGG brain microenvironment.

5. Conclusions

Collectively, our results highlight the possibility to stratify pHGGs with a specific DNA repair and cell cycle gene signature, and reveal how subsets of pHGGs, especially thalamic and sus-tentorial pHGGs, display specific alterations in the expression of DNA repair and cell cycle genes. Validation studies at the protein expression level provide evidence that PARP1 hyper-expression, associated to XRCC1 expression, *TP53* mutations and *TOP2A* amplification, might represent a new theranostic and therapeutic target in pHGGs.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13092252/s1>, Figure S1: Adult glioblastoma (aGBM) signatures, Figure S2: Heatmap of hierarchical clustering in the DIPG cohort based on the 27-gene aGBM signature (A) and ICA (Independent Component Analysis) of cell cycle gene biological processes in the DIPG cohort (B,C), Figure S3: Heatmaps of hierarchical clustering in the sus-tentorial pHGG cohort with the 27-gene aGBM signature, Figure S4: Heatmap illustrating the partial segregation of DIPG specimens from a cohort containing H3.1 *K27M* and H3.3 *K27M* mutant samples based on the specific pHGG 28-DDR signature, Figure S5: Immunohistochemical analyses. Examples of PARP1, XRCC1, KI67, RAD51, MPG, and APE1 positive immunostainings.

Author Contributions: N.E.-W. and E.V.D. designed the research. N.E.-W., E.V.D. and O.P. coordinated the work. All authors wrote the manuscript. N.E.-W., P.V.N., L.P., O.P., B.L., M.P.C., E.G., Q.F., H.B., G.N., L.C., M.D. and E.V.D., completed the research experiments and analyzed the data. N.E.-W., E.V.D. and D.C. provided genomic data. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was mainly initiated and supported by a grant from the « Fédération Enfants et Santé » and the « Société Française de lutte contre les Cancers et les leucémies de l'Enfant et de l'adolescent ». This work had complementary financial supports from the Satt Conectus program, and Fondation de l'Université de Strasbourg, as well as « LifePink », « J'ai demandé la lune », « Une roulade pour Charline », « Franck Rayon de Soleil » and « Semeurs d'Etoile » associations. We are very thankful for this financial support and their help for this study.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of University Hospital of Strasbourg. The declaration number DC-2017-3090 was obtained for the use of FFPE and fresh-frozen samples.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects and their parents involved in the study.

Data Availability Statement: Gene expression data of adult glioblastomas and its corresponding signature are available in the ArrayExpress database (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress> (accessed on 6 April 2021)) under accession number E-MTAB-6425. The 6 pHGG and 10 pilocytic astrocytoma omic data used for the pHGG signature are part of the CIT (Carte d'Identité des Tumeurs) program and will be obtained upon request until 01 January 2022, when they will be published on public omic database. The DIPG and HERBY protocol are already accessible on public database [24,25]. The cell lines data were published on the Gene Expression Omnibus website (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ (accessed on 6 April 2021)) with the following accession number: GSE101799.

Acknowledgments: We thank the children and families affected by HGGs for their contributions to this research and their support. We also thank Aurélie Nguyen and Viviane Lobstein initiating the manipulation on TMA and RT-qPCR procedures. We are also thankful to Jacques Grill, David Castel, Alan MacKay, and Chris Jones providing the DIPG and HERBY protocol RNA sequencing data. We thank Arnaud Muller for the initial processing of the HERBY dataset.

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

References

- Haase, S.; Nuñez, F.M.; Gauss, J.C.; Thompson, S.; Brumley, E.; Lowenstein, P.; Castro, M.G. Hemispherical Pediatric High-grade Glioma: Molecular Basis and Therapeutic Opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Coleman, C.; Stoller, S.; Grotzer, M.; Stucklin, A.G.; Nazarian, J.; Mueller, S. Pediatric hemispheric high-grade glioma: Targeting the future. *Cancer Metastasis Rev.* **2020**, *39*, 245–260. [[CrossRef](#)]
- Aziz-Bose, R.; Monje, M. Diffuse intrinsic pontine glioma: Molecular landscape and emerging therapeutic targets. *Curr. Opin. Oncol.* **2019**, *31*, 522–530. [[CrossRef](#)]
- Mackay, A.; Burford, A.; Carvalho, D.; Izquierdo, E.; Fazal-Salom, J.; Taylor, K.R.; Bjerke, L.; Clarke, M.; Vinci, M.; Nandhabalan, M.; et al. Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 520–537. [[CrossRef](#)]
- El-Khouly, F.E.; Van Zanten, S.E.M.V.; Lopez, V.S.-M.; Hendrikse, N.H.; Kaspers, G.J.L.; Loizos, G.; Sumerauer, D.; Nysom, K.; Pruunsild, K.; Pentikainen, V.; et al. Diagnostics and treatment of diffuse intrinsic pontine glioma: Where do we stand? *J. Neuro Oncol.* **2019**, *145*, 177–184. [[CrossRef](#)]
- Grill, J.; Massimino, M.; Bouffet, E.; Azizi, A.A.; McCowage, G.; Cañete, A.; Saran, F.; Le Deley, M.-C.; Varlet, P.; Morgan, P.S.; et al. Phase II, Open-Label, Randomized, Multicenter Trial (HERBY) of Bevacizumab in Pediatric Patients With Newly Diagnosed High-Grade Glioma. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 951–958. [[CrossRef](#)]
- Kasper, L.H.; Baker, S.J. Invited Review: Emerging functions of histone H3 mutations in paediatric diffuse high-grade gliomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2020**, *46*, 73–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kaina, B.; Christmann, M.; Naumann, S.; Roos, W.P. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair* **2007**, *6*, 1079–1099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nguyen, A.; Legrain, M.; Noel, G.; Coca, A.; Meyer(Ea), N.; Schott, R.; Lasthaus, C.; Chenard, M.P.; Gaub, M.P.; Lessinger, J.M.; et al. An Innovative Fluorescent Semi-quantitative Methylation-specific PCR Method for the Determination of MGMT Promoter Methylation is Reflecting Intra-tumor Heterogeneity. *Curr. Cancer Drug Targets* **2015**, *15*, 624–640. [[CrossRef](#)]
- Cohen, K.J.; Pollack, I.F.; Zhou, T.; Buxton, A.; Holmes, E.J.; Burger, P.C.; Brat, D.J.; Rosenblum, M.K.; Hamilton, R.L.; Lavey, R.S.; et al. Temozolomide in the treatment of high-grade gliomas in children: A report from the Children’s Oncology Group. *Neuro Oncol.* **2011**, *13*, 317–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sun, Z.; Zhang, Y.; Jia, J.; Fang, Y.; Tang, Y.; Wu, H.; Fang, D. H3K36me3, message from chromatin to DNA damage repair. *Cell Biosci.* **2020**, *10*, 9. [[CrossRef](#)]
- Pedersen, H.; Schmiegelow, K.; Hamerlik, P. Radio-Resistance and DNA repair in Pediatric diffuse Midline Gliomas. *Cancers* **2020**, *12*, 2813. [[CrossRef](#)]
- Baretti, M.; Le, D.T. DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *189*, 45–62. [[CrossRef](#)]
- Durnoab, C.A.; Sherman, P.M.; Aronson, M.; Malkin, D.; Hawkins, C.; Bakry, D.; Bouffet, E.; Gallinger, S.; Pollett, A.; Campbell, B.; et al. Phenotypic and genotypic characterisation of biallelic mismatch repair deficiency (BMMR-D) syndrome. *Eur. J. Cancer* **2015**, *51*, 977–983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Guerrini-Rousseau, L.; Varlet, P.; Colas, C.; Andreiuolo, F.; Bourdeaut, F.; Dahan, K.; Devalck, C.; Faure-Conter, C.; Genuardi, M.; Goldberg, Y.; et al. Constitutional mismatch repair deficiency-associated brain tumors: Report from the European C4CMMRD consortium. *Neurooncol. Adv.* **2019**, *1*, vdz033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Touat, M.; Li, Y.Y.; Boynton, A.N.; Spurr, L.F.; Iorgulescu, J.B.; Bohrsen, C.L.; Cortes-Ciriano, I.; Birzu, C.; Geduldig, J.E.; Pelton, K.; et al. Mechanisms and therapeutic implications of hypermutation in gliomas. *Nat. Cell Biol.* **2020**, *580*, 517–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gong, F.; Miller, K.M. Histone methylation and the DNA damage response. *Mutat. Res.* **2019**, *780*, 37–47. [[CrossRef](#)]
- Werbrouck, C.; Evangelista, C.C.; Lobón-Iglesias, M.-J.; Barret, E.; Le Teuff, G.; Merlevede, J.; Brusini, R.; Kergrohen, T.; Mondini, M.; Bolle, S.; et al. TP53 Pathway Alterations Drive Radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG). *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 6788–6800. [[CrossRef](#)]
- Katagi, H.; Louis, N.; Unruh, D.; Sasaki, T.; He, X.; Zhang, A.; Ma, Q.; Piunti, A.; Shimazu, Y.; Lamano, J.B.; et al. Radiosensitization by Histone H3 Demethylase Inhibition in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 5572–5583. [[CrossRef](#)]
- Wang, S.; Meyer, D.H.; Schumacher, B. H3K4me2 regulates the recovery of protein biosynthesis and homeostasis following DNA damage. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2020**, *27*, 1165–1177. [[CrossRef](#)]
- Lowe, B.R.; Yadav, R.K.; Henry, R.A.; Schreiner, P.; Matsuda, A.; Fernandez, A.G.; Finkelstein, D.; Campbell, M.; Kallappagoudar, S.; Jablonowski, C.M.; et al. Surprising phenotypic diversity of cancer-associated mutations of Gly 34 in the histone H3 tail. *eLife* **2021**, *10*, 65369. [[CrossRef](#)]
- Gobin, M.; Nazarov, P.V.; Warta, R.; Timmer, M.; Reifemberger, G.; Felsberg, J.; Vallar, L.; Chalmers, A.J.; Herold-Mende, C.C.; Goldbrunner, R.; et al. A DNA Repair and Cell-Cycle Gene Expression Signature in Primary and Recurrent Glioblastoma: Prognostic Value and Clinical Implications. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 1226–1238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Blandin, A.F.; Durand, A.; Litzler, M.; Tripp, A.; Guérin, É.; Ruhland, E.; Obrecht, A.; Keime, C.; Fuchs, Q.; Reita, D.; et al. Hypoxic Environment and Paired Hierarchical 3D and 2D Models of Pediatric H3.3-Mutated Gliomas Recreate the Patient Tumor Complexity. *Cancers* **2019**, *11*, 1875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Castel, D.; Philippe, C.; Calmon, R.; Le Dret, L.; Truffaux, N.; Boddaert, N.; Pagès, M.; Taylor, K.R.; Saulnier, P.; Lacroix, L.; et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol.* **2015**, *130*, 815–827. [[CrossRef](#)]
25. Mackay, A.; Burford, A.; Molinari, V.; Jones, D.T.; Izquierdo, E.; Brouwer-Visser, J.; Giangaspero, F.; Haberler, C.; Pietsch, T.; Jacques, T.S.; et al. Molecular, Pathological, Radiological, and Immune Profiling of Non-brainstem Pediatric High-Grade Glioma from the HERBY Phase II Randomized Trial. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 829–842. [[CrossRef](#)]
26. Leek, J.T.; Johnson, W.E.; Parker, H.S.; Jaffe, A.E.; Storey, J.D. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 882–883. [[CrossRef](#)]
27. Nazarov, P.V.; Wienecke-Baldacchino, A.K.; Zinovyev, A.; Czerwińska, U.; Muller, A.; Nashan, D.; Azuaje, F.; Kreis, S. Deconvolution of transcriptomes and miRNomes by independent component analysis provides insights into biological processes and clinical outcomes of melanoma patients. *BMC Med. Genom.* **2019**, *12*, 132. [[CrossRef](#)]
28. Guerin, E.; Entz-Werlé, N.; Eyer, D.; Pencreac’h, E.; Schneider, A.; Falkenrodt, A.; Uettwiller, F.; Babin, A.; Voegeli, A.-C.; Lessard, M.; et al. Modification of topoisomerase genes copy number in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2003**, *17*, 532–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Yang, L.; Huang, K.; Li, X.; Du, M.; Kang, X.; Luo, X.; Gao, L.; Wang, C.; Zhang, Y.; Zhang, C.; et al. Identification of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 as a Cell Cycle Regulator through Modulating Sp1 Mediated Transcription in Human Hepatoma Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Gaspar, N.; Marshall, L.; Perryman, L.; Bax, D.A.; Little, S.E.; Viana-Pereira, M.; Sharp, S.Y.; Vassal, G.; Pearson, A.D.J.; Reis, R.M.; et al. MGMT-independent temozolomide resistance in paediatric glioblastoma cells associated with a PI3-kinase-mediated HOX/stem cell signature. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 9243–9252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Chormenky, Y.; Agnihotri, S.; Yu, M.; Buczkowicz, P.; Rakopoulos, P.; Golbourn, B.; Garzia, L.; Siddaway, R.; Leung, S.; Rutka, J.T.; et al. Poly-ADP-Ribose Polymerase as a Therapeutic Target in Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Glioma and Pediatric High-Grade Astrocytoma. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 2560–2568. [[CrossRef](#)]
32. Van Vuurden, D.G.; Hulleman, E.; Meijer, O.L.; Wedekind, L.E.; Kool, M.; Witt, H.; Vandertop, W.P.; Würdinger, T.; Noske, D.P.; Kaspers, G.J.; et al. PARP inhibition sensitizes childhood high grade glioma, medulloblastoma and ependymoma to radiation. *Oncotarget* **2011**, *2*, 984–996. [[CrossRef](#)]
33. Fang, J.; Huang, Y.; Mao, G.; Yang, S.; Rennert, G.; Gu, L.; Li, H.; Li, G.-M. Cancer-driving H3G34V/R/D mutations block H3K36 methylation and H3K36me3–MutS α interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 9598–9603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Pfister, S.X.; Ahrabi, S.; Zalmas, L.P.; Sarkar, S.; Aymard, F.; Bachrati, C.Z.; Helleday, T.; Legube, G.; Thangue, N.B.L.; Porter, A.C.G.; et al. SETD2-dependent histone H3K36 trimethylation is required for homologous recombination repair and genome stability. *Cell Rep.* **2014**, *7*, 2006–2018. [[CrossRef](#)]
35. Kumar, S.S.; Sengupta, S.; Zhu, X.; Mishra, D.K.; Phoenix, T.; Dyer, L.; Fuller, C.; Stevenson, C.B.; DeWire, M.; Fouladi, M.; et al. Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Cells Are Vulnerable to Mitotic Abnormalities Associated with BMI-1 Modulation. *Mol. Cancer Res.* **2020**, *18*, 1711–1723. [[CrossRef](#)]
36. Wang, Z.; Xu, C.; Diplas, B.H.; Moure, C.J.; Chen, C.J.; Chen, L.H.; Du, C.; Zhu, H.; Greer, P.K.; Zhang, L.; et al. Targeting Mutant PPM1D sensitizes Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Cells to the PARP Inhibitor Olaparib. *Mol. Cancer Res.* **2020**, *18*, 968–980. [[CrossRef](#)]
37. Akamandisa, M.P.; Nie, K.; Nahta, R.; Hambardzumyan, D.; Castellino, R.C. Inhibition of mutant PPM1D enhances DNA damage response and growth suppressive effects of ionizing radiation in diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro Oncol.* **2019**, *21*, 786–799. [[CrossRef](#)]
38. Aymard, F.; Bugler, B.; Schmidt, C.K.; Guillou, E.; Caron, P.; Briosis, S.; Iacovoni, J.S.; Daburon, V.; Miller, K.M.; Jackson, S.P.; et al. Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 366–374. [[CrossRef](#)]
39. Surowiec, R.K.; Ferris, S.F.; Apfelbaum, A.; Espinoza, C.; Mehta, R.K.; Monchamp, K.; Sirihorachai, V.R.; Bedi, K.; Ljungman, M.; Galban, S. Transcriptomic Analysis of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG) Identifies a Targetable ALDH-Positive Subset of Highly Tumorigenic Cancer Stem-like Cells. *Mol. Cancer Res.* **2021**, *19*, 223–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ali, R.; Alabdullah, M.; Alblihy, A.; Miligy, I.; Mesquita, K.A.; Chan, S.Y.; Moseley, P.; Rakha, E.A.; Madhusudan, S. PARP1 blockade is synthetically lethal in XRCC1 deficient sporadic epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett.* **2020**, *469*, 124–133. [[CrossRef](#)]
41. Veith, S.; Schink, A.; Engbrecht, M.; Mack, M.; Rank, L.; Rossatti, P.; Hakobyan, M.; Goly, D.; Hefele, T.; Frensch, M.; et al. PARP1 regulates DNA damage-induced nucleolar-nucleoplasmic shuttling of WRN and XRCC1 in a toxicant and protein-specific manner. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ali, R.; Al-Kawaz, A.; Toss, M.S.; Green, A.R.; Miligy, I.M.; Mesquita, K.A.; Seedhouse, C.; Mirza, S.; Band, V.; Rakha, E.A.; et al. Targeting PARP1 in XRCC1-deficient sporadic invasive breast cancer or preinvasive ductal carcinoma in situ induces synthetic lethality and chemoprevention. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 6818–6827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]


Annexe 3

Revue scientifique publiée dans Cells

**Focus on Hypoxia-Related Pathways in Pediatric Osteosarcomas
and Their Druggability**

Review

Focus on Hypoxia-Related Pathways in Pediatric Osteosarcomas and Their Druggability

Marina Pierrelvein ¹, Quentin Fuchs ¹, Benoit Lhermitte ^{1,2}, Melissa Messé ¹, Eric Guérin ³ , Noelle Weingertner ², Sophie Martin ¹, Isabelle Lelong-Rebel ¹, Charlotte Nazon ⁴, Monique Dontenwill ¹ and Natacha Entz-Werlé ^{1,4,*}

¹ Laboratory of Bioimaging and Pathologies, UMR CNRS 7021, 67405 Illkirch, France; marina.pierrelvein@etu.unistra.fr (M.P.); quentin.fuchs@etu.unistra.fr (Q.F.); Benoit.lhermitte@chru-strasbourg.fr (B.L.); melissa.messe@etu.unistra.fr (M.M.); sophie.martin@unistra.fr (S.M.); isabelle.lelong-rebel@unistra.fr (I.L.-R.); monique.dontenwill@unistra.fr (M.D.)

² Pathology Department, University Hospital of Strasbourg, 67098 Strasbourg, France; Noelle.weingertner@chru-strasbourg.fr

³ Oncobiology, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, University Hospital of Strasbourg, 67098 Strasbourg, France; Eric.guerin@chru-strasbourg.fr

⁴ Pediatric Oncohematology Unit, University Hospital of Strasbourg, 67098 Strasbourg, France; Charlotte.nazon@chru-strasbourg.fr

* Correspondence: Natacha.entz-werle@chru-strasbourg.fr; Tel.: +33-3-8812-8396; Fax: +33-3-8812-8092

Received: 2 August 2020; Accepted: 22 August 2020; Published: 31 August 2020



Abstract: Osteosarcoma is the most frequent primary bone tumor diagnosed during adolescence and young adulthood. It is associated with the worst outcomes in the case of poor response to chemotherapy and in metastatic disease. While no molecular biomarkers are clearly and currently associated with those worse situations, the study of pathways involved in the high level of tumor necrosis and in the immune/metabolic intra-tumor environment seems to be a way to understand these resistant and progressive osteosarcomas. In this review, we provide an updated overview of the role of hypoxia in osteosarcoma oncogenesis, progression and during treatment. We describe the role of normoxic/hypoxic environment in normal tissues, bones and osteosarcomas to understand their role and to estimate their druggability. We focus particularly on the role of intra-tumor hypoxia in osteosarcoma cell resistance to treatments and its impact in its endogenous immune component. Together, these previously published observations conduct us to present potential perspectives on the use of therapies targeting hypoxia pathways. These therapies could afford new treatment approaches in this bone cancer. Nevertheless, to study the osteosarcoma cell druggability, we now need specific in vitro models closely mimicking the tumor, its intra-tumor hypoxia and the immune microenvironment to more accurately predict treatment efficacy and be complementary to mouse models.

Keywords: osteosarcoma; hypoxia; progression; immunity; druggability; preclinical models

1. Introduction

The overall survival (OS) of osteosarcoma (OTS) patients has remained stable for three decades. For that reason, it is important to find new therapeutic strategies and new biomarkers to be able to predict the outcome and refine the prognosis of those children from the diagnosis. Pediatric high-grade OTS is the most common primary malignant bone tumor in children and adolescents. Those tumors account for more than 50% of primary bone cancers each year. The annual incidence is around 2 per million persons [1,2] with an incidence peak during puberty in a gender-dependent manner (males

are more affected than females) [3]. Ten-year OS is 65% for patients diagnosed without metastases and decreases to 20% for patients with metastatic disease at diagnosis [4]. The most frequent tumor localizations are metaphyseal areas of long bones (e.g., 42% in the femur, 19% in the tibia and 10% in humerus) [5]. These metaphyseal bones are close to the growth plates, where there is rapid bone growth. OTS is characterized by an impaired balance between the osteoblast, osteoclast and the mesenchymal precursor activities. They are defined by an extracellular osteoid and sometimes chondroid matrix produced by the malignant osteoblasts and a rapid proliferation with early micro- and macro-metastases [5]. At diagnosis, 80% of the patients present “invisible” micro-metastasis and 23% of the patients will have already visible metastases, which are located for more than two-thirds of the cases in the lungs and 16% in bones [4,5].

This bone cancer is known as a highly necrotic tumor even at diagnosis, where this histological feature is frequently observed on biopsies. This necrosis might be the consequence of the excessive and rapid growth of cancer cells, which are proficient in creating a hypoxic microenvironment [6,7] and an abnormal neoangiogenesis [8,9]. Besides finding tumor necrosis at biopsy, OTS is also characterized by necrotic rate assessment on surgical tumor resection after a neoadjuvant multichemotherapy approach. The histological Huvos grading classifies OTS patients in 2 groups considering the number of residual tumor cells and their paired necrotic percentage [7,10]. A rate of less than 10% viable cells is the witness of good histological response (GR): grade III GRs have less than 10% residual tumor cells and grade IV GRs have a complete tumor necrosis. A rate above 10% viable cells is related to a poor histological response (PR): grade II PR is between 10 and 50% residual tumor cells and grade I PR is above 50% of residual tumor cells. The 5-year OS in localized GR patients is 80%, whereas this OS decreases dramatically at less than 30% in patients with PR, an unresectable tumor, a primitive metastatic tumor or a therapeutic resistance [7,11]. Tumor necrosis is believed to represent the endpoint of severe chronic hypoxia. This necrosis can promote oxidative stress and modify metabolic responses due to inducing hypoxia-related biomarkers. Hypoxia itself can induce necrosis in the heart of the tumor, but, oppositely, can also induce inhibition of apoptosis and necrosis during cancer progression and treatment [12]. The cancer-related hypoxia is in addition to *in vivo* physiological oxygen tension, called physioxia (Figure 1). The atmospheric oxygen level (21% oxygen) is a non-physiological environment and can be considered as hyperoxia. The physioxia within human organs ranges from 5 to 9% depending on body regions (e.g., breast is at 8.5%, bone marrow at 7% and 5% for bones) [12–14]. Therefore, the hypoxic level can be probably defined in tumors and OTS as the rate of oxygen, which is below physiological oxygen concentration, then, less than 9% (Figure 1). This hypoxia directly induces the overexpression of hypoxia-inducible factors (HIFs). These hypoxia-related biomarkers were in past studies found to be frequently associated with the worst OS in many cancers, including OTS. HIF-1 α hyperexpression was significantly linked with metastatic disease, poor prognosis and outcome in OTS, supporting its probable role at diagnosis and during progression [15–18]. Usually, hypoxia confers a more aggressive phenotype by activating a cascade of molecular events partly mediated and regulated by HIFs. These also play an essential role in immunological responses and are considered as crucial physiological regulators of homeostasis, vascularization and anaerobic metabolism. So, the hypoxia-specific tumor microenvironment might be of importance during OTS oncogenesis, progression and during their treatment. Therefore, we try to decipher the normoxic/hypoxic pathways in normal tissues, bones and osteosarcomas to understand their role and to estimate their druggability in OTS. To study the efficacy of drugs inhibiting hypoxic biomarkers, we now need specific *in vitro* models closely mimicking the tumor and its intra-tumor hypoxia.

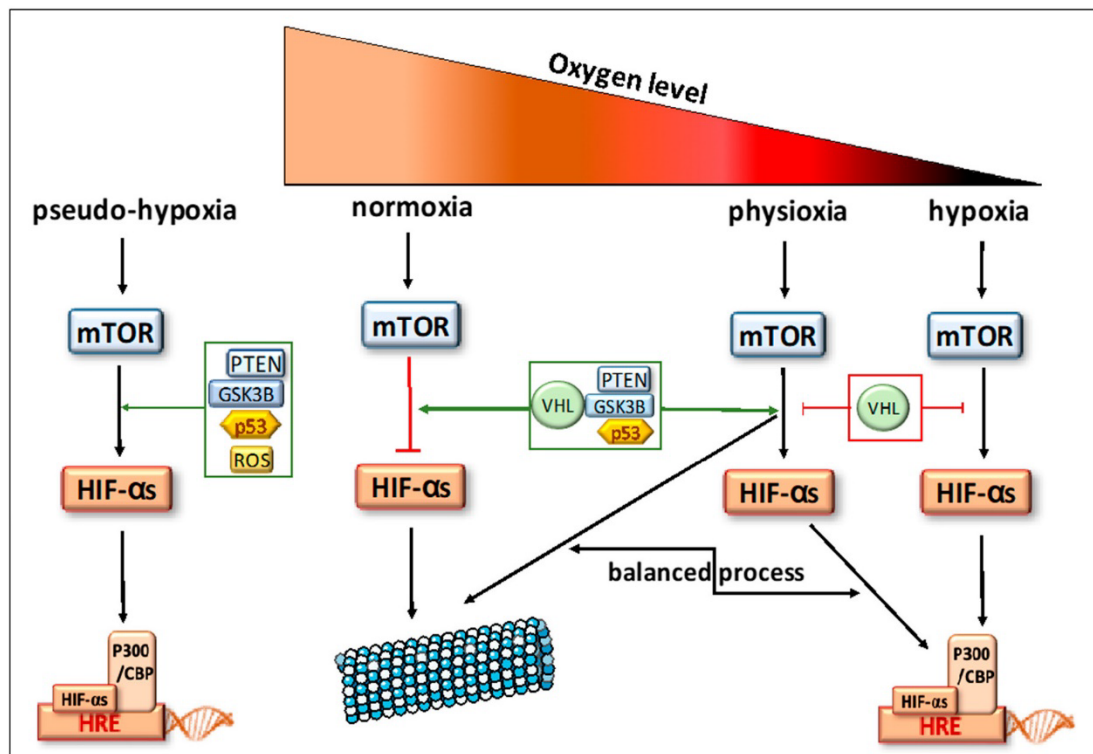


Figure 1. Oxygen tensions in bone tissues. Description of the signaling pathways controlling responses to oxygen variations.

2. Biomarkers Related to Hypoxia Regulation in Normal Tissues

In response to a decrease in oxygen level, HIFs are induced and will rapidly after induction regulate the downstream- and upstream-related pathways (descriptions in Figures 1 and 2). These transcription factors are heterodimeric DNA-binding complexes with a basic helix-loop-helix-PAS domain and comprise one α subunit (HIF-1 α , HIF-2 α or HIF-3 α) and the paired β subunit. Knowledge is very limited for the role of HIF-3 α , but HIF-1 α and HIF-2 α are frequently described in hypoxia regulation [19]. The aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT), the β unit, is constitutively expressed in the cell nucleus and its rate is constant and independent of oxygen tension. The α subunits are in normoxic conditions hydroxylated at their proline residues (PHD) by HIF prolyl-hydroxylases to be, thereafter, ubiquitinated by the pVHL (protein Von Hippel-Lindau) ubiquitin ligase complex and degraded by the proteasome (Figure 2A). In hypoxia, HIF prolyl-hydroxylases are inhibited and HIF- α subunits are stabilized to translocate into the nucleus, where they heterodimerize with the β unit (Figure 2B). The heterocomplex composed of the HIF- α and HIF- β will bind the hypoxia response element (HRE) with the coactivators CBP and p300 and recognize the promoters of a large number of genes to enhance their transcription [20–23]. Physioxia (Figure 1) seems to be part of these hypoxia-related pathways and is associated with a modulation of stress signals that can induce a balance between proteasomal degradation of HIFs- α and their stabilization [24]. No clear-cut threshold separates physioxia from hypoxia nor normoxia.

Globally, HIFs are regulated by their upstream signaling cascade in all oxygen tensions (Figure 2A,B). When PI3K/AKT/mTOR or RAS/RAF/MEK/ERK pathways are upregulated, HIF- α mRNA transcriptions and protein translations are promoted [25–28]. The distinct roles of HIF-1 α and HIF-2 α cover the regulation of cell differentiation and promotion of the tumor cell resistance and invasion. HIF-1 α is known to activate acutely more than one hundred genes [19] in combination with PI3K/AKT/mTOR [29,30], RAS/MAPK [21,30] and NF- κ B pathways [31]. These molecular cascades will

activate cell proliferation and oncogenic features, cell migration and invasion [32]. Locally or during metastatic processes, HIF-1 α will induce a neoangiogenesis with VEGF/VEGFR (vascular endothelial growth factor and receptor) cascade and an anaerobic glycolytic switch, pushing cells in a specific phenotype in case of acute hypoxia. It will also play a role in epithelial–mesenchymal transition, as well as in the tumor cell resistance to therapies through p53 or upstream signaling [16,20,30,33–35]. HIF-2 α regulates, like its HIF-1 α counterpart, many physiological functions, such as local or metastatic neoangiogenesis, cell proliferation, and migration [23,30,33,36]. For the metabolism, HIF-2 α seems to promote an alternative metabolic switch like phospholipid or amino acid metabolisms [37]. Through its specific roles, HIF-2 α mostly drives the response to chronic hypoxia, maintaining immature tumor cells [23,32,33,38,39]. Both HIFs are modulated and combined to adapt normal and cancer cells to oxygen variations and tensions. They have probable compensatory activities because, when HIF-1 α is underexpressed, HIF-2 α can in different conditions increase its expression. Nevertheless, this modulation is probably in a tissue dependency manner [11,19,23,24,40].

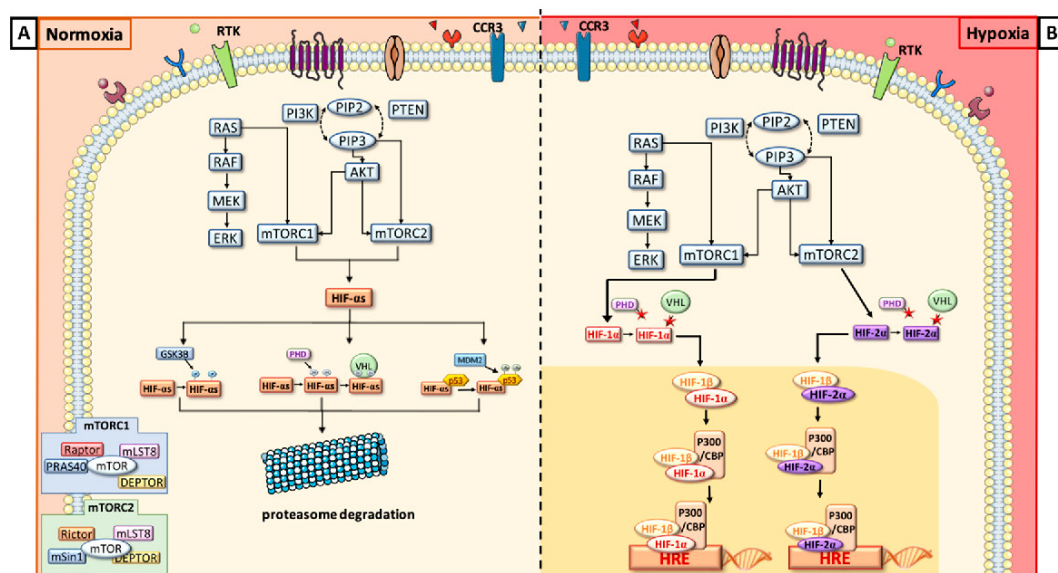


Figure 2. Schematic description of the biomarkers involved in normoxia (A) and hypoxia (B) and their interplay.

Just upstream to HIFs (Figures 1 and 2), there is the mammalian target of rapamycin (mTOR), a serine/threonine kinase, which is represented by two subunits: mTORC1 and mTORC2. They have several common components: mTOR kinase, which is the central catalytic component, mLST8, a scaffolding protein, and Deptor, a regulatory subunit. mTORC1 is associated with Raptor, a scaffolding protein necessary to stabilize its subcellular localization and with PRAS40, inhibiting mTORC1 activity in absence of growth factor. mTORC2 is composed of Rictor and mSin1, a negative regulator. Rictor and Raptor have similar functions [41,42]. To simplify, usually, mTORC1 upregulates HIF-1 α via the S6 ribosomal protein (S6K), whereas mTORC2 directly activates HIF-2 α [25,32,33].

Upstream to mTOR, we have two signaling cascades, both stimulated by tyrosine kinase receptor phosphorylation: PI3K/AKT and RAS/ERK/MAPK. The production of phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3) will directly activate mTORC2, which phosphorylates Akt on ser473. mTORC1 is activated by PI3K/AKT in two different ways: either by phosphorylation of PRAS40 or by the inhibition of tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) [43,44]. RAS indirectly activates mTORC1 and ERK HIF-1 α through S6K [45].

In parallel to these cascades, where oxygen variations are predominant drivers [46], there are two oxygen-independent conditions where HIFs can be regulated by other mechanisms than the

pVHL-induced proteasomal process. Indeed, HIF-1 α will also undergo proteasomal degradation, after it binds p53 protein leading to ubiquitination by MDM2 (Murine Double Minute 2), another ubiquitin ligase. Another mechanism of HIF-1 α degradation is driven by glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β). In fact, GSK3 β is known to phosphorylate HIF-1 α and then enhance its degradation [47]. Furthermore, a specific mechanism, called pseudo-hypoxia (Figure 1), is also described for HIF- α induction in normoxic conditions. It is a compromised cellular capacity of utilizing oxygen due to decreased levels of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), which can cause the accumulation of NADH with the occurrence of NADH/NAD redox imbalance. These metabolic modifications might induce HIF production or stabilization mainly through stress signals and ROS accumulations [19].

3. Normal Bone and Hypoxia: Involvement in Osseous Production and Formation and Osteoclast-Mediated Bone Resorption

Bone and its associated marrow microenvironment offer access to growth factors, cytokines, blood supply and tumor-supportive cells including macrophages, T cells and stromal cells. The osteoblasts and the osteoclasts play a pivotal role in skeletal development and remodeling. Bone can form through two different mechanisms: intramembranous or endochondral ossification. The intramembranous bone formation is dedicated to flat bones. It develops from mesenchymal cells that directly differentiate into osteoblasts for the skull. In other flat skeletal locations, it derives from a chondrocyte anlage that is replaced by bone [48–50]. For the endochondral bone development, we have three steps where physioxia and hypoxia play major roles. The first step is the condensation of mesenchymal cells, which will next differentiate into chondrocytes and, at the end, generate the growth plates. In the growth plates, chondrocytes are highly proliferative and will form columnar layers, where, in the most distal part, cells will stop proliferating, exit the cell cycle and differentiate into hypertrophic chondrocytes associated with mineralization [50,51]. The growth plate is a unique mesenchymal tissue with avascular and hypoxic regions [52]. To overpass this challenging microenvironment, the chondrocytes need HIF-1 α expression and production of VEGF-A to induce the angiogenic switch and be able to replace cartilage by bone [51]. This overexpression is associated with pVHL expression, that is modulated by HIF-1 α , and the stabilization of HIF-2 α , which is balancing HIF-1 α action [53]. In fact, the HIF signaling pathway has a critical role in regulating both the osteoblastic and the vascular niches during the endochondral process. HIF-1 α is considered as a positive regulator of bone formation, as well as osteoblast number and activity. It stimulates non-oxidative glycolysis in osteoblasts and can delay osteoclastogenesis, favoring the senescence of bone macrophages [51]. So, HIF-1 α will play a role of regulator of osteoclast-mediated bone resorption, but with little effect on osteoclast differentiation itself [54]. It stimulates the expression of cytokines that might regulate the differentiation process and increases both the glycolytic and mitochondrial metabolic rate to provide an adaptive support to the macrophages during bone resorption [35,55]. By contrast HIF-2 α can, then, be considered as a negative regulator of bone mass accrual with a direct action on osteoblast lineage [51]. In compensation, MIF (macrophage migration inhibitory factor) seems to regulate HIF-1 α activity in a p53-dependant manner. This physiological oxygen tension and pathological hypoxia during cancer processes might in this context of hypoxic growth plate be a good site to favor tumor cell homing and initiation, as well as tumor expansion. It can also explain the tight interactions between malignant osteoblast and its immune environment, as well as blood vessel formation and the macrophages infiltrating tumor microenvironment.

4. Presence of Hypoxic Biomarkers in Osteosarcomas Is Related to Progression and Resistance to Treatment

Hypoxia seems to be an important key in OTS local and distant environments. As described above, the local environment of growth plates is conducive to favor variations in oxygen levels and is typically the location where osteosarcoma cell arise. The hypoxic biomarkers seem to be modulated during osteosarcoma initiation and progression. Correlations have been established in numerous

publications between OTS poor prognosis and those biomarkers including HIFs, mTOR or CA IX (Carbonic Anhydrase IX) [16–18,47,56–58]. They are underlining the dominant driving force of hypoxia for OTS cancer progression, drug resistance and metastatic propensity. When looking at the material used in studies, the proof of concept for hypoxia in osteosarcomas was made in in vitro or in vivo preclinical models, as well as in tumor collections. However, constantly, HIF-1 α was the central hypoxia-related marker involved in OTS and is frequently hyper-expressed in locally aggressive and metastatic OTS [17–19,58,59]. It is associated with GLUT-1 (GLucose Transporter 1), CA IX or VEGF/VEGFR overexpression [57–59], explaining a global enhancement of the hypoxia pathways from the membrane to the nucleus and the increase of intra-tumor microvessel density [20]. HIF-1 α was, then, mostly described as a major driver of tumor microenvironment modulation. HIF-2 α was less studied in OTS than its homologues, but seems to be implicated in OTS cell proliferation and apoptosis and promotes OTS stemness features [17,36,38,56,60,61]. So, HIF-2 α was mostly described as a major driver in OTS cells with specific metabolic switch [40]. mTOR was frequently involved in direct links with autophagic processes and was associated with Pi3K/AKT upstream signaling stimulated by different tyrosine kinase receptors [62–64], combining an OTS cell and tumor microenvironment effect. Nevertheless, it is for instance not so clear how all those biomarkers specifically interact during OTS progression and metastatic propensity, as hypoxia is present since the OTS cell initiation. A balanced HIF-1 α /HIF-2 α , as well as a variation of expression of both markers, are now more precisely described to explain the intermittent role of hypoxia signaling pathways in many cancer types, but must be more studied in OTS [33,47].

Recent insights also associate a global intra-tumor hypoxia to elevated genomic instability in cancer cells, including osteosarcomas, where a high level of chromosomal breakage and chromothripsis are usually observed [15,65]. This genomic instability and complexity is linked to a poor outcome and is frequently correlated in such tumor types with a high dysregulation of microRNAs subsequent to hypoxia. In OTS, it is miRNA-133a that was probably shown to be part of chromosomal deregulation and osteosarcoma progression [66].

The epithelial–mesenchymal transition (EMT) is a mechanism also playing a role in OTS proliferation and cell invasion. One central signaling pathway was particularly deciphered in OTS EMT process, which is Wnt/ β -catenin signaling. Surprisingly, studies more often describe a balance of down- and up-regulation to explain the role of the Wnt/ β catenin pathway. In fact, it is up-regulated to favor cell proliferation, colony formation and migration [67], but it is down-regulated by hypoxia and, then, promotes cell resistance to chemotherapies through stemness properties and MDR (MultiDrug Resistance) induction [68]. For these treatment resistances, several other studies have focused on hypoxia as a way for OTS cells to adapt to their new environment and induce neoangiogenesis to favor cell proliferation and tumor growth, avoiding autophagic and apoptotic response to therapies [8,11,33,38,68,69]. They confirmed that MDR phenotype is reactivated during oxygen hypoxic tension [70]. Another process was the inhibition by PI3K/AKT and HIF-1 α of MAX dimerization protein 1 (Mxdm1), a member of the Myc/Mxd/Max family, to notably overpass cisplatin DNA toxicity in OTS cells [70,71]. Finally, the overproduction of reactive oxygen species (ROS) interplays with OTS hypoxia and the AMPK signaling pathway, as well as autophagy and another hypoxic biomarker [71,72], to promote treatment resistance for chemotherapeutic strategies and for irradiation [57].

5. Immune Response, Hypoxia and Osteosarcoma Cells

The OTS microenvironment is surprisingly characterized by specific immune infiltrates in which mostly macrophages and osteoclasts are present. T cell response, able to fight against the tumor cells, is suppressed in OTS leading to a T-cell exhaustion. It induces immune tolerance and prevents excessive immune responses leading to tumor growth, drug resistance and/or metastatic spread [73–75]. Besides the fact that programmed death receptor-1 (PD-1) and its ligand PD-L1 seem to be interesting cancer targets, PD-L1 is absent in the OTS primary tumor. The PD-1/PD-L1 expression is described

mostly in metastatic locations and is linked to a poorer outcome [76,77]. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) is another suppressive protein, which is also minimally expressed as PD-1 and only in metastatic disease [77]. Nevertheless, this T-cell immunity is rare in OTS, explaining the fact that predominant immune system balance is macrophage based [74,77–80]. Hypoxia is known to attract myeloid-derived suppressor cells and tumor-associated macrophages (TAMs).

In the innate immune response, osteoclasts favor metastatic OTS spread with local environment destruction. A balance between M1, considered as pro-inflammatory and anti-tumoral macrophages, and M2, considered as pro-tumoral macrophages, is frequently described in OTS to explain the response to macrophage modulators, as well as the capacity to have local or distant progression. This M2 polarization phenotype and specific TAM infiltration change during OTS tumor growth represents a whole dynamic process precisely regulated by hypoxia [59,79,81,82]. Hypoxia and especially the PI3K/AKT/mTOR upstream pathway are known to regulate this osteoclastogenesis phenomenon [82,83], but also the immune system through cell surface protein modulations. This balanced M1/M2 phenotype in OTS is complex, but growing evidence suggests that a high density of M2 TAM is associated with OTS primary and metastatic locations. The TAM recruitment in the OTS microenvironment is hypoxia-dependent and in direct link with several chemokines and their receptors.

In fact, M1 macrophages, which are activated by interferon γ or lipopolysaccharide, exhibit anti-tumor properties through the production of pro-inflammatory cytokines (interleukin-1 β and interleukin-6) and inducible factors against pathogens such as the tumor necrosis factor α (TNF- α) and the nitric oxide synthase (iNOS). HIF-1 α upregulation usually stimulates the amino acid metabolism and promotes nitric oxide synthase activity. When suppressing the M1 macrophage activity, as in the recent OS2006 therapeutic protocol, it can promote a poorer outcome in metastatic disease [81]. The presence of the M1 subtype was therefore linked to a better OTS patient outcome [78–80]. M2 macrophages, instead, are activated by anti-inflammatory cytokines (interleukin-4 and interleukin-10) and the PI3K/AKT/mTOR pathway, and exert immunosuppressive effects associated with enhanced angiogenesis and tumor progression, pushing OTS cells in stemness status [78,82,83]. In fact, they are able to suppress T cell proliferation [84], favor angiogenesis through VEGF and angiopoietin signaling, and enhance cancer stem cell properties by upregulating CD133+ cells [34].

Additional effects of hypoxia reinforce this M2 pro-tumoral phenotype. In fact, hypoxia can also decrease the expression of cell surface MHC class I-related chain molecules A (MICA) and prevents the immune cells degrading the tumor cell via a HIF-1 α -dependent pathway linked to increased expression of metalloproteinase (MMP) [77]. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) interplays with HIF-1 α protein overexpression and stabilization [50] for the promotion of OTS tumorigenesis, whereas osteoclast activity is enhanced by the hypoxia-induced ANGPTL4 (angiopoietin-like 4) overexpression [8].

Recent studies have linked hypoxia and immunomodulation scores in OTS [77,85]. This score also supports the idea that hypoxia-driven immunity is associated with glycolytic metabolic switch, collagen biosynthesis and redox regulation. Globally, HIFs and mTOR pathway exert a tumor-promoting effect by intra-tumor immunosuppression.

6. HIFs Targeting in OTS

All these findings point out the crucial role of HIFs in osteosarcoma initiation, progression and immune dynamic modulation. They suggest that HIFs and their upstream and downstream pathways might be key targets in OTS treatments. Many hypoxia inhibitors exist to stop directly or indirectly the hypoxic pathways and now are progressively used in clinical trials. When focusing on HIFs, several levels of inhibition can be listed and are summarized in Figure 3. In fact, a growing number of molecules have been demonstrated to inhibit HIFs by reducing mRNA or protein levels, DNA-binding activity or the trans-activation of some HIFs related genes [85]. They can also block HIFs/HIF-1 β dimerization. The synthesis of HIF-1 α is strictly related to mTOR activity. As described above, the continuous activation of PI3K/AKT and RAS/MAPK signals determines the increase of mTOR activity and the

consecutive activation of HIFs [26,27]. Thus, inhibitors of those biomarkers are also able to inhibit HIF activity and reduce their impact on OTS cell adaptation.

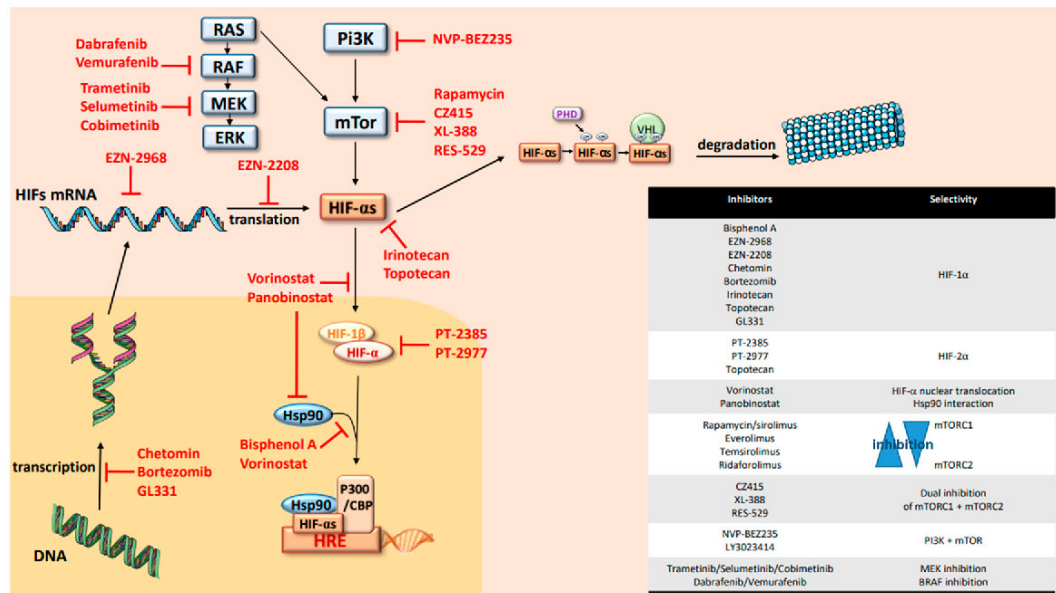


Figure 3. Hypoxia cascade targeting.

HIFs, as transcription factors, have been considered undruggable for a long time [40]. To date, no specific inhibitors of HIF-1 α have been brought to the market, but the use of indirect or partial inhibitors are currently increasing in trials and recently in OTS protocols. Oppositely, recent direct inhibitors of HIF-2 α have been developed and commercialized, such as PT2385 or PT2977, but are not used directly in OTS and only preclinical data show that HIF-2 α targeting can attenuate the proliferation, migration and invasion of OTS cells [61,85,86]. Those specific inhibitors of HIF-2 α destabilize heterodimerization of HIF-2 α with ARNT, leading to inhibition of target genes and tumor regression. These treatments were used recently in clinical trials for patients with clear cell renal cell carcinoma, where the majority of patients had a partial response or a stable disease associated with a good tolerance [61,85,86]. The HIF-1 α inhibitors are mostly decreasing HIF-1 α expression with a proven mRNA downregulation in the OTS preclinical models or in cancer trials [85–90]. So, molecules like EZN-2968 or EZN-2208 and topoisomerase I (irinotecan) and II (topotecan and GL331) are frequently used for this purpose. A small number of pediatric studies have proposed these molecules, which were well tolerated and efficient in hypoxic tumors like neuroblastomas. Only topotecan seems to have a dual effect of HIF-1 α /HIF-2 α . Histone DeAcetylase (HDAC) inhibitors, like vorinostat or panobinostat, can also block HIF-1 α nuclear translocation via direct acetylation of its associated chaperone, heat shock protein 90 (Hsp90) [90]. Artificially, the same mechanism of inhibition was also shown with Bisphenol A that is not used in clinics [91]. Another way to stop HIF transcription is to interrupt interaction between HIF-1 α and its coactivator p300, which results in a mitigation of hypoxia-inducible transcription [92]. Proteasome inhibitors like bortezomib might also interact with HIF transcription and can be used efficiently alone or in combination with other targeted therapies of the mTOR/HIF pathway [93,94]. Upstream to HIFs, PI3K/AKT, RAS/ERK/MAPK and mTOR are also good candidates for targeted treatments using specific mTORC1 and/or mTORC2 inhibitors or combining mTOR and PI3K antagonists [62,72,95,96]. In parallel, RAS/BRAF/MEK/ERK mitogen-activated protein kinase cascade is known to be involved in OTS. It integrates signals from cell surface receptors to activate ERK and such upregulation can be also targeted by MEK or BRAF inhibitors. In fact, multiple selective, orally available, non-ATP-competitive small-molecules are now available in clinics to block MEK1 and

MEK2 (MAPK kinase) proteins and might be administered in new OTS trials. They might be proposed in a single drug approach or combined with BRAF inhibitors.

Finally, when inhibiting mechanisms induced by hypoxia, efficient drugs should promote tumor growth and cell proliferation arrest through an up-regulation of caspase-3. These molecules might also attenuate tumor angiogenesis leading to efficacy antitumor strategies and reduce usually radio- and chemoresistance of human OS cells in hypoxic conditions. Nevertheless, frequent oncogenic addictions are described due to an AKT reinduction after mTOR or HIFs inhibition, leading to a selective resistance to these inhibitors and conducting the proposal of more and more combinations in phase I and II trials [62,72,94].

When looking at osteosarcoma trials on the <https://clinicaltrials.gov> website, fewer than 15 currently opened protocols are using such strategies with HIFs inhibitors such as irinotecan, mTor inhibitors (ridaforolimus, everolimus, sirolimus) or AKT/Pi3K inhibition with dual mTOR/PI3K targeting. More recently, other therapies independently from HIFs, such as the CA IX inhibitors or strategies targeting metabolic OTS cell vulnerabilities, seem to be effective in in vitro and in vivo models with an increase of cytotoxicity on OTS cells [97].

The future of all those therapies' proposals is to combine treatments in order to increase the effects and decrease therapeutic resistance.

7. In Vitro and In Vivo Models to Recreate OTS Hypoxic Microenvironment

To study hypoxia features and test druggability of those biomarkers, a recent effort was made to develop appropriate models to mimic closely both OTS patient cells and the tumor microenvironment (Figure 4). First, the OTS cells themselves are now mostly patient-derived cell lines based on diagnostic tumor or relapse tissue specimens. In fact, for several years, there have been commercial cell lines allowing the study of OTS. In order to get as close as possible to the physiological conditions, it is important to develop cell models able to recreate the OTS behavior and heterogeneity and the tumor microenvironment, where several supporting stromal cell subtypes are present [98]. For this purpose, more and more 3D-based approaches have been developed and offer advantages over the monolayer-based cultures (Figure 4).

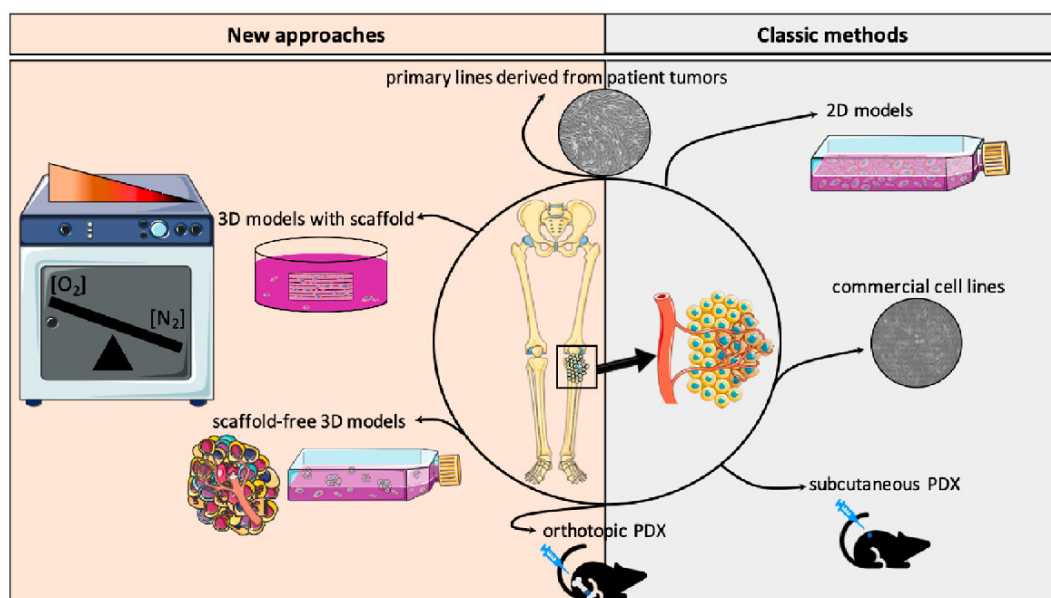


Figure 4. In vitro and in vivo models recreating osteosarcoma and hypoxic environment.

The evolution of 3D OTS culture systems now takes into account the engineered osteoid matrix, as well as oxygen concentrations, angiogenic cells or intrinsic immune components (e.g., macrophages or lymphocytes). They overlap the tumor spheroids to the complex organoid-derived models, where the endogenous infiltrating immune stroma is automatically present. In sphere culture, co-culture with angiogenic cells like HUVEC, as well as macrophages, can partially replace the stromal or immune subtypes observed in initial patient tumors. For the bone environment, one major part is the osseous matrix, which can be mimicked by natural (e.g., collagen, Matrigel) or synthetic scaffolds (e.g., hydrogels) [99]. For hypoxia features and oxygen variations, hypoxia chambers are the most accurate culture environment, where deep intra-tumor hypoxia might be approximate (Figure 4).

Patient tumor cells can also be injected subcutaneously or orthotopically in mouse models [100]. Unfortunately, in these models, metastatic modelization is variable and probably more frequently accessible during orthotopic injections. To facilitate tumor cell dissemination and metastatic spread, some publications describe femoral artery ligation close to the orthotopic injection to promote a hypoxic environment and enhance the probability of success in obtaining pulmonary metastases.

The final goal of all those models is to obtain more representative results after drug testing and allow a rapid translation of those preclinical data into new innovative therapeutic trials for patients.

8. Conclusions

Development of innovative therapies for worst outcome OTS is an unmet medical need. The extended knowledge in hypoxia-driven OTS development offers understanding of crucial key points of OTS progression and interaction with its immune environment. It also helps to support the development of personalized hypoxia-targeting trials in OTS, as drugs are available and might be used in combination. Nevertheless, to improve targeting hypoxic biomarkers, a number of challenges need to be addressed in specific 3D preclinical models integrating hypoxia, bone matrix, patient-derived OTS cells and the endogenous immune-infiltrating macrophages.

Author Contributions: N.E.-W. conceived the plan of the review and wrote together with M.P. the manuscript. M.P. did also the figures in collaboration with Q.F., B.L., N.W. and C.N. brought their expertise in the writing of osteosarcoma development. M.M., E.G., I.L.-R., S.M. and M.D. were helping in the writing on model. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research did not receive any specific grant.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest for this publication.

References

1. Duong, L.M.; Richardson, L.C. Descriptive epidemiology of malignant primary osteosarcoma using population-based registries, United States, 1999–2008. *J. Regist. Manag.* **2013**, *40*, 59–64.
2. Kaatsch, P.; Strothotte, J.; Becker, C.; Bielack, S.; Dirksen, U.; Blettner, M. Pediatric bone tumors in Germany from 1987 to 2011: Incidence rates, time trends and survival. *Acta Oncol.* **2016**, *55*, 1145–1151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mirabello, L.; Troisi, R.J.; Savage, S.A. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004. *Cancer* **2009**, *115*, 1531–1543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Duchman, K.; Gao, Y.; Miller, B.T. Prognostic factors for survival in patients with high-grade osteosarcoma using the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program database. *Cancer Epidemiol.* **2015**, *39*, 593–599. [[CrossRef](#)]
5. Moore, D.D.; Luu, H.H. Osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* **2014**, *162*, 65–92.
6. Cates, J.M.M.; Dupont, W.D. Cytologic anaplasia is a prognostic factor in osteosarcoma biopsies, but mitotic rate or extent of spontaneous tumor necrosis are not: A critique of the College of American Pathologists Bone Biopsy template. *Mod. Pathol.* **2016**, *30*, 52–59. [[CrossRef](#)]
7. Friebele, J.C.; Peck, J.; Pan, X.; Abdel-Rasoul, M.; Mayerson, J.L. Osteosarcoma: A Meta-Analysis and Review of the Literature. *Am. J. Orthop.* **2015**, *44*, 547–553.

8. Zhang, T.; Kastrenopoulou, A.; Larrouette, Q.; Athanasou, N.A.; Knowles, H.J. Angiopoietin-like 4 promotes osteosarcoma cell proliferation and migration and stimulates osteoclastogenesis. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 536. [[CrossRef](#)]
9. Lowery, C.D.; Blosser, W.; Dowless, M.; Renschler, M.; Perez, L.V.; Stephens, J.; Pytowski, B.; Wasserstrom, H.; Stancato, L.F.; Falcon, B.; et al. Anti-VEGFR2 therapy delays growth of preclinical pediatric tumor models and enhances anti-tumor activity of chemotherapy. *Oncotarget* **2019**, *10*, 5523–5533. [[CrossRef](#)]
10. Huvos, A.G.; Rosen, G.; Marcove, R.C. Primary osteogenic sarcoma: Pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy en bloc resection, and prosthetic bone replacement. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **1977**, *101*, 14–18.
11. Hayashi, Y.; Yokota, A.; Harada, H.; Huang, G. Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer. *Cancer Sci.* **2019**, *110*, 1510–1517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Brahimi-Horn, M.C.; Pouyssegur, J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3582–3591. [[CrossRef](#)]
13. Wenger, R.H.; Kurtcuoglu, V.; Scholz, C.; Marti, H.H.; Hoogewijs, D. Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia* **2015**, *3*, 35–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Carreau, A.; El Hafny-Rahbi, B.; Matejuk, A.; Grillon, C.; Kieda, C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* **2011**, *15*, 1239–1253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bhandari, V.; Hoey, C.; Liu, L.Y.; LaLonde, E.; Ray, J.; Livingstone, J.; Lesurf, R.; Shiah, Y.-J.; Vujcic, T.; Huang, X.; et al. Molecular landmarks of tumor hypoxia across cancer types. *Nat. Genet.* **2019**, *51*, 308–318. [[CrossRef](#)]
16. Ouyang, Y.; Li, H.; Bu, J.; Li, X.; Chen, Z.; Xiao, T. Hypoxia-Inducible Factor-1 Expression Predicts Osteosarcoma Patients' Survival: A Meta-Analysis. *Int. J. Boil. Markers* **2016**, *31*, 229–234. [[CrossRef](#)]
17. Li, Y.; Zhang, W.; Li, P.; Tu, C. Prognosis value of Hypoxia-inducible factor-1 α expression in patients with bone and soft tissue sarcoma: A meta-analysis. *SpringerPlus* **2016**, *5*, 1370. [[CrossRef](#)]
18. Zhang, B.; Li, Y.-L.; Zhao, J.-L.; Zhen, O.; Yu, C.; Yang, B.-H.; Yu, X.-R. Hypoxia-inducible factor-1 promotes cancer progression through activating AKT/Cyclin D1 signaling pathway in osteosarcoma. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *105*, 1–9. [[CrossRef](#)]
19. Schito, L.; Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer* **2016**, *2*, 758–770. [[CrossRef](#)]
20. Carmeliet, P.; Dor, Y.; Herbert, J.-M.; Fukumura, D.; Brusselmans, K.; Dewerchin, M.; Neeman, M.; Bono, F.; Abramovitch, R.; Maxwell, P.H.; et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **1998**, *394*, 485–490. [[CrossRef](#)]
21. Wang, G.L.; Jiang, B.; Rue, E.A.; Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5510–5514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Pugh, C.W.; O'Rourke, J.F.; Nagao, M.; Gleadle, J.M.; Ratcliffe, P.J. Activation of Hypoxia-inducible Factor-1; Definition of Regulatory Domains within the α Subunit. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 11205–11214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ratcliffe, P.J. HIF-1 and HIF-2: Working alone or together in hypoxia? *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 862–865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chen, R.; Lai, U.H.; Zhu, L.; Singh, A.; Ahmed, M.; Forsyth, N.R. Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors. *Front. Cell Dev. Boil.* **2018**, *6*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Mohlin, S.; Hamidian, A.; Von Stedingk, K.; Bridges, E.; Wigerup, C.; Bexell, D.; Pahlman, S. PI3K–mTORC2 but not PI3K–mTORC1 Regulates Transcription of HIF2A/EPAS1 and Vascularization in Neuroblastoma. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 4617–4628. [[CrossRef](#)]
26. Arsham, A.M.; Howell, J.J.; Simon, M.C. A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 29655–29660. [[CrossRef](#)]
27. Minet, E.; Arnould, T.; Michel, G.; Roland, I.; Mottet, D.; Raes, M.; Remacle, J.; Michiels, C. ERK activation upon hypoxia: Involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett.* **2000**, *468*, 53–58. [[CrossRef](#)]

28. Green, Y.S.; Sargis, T.; Reichert, E.C.; Rudasi, E.; Fuja, D.; Jonasch, E.; Koh, M.Y. Hypoxia-Associated Factor (HAF) Mediates Neurofibromin Ubiquitination and Degradation Leading to Ras–ERK Pathway Activation in Hypoxia. *Mol. Cancer Res.* **2019**, *17*, 1220–1232. [[CrossRef](#)]
29. Courtney, R.; Ngo, D.C.; Malik, N.; Ververis, K.; Tortorella, S.M.; Karagiannis, T.C. Cancer metabolism and the Warburg effect: The role of HIF-1 and PI3K. *Mol. Boil. Rep.* **2015**, *42*, 841–851. [[CrossRef](#)]
30. Semenza, G.L. HIF-1: Using two hands to flip the angiogenic switch. *Cancer Metastasis Rev.* **2000**, *19*, 59–65. [[CrossRef](#)]
31. Royds, J.A.; Dower, S.K.; Qwarnstrom, E.E.; Lewis, C.E. Response of tumour cells to hypoxia: Role of p53 and NFkB. *Mol. Pathol.* **1998**, *51*, 55–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* **2012**, *148*, 399–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Keith, B.; Johnson, R.S.; Simon, M.C. HIF1 α and HIF2 α : Sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *12*, 9–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Koka, P.; Mundre, R.S.; Rangarajan, R.; Chandramohan, Y.; Subramanian, R.; Dhanasekaran, A. Uncoupling Warburg effect and stemness in CD133+ve cancer stem cells from Saos-2 (osteosarcoma) cell line under hypoxia. *Mol. Boil. Rep.* **2018**, *45*, 1653–1662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Oda, S.; Oda, T.; Nishi, K.; Takabuchi, S.; Wakamatsu, T.; Tanaka, T.; Adachi, T.; Fukuda, K.; Semenza, G.L.; Hirota, K. Macrophage Migration Inhibitory Factor Activates Hypoxia-Inducible Factor in a p53-Dependent Manner. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2215. [[CrossRef](#)]
36. Wang, Y.; Wang, X.; Su, X.; Liu, T. HIF-2 α affects proliferation and apoptosis of MG-63 osteosarcoma cells through MAPK signaling. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *15*, 2174–2178. [[CrossRef](#)]
37. Rankin, E.B.; Rha, J.; Selak, M.A.; Unger, T.L.; Keith, B.; Liu, Q.; Haase, V.H. Hypoxia-Inducible Factor 2 Regulates Hepatic Lipid Metabolism. *Mol. Cell. Boil.* **2009**, *29*, 4527–4538. [[CrossRef](#)]
38. Wagner, F.; Holzapfel, B.M.; Martine, L.C.; McGovern, J.; Lahr, C.A.; Boxberg, M.; Proding, P.M.; Grassel, S.; Loessner, D.; Huttmacher, D.W. A humanized bone microenvironment uncovers HIF2 alpha as a latent marker for osteosarcoma. *Acta Biomater.* **2019**, *89*, 372–381. [[CrossRef](#)]
39. Serocki, M.; Bartoszewska, S.; Janaszak-Jasiecka, A.; Ochocka, R.J.; Collawn, J.F.; Bartoszewski, R. miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: A novel therapeutic target. *Angiogenesis* **2018**, *21*, 183–202. [[CrossRef](#)]
40. Johnson, R.W.; Schipani, E.; Giaccia, A.J. HIF targets in bone remodeling and metastatic disease. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *150*, 169–177. [[CrossRef](#)]
41. Kim, D.-H.; Sarbassov, D.D.; Ali, S.M.; King, J.E.; Latek, R.R.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Sabatini, D.M. mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell* **2002**, *110*, 163–175. [[CrossRef](#)]
42. Guertin, D.A.; Sabatini, D.M. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell* **2007**, *12*, 9–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Shaw, R.J.; Cantley, L.C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **2006**, *441*, 424–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Manning, B.D.; Tee, A.R.; Logsdon, M.N.; Blenis, J.; Cantley, L.C. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 151–162. [[CrossRef](#)]
45. Avruch, J.; Long, X.; Lin, Y.; Ortiz-Vega, S.; Rapley, J.; Papageorgiou, A.; Oshiro, N.; Kikkawa, U. Activation of mTORC1 in two steps: Rheb-GTP activation of catalytic function and increased binding of substrates to raptor1. *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, *37*, 223–226. [[CrossRef](#)]
46. Semenza, G.L. HIF-1: Upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2010**, *20*, 51–56. [[CrossRef](#)]
47. Koh, M.Y.; Spivak-Kroizman, T.R.; Powis, G. HIF-1 regulation: Not so easy come, easy go. *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33*, 526–534. [[CrossRef](#)]
48. Karsenty, G. The complexities of skeletal biology. *Nature* **2003**, *423*, 316–318. [[CrossRef](#)]
49. Kronenberg, H.M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **2003**, *423*, 332–336. [[CrossRef](#)]
50. Provot, S.; Schipani, E. Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *328*, 658–665. [[CrossRef](#)]

51. Cramer, T.; Schipani, E.; Johnson, R.S.; Swoboda, B.; Pfander, D. Expression of VEGF isoforms by epiphyseal chondrocytes during low-oxygen tension is HIF-1 alpha dependent. *Osteoarthr. Cartil.* **2004**, *12*, 433–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Maes, C.; Araldi, E.; Haigh, K.; Khatri, R.; Van Looveren, R.; Giaccia, A.J.; Haigh, J.J.; Carmeliet, G.; Schipani, E. VEGF-independent cell-autonomous functions of HIF-1 α regulating oxygen consumption in fetal cartilage are critical for chondrocyte survival. *J. Bone Miner. Res.* **2012**, *27*, 596–609. [[CrossRef](#)]
53. Rankin, E.B.; Wu, C.; Khatri, R.; Wilson, T.L.; Andersen, R.; Araldi, E.; Rankin, A.L.; Yuan, J.; Kuo, C.J.; Schipani, E.; et al. The HIF Signaling Pathway in Osteoblasts Directly Modulates Erythropoiesis through the Production of EPO. *Cell* **2012**, *149*, 63–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Gorissen, B.M.C.; De Bruin, A.; Miranda-Bedate, A.; Korthagen, N.; Wolschrijn, C.; De Vries, T.J.; Van Weeren, R.; Tryfonidou, M. Hypoxia negatively affects senescence in osteoclasts and delays osteoclastogenesis. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *234*, 414–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hulley, P.A.; Bishop, T.; Vernet, A.; Schneider, J.E.; Edwards, J.R.; Athanasou, N.A.; Knowles, H.J. Hypoxia-inducible factor 1-alpha does not regulate osteoclastogenesis but enhances bone resorption activity via prolyl-4-hydroxylase 2: HIF-1 α and PHD2 regulate bone resorption by osteoclasts. *J. Pathol.* **2017**, *242*, 322–333. [[CrossRef](#)]
56. Li, W.; He, X.; Xue, R.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Lu, J.; Zhang, Z.; Xue, L.; Zhan, Y. Combined over-expression of the hypoxia-inducible factor 2 α gene and its long non-coding RNA predicts unfavorable prognosis of patients with osteosarcoma. *Pathol.-Res. Pract.* **2016**, *212*, 861–866. [[CrossRef](#)]
57. Okuno, K.; Matsubara, T.; Nakamura, T.; Iino, T.; Kakimoto, T.; Asanuma, K.; Matsumine, A.; Sudo, A. Carbonic anhydrase IX enhances tumor cell proliferation and tumor progression in osteosarcoma. *OncoTargets Ther.* **2018**, *11*, 6879–6886. [[CrossRef](#)]
58. Mizobuchi, H.; García-Castellano, J.M.; Philip, S.; Healey, J.H.; Gorlick, R. Hypoxia Markers in Human Osteosarcoma: An Exploratory Study. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2008**, *466*, 2052–2059. [[CrossRef](#)]
59. XIX CONGRESSO NAZIONALE S.I.C.O.O.P. SOCIETA' ITALIANA CHIRURGHI ORTOPEDICI DELL'OSPEDALITA' PRIVATA ACCREDITATA; Capasso, L.; Florio, M.; Lillo, M.; Basilico, M.; De Santis, V.; Ziranu, A.; Grasso, A.; Minutillo, F.; Maccauro, G. Vascular endothelial growth factor expression as a biomarker of prognosis in patients with chondrosarcoma, Ewing's sarcoma and osteosarcoma. Current concepts. *J. Boil. Regul. Homeost.* **2019**, *33*, 39–43.
60. Wagner, F.; Holzapfel, B.M.; Thibaudeau, L.; Straub, M.; Ling, M.-T.; Grifka, J.; Loessner, D.; Levesque, J.-P.; Huttmacher, D.W.; Martine, L. A Validated Preclinical Animal Model for Primary Bone Tumor Research. *J. Bone Joint. Surg. Am. Vol.* **2016**, *98*, 916–925. [[CrossRef](#)]
61. Zhao, D.; Wang, S.; Chu, X.; Han, D. LncRNA HIF2PUT inhibited osteosarcoma stem cells proliferation, migration and invasion by regulating HIF2 expression. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2019**, *47*, 1342–1348. [[CrossRef](#)]
62. Bertoldo, F.; Silvestris, F.; Ibrahim, T.; Cognetti, F.; Generali, D.; Ripamonti, C.; Amadori, D.; Colleoni, M.; Conte, P.; Del Mastro, L.; et al. Targeting bone metastatic cancer: Role of the mTOR pathway. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergy* **2014**, *1845*, 248–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Niu, J.; Yan, T.; Guo, W.; Wang, W.; Zhao, Z. Insight Into the Role of Autophagy in Osteosarcoma and Its Therapeutic Implication. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Feng, H.; Wang, J.; Chen, W.; Shan, B.; Guo, Y.; Xu, J.; Wang, L.; Guo, P.; Zhang, Y. Hypoxia-induced autophagy as an additional mechanism in human osteosarcoma radioresistance. *J. Bone Oncol.* **2016**, *5*, 67–73. [[CrossRef](#)]
65. Smida, J.; Xu, H.; Zhang, Y.; Baumhoer, D.; Ribi, S.; Kovac, M.; Von Luetlichau, I.; Bielack, S.; O'Leary, V.B.; Leib-Mösch, C.; et al. Genome-wide analysis of somatic copy number alterations and chromosomal breakages in osteosarcoma. *Int. J. Cancer* **2017**, *141*, 816–828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Yang, W.; Qi, Y.-B.; Si, M.; Hou, Y.; Nie, L. A comprehensive analysis for associations between multiple microRNAs and prognosis of osteosarcoma patients. *Peer J.* **2020**, *8*, 8389.
67. Fang, F.; VanCleave, A.; Helmuth, R.; Torres, H.; Rickel, K.; Wollenzien, H.; Sun, H.; Zeng, E.; Zhao, J.; Tao, J. Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in human osteosarcoma cells. *Oncotarget* **2018**, *9*, 36780–36792. [[CrossRef](#)]

68. Scholten, D.J.; Timmer, C.M.; Peacock, J.D.; Pelle, D.W.; Williams, B.O.; Steensma, M.R. Down Regulation of Wnt Signaling Mitigates Hypoxia-Induced Chemoresistance in Human Osteosarcoma Cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e111431. [[CrossRef](#)]
69. Zhao, C.; Zhang, Q.; Yu, T.; Sun, S.; Wang, W.; Liu, G. Hypoxia promotes drug resistance in osteosarcoma cells via activating AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling. *J. Bone Oncol.* **2016**, *5*, 22–29. [[CrossRef](#)]
70. Roncuzzi, L.; Pancotti, F.; Baldini, N. Involvement of HIF-1 α activation in the doxorubicin resistance of human osteosarcoma cells. *Oncol. Rep.* **2014**, *32*, 389–394. [[CrossRef](#)]
71. Zheng, D.; Wu, W.; Dong, N.; Jiang, X.; Xu, J.; Zhan, X.; Zhang, Z.; Hu, Z. Mxd1 mediates hypoxia-induced cisplatin resistance in osteosarcoma cells by repression of the PTEN tumor suppressor gene. *Mol. Carcinog.* **2017**, *56*, 2234–2244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Kiezun, A.; Perry, J.; Tonzi, P.; Van Allen, E.; Carter, S.L.; Baca, S.; Bhatt, A.; Lawrence, M.; Walensky, L.; Wagle, N.; et al. Abstract A41: Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma. *Sarcomas* **2014**, *111*, 5564. [[CrossRef](#)]
73. Ahmed, N.; Salsman, V.S.; Yvon, E.; Louis, C.U.; Perlaky, L.; Wels, W.S.; Dishop, M.K.; E Kleinerman, E.; Pulé, M.; Rooney, C.M.; et al. Immunotherapy for Osteosarcoma: Genetic Modification of T cells Overcomes Low Levels of Tumor Antigen Expression. *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 1779–1787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Shen, J.K.; Cote, G.M.; Choy, E.; Yang, P.; Harmon, D.; Schwab, J.; Nielsen, G.P.; Chebib, I.; Ferrone, S.; Wang, X.; et al. Programmed cell death 1 ligand 1 expression in osteosarcoma. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 690–698. [[CrossRef](#)]
75. Koirala, P.; Roth, M.E.; Gill, J.; Piperdi, S.; Chinai, J.M.; Geller, D.S.; Hoang, B.H.; Park, A.; Fremed, M.A.; Zang, X.; et al. Immune infiltration and PD-L1 expression in the tumor microenvironment are prognostic in osteosarcoma. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 30093. [[CrossRef](#)]
76. Thanindratarn, P.; Dean, D.C.; Nelson, S.D.; Hornicek, F.J.; Duan, Z. Advances in immune checkpoint inhibitors for bone sarcoma therapy. *J. Bone Oncol.* **2019**, *15*, 100221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Mceachron, T.A.; Triche, T.J.; Sorenson, L.; Parham, D.M.; Carpten, J.D. Profiling targetable immune checkpoints in osteosarcoma. *OncImmunology* **2018**, *7*, e1475873-12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Hong, W.; Yuan, H.; Gu, Y.; Liu, M.; Ji, Y.; Huang, Z.; Yang, J.; Ma, L. Immune-related prognosis biomarkers associated with osteosarcoma microenvironment. *Cancer Cell Int.* **2020**, *20*, 1–12. [[CrossRef](#)]
79. Gomez-Brouchet, A.; Illac, C.; Gilhodes, J.; Bouvier, C.; Aubert, S.; Guinebretiere, J.-M.; Marie, B.; Larousserie, F.; Entz-Werlé, N.; De Pinieux, G.; et al. CD163-positive tumor-associated macrophages and CD8-positive cytotoxic lymphocytes are powerful diagnostic markers for the therapeutic stratification of osteosarcoma patients: An immunohistochemical analysis of the biopsies from the French OS2006 phase 3 trial. *OncImmunology* **2017**, *6*, e1331193. [[CrossRef](#)]
80. Buddingh, E.P.; Kuijjer, M.L.; Duim, R.A.; Agelopoulos, K.; Myklebost, O.; Serra, M.; Mertens, F.; Hogendoorn, P.C.; Lankester, A.C.; Cleton-Jansen, A.-M.; et al. Tumor-Infiltrating Macrophages Are Associated with Metastasis Suppression in High-Grade Osteosarcoma: A Rationale for Treatment with Macrophage Activating Agents. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 2110–2119. [[CrossRef](#)]
81. Piperno-Neumann, S.; Le Deley, M.-C.; Rédini, F.; Pacquement, H.; Marec-Berard, P.; Petit, P.; Brisse, H.J.; Lervat, C.; Gentet, J.C.; Entz-Werlé, N.; et al. Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): A randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 1070–1080. [[CrossRef](#)]
82. Tiedemann, K.; Le Nihouannen, D.; Fong, J.E.; Hussein, O.; Barralet, J.E.; Komarova, S.V. Regulation of Osteoclast Growth and Fusion by mTOR/raptor and mTOR/riCTOR/Akt. *Front. Cell Dev. Boil.* **2017**, *5*, 5. [[CrossRef](#)]
83. Linke, M.; Fritsch, S.D.; Sukhbaatar, N.; Hengstschläger, M.; Weichhart, T. mTORC1 and mTORC2 as regulators of cell metabolism in immunity. *FEBS Lett.* **2017**, *591*, 3089–3103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Wigerup, C.; Pählman, S.; Bexell, D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *164*, 152–169. [[CrossRef](#)]
85. Song, Z.; Pearce, M.C.; Jiang, Y.; Yang, L.; Goodall, C.; Miranda, C.L.; Milovancev, M.; Bracha, S.; Kolluri, S.K.; Maier, C.S. Delineation of hypoxia-induced proteome shifts in osteosarcoma cells with different metastatic propensities. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

86. Courtney, K.D.; Infante, J.R.; Lam, E.T.; Figlin, R.A.; Rini, B.I.; Brugarolas, J.; Zojwalla, N.J.; Lowe, A.M.; Wang, K.; Wallace, E.M.; et al. Phase I Dose-Escalation Trial of PT2385, a First-in-Class Hypoxia-Inducible Factor-2 α Antagonist in Patients With Previously Treated Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 867–874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Jeong, W.; Rapisarda, A.; Park, S.R.; Kinders, R.J.; Chen, A.; Melillo, G.; Turkbey, B.; Steinberg, S.M.; Choyke, P.; Doroshow, J.H.; et al. Pilot trial of EZN-2968, an antisense oligonucleotide inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α), in patients with refractory solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2013**, *73*, 343–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Norris, R.E.; Shusterman, S.; Gore, L.; Muscal, J.A.; Macy, M.E.; Fox, E.; Berkowitz, N.; Buchbinder, A.; Bagatell, R. Phase 1 evaluation of EZN-2208, a polyethylene glycol conjugate of SN38, in children adolescents and young adults with relapsed or refractory solid tumors. *Pediatr. Blood Cancer* **2014**, *61*, 1792–1797. [[CrossRef](#)]
89. Guérin, E.; Raffelsberger, W.; Pencreach, E.; Maier, A.; Neuville, A.; Schneider, A.; Bachellier, P.; Rohr, S.; Petitprez, A.; Poch, O.; et al. In Vivo Topoisomerase I Inhibition Attenuates the Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Target Genes and Decreases Tumor Angiogenesis. *Mol. Med.* **2011**, *18*, 83–94. [[CrossRef](#)]
90. Zhang, C.; Yang, C.; Feldman, M.J.; Wang, H.; Pang, Y.; Maggio, D.M.; Zhu, D.; Nesvick, C.L.; Dmitriev, P.; Bullova, P.; et al. Vorinostat suppresses hypoxia signaling by modulating nuclear translocation of hypoxia inducible factor 1 alpha. *Oncotarget* **2017**, *8*, 56110–56125. [[CrossRef](#)]
91. Kubo, T.; Maezawa, N.; Osada, M.; Katsumura, S.; Funae, Y.; Imaoka, S. Bisphenol A, an environmental endocrine-disrupting chemical, inhibits hypoxic response via degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha): Structural requirement of bisphenol A for degradation of HIF-1alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *318*, 1006–1011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Jin, Z.; Aixi, Y.; Baiwen, Q.; Zonghuan, L.; Xiang, H. Inhibition of Hypoxia-inducible Factor-1 Alpha Radiosensitized MG-63 Human Osteosarcoma Cells in Vitro. *Tumori J.* **2015**, *101*, 578–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Abd-Aziz, N.; Stanbridge, E.J.; Shafee, N. Bortezomib attenuates HIF-1- but not HIF-2-mediated transcriptional activation. *Oncol. Lett.* **2015**, *10*, 2192–2196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Loh, A.H.; Stewart, E.; Bradley, C.L.; Chen, X.; Daryani, V.; Stewart, C.F.; Calabrese, C.; Funk, A.; Miller, G.; Karlstrom, A.; et al. Combinatorial screening using orthotopic patient derived xenograft-expanded early phase cultures of osteosarcoma identify novel therapeutic drug combinations. *Cancer Lett.* **2019**, *442*, 262–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Zhu, Y.-R.; Zhou, X.-Z.; Zhu, L.-Q.; Yao, C.; Fang, J.-F.; Zhou, F.; Deng, X.-W.; Zhang, Y.-Q. The anti-cancer activity of the mTORC1/2 dual inhibitor XL388 in preclinical osteosarcoma models. *Oncotarget* **2016**, *7*, 49527–49538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Huang, J.-C.; Cui, Z.-F.; Chen, S.-M.; Yang, L.-J.; Lian, H.-K.; Liu, B.; Su, Z.-H.; Liu, J.-S.; Wang, M.; Hu, Z.-B.; et al. NVP-BEZ235 synergizes cisplatin sensitivity in osteosarcoma. *Oncotarget* **2017**, *9*, 10483–10496. [[CrossRef](#)]
97. Perut, F.; Carta, F.; Bonuccelli, G.; Grisendi, G.; Di Pompo, G.; Avnet, S.; Sbrana, F.V.; Hosogi, S.; Dominici, M.; Kusuzaki, K.; et al. Carbonic anhydrase IX inhibition is an effective strategy for osteosarcoma treatment. *Expert Opin. Ther. Targets* **2015**, *19*, 1593–1605. [[CrossRef](#)]
98. Cortini, M.; Baldini, N.; Avnet, S. New Advances in the Study of Bone Tumors: A Lesson From the 3D Environment. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 814. [[CrossRef](#)]
99. Monteiro, M.V.; Gaspar, V.M.; Ferreira, L.P.; Mano, J.F. Hydrogel 3D in vitro tumor models for screening cell aggregation mediated drug response. *Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 1855–1864. [[CrossRef](#)]
100. Castillo-Tandazo, W.; Mutsaers, A.J.; Walkley, C.R. Osteosarcoma in the Post Genome Era: Preclinical Models and Approaches to Identify Tractable Therapeutic Targets. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2019**, *17*, 343–352. [[CrossRef](#)]



Annexe 4

Revue scientifique publiée dans ChemBioChem

**Biological relevance of RGD-integrin subtype-specific ligands in
cancer**

Biological relevance of RGD-integrin subtype-specific ligands in cancer

Saidu SANI^{a,b,\$}, Mélissa MESSE^{a,c} \$, Quentin FUCHS^a, Marina PIERREVELCIN^a, Patrice LAQUERRIERE^c, Natacha ENTZ-WERLE^{a,d}, Damien REITA^{a,e}, Nelly ETIENNE-SELLOUM^{a,f}, Véronique BRUBAN^a, Laurence CHOULIER^a, Sophie MARTIN^a and Monique DONTENWILL^{a,*}

a) Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies (LBP), UMR CNRS 7021, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, CS 60024, 67401 Illkirch cedex, France. Institut Thématique Interdisciplinaire InnoVec, Université de Strasbourg.

b) Cancer and Diabetic Research Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Science, Federal University Ndufu-Alike Ikwo, P.M.B 1010, Abakaliki, Ebonyi State. Nigeria.

c) Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), UMR CNRS 7178, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France.

d) Pediatric Onco-Hematology Department, Pediatrics, University Hospital of Strasbourg, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg, France.

e) Department of Oncobiology, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, University Hospital of Strasbourg, France

f) Institut du Cancer Strasbourg Europe (ICANS), Service de Pharmacie, Strasbourg, France.

\$ equal first authors

* corresponding author; monique.dontenwill@unistra.fr

ABSTRACT

Integrins are heterodimeric transmembrane proteins able to connect the cells with the micro-environment. They represent a family of receptors involved in almost all the hallmarks of cancer. Integrins recognizing the Arg-Gly-Asp (RGD) peptide in their natural extracellular-matrix ligands, have been particularly investigated as tumoral therapeutic targets. In the last 30 years, intense research was dedicated to design specific RGD-like ligands able to discriminate selectively the different RGD-recognizing integrins. Efforts of chemists led to the proposition of modified peptide or peptidomimetic libraries to be used for tumor targeting and/or for tumor imaging. Here we review, from the biological point of view, the rational underlying the need to clearly delineate each RGD-integrin subtype by selective tools. We describe the complex roles of RGD-integrins (mainly the most studied $\alpha\beta3$ and $\alpha5\beta1$ integrins) in tumors, the steps towards selective ligands and the current usefulness of such ligands. Although the impact of integrins in cancer is well acknowledged, the biological characteristics of each integrin subtype in a specific tumor are far from being completely

resolved. Selective ligands may help to reconsider integrins as therapeutic targets in specific clinical settings.

1 INTRODUCTION

Integrins are heterodimeric transmembrane proteins recognized first as adhesion molecules on specific extracellular matrix (ECM) components. They were further assigned to a true receptor family as their ability to initiate intracellular signaling pathways was largely emphasized. In the hallmarks of cancer as defined by Hanahan and Weinberg in 2000 ^[1], integrins were acknowledged as actors of self-sufficiency growth signaling, as regulators of anti-apoptotic signaling, angiogenesis and adaptation to new environments during invasion and metastasis of tumor cells. New hallmarks were added ten years later ^[2], in particular, the contribution of the tumor microenvironment (TME) to tumorigenesis. The TME does not only contain ECM but also recruits immune and stromal cells able to facilitate tumor growth. Changes in the repertoire and expression level of integrins in these non tumoral cells were described to support aggressive tumoral phenotypes ^[3]. Integrins were recognized early as therapeutic targets in cancers ^[4–6]. The most studied integrins in oncology belong to the RGD-integrin subfamily with $\alpha\beta3/\beta5$ and $\alpha5\beta1$ integrins in the spotlight for the two last decades ^[7]. The RGD (Arg-Gly-Asp) peptidic motif is found in ECM proteins (fibronectin, vitronectin, osteopontin, thrombospondin among others) and represents a selective binding site for integrins to ECM. Since activation of integrins by adhesion to their ECM ligands was shown to be essential to non-tumoral adherent cell survival ^[8,9], similar effect was expected for tumoral cells. Disrupting the interactions between integrins and ECM through RGD-like compounds appeared therefore a valuable strategy to trigger tumor cell apoptosis. Research in the design and characterization of integrin antagonists as cancer drug candidates has expanded rapidly ^[10]. Cilengitide, a cyclic RGD peptide, was the first $\alpha\beta3/\beta5$ integrin antagonist that reached the clinic ^[11]. Despite numerous preclinical encouraging data, cilengitide failed to improve glioblastoma patient's survival in phase II/III randomized clinical trials ^[12,13]. No better outcomes were obtained with Volociximab or MINT1526A, both $\alpha5\beta1$ integrin inhibitory antibodies, in several clinical settings ^[14,15]. These disappointing results impeded considerably research on RGD-integrins as therapeutic targets in oncology. However, recent reviews on integrins and cancer emphasize the need to reconsider the topic ^[6,7,16–20]. In this review we will focus mainly on RGD-integrins $\alpha\beta3$ and $\alpha5\beta1$ as most ligands have been designed for them. We will support the idea that integrins should still be considered as targets for anti-cancer therapies. In addition, ligands specific for definite subtypes of integrins will help in understanding how and where integrins must be targeted and will shed more light on the complexity of the topic.

2 RGD-integrins in cancer

2.1. Integrins in focal adhesion and cell migration

Common rules of integrins have been extensively reviewed elsewhere (for a recent review see ^[21]). In human, 18 α and 8 β subunits can combine to form heterodimeric transmembrane

proteins with specific ligand recognition properties. They share an architecture comprising an extracellular domain, a transmembrane region, and a generally short intracellular part. If specific adhesion to ligands lies in the composition of the $\alpha\beta$ extracellular head, integrins signal inside the cells by structural changes and recruitment of cytoplasmic proteins in complexes named adhesomes^[22]. Such complexes contain about 2000 proteins among which a highly dynamic “consensus adhesome” of 60 proteins may control integrin dependent cell adhesion and signaling^[23]. Mechanical forces can influence the assembly/disassembly of these macro-molecular structures adding a further level of complexity^[24]. Recent work pointed that $\beta3$ integrins were more strongly bound to their substrate in adhesion sites submitted to high tension than $\beta1$ integrins^[25]. The dynamic nanoscale organization of integrins and their regulators within focal adhesion points was shown to differ between $\beta3$ - and $\beta1$ -integrins in the control of signaling during cellular functions^[26,27]. Although both integrins recognize fibronectin, striking differences between $\alpha5\beta1$ and $\alpha v\beta3$ integrin signaling pathways have been described in normal/tumoral cells. Most data addressed the question of focal adhesion point maturation and cell migration. $\alpha v\beta3$ integrins were associated with persistent migration through activation of Rac-mDia1, whereas $\alpha5\beta1$ integrins were linked to RhoA-Rock-MyoDII pathway and random migration^[28]. The role of both fibronectin-binding integrin classes can begin with an initial competition followed by a cooperative crosstalk^[29]. Alternatively, blocking $\alpha v\beta3$ integrin may activate $\alpha5\beta1$ integrin recycling back to membrane and increase cell migration^[30]. Distinct mechanisms and/or efficient crosstalk between both integrins have emerged over the years^[31]. New insights on focal adhesion maturation have been made possible using ligands specifically designed to target either $\alpha v\beta3$ or $\alpha5\beta1$ integrins. It was shown that focal adhesion maturation on $\alpha5\beta1$ integrin-selective substrates is dependent on $\alpha v\beta3$ integrin recruitment^[32–34]. Most of the above described knowledges were obtained in non-tumoral cells and translation to cancer cells may be even more decisive for their functional behavior as the expression of integrins and the ratio between $\alpha v\beta3$ and $\alpha5\beta1$ integrin levels are specifically altered in tumoral tissues as is the case for the expression of their common ECM ligand fibronectin^[35].

2.2. Integrins in hallmarks of cancer

Thirty years ago integrin $\alpha v\beta3$ emerged as a marker of tumoral neo-angiogenesis which was inhibited by specific antagonists such as cilengitide in preclinical models^[36–38]. These results were challenged as enhanced pathological angiogenesis and increased primary tumor growth were observed in mice lacking $\beta3$ or $\beta3/\beta5$ integrins^[39]. Specific overexpression of Integrin $\beta3$ in tumor cells suppressed tumor growth in a human model of gliomagenesis^[40]. Additionally, it was shown that nanomolar concentrations of RGD-mimetic $\alpha v\beta3/\alpha v\beta5$ inhibitors can enhance the growth of tumors in vivo by promoting VEGF-mediated angiogenesis^[41]. These data may explain in part why the therapies with these inhibitors have failed in humans^[12,13]. Other integrins participate in angiogenesis^[42] and the proangiogenic function of $\alpha5\beta1$ integrin has been clearly demonstrated^[43–45]. It was shown that reduced expression of the $\alpha5$ subunit is associated with reduced blood vessel formation and tumor growth^[46] and that $\alpha5\beta1$ integrin was overexpressed in tumoral vessels^[47]. It will be essential to reconsider and to revisit fundamental biology underlying how these integrins coordinate angiogenesis to successfully target them^[48].

Beside their role in angiogenesis, both integrins are overexpressed in many tumoral cells and thought to participate in enhanced survival and resistance to therapies [7,20,49–52]. This overexpression is mainly characterized at the mRNA level but less data exist at the protein level in cohorts of patients. The large transcriptomic databanks available nowadays for different tumor types help not only to define the inter-patient heterogeneity but also to correlate specific gene overexpression in tumor subtypes to patient survival. They have been used for high grade brain tumors (glioblastoma, GBM) for example [53]. In these tumors, $\alpha 5$ and $\beta 1$ integrin mRNAs are overexpressed in GBM versus normal brain but even more in the GBM mesenchymal subgroup [54]; it was less subgroup dependent for αv and $\beta 3$ integrin mRNA [55]. $\alpha 5$ and $\beta 1$ genes are included in the GBM mesenchymal signature so that they represent biomarkers of this aggressive subtype. Interestingly $\alpha 5$ integrin is also overexpressed in subclones of pediatric brain tumors [56]. Extensive evaluation and comparison of integrin gene expression in different tumors and tumor subtypes would be a first step towards efficient anti-integrin therapeutic strategies. Even if determination of integrin proteins in cell lines is a prerequisite to characterize functional implication in vitro, the missing link is however the characterization of integrins at the protein level in clinical studies. Few data on small- to medium-sized patient cohorts are available in the literature. Immunohistochemical analysis of αv or $\beta 3$ integrin protein expression in such cohorts were recently reported in osteosarcoma [57], hepatocellular carcinoma [58], leukemia [59] and the relationships with patient survival established. A retrospective immunohistochemical analysis of $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ or $\alpha v\beta 8$ integrins in the glioblastoma patient cohorts of cilengitide clinical trials was done. It revealed that only $\alpha v\beta 3$ integrin expression in tumoral cells may predict benefit from cilengitide inhibition in a subset of patients with glioblastoma lacking *MGMT* promoter methylation [60]. Similarly, high levels of $\alpha 5$ or $\beta 1$ integrin protein expression corresponded to worse survival in oral carcinoma [61], triple negative breast cancer [62], pancreatic cancer [63], osteosarcoma [64] and colorectal cancer [65]. In the last period, data concerning integrin expressions and functions in non-tumoral cells in the microenvironment of tumors have been increasingly reported. Roles of integrins in Cancer Associated Fibroblasts (CAF) have been reviewed recently [66]. Engineered mice models allowed deletion of integrin gene in specific population of cells. It was shown that acute deletion of $\beta 3$ integrin in endothelial cells transiently diminished tumor growth and angiogenesis but long term deletion was ineffective [67]. Specific deletion of this gene in myeloid cells resulted in enhanced tumor growth [68] and increase of M2 macrophages at the tumor site thus promoting pro-tumoral functions in the microenvironment [69]. In another work, it was shown that tumor-associated macrophages (TAM) accumulation correlated with tumor cell expression of $\alpha v\beta 3$. This characteristic was used to design an $\alpha v\beta 3$ antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against tumoral cells [70]. Two recent works underlined the expression of $\alpha 5$ integrin in the stroma of pancreatic [71] and colorectal tumors [72]. In the former study, inhibition of this integrin in pancreatic stellate cells attenuates tumorigenicity and potentiates efficacy of chemotherapy; in the latter, integrin depletion reduced the ability of CAF to promote cancer cell migration presumably by the down regulation of fibronectin.

All the non-exhaustive recent findings described in the first part of this review suggest that we need to better understand the roles of RGD-integrins in tumors. Encouraging preclinical discoveries with integrin inhibitors did not translate to clinical successes due to the complexity

of integrin biology. We will have to consider not only integrins in tumoral cells and vessels but also in the tumor microenvironment including the immune system (Figure 1). For this point, preclinical modeling of the clinical reality remains a challenge. The overexpression of some integrins in treatment-resistant cells or at metastatic sites must be thoroughly characterized. We will have to refine the positive or negative crosstalk between different integrins and their relationships in specific tumor area or in specific subset of patients. We need to compare different integrin subtypes more systematically to address their respective contribution to tumorigenicity and optimize the use of specific inhibitors. The availability of specific and selective integrin ligands is of great importance to go further on.

3 RGD-integrin ligands

Three main classes of integrin ligands have been proposed: antibodies, RGD-derived peptides and RGD-mimetic small molecules (Figures 2 and 3). More recently, aptamers (short nucleic acid sequences) have been included in this list [73,74]. While antibodies may be highly integrin subtype-specific by nature, RGD-derived ligands may recognize all RGD-binding integrins. Efforts towards achieving high selectivity of RGD-integrin ligands were actively made during the last two decades with, for example, the pioneer works of H. Kessler's group. Although recognizing the same tripeptide sequence in their natural ligands, similarities and differences between RGD-integrins have been highlighted based on their crystal structures. The structures of the extracellular fragment of integrins $\alpha v\beta 3$, $\alpha IIb\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ were respectively resolved in 2001 [75,76], 2004 [77] and 2012 [78] helping to understand how ligands fit in the integrin binding sites.

3.1. Specificity, selectivity, and activity of integrin ligands.

Until today, integrin ligands were mainly tested for their capacity to bind integrins and to disrupt their interactions with their preferred natural ligands, using as a readout the role of integrin as adhesion proteins. For the evaluation of large libraries of compounds, tests must be rapid and reliable for lead characterization and optimization. They are based either on cell adhesion assays or on purified soluble integrins adhesion assays on specific ECM substrates. Results (expressed as IC50 values) obtained by both approaches are strongly variable depending on several parameters. Rational design of such tests appears crucial to compare ligands for one integrin or one ligand for different integrins. Recent works give insights in this topic [79,80]. Concerning activity, the notion of integrin antagonism versus agonism is fairly taken into account in the first steps of ligand selection. This point becomes critical in the field of oncology where disruption of cell adherence does not automatically relate to cell death. Moreover, RGD-like compounds may behave as true agonists mimicking the ECM natural ligand-dependent activation of integrins and subsequent pro-tumoral signaling pathways [41]. Very interestingly, recent developments on integrin pure antagonists have been published supporting a new area in integrin ligand research [81-84]. Based on electron microscopy, X-ray crystallography and receptor priming studies, it was shown that these new classes of integrin antagonists do not induce the integrin conformational changes associated with activation.

3.2 Antibodies

Specific antibodies against RGD-integrins contributed to study integrin activation-state regulation, integrin biology and integrin-based therapeutics. In contrast with peptides or peptide-mimetics acting essentially at the RGD binding domain, they cover a large set of epitopes localized in different structural parts of the α or β integrin subunits^[85]. They can be classified into three main groups: stimulatory or activation-specific, inhibitory and non-functional antibodies as largely described by the group of M. Humphries^[86–88]. It must be emphasized here that integrin conformations are known to be variable in relation to their functional status which addressed mainly their capacity to adhere to ECM ligands. The bent, the extended closed and the extended open global conformations are likely to be shared by the majority of integrins. Using electron microscopy and biophysical thermodynamic analysis on $\alpha 5\beta 1$ integrin and with the help of specific antibodies, it was shown that only the extended-open conformation mediates adhesion to fibronectin and that intrinsic affinity depends on specific integrin conformational states^[89,90]. Antibodies against $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha \nu \beta 3$ integrins are thus widely used in preclinical studies to depict fundamental cues, label or inhibit these integrins. Among inhibitory antibodies, some reached early phases clinical trials (volociximab for $\alpha 5\beta 1$ integrin and Intratumumab/CNTO95 or abituzumab for $\alpha \nu \beta x$ integrin)^[91,92]. But despite being well tolerated, they failed to progress to phase II/III trials.

3.3. RGD-derived peptides

Cilengitide, a cyclic pentapeptide, developed twenty years ago by Horst Kessler and his group, became the prototype of RGD-derived peptides with enhanced selectivity towards $\alpha \nu \beta 3$ integrin. The story of cilengitide is extensively described in^[93] explaining the different steps of development from a linear, flexible and non-selective RGD peptide to a cyclic, rigid and selective one. In the search for peptides with increased selectivity either towards $\alpha \nu \beta 3$ or $\alpha 5\beta 1$ integrins, multiple strategies have been explored using isoDGR motifs^[94,95], cyclic azapeptides^[96] or di-N-methylation of cilengitide^[97]. Cilengitide remains the reference compound in the field and integrin binding characteristics of new integrin ligands are often compared to it. Other groups worked around the cyclic pentapeptide structure. For example, cyclic RGD pseudopentapeptide incorporating bicyclic lactams were described^[98] and further optimized leading to potent antagonists of $\alpha \nu \beta 3/\beta 5$ integrins^[98–101]. Series of cyclo-octapeptides including RGD have also been described. Based on One-bead One-Compound combinatorial library technology, the lead compound LXW7 was discovered^[102] and optimized as LXW64 and LXZ2^[103,104]. These compounds proved able to selectively label tumoral cells expressing $\alpha \nu \beta 3$ in vitro and in vivo. Recently, a novel specific integrin $\alpha \nu \beta 3$ targeting linear pentapeptide, RWrNK, was described^[105]. Its development used a structure-based pharmacophore method integrated with molecular docking. Bifunctional diketopiperazines were introduced into cyclic peptidomimetics containing the RGD sequence (DKP-RGD) leading to compounds specific for $\alpha \nu \beta 3/\beta 5$ integrins^[106]. Interestingly, these compounds exhibited binding affinities towards $\alpha 5\beta 1$ integrin but always lower than for $\alpha \nu \beta 3$ integrin^[107]. Thus using several approaches, numerous peptidic ligands specific/ selective for $\alpha \nu \beta 3/\beta 5$ integrins have been made available unlike those for $\alpha 5\beta 1$ integrin. The isoDGR peptide library^[95] was screened to confer to the small lead pentapeptide selectivity towards the fibronectin-binding integrins $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha \nu \beta 6$ ^[94]. Through sequential N-methylation, the biselective c(phg-isoDGR-k) was converted to c(phg-isoDGR-(NMe)k) which appeared as a selective $\alpha 5\beta 1$ integrin ligand

^[108]. It should be noted that other peptides highly selective for $\alpha 5\beta 1$ integrin have also been proposed without an RGD sequence. The first example is the Cys-Arg-Arg-Glu-Thr-Ala-Trp-Ala-Cys (CRRETAWAC) peptide originally discovered in 1993 from the screening of a phage-display library in which heptapeptides were flanked by cysteine residues, thus making the inserts potentially cyclic ^[109]. Further investigations showed that residues of the $\alpha 5$ subunit involved in recognition of RRETAWA are predicted to lie close to those involved in RGD binding but do not completely overlap ^[110]. The second example is ATN161, a capped five amino-acid peptide derived from the synergy region PHSRN of fibronectin (which contributes to high affinity recognition of fibronectin by $\alpha 5\beta 1$ integrin). It was shown to be very selective for $\alpha 5\beta 1$ integrin over $\alpha \nu\beta 3/\beta 5/\beta 6/\beta 8$ integrins in an ELISA test using soluble purified integrins ^[79]. Compared to other integrin ligands, ATN-161 has the particularity of not competing with the fibronectin binding and thus is unable to detach the cells from the matrix. It was included in two clinical trials (for advanced renal cancer and recurrent glioblastoma) but no results were posted to date.

Panels of selective RGD-derived peptides are available. Few of them have been studied as true antagonists of integrin signaling pathways and pro-tumoral effects. However, knowledge on the mode of binding of RGD-containing peptidomimetics has largely increased with the advent of computer-assisted docking studies in the crystal structure of the integrin binding sites. This helped and will further improve the design of new ligands.

3.4. Small molecules as RGD-mimetics.

In parallel with the design of RGD-derived peptides, search for RGD-mimetics, led to the discovery of selective more stable and bioavailable small molecules as integrin ligands. The first goal of research was to obtain selectivity for $\alpha \nu\beta 3$ versus $\alpha 11\beta 3$ integrins. This latter RGD-integrin is involved in platelets regulation and undesirable antagonist side effects had to be avoided. The second goal was to evaluate the possibility of distinguishing the $\alpha \nu\beta 3$ integrin from the $\alpha 5\beta 1$ in order to have highly selective ligands even though their RGD binding site are highly homologous. Both goals were achieved by pharmaceutical and academic groups. A review recapitulated the $\alpha \nu\beta 3$ antagonists available in 2000 ^[111]. The field has progressed and began to focus also on $\alpha 5\beta 1$ integrin. The initial series of $\alpha \nu\beta 3$ integrin ligands were generally also recognized by $\alpha 5\beta 1$ integrin. A series of nonpeptide integrin ligands containing spirocyclic scaffolds was described including SJ749 and SJ755, the first highly selective molecules for $\alpha 5\beta 1$ integrin ^[112,113]. Their biological effects have been characterized : they behave as potential enhancers of antibiotic efficacy by interfering with $\alpha 5\beta 1$ integrin/fibronectin/M1 protein-dependent bacterial entry in epithelial cells ^[114], as blockers of angiogenesis ^[115] and as inhibitors of proliferation and migration of glioma cells ^[116,117]. Docking of SJ749 into a built 3D model of the binding domain of $\alpha 5\beta 1$ integrin has permitted the identification of two potentially important and unique regions of this integrin compared to others ^[118]. This model was largely used for the rational design of highly active and selective ligands for $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha \nu\beta 3$ integrins achieving a selectivity ratio as high as 10000 ^[119–121]. The differentiation between the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha \nu\beta 3$ integrin-dependent glioma migration modes was possible using such ligands and revealed that $\alpha \nu\beta 3$ integrin antagonists increased single cell migration whereas $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists decreased it ^[122]. Additionally, we showed that, unlike

$\alpha v \beta 3$ integrin antagonists, those selective for $\alpha 5 \beta 1$ integrin pushed glioma cells towards apoptosis when combined with chemotherapy or p53 activators^[123–125]. Starting from a virtual combinatorial library designed to cover the chemical space specific for RGD-like compounds, Stragies et al synthesized dual $\alpha 5 \beta 1 / \alpha v \beta 3$ specific inhibitors^[126]. Optimization of one lead gave JSM6427 which exhibits 10000 times more affinity for $\alpha 5 \beta 1$ versus $\alpha v \beta 3$ and showed inhibitory activity in several models of pathological angiogenesis^[127–129]. It was further developed for the treatment of macular degeneration but did not overpass the phase 1 clinical trial.

More recently, new β -lactam derivatives were designed to target integrins. Interestingly, the concept of integrin agonists has gradually emerged since compounds with azetidinone as the only cyclic framework increased integrin-dependent cell adhesion rather than decreasing it^[130]. Substituent variations around the β -lactam core led to the discovery of selective compounds for different integrins including $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha v \beta 3 / \beta 5$. Similar selectivity ranges were obtained for these integrins by competitive solid-phase binding assays using purified integrins and cell-adhesion based assays^[131,132]. Increase in cell adhesion by integrin “agonists” was corroborated by an increase in integrin-dependent ERK signaling pathway. First characterized as racemic compounds, it was demonstrated that only (S)-enantiomers maintain the agonist activity thus revealing an important stereochemical requirement for integrin recognition and activation^[133]. Whether integrin agonists could play a role as therapeutic drugs in oncology remains to be demonstrated^[134].

Taking together all the data concerning these RGD-mimetic ligands, structural determinants discriminating different RGD-binding integrins have been characterized based on compound structure-activity relationships and computer-assisted docking on crystallographic integrin models. As is the case for the RGD-derived peptides, few of these original ligands are currently under investigations to check their potential anti-tumoral effects. The main knowledge concerns their ability to inhibit/increase integrin-dependent cell adhesion. Analysis of their roles on integrin signaling pathways has become an urgent need to more clearly decipher the biological cues of specific RGD-integrins in tumoral or surrounding stromal cells.

4 Current applications of RGD-ligands

Huge efforts to get more and more selective RGD-ligands led to interesting libraries of compounds. Due to the failure of the lead cilengitide to improve patient survival in clinical trials, none of them appears to be developed as anti-cancer therapeutics. Currently they are being exploited as useful tools either as tumor diagnostic or tumor targeting markers. They also serve for functionalization of biomaterials helping to solve several selective integrin-dependent cell phenotypes.

4.1. RGD-ligands for tumor diagnostic

As stated above, the input of RGD-integrins in hallmarks of cancer is largely acknowledged. Their heterogeneous expression in patient tumors closed the way to use their antagonists as therapeutics in unselected cohort of patients. Characterization of the integrin expression panel by a noninvasive way may be of importance to delineate patient subpopulations and adapt therapies. From early 2000 to 2015, huge efforts to characterize Positron Emission

Tomography (PET) markers for $\alpha\beta3$ integrin were made. Radiolabeled cyclic RGD peptides (with ^{18}F , $^{64}\text{Cu}/^{68}\text{Ga}$ tracers) were thoroughly designed and characterized (for review see [135] and [136]). Several were investigated in the clinic [137–139]. By contrast very few radiotracers specific for $\alpha5\beta1$ integrin are available (Table 1) as this integrin moved in the forefront of cancer research more recently, in particular for its unambiguous role in neoangiogenesis. The first $\alpha5\beta1$ -selective integrin antagonist useful as a PET tracer was described in 2013 by the group of H. Kessler [140]. A selective $\alpha5\beta1$ integrin peptidomimetic (described in [119,141]) was functionalized with the NODAGA chelator, labelled with ^{68}Ga and named FR366 [142]. FR366 has a high affinity for $\alpha5\beta1$ integrin, a specific integrin uptake in vivo and a good tumor-to-background contrast. A further step was achieved by trimerization of an azide-functionalized pseudopeptide [143] using a 1-pot click chemistry procedure with a TRAP chelator scaffold [144]. The compound ^{68}Ga -Aquibepirin obtained by this way has affinity and selectivity for $\alpha5\beta1$ integrins and gave high contrast PET imaging in vivo [145,146]. A similar approach was used with α (phg-isoDGR-(NMe)k peptide (see above) which was conjugated to pentynoic acid on the lysine side chain and then trimerized by the TRAP chelator. In a proof of concept experiment this compound labeled with ^{68}Ga behaved as a potential PET agent for noninvasive imaging of $\alpha5\beta1$ expressing tumors [108]. Other PET peptidic radiotracers for $\alpha5\beta1$ integrin were proposed (based on CRETAVAC or KSSPHSRN(SG)5RGDSP linear peptides) but they lack an efficient accumulation in $\alpha5\beta1$ integrin-positive tumors in vivo [147,148].

4.2. RGD-ligands for tumor targeting

Integrins appear as valuable entry door for anti-cancer drugs in a tumor selective way. Based on the overexpression of $\alpha\beta3$ and $\alpha5\beta1$ integrins in tumor vasculature and cells and their ability to get internalized through endosomes [149], strategies have been developed to achieve specific transport for therapeutics. RGD-ligands coupled to cytotoxic drugs can serve as direct carriers and are intensively investigated. The drug is coupled to the RGD peptide by a linker which may be cleaved inside the cell to allow the therapeutic effect (for review see [150,151]. Examples of RGD-ligands and cytotoxic drug complexes can be found in two recent reviews ([152,153]. Recent advances in the field included dual-functional complexes that incorporate one fluorophore on one side for imaging and a cytotoxic pro-drug on the other side [154]. But currently intense efforts are mainly directed towards nanocarriers functionalized with RGD-ligands. We will not develop here this topic as recent reviews are available to which readers can refer [155–161].

Although huge literature exists concerning the applications available with RGD-ligands for targeting tumors, they appear, to our knowledge, non-dedicated to address specifically the selectivity of RGD-integrins. The RGD-ligands mainly used in these studies have been designed to target $\alpha\beta3$ integrins. From a biologist point of view, further improvements will be achieved when tailored systems will be proposed to target specifically either $\alpha\beta3$ or $\alpha5\beta1$ integrin expressing tumors.

5 Summary and outlook

In this review we focused on two RGD-integrins which are important players in oncology, the $\alpha\beta3$ and $\alpha5\beta1$ integrins. It is important to note that other RGD-integrins become under

spotlight as for example the $\alpha\beta6$ integrin [162]. Selective Inhibitors and PET tracers have been designed [163–167] which will be useful to detect and treat epithelial carcinoma for example. Integrins remain therapeutic targets in oncology (as assessed by 2 recent reviews [168,169]) but we have to reconsider their roles in the area of personalized medicine.

Our goal in this review was to give the biologist point of view regarding the chemical approaches to design selective compounds differentiating RGD-integrins in preclinical and clinical settings. According to the data (even the recent ones), the $\alpha\beta3$ integrin still remains the gold standard tumoral target. Efforts are however made towards other integrins. This is an important point in order to have a better knowledge of the complex integrin world. To go further, we have to set up a virtuous circle by increasing the knowledge on one particular integrin using selective ligands and inversely to take into account this knowledge to design new ligands with improved efficacy. The biological tests are crucial as are the preclinical models. It is time to progress towards models that better reflect the clinical reality to test integrin antagonists. For example, replacing 2D by 3D sphere cultures and hence by organoids/tumoroids to test integrin antagonists is nowadays accessible steps. In addition, we have to develop high/medium throughput assays aiming to characterize the biological effects of RGD-ligands on not only integrin/cell adhesion but also on oncogenic signaling pathways. We have also to keep in mind that integrin antagonists/agonists may inhibit/activate general mechanisms which are under the control of several players. It will be of great interest to evaluate more thoroughly the benefit of their association with other targeted therapies. Transdisciplinary networks involving biologists, clinicians and chemists will greatly help to go through preclinical investigations towards clinical benefits with integrin ligands.

Acknowledgements

We are thankful for financial support from Institut National du Cancer (grant INCA_11527), Ligue contre le Cancer (CCIR Est), Association pour la Recherche contre le Cancer, CNRS (grant 80 PRIME), the University of Strasbourg (France), the Alex Akwueme Federal University Ndufu-Alike Ikwo (Nigeria), the Association Lyons Club de Niederbronn Les Bains.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Keywords : RGD-integrins, ligand design, inhibitors, peptides, cancer

References

- [1] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
- [2] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
- [3] J. A. Eble, D. Gullberg, *Cancers* **2019**, *11*, DOI 10.3390/cancers11091296.
- [4] J. S. Desgrosellier, D. A. Cheresh, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 9–22.
- [5] D. Bianconi, M. Unseld, G. W. Prager, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, DOI 10.3390/ijms17122037.
- [6] S. Raab-Westphal, J. F. Marshall, S. L. Goodman, *Cancers* **2017**, *9*, 110.

- [7] M. Nieberler, U. Reuning, F. Reichart, J. Notni, H.-J. Wester, M. Schwaiger, M. Weinmüller, A. Räder, K. Steiger, H. Kessler, *Cancers* **2017**, *9*, 116.
- [8] S. M. Frisch, K. Vuori, E. Ruoslahti, P. Y. Chan-Hui, *J. Cell Biol.* **1996**, *134*, 793–799.
- [9] D. G. Stupack, X. S. Puente, S. Boutsabouloy, C. M. Storgard, D. A. Cheresch, *J. Cell Biol.* **2001**, *155*, 459–470.
- [10] A. Meyer, J. Auernheimer, A. Modlinger, H. Kessler, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 2723–2747.
- [11] C. Mas-Moruno, F. Rechenmacher, H. Kessler, *Anticancer Agents Med. Chem.* **2010**, *10*, 753–768.
- [12] R. Stupp, M. E. Hegi, T. Gorlia, S. C. Erridge, J. Perry, Y.-K. Hong, K. D. Aldape, B. Lhermitte, T. Pietsch, D. Grujicic, J. P. Steinbach, W. Wick, R. Tarnawski, D.-H. Nam, P. Hau, A. Weyerbrock, M. J. B. Taphoorn, C.-C. Shen, N. Rao, L. Thurzo, U. Herrlinger, T. Gupta, R.-D. Kortmann, K. Adamska, C. McBain, A. A. Brandes, J. C. Tonn, O. Schnell, T. Wiegel, C.-Y. Kim, L. B. Nabors, D. A. Reardon, M. J. van den Bent, C. Hicking, A. Markivskyy, M. Picard, M. Weller, *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 1100–1108.
- [13] L. B. Nabors, K. L. Fink, T. Mikkelsen, D. Grujicic, R. Tarnawski, D. H. Nam, M. Mazurkiewicz, M. Salacz, L. Ashby, V. Zagonel, R. Depenni, J. R. Perry, C. Hicking, M. Picard, M. E. Hegi, B. Lhermitte, D. A. Reardon, *Neuro-Oncol.* **2015**, *17*, 708–717.
- [14] C. D. Weekes, L. S. Rosen, A. Capasso, K. M. Wong, W. Ye, M. Anderson, B. McCall, J. Fredrickson, E. Wakshull, S. Eppler, Q. Shon-Nguyen, R. Desai, M. Huseni, P. S. Hegde, T. Pourmohamad, I. Rhee, A. Bessudo, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2018**, *82*, 339–351.
- [15] K. M. Bell-McGuinn, C. M. Matthews, S. N. Ho, M. Barve, L. Gilbert, R. T. Penson, E. Lengyel, R. Palaparthi, K. Gilder, A. Vassos, W. McAuliffe, S. Weymer, J. Barton, R. J. Schilder, *Gynecol. Oncol.* **2011**, *121*, 273–279.
- [16] D. Bianconi, M. Unsel, G. W. Prager, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 2037.
- [17] A. Ellert-Miklaszewska, K. Poleszak, M. Pasierbinska, B. Kaminska, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 888.
- [18] M. Janiszewska, M. C. Primi, T. Izard, *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 2495–2505.
- [19] H. Hamidi, J. Ivaska, *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 533–548.
- [20] A.-F. Blandin, G. Renner, M. Lehmann, I. Lelong-Rebel, S. Martin, M. Dontenwill, *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 279.
- [21] Y. A. Kadry, D. A. Calderwood, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2020**, *1862*, 183206.
- [22] R. O. Hynes, *Cell* **2002**, *110*, 673–687.
- [23] E. R. Horton, A. Byron, J. A. Askari, D. H. J. Ng, A. Millon-Frémillon, J. Robertson, E. J. Koper, N. R. Paul, S. Warwood, D. Knight, J. D. Humphries, M. J. Humphries, *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1577–1587.
- [24] L. MacKay, A. Khadra, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2020**, *18*, 393–416.
- [25] R. De Mets, I. Wang, M. Bolland, C. Oddou, P. Moreau, B. Fourcade, C. Albiges-Rizo, A. Delon, O. Destaing, *Mol. Biol. Cell* **2018**, *30*, 181–190.
- [26] O. Rossier, V. Oceau, J.-B. Sibarita, C. Leduc, B. Tessier, D. Nair, V. Gatterdam, O. Destaing, C. Albigès-Rizo, R. Tampé, L. Cognet, D. Choquet, B. Lounis, G. Giannone, *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 1057–1067.
- [27] N. Strohmeier, M. Bharadwaj, M. Costell, R. Fässler, D. J. Müller, *Nat. Mater.* **2017**, *16*, 1262–1270.
- [28] H. B. Schiller, M.-R. Hermann, J. Polleux, T. Vignaud, S. Zanivan, C. C. Friedel, Z. Sun, A. Raducanu, K.-E. Gottschalk, M. Théry, M. Mann, R. Fässler, *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 625–636.

- [29] M. Bharadwaj, N. Strohmeyer, G. P. Colo, J. Helenius, N. Beerenwinkel, H. B. Schiller, R. Fässler, D. J. Müller, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14348.
- [30] G. Jacquemet, D. M. Green, R. E. Bridgewater, A. von Kriegsheim, M. J. Humphries, J. C. Norman, P. T. Caswell, *J. Cell Biol.* **2013**, *202*, 917–935.
- [31] I. Samaržija, A. Dekanić, J. D. Humphries, M. Paradžik, N. Stojanović, M. J. Humphries, A. Ambriović-Ristov, *Cancers* **2020**, *12*, 1910.
- [32] D. Missirlis, T. Haraszti, C. v. C. Scheele, T. Wiegand, C. Diaz, S. Neubauer, F. Rechenmacher, H. Kessler, J. P. Spatz, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23258.
- [33] C. Diaz, S. Neubauer, F. Rechenmacher, H. Kessler, D. Missirlis, *J. Cell Sci.* **2020**, *133*, DOI 10.1242/jcs.232702.
- [34] V. Schaufler, H. Czichos-Medda, V. Hirschfeld-Warnecken, S. Neubauer, F. Rechenmacher, R. Medda, H. Kessler, B. Geiger, J. P. Spatz, E. A. Cavalcanti-Adam, *Cell Adhes. Migr.* **2016**, *10*, 505–515.
- [35] G. Efthymiou, A. Saint, M. Ruff, Z. Rekad, D. Ciais, E. Van Obberghen-Schilling, *Front. Oncol.* **2020**, *10*, DOI 10.3389/fonc.2020.00641.
- [36] P. C. Brooks, R. A. Clark, D. A. Cheresch, *Science* **1994**, *264*, 569–571.
- [37] P. C. Brooks, A. M. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, D. A. Cheresch, *Cell* **1994**, *79*, 1157–1164.
- [38] S. Yamada, X.-Y. Bu, V. Khankaldyyan, I. Gonzales-Gomez, J. G. McComb, W. E. Laug, *Neurosurgery* **2006**, *59*, 1304–1312; discussion 1312.
- [39] D. Taverna, H. Moher, D. Crowley, L. Borsig, A. Varki, R. O. Hynes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 763–768.
- [40] M. Kanamori, S. R. Vanden Berg, G. Bergers, M. S. Berger, R. O. Pieper, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 2751–2758.
- [41] A. R. Reynolds, I. R. Hart, A. R. Watson, J. C. Welti, R. G. Silva, S. D. Robinson, G. Da Violante, M. Gourlaouen, M. Salih, M. C. Jones, D. T. Jones, G. Saunders, V. Kostourou, F. Perron-Sierra, J. C. Norman, G. C. Tucker, K. M. Hodivala-Dilke, *Nat. Med.* **2009**, *15*, 392–400.
- [42] C. J. Avraamides, B. Garmy-Susini, J. A. Varner, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 604–617.
- [43] L. Li, J. Welser-Alves, A. van der Flier, A. Boroujerdi, R. O. Hynes, R. Milner, *Exp. Neurol.* **2012**, *237*, 46–54.
- [44] D. Pang, L. Wang, J. Dong, X. Lai, Q. Huang, R. Milner, L. Li, *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, 117.
- [45] S. E. Francis, K. L. Goh, K. Hodivala-Dilke, B. L. Bader, M. Stark, D. Davidson, R. O. Hynes, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 927–933.
- [46] D. Taverna, R. O. Hynes, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 5255–5261.
- [47] P. Parsons-Wingenter, I. M. Kasman, S. Norberg, A. Magnussen, S. Zanivan, A. Rissone, P. Baluk, C. J. Favre, U. Jeffry, R. Murray, D. M. McDonald, *Am. J. Pathol.* **2005**, *167*, 193–211.
- [48] F. Demircioglu, K. Hodivala-Dilke, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2016**, *42*, 121–127.
- [49] E. Cruz da Silva, M. Dontenwill, L. Choulier, M. Lehmann, *Cancers* **2019**, *11*, DOI 10.3390/cancers11050692.
- [50] S. Martin, H. Janouskova, M. Dontenwill, *Front. Oncol.* **2012**, *2*, 157.
- [51] F. Schaffner, A. M. Ray, M. Dontenwill, *Cancers* **2013**, *5*, 27–47.
- [52] L. Seguin, J. S. Desgrosellier, S. M. Weis, D. A. Cheresch, *Trends Cell Biol.* **2015**, *25*, 234–240.
- [53] R. G. W. Verhaak, K. A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M. D. Wilkerson, C. R. Miller, L. Ding, T. Golub, J. P. Mesirov, G. Alexe, M. Lawrence, M. O’Kelly, P. Tamayo, B. A. Weir, S. Gabriel, W. Winckler, S. Gupta, L. Jakkula, H. S. Feiler, J. G. Hodgson, C. D. James, J. N. Sarkaria, C. Brennan, A. Kahn, P. T. Spellman, R. K.

- Wilson, T. P. Speed, J. W. Gray, M. Meyerson, G. Getz, C. M. Perou, D. N. Hayes, Cancer Genome Atlas Research Network, *Cancer Cell* **2010**, *17*, 98–110.
- [54] Y.-B. Pan, S. Wang, B. Yang, Z. Jiang, C. Lenahan, J. Wang, J. Zhang, A. Shao, *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 3901–3916.
- [55] L. Malric, S. Monferran, J. Gilhodes, S. Boyrie, P. Dahan, N. Skuli, J. Sesen, T. Filleron, A. Kowalski-Chauvel, E. Cohen-Jonathan Moyal, C. Toulas, A. Lemarié, *Oncotarget* **2017**, *8*, 86947–86968.
- [56] M. Vinci, A. Burford, V. Molinari, K. Kessler, S. Popov, M. Clarke, K. R. Taylor, H. N. Pemberton, C. J. Lord, A. Gutteridge, T. Forsheew, D. Carvalho, L. V. Marshall, E. Y. Qin, W. J. Ingram, A. S. Moore, H.-K. Ng, S. Trabelsi, D. H'mida-Ben Brahim, N. Entz-Werle, S. Zacharoulis, S. Vaidya, H. C. Mandeville, L. R. Bridges, A. J. Martin, S. Al-Sarraj, C. Chandler, M. Sunol, J. Mora, C. de Torres, O. Cruz, A. M. Carcaboso, M. Monje, A. Mackay, C. Jones, *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1204–1215.
- [57] K. Shi, S.-L. Wang, B. Shen, F.-Q. Yu, D.-F. Weng, J.-H. Lin, *World J. Surg. Oncol.* **2019**, *17*, 23.
- [58] F. Sun, J. Wang, Q. Sun, F. Li, H. Gao, L. Xu, J. Zhang, X. Sun, Y. Tian, Q. Zhao, H. Shen, K. Zhang, J. Liu, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 449.
- [59] S. Johansen, A. K. Brenner, S. Bartaula-Brevik, H. Reikvam, Ø. Bruserud, *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, DOI 10.3390/ijms19010251.
- [60] M. Weller, L. B. Nabors, T. Gorlia, H. Leske, E. Rushing, P. Bady, C. Hicking, J. Perry, Y.-K. Hong, P. Roth, W. Wick, S. L. Goodman, M. E. Hegi, M. Picard, H. Moch, J. Straub, R. Stupp, *Oncotarget* **2016**, *7*, 15018–15032.
- [61] Y. Deng, Q. Wan, W. Yan, “<p>Integrin $\alpha 5$ /ITGA5 Promotes The Proliferation, Migration, Invasion And Progression Of Oral Squamous Carcinoma By Epithelial–Mesenchymal Transition</p>,” can be found under <https://www.dovepress.com/integrin-alpha5itga5-promotes-the-proliferation-migration-invasion-and-peer-reviewed-article-CMAR>, **2019**.
- [62] F. Ou-Yang, M.-R. Pan, S.-J. Chang, C.-C. Wu, S.-Y. Fang, C.-L. Li, M.-F. Hou, C.-W. Luo, *Life Sci.* **2019**, *238*, 116963.
- [63] K. Taniuchi, M. Furihata, S. Naganuma, M. Sakaguchi, T. Saibara, *PLOS ONE* **2019**, *14*, e0217920.
- [64] R. Li, Y. Shi, S. Zhao, T. Shi, G. Zhang, *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *123*, 1035–1043.
- [65] Z. Niu, P. Xu, D. Zhu, W. Tang, M. Ji, Q. Lin, T. Liu, L. Ren, Y. Wei, J. Xu, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2018**, *11*, 4771–4783.
- [66] C. Zeltz, I. Primac, P. Erusappan, J. Alam, A. Noel, D. Gullberg, *Semin. Cancer Biol.* **2020**, *62*, 166–181.
- [67] V. Steri, T. S. Ellison, A. M. Gontarczyk, K. Weilbaeher, J. G. Schneider, D. Edwards, M. Fruttiger, K. M. Hodivala-Dilke, S. D. Robinson, *Circ. Res.* **2014**, *114*, 79–91.
- [68] E. A. Morgan, J. G. Schneider, T. E. Baroni, O. Uluçkan, E. Heller, M. A. Hurchla, H. Deng, D. Floyd, A. Berdy, J. L. Prior, D. Piwnica-Worms, S. L. Teitelbaum, F. Patrick Ross, K. N. Weilbaeher, *FASEB J.* **2010**, *24*, 1117–1127.
- [69] X. Su, A. K. Esser, S. R. Amend, J. Xiang, Y. Xu, M. H. Ross, G. C. Fox, T. Kobayashi, V. Steri, K. Roomp, F. Fontana, M. A. Hurchla, B. L. Knolhoff, M. A. Meyer, E. A. Morgan, J. C. Tomasson, J. S. Novack, W. Zou, R. Faccio, D. V. Novack, S. D. Robinson, S. L. Teitelbaum, D. G. DeNardo, J. G. Schneider, K. N. Weilbaeher, *Cancer Res.* **2016**, *76*, 3484–3495.
- [70] H. I. Wettersten, S. M. Weis, P. Pathria, T. Von Schalscha, T. Minami, J. A. Varner, D. A. Cheresh, *Cancer Res.* **2019**, *79*, 5048–5059.

- [71] P. R. Kuninty, R. Bansal, S. W. L. De Geus, D. F. Mardhian, J. Schnittert, J. van Baarlen, G. Storm, M. F. Bijlsma, H. W. van Laarhoven, J. M. Metselaar, P. J. K. Kuppen, A. L. Vahrmeijer, A. Östman, C. F. M. Sier, J. Prakash, *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaax2770.
- [72] L. Lu, R. Xie, R. Wei, C. Cai, D. Bi, D. Yin, H. Liu, J. Zheng, Y. Zhang, F. Song, Y. Gao, L. Tan, Q. Wei, H. Qin, *Mol. Oncol.* **2019**, *13*, 2697–2714.
- [73] P. Fechter, E. Cruz Da Silva, M.-C. Mercier, F. Noulet, N. Etienne-Seloum, D. Guenot, M. Lehmann, R. Vauchelles, S. Martin, I. Lelong-Rebel, A.-M. Ray, C. Seguin, M. Dontenwill, L. Choulier, *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2019**, *17*, 63–77.
- [74] Marie-Cécile Mercier, Monique Dontenwill, Laurence Choulier, *Cancers* **2017**, *9*, 69.
- [75] J.-P. Xiong, *Science* **2001**, *294*, 339–345.
- [76] J.-P. Xiong, *Science* **2002**, *296*, 151–155.
- [77] T. Xiao, J. Takagi, B. S. Collier, J.-H. Wang, T. A. Springer, *Nature* **2004**, *432*, 59–67.
- [78] M. Nagae, S. Re, E. Mihara, T. Nogi, Y. Sugita, J. Takagi, *J. Cell Biol.* **2012**, *197*, 131–140.
- [79] T. G. Kapp, F. Rechenmacher, S. Neubauer, O. V. Maltsev, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Zarka, U. Reuning, J. Notni, H.-J. Wester, C. Mas-Moruno, J. Spatz, B. Geiger, H. Kessler, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 39805.
- [80] R. J. D. Hatley, S. J. F. Macdonald, R. J. Slack, J. Le, S. B. Ludbrook, P. T. Lukey, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 3298–3321.
- [81] J. F. Van Agthoven, J.-P. Xiong, J. L. Alonso, X. Rui, B. D. Adair, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 383–388.
- [82] J. Li, Y. Fukase, Y. Shang, W. Zou, J. M. Muñoz-Félix, L. Buitrago, J. van Agthoven, Y. Zhang, R. Hara, Y. Tanaka, R. Okamoto, T. Yasui, T. Nakahata, T. Imaeda, K. Aso, Y. Zhou, C. Locuson, D. Nesic, M. Duggan, J. Takagi, R. D. Vaughan, T. Walz, K. Hodivala-Dilke, S. L. Teitelbaum, M. A. Arnaout, M. Filizola, M. A. Foley, B. S. Collier, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2019**, *2*, 387–401.
- [83] R. C. Turaga, L. Yin, J. J. Yang, H. Lee, I. Ivanov, C. Yan, H. Yang, H. E. Grossniklaus, S. Wang, C. Ma, L. Sun, Z.-R. Liu, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11675.
- [84] B. D. Adair, J. L. Alonso, J. van Agthoven, V. Hayes, H. S. Ahn, I.-S. Yu, S.-W. Lin, J.-P. Xiong, M. Poncz, M. A. Arnaout, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 398.
- [85] A. Byron, J. D. Humphries, J. A. Askari, S. E. Craig, A. P. Mould, M. J. Humphries, *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 4009–4011.
- [86] A. P. Mould, M. J. Humphries, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, *16*, 544–551.
- [87] A. P. Mould, J. A. Askari, A. Byron, Y. Takada, T. A. Jowitt, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 20993–21007.
- [88] A. P. Mould, S. E. Craig, S. K. Byron, M. J. Humphries, T. A. Jowitt, *Biochem. J.* **2014**, *464*, 301–313.
- [89] J. Li, Y. Su, W. Xia, Y. Qin, M. J. Humphries, D. Vestweber, C. Cabañas, C. Lu, T. A. Springer, *EMBO J.* **2017**, *36*, 629–645.
- [90] Y. Su, W. Xia, J. Li, T. Walz, M. J. Humphries, D. Vestweber, C. Cabañas, C. Lu, T. A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, E3872–E3881.
- [91] S. Almokadem, C. P. Belani, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2012**, *12*, 251–257.
- [92] M. Hussain, S. Le Moulec, C. Gimmi, R. Bruns, J. Straub, K. Miller, on behalf of the PERSEUS Study Group, *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 3192–3200.
- [93] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033–3040.
- [94] A. Bochen, U. K. Marelli, E. Otto, D. Pallarola, C. Mas-Moruno, F. S. Di Leva, H. Boehm, J. P. Spatz, E. Novellino, H. Kessler, L. Marinelli, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1509–1519.

- [95] A. O. Frank, E. Otto, C. Mas-Moruno, H. B. Schiller, L. Marinelli, S. Cosconati, A. Bochen, D. Vossmeier, G. Zahn, R. Stragies, E. Novellino, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9278–9281.
- [96] J. Spiegel, C. Mas-Moruno, H. Kessler, W. D. Lubell, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 5271–5278.
- [97] C. Mas-Moruno, J. G. Beck, L. Doedens, A. O. Frank, L. Marinelli, S. Cosconati, E. Novellino, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9496–9500.
- [98] L. Belvisi, A. Bernardi, A. Checchia, L. Manzoni, D. Potenza, C. Scolastico, M. Castorina, A. Cupelli, G. Giannini, P. Carminati, C. Pisano, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1001–1004.
- [99] D. Arosio, L. Belvisi, L. Colombo, M. Colombo, D. Invernizzi, L. Manzoni, D. Potenza, M. Serra, M. Castorina, C. Pisano, C. Scolastico, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1589–1603.
- [100] L. Belvisi, A. Bernardi, M. Colombo, L. Manzoni, D. Potenza, C. Scolastico, G. Giannini, M. Marcellini, T. Riccioni, M. Castorina, P. LoGiudice, C. Pisano, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 169–180.
- [101] L. Belvisi, T. Riccioni, M. Marcellini, L. Vesce, I. Chiarucci, D. Efrati, D. Potenza, C. Scolastico, L. Manzoni, K. Lombardo, M. A. Stasi, A. Orlandi, A. Ciucci, B. Nico, D. Ribatti, G. Giannini, M. Presta, P. Carminati, C. Pisano, *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1670–1680.
- [102] W. Xiao, Y. Wang, E. Y. Lau, J. Luo, N. Yao, C. Shi, L. Meza, H. Tseng, Y. Maeda, P. Kumaresan, R. Liu, F. C. Lightstone, Y. Takada, K. S. Lam, *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 2714–2723.
- [103] Y. Wang, W. Xiao, Y. Zhang, L. Meza, H. Tseng, Y. Takada, J. B. Ames, K. S. Lam, *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 232–240.
- [104] A. Silva, W. Xiao, Y. Wang, W. Wang, H. W. Chang, J. B. Ames, K. S. Lam, Y. Zhang, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3076.
- [105] L. Zhang, X. Shan, X. Meng, T. Gu, L. Guo, X. An, Q. Jiang, H. Ge, X. Ning, *Mol. Pharm.* **2019**, *16*, 3977–3984.
- [106] A. S. M. da Ressurreição, A. Vidu, M. Civera, L. Belvisi, D. Potenza, L. Manzoni, S. Ongeri, C. Gennari, U. Piarulli, *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 12184–12188.
- [107] I. Guzzetti, M. Civera, F. Vasile, D. Arosio, C. Tringali, U. Piarulli, C. Gennari, L. Pignataro, L. Belvisi, D. Potenza, *ChemistryOpen* **2017**, *6*, 128–136.
- [108] T. G. Kapp, F. S. Di Leva, J. Notni, A. F. B. Räder, M. Fottner, F. Reichart, D. Reich, A. Wurzer, K. Steiger, E. Novellino, U. K. Marelli, H.-J. Wester, L. Marinelli, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 2490–2499.
- [109] E. Koivunen, B. Wang, E. Ruoslahti, *J. Cell Biol.* **1994**, *124*, 373–380.
- [110] A. P. Mould, L. Burrows, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25664–25672.
- [111] W. H. Miller, R. M. Keenan, R. N. Willette, M. W. Lark, *Drug Discov. Today* **2000**, *5*, 397–408.
- [112] W. J. Pitts, J. Wityak, J. M. Smallheer, A. E. Tobin, J. W. Jetter, J. S. Buynitsky, P. P. Harlow, K. A. Solomon, M. H. Corjay, S. A. Mousa, R. R. Wexler, P. K. Jadhav, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 27–40.
- [113] J. M. Smallheer, C. A. Weigelt, F. J. Woerner, J. S. Wells, W. F. Daneker, S. A. Mousa, R. R. Wexler, P. K. Jadhav, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 383–387.
- [114] D. Cue, S. O. Southern, P. J. Southern, J. Prabhakar, W. Lorelli, J. M. Smallheer, S. A. Mousa, P. P. Cleary, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 2858–2863.
- [115] S. Kim, K. Bell, S. A. Mousa, J. A. Varner, *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 1345–1362.
- [116] A. Maglott, P. Bartik, S. Cosgun, P. Klotz, P. Rondé, G. Fuhrmann, K. Takeda, S. Martin, M. Dontenwill, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 6002–6007.

- [117] S. Martin, E. C. Cosset, J. Terrand, A. Maglott, K. Takeda, M. Dontenwill, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2009**, *1793*, 354–367.
- [118] L. Marinelli, A. Meyer, D. Heckmann, A. Lavecchia, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4204–4207.
- [119] D. Heckmann, A. Meyer, L. Marinelli, G. Zahn, R. Stragies, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3571–3574.
- [120] N. C. Henderson, T. D. Arnold, Y. Katamura, M. M. Giacomini, J. D. Rodriguez, J. H. McCarty, A. Pellicoro, E. Raschperger, C. Betsholtz, P. G. Ruminski, D. W. Griggs, M. J. Prinsen, J. J. Maher, J. P. Iredale, A. Lacy-Hulbert, R. H. Adams, D. Sheppard, *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1617–1624.
- [121] S. Neubauer, F. Rechenmacher, R. Brimiouille, F. S. Di Leva, A. Bochen, T. R. Sobahi, M. Schottelius, E. Novellino, C. Mas-Moruno, L. Marinelli, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3410–3417.
- [122] A.-M. Ray, F. Schaffner, H. Janouskova, F. Noulet, D. Rognan, I. Lelong-Rebel, L. Choulier, A.-F. Blandin, M. Lehmann, S. Martin, T. Kapp, S. Neubauer, F. Rechenmacher, H. Kessler, M. Dontenwill, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2014**, *1840*, 2978–2987.
- [123] H. Janouskova, A.-M. Ray, F. Noulet, I. Lelong-Rebel, L. Choulier, F. Schaffner, M. Lehmann, S. Martin, J. Teisinger, M. Dontenwill, *Cancer Lett.* **2013**, *336*, 307–318.
- [124] G. Renner, H. Janouskova, F. Noulet, V. Koenig, E. Guerin, S. Bär, J. Nuesch, F. Rechenmacher, S. Neubauer, H. Kessler, A.-F. Blandin, L. Choulier, N. Etienne-Selloum, M. Lehmann, I. Lelong-Rebel, S. Martin, M. Dontenwill, *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 640–653.
- [125] E. Martinkova, A. Maglott, D. Y. Leger, D. Bonnet, M. Stiborova, K. Takeda, S. Martin, M. Dontenwill, *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 1240–1248.
- [126] R. Stragies, F. Osterkamp, G. Zischinsky, D. Vossmeier, H. Kalkhof, U. Reimer, G. Zahn, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3786–3794.
- [127] G. Zahn, K. Volk, G. P. Lewis, D. Vossmeier, R. Stragies, J. S. Heier, P. E. Daniel, A. P. Adamis, E. A. Chapin, S. K. Fisher, F. G. Holz, K. U. Löffler, J. Knolle, *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2010**, *51*, 1028.
- [128] G. Zahn, *Arch. Ophthalmol.* **2009**, *127*, 1329.
- [129] A.-K. B. Maier, N. Kociok, G. Zahn, D. Vossmeier, R. Stragies, P. S. Muether, A. M. Jousen, *Curr. Eye Res.* **2007**, *32*, 801–812.
- [130] P. Galletti, R. Soldati, M. Pori, M. Durso, A. Tolomelli, L. Gentilucci, S. D. Dattoli, M. Baiula, S. Spampinato, D. Giacomini, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *83*, 284–293.
- [131] M. Baiula, P. Galletti, G. Martelli, R. Soldati, L. Belvisi, M. Civera, S. D. Dattoli, S. M. Spampinato, D. Giacomini, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9721–9742.
- [132] G. Martelli, M. Baiula, A. Caligiana, P. Galletti, L. Gentilucci, R. Artali, S. Spampinato, D. Giacomini, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 10156–10166.
- [133] G. Martelli, P. Galletti, M. Baiula, L. Calcinari, G. Boschi, D. Giacomini, *Bioorganic Chem.* **2019**, *88*, 102975.
- [134] A. Tolomelli, P. Galletti, M. Baiula, D. Giacomini, *Cancers* **2017**, *9*, 78.
- [135] H. Cai, P. S. Conti, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2013**, *56*, 264–279.
- [136] J. Shi, F. Wang, S. Liu, *Biophys. Rep.* **2016**, *2*, 1–20.
- [137] R. Haubner, W. A. Weber, A. J. Beer, E. Vabuliene, D. Reim, M. Sarbia, K.-F. Becker, M. Goebel, R. Hein, H.-J. Wester, H. Kessler, M. Schwaiger, *PLoS Med.* **2005**, *2*, e70.
- [138] O. Schnell, B. Krebs, J. Carlsen, I. Miederer, C. Goetz, R. H. Goldbrunner, H.-J. Wester, R. Haubner, G. Pöpperl, M. Holtmannspötter, H. A. Kretschmar, H. Kessler, J.-C. Tonn, M. Schwaiger, A. J. Beer, *Neuro-Oncol.* **2009**, *11*, 861–870.

- [139] N. Withofs, N. Signolle, J. Somja, P. Lovinfosse, E. M. Nzaramba, F. Mievis, F. Giacomelli, D. Waltregny, D. Cataldo, S. S. Gambhir, R. Hustinx, *J. Nucl. Med.* **2015**, *56*, 361–364.
- [140] S. Neubauer, F. Rechenmacher, A. J. Beer, F. Curnis, K. Pohle, C. D'Alessandria, H.-J. Wester, U. Reuning, A. Corti, M. Schwaiger, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11656–11659.
- [141] D. Heckmann, A. Meyer, B. Laufer, G. Zahn, R. Stragies, H. Kessler, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1397–1407.
- [142] C. D'Alessandria, K. Pohle, F. Rechenmacher, S. Neubauer, J. Notni, H.-J. Wester, M. Schwaiger, H. Kessler, A. J. Beer, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, *43*, 953–963.
- [143] F. Rechenmacher, S. Neubauer, C. Mas-Moruno, P. M. Dorfner, J. Polleux, J. Guasch, B. Conings, H.-G. Boyen, A. Bochen, T. R. Sobahi, R. Burgkart, J. P. Spatz, R. Fässler, H. Kessler, *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 9218–9223.
- [144] J. Notni, J. Šimeček, P. Hermann, H.-J. Wester, *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17*, 14718–14722.
- [145] J. Notni, K. Steiger, F. Hoffmann, D. Reich, T. G. Kapp, F. Rechenmacher, S. Neubauer, H. Kessler, H.-J. Wester, *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 460–466.
- [146] J. Notni, K. Steiger, F. Hoffmann, D. Reich, M. Schwaiger, H. Kessler, H.-J. Wester, *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 1618–1624.
- [147] R. Haubner, S. Maschauer, J. Einsiedel, I. E. Eder, C. Rangger, P. Gmeiner, I. J. Virgolini, O. Prante, *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–12.
- [148] Z.-H. Jin, T. Furukawa, K. Kumata, L. Xie, J. Yui, H. Wakizaka, Y. Fujibayashi, M.-R. Zhang, T. Saga, *Biol. Pharm. Bull.* **2015**, *38*, 1722–1731.
- [149] G. Mana, D. Valdembri, G. Serini, *Biochem. Soc. Trans.* **2020**, *48*, 83–93.
- [150] A. Dal Corso, L. Pignataro, L. Belvisi, C. Gennari, *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *16*, 314–329.
- [151] A. Dal Corso, L. Pignataro, L. Belvisi, C. Gennari, *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25*, 14740–14757.
- [152] D. Arosio, L. Manzoni, C. Corno, P. Perego, *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* **2017**, *12*, 148–168.
- [153] S. Katsamakos, T. Chatzisideri, S. Thysiadis, V. Sarli, *Future Med. Chem.* **2017**, *9*, 579–604.
- [154] H.-J. Cho, S.-J. Park, Y.-S. Lee, S. Kim, *J. Controlled Release* **2019**, *300*, 73–80.
- [155] K. Ahmad, E. J. Lee, S. Shaikh, A. Kumar, K. M. Rao, S.-Y. Park, J. O. Jin, S. S. Han, I. Choi, *Semin. Cancer Biol.* **2019**, S1044579X19302068.
- [156] M. Alipour, M. Baneshi, S. Hosseinkhani, R. Mahmoudi, A. Jabari Arabzadeh, M. Akrami, J. Mehrzad, H. Bardania, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2020**, *108*, 839–850.
- [157] P.-H. Wu, A. E. Opadele, Y. Onodera, J.-M. Nam, *Cancers* **2019**, *11*, 1783.
- [158] Y. Cheng, Y. Ji, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *128*, 8–17.
- [159] K. R. Gajbhiye, V. Gajbhiye, I. A. Siddiqui, J. M. Gajbhiye, *J. Drug Target.* **2019**, *27*, 111–124.
- [160] S. Fu, X. Xu, Y. Ma, S. Zhang, S. Zhang, *J. Drug Target.* **2019**, *27*, 1–11.
- [161] U. K. Marelli, F. Rechenmacher, T. R. A. Sobahi, C. Mas-Moruno, H. Kessler, *Front. Oncol.* **2013**, *3*, DOI 10.3389/fonc.2013.00222.
- [162] J. Niu, Z. Li, *Cancer Lett.* **2017**, *403*, 128–137.
- [163] F. S. Di Leva, S. Tomassi, S. Di Maro, F. Reichart, J. Notni, A. Dangi, U. K. Marelli, D. Brancaccio, F. Merlino, H.-J. Wester, E. Novellino, H. Kessler, L. Marinelli, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 14645–14649.

- [164] O. V. Maltsev, U. K. Marelli, T. G. Kapp, F. S. Di Leva, S. Di Maro, M. Nieberler, U. Reuning, M. Schwaiger, E. Novellino, L. Marinelli, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1535–1539.
- [165] R. H. Kimura, L. Wang, B. Shen, L. Huo, W. Tummers, F. V. Filipp, H. H. Guo, T. Haywood, L. Abou-Elkacem, L. Baratto, F. Habte, R. Devulapally, T. H. Witney, Y. Cheng, S. Tikole, S. Chakraborti, J. Nix, C. A. Bonagura, N. Hatami, J. J. Mooney, T. Desai, S. Turner, R. S. Gaster, A. Otte, B. C. Visser, G. A. Poultsides, J. Norton, W. Park, M. Stolowitz, K. Lau, E. Yang, A. Natarajan, O. Ilovich, S. Srinivas, A. Srinivasan, R. Paulmurugan, J. Willmann, F. T. Chin, Z. Cheng, A. Iagaru, F. Li, S. S. Gambhir, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4673.
- [166] J. Notni, D. Reich, O. V. Maltsev, T. G. Kapp, K. Steiger, F. Hoffmann, I. Esposito, W. Weichert, H. Kessler, H.-J. Wester, *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 671–677.
- [167] Y. Tang, R. Davis, T. Ganguly, J. Sutcliffe, *Molecules* **2019**, *24*, 309.
- [168] B. Alday-Parejo, R. Stupp, C. Rüegg, *Cancers* **2019**, *11*, 978.
- [169] J. Cooper, F. G. Giancotti, *Cancer Cell* **2019**, *35*, 347–367.

ligand	Cell line	models	references
⁶⁸ Ga-NODAGA-peptidomimetic	Human colon carcinoma (RKO cells) Human melanoma (M21 cells)	Heterotopic xenografts in mice	Neubauer et al, 2013
⁶⁸ Ga-NODAGA-peptidomimetic (FR366)			D'Alessandria et al, 2016
⁶⁸ Ga-TRAP-peptidomimetic (Aquibepirin)			Notni et al, 2016
¹⁸ F-peptide (CRRETAWAC)	Human prostate carcinoma (DU145 cells)	Heterotopic xenografts in mice	Hauber et al, 2014
¹⁸ F-NOTA-peptide (KSSPHSRN(SG) ₅ RGDSP)	Murine melanoma (B16-F10 cells) Human colorectal carcinoma (SW48 cells)	Heterotopic xenografts in mice	Jin et al, 2015
⁶⁸ Ga-TRAP-peptide (c(phg-isoDGR-(NMe)k))	Human melanoma (M21 cells)	Heterotopic xenografts in mice	Kapp et al, 2018

Table1: PET radiotracers selective for $\alpha 5\beta 1$ integrin. Different xenografted tumoral cell lines have been used with differential expression of $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins. RKO cells : $\alpha 5\beta 1$ +, $\alpha v\beta 3$ -; M21 cells: $\alpha 5\beta 1$ +/- and $\alpha v\beta 3$ +; DU145 cells: $\alpha 5\beta 1$ +, $\alpha v\beta 3$ -; B16-F10: $\alpha 5\beta 1$ +, $\alpha v\beta 3$ +/-; SW48 cells: $\alpha 5\beta 1$ -, $\alpha v\beta 3$ +/-.

Legends to figures

Figure 1: Integrins in hallmarks of cancer. Altered expressions of integrins are detected in tumor cells but also in non tumoral cells in the tumor microenvironment. Integrin-activated signaling pathways have pro-tumoral functions.

Figure 2: RGD-integrin ligands. Integrins $\alpha\beta3$ and $\alpha5\beta1$ both recognize Fibronectin (FN). Ligands able to interfere with FN-integrin complexes have been developed mainly as integrin antagonists of cell adherence (RGD-based peptides, RGD-mimetics). Antibodies recognize epitopes in- or outside the RGD binding sites and are useful to mark integrins in inactivated or activated states. Non-RGD peptides have been developed based on the FN synergy site (PHSRN) recognized by $\alpha5\beta1$ integrin.

Figure 3: Chemical structures of some RGD-integrin ligands. Cilengitide was the first RGD-containing cyclic peptide reaching the clinic for glioblastoma treatment [93]. LXW7 is a cyclooctapeptide described in [102]. C(phg-isoDGR-NMe)k is described in [108]. SJ755 was one of the first small molecule specific for $\alpha5\beta1$ integrin [112]. Compound 1 is described in [141] and compound 17 is an $\alpha5\beta1$ integrin agonist [131].

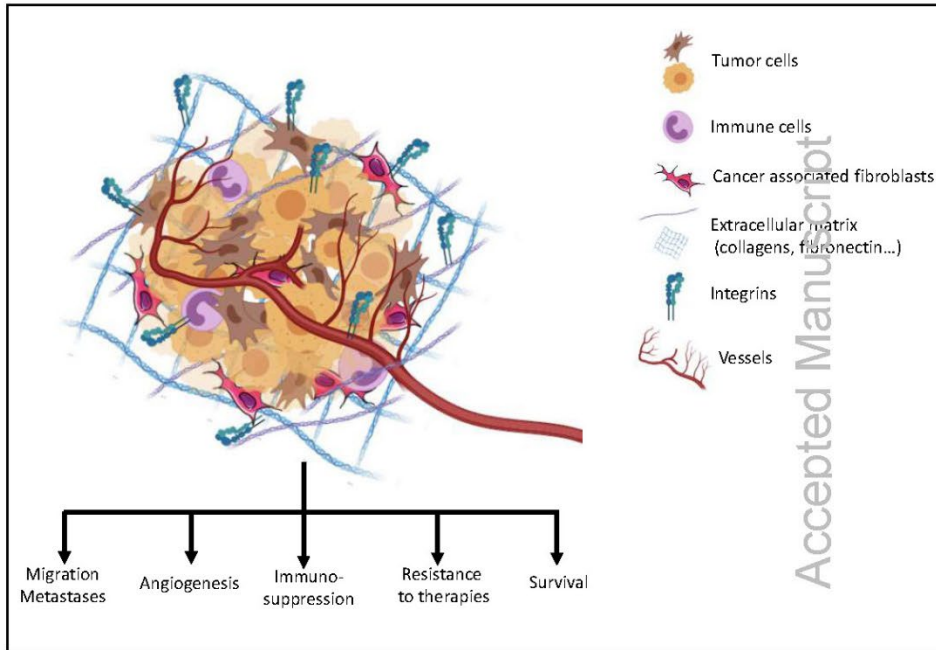
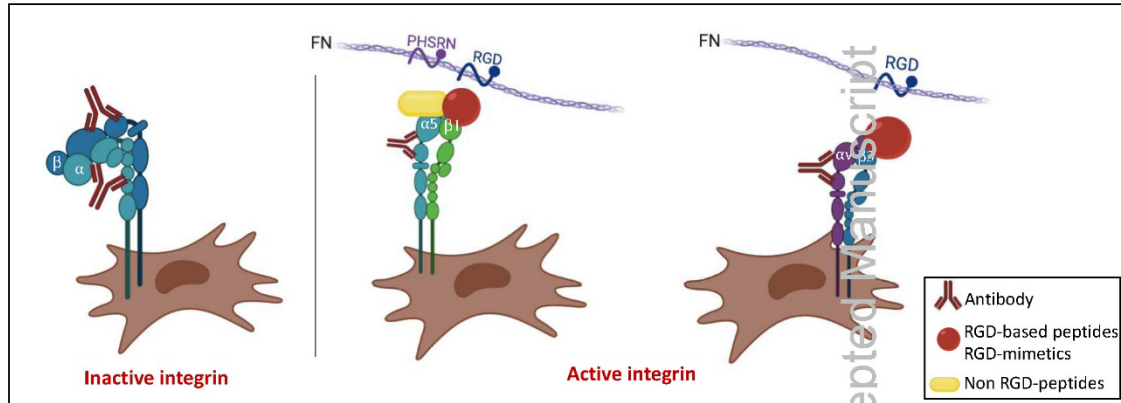


Figure 1

Figure 2



This article is protected by copyright. All rights reserved.

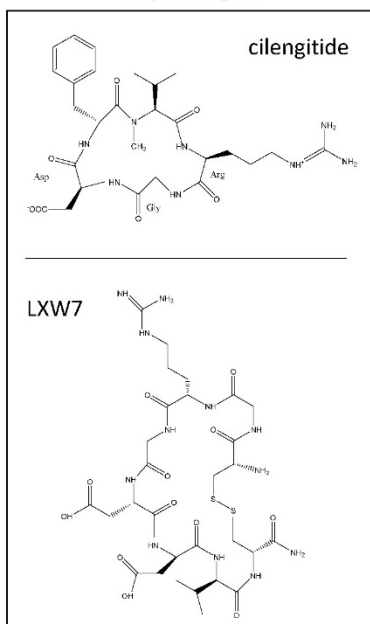
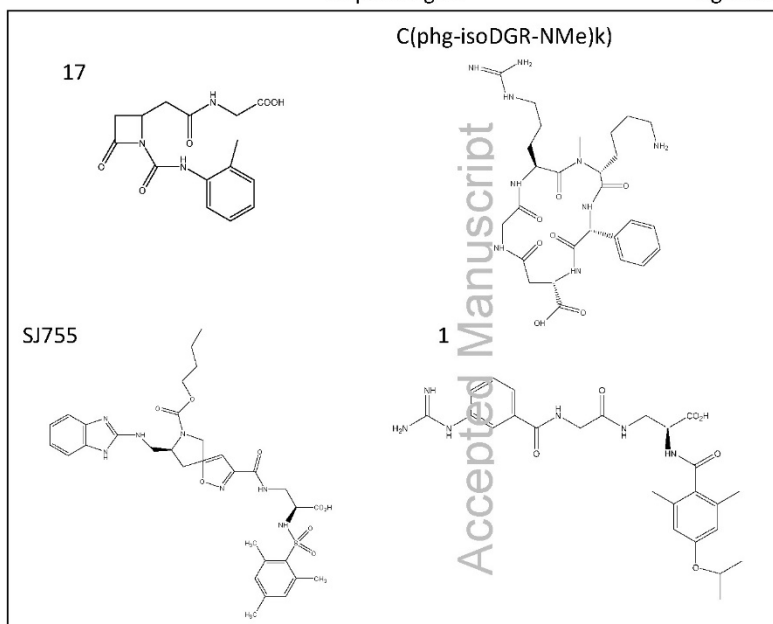
$\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ integrin

Figure 3



Quentin FUCHS

Rôle et ciblage de HIF-2 α

dans les gliomes de haut-grade pédiatriques de la ligne médiane

Résumé

Les gliomes diffus de la ligne médiane (DMG) et les gliomes infiltrants du tronc cérébral (DIPG) porteurs de la mutation driver H3.3K27M sont des tumeurs cérébrales agressives et incurables. Cette agressivité est en partie liée à l'hypoxie intratumorale et à l'activation des facteurs de transcription induits par l'hypoxie (HIF), en particulier HIF-2 α . De précédentes études ont suggéré que HIF-2 α était un marqueur de résistance des tumeurs à des thérapies ciblant la voie mTor/HIF-1 α . Cependant, très peu de données existent à ce jour sur le rôle de HIF-2 α dans les GHG pédiatriques et peu de modèles d'étude permettent de mimer le microenvironnement hypoxique des DMG et des DIPG. Ce travail de thèse a consisté à : 1) Développer des modèles in-vitro 2D et 3D à partir de lignées dérivées de patients (PDCLs) afin de mimer l'hétérogénéité tumorale et y intégrer l'hypoxie intratumorale et les interactions avec les réseaux neuronaux et les cellules gliales. Ces modèles conservent les caractéristiques cellulaires et moléculaires de la tumeur originelle et permettent d'étudier les interactions électrophysiologiques entre des PDCLs et un réseau de neurones.

2) Explorer et caractériser les voies de signalisation modulées par HIF-2 α dans les DMG et les DIPG et montrer que les inhibitions combinées des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α par des traitements associant irinotecan et PT2385 permettent de diminuer la prolifération et l'invasion de ces tumeurs et pourrait contribuer à leur radiosensibilisation.

Mots-clés : gliomes de haut-grade, H3.3K27M, hypoxie, neurones, modèles

Abstract

Diffuse midline (DMGs) and brainstem (DIPGs) high grade gliomas (HGG) bearing the H3.3K27M driver mutation are aggressive and incurable brain tumors. This aggressiveness is partly linked to intratumoral hypoxia and the activation of Hypoxia inducible factors (HIF), in particular HIF-2 α . Previous studies have underlined that HIF-2 α is a marker of tumor resistance to therapies targeting the mTor/HIF-1 α pathway. However, very few data exist to date on the role of HIF-2 α in pediatric HGG and few study models can mimic the hypoxic microenvironment of DMGs and DIPGs. This work consisted in: 1) Developing 2D and 3D in-vitro models from patient-derived cell lines (PDCLs) to mimic tumor heterogeneity and integrate intratumoral hypoxia and interactions with neural networks and glial cells. These models retain the cellular and molecular characteristics of the original tumor and allow to study the electrophysiological interactions between PDCLs and neurons; 2) Explore and characterize the signaling pathways modulated by HIF-2 α in DMGs and DIPGs and demonstrate that the combined inhibitions of the HIF-1 α and HIF-2 α factors by irinotecan and PT2385 treatments reduce proliferation and invasion of these tumors and could contribute to their radiosensitization.

Keywords : high-grade gliomas, hypoxia, neurons, H3.3K27M, models

