THESE DE DOCTORAT

Université de Lille
École Doctorale Biologie-Santé

Spécialité : biologie cellulaire

Développement et caractérisation de modèles cellulaires pour l'étude du rôle de l'oncohistone H3.3 K27M dans le phénotype agressif et la réponse aux thérapies des gliomes pédiatriques diffus de la ligne médiane

---

Présentée et soutenue publiquement par

Andria Rakotomalala

Le 27 Mars 2024

En vue de l'obtention du grade de **docteur de l'Université de Lille**

Membres du jury

Dr. Celio Pouponnot Directeur de recherche (CNRS)	Rapporteur
Dr. Thomas Daubon Directeur de recherche (CNRS)	Rapporteur
Dr. Erika Cosset Chargée de recherche (CNRS)	Examinatrice
Pr. Natacha Entz-Werle Professeure des Universités – praticienne hospitalier (Université de Strasbourg)	Examinatrice
Pr. Xuefen Le Bourhis Professeure des Universités (Université de Lille)	Présidente du jury
Dr. Samuel Meignan Directeur de recherche (Centre Oscar Lambret)	Directeur de thèse

Remerciements

J'exprime en premier lieu ma reconnaissance à l'ensemble des membres de mon jury de thèse pour le temps précieux consacré à l'expertise de mon travail. Je remercie tout particulièrement les Docteurs Celio Pouponnot et Thomas Daubon, qui ont accepté le rôle de rapporteurs de cette thèse, ainsi que le Docteur Erika Cosset, le Professeur Natacha Entz-Werle et le Professeur Xuefen Le Bourhis, en qualité d'examinatrices de mes travaux.

J'ai réalisé ma thèse au sein de l'UMR CANTHER « Hétérogénéité, Plasticité et résistance aux thérapies des Cancers » (UMR 9020 CNRS – 1277 Inserm) de l'institut ONCOLille, dirigée par le Dr. Isabelle Van Seuningen, que je remercie grandement pour son accueil. Je remercie également le professeur Xuefen Le Bourhis de m'avoir accueilli au sein de son équipe depuis mon premier stage en laboratoire de recherche.

Je souhaite également remercier le Professeur Eric Lartigau, directeur du Centre Oscar Lambret, pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité Tumorigenèse et Résistance aux Traitements (UTRT), dans laquelle j'ai été fier de travailler.

Je tiens à remercier la Région Hauts-de-France et le Centre Oscar Lambret pour le financement de mon allocation doctorale. Je remercie également les nombreuses associations qui ont soutenu et rendu possible ce travail.

À mon directeur de thèse, le Docteur Samuel Meignan, j'adresse mes plus sincères remerciements pour son encadrement qui m'est très précieux depuis maintenant plusieurs années. Samuel, je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée, votre disponibilité, votre bienveillance et votre altruisme à mon égard qui me touchent énormément. Un grand merci pour toutes nos discussions, tous vos conseils, toujours très formateurs et bienveillants, ainsi que pour le temps précieux que vous avez consacré à relire et corriger mes nombreux écrits et présentations. Je suis également très heureux d'avoir partagé avec vous divers déplacements en congrès, je pense notamment à l'AACR, expérience dont je me souviendrai longtemps. Je m'estime particulièrement chanceux d'avoir pu réaliser cette thèse sous votre direction.

Un grand merci au Docteur Alessandro Furlan pour ses conseils et ses nombreuses relectures avisés qui m'ont beaucoup apporté au cours de cette thèse. Je te suis très reconnaissant Alessandro pour ton soutien, pour ta bienveillance ainsi que pour tout l'intérêt que tu as porté à ma thèse depuis le début. C'est toujours avec grand plaisir que j'ai discuté de science avec toi et j'ai beaucoup appris de nos échanges. Au-delà du laboratoire, je te remercie également pour les bons moments partagés au sport le mercredi midi.

Merci beaucoup Quentin de m'avoir transmis tes connaissances, scientifiques et techniques, durant mes différents stages de licence et de master. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi et tu m'as insufflé une rigueur et des méthodes scientifiques qui m'ont été essentielles au cours de cette thèse.

Merci à toi, Mélanie, pour m'avoir formé à bien des techniques et méthodes de travail. Je te remercie pour ta rigueur, ta persévérance et ta bonne humeur constante, j'ai beaucoup apprécié travailler en binôme avec toi sur les aspects de radiobiologie, même sur des projets qui n'étaient pas évidents à mener. Je pense notamment à la mise au point du *comet assay*, dont nous nous souviendrons longtemps je pense. Merci beaucoup pour ton aide très précieuse.

Merci à toi, Christine, pour ta formation et ton aide précieuse sur de nombreux aspects, notamment les tests de clonogénicité dont tu es l'experte. Merci beaucoup pour tous tes conseils, ta bienveillance et tes réponses à mes nombreuses questions.

Un grand merci à toi Paul, pour ton aide très précieuse, pour nos expériences communes ainsi que toutes nos longues discussions sur le projet, qui ont fortement contribué à l'avancée des travaux présentés dans ce manuscrit. Je suis fier d'avoir participé à ton encadrement depuis ton master 2 et d'avoir travaillé avec toi. Je te remercie pour ta rigueur scientifique, tes questions toujours pertinentes et ta conscience professionnelle qui, j'en suis sûr, te permettront de mener à bien les projets que nous avons initiés.

Je te remercie Sirine pour ton aide (passionnée) concernant l'étude du métabolisme cellulaire. Tu as permis de faire avancer considérablement ce projet et ce fût un plaisir de te former, toujours dans la bonne humeur qui te caractérise.

Merci Karine, Lisa et Calypso pour votre bienveillance et votre bonne humeur au quotidien, je vous souhaite plein de courage pour la suite de vos thèses.

Je remercie mes collègues Joanne et Agathe pour leurs aide et conseils, ainsi que pour leur bienveillance et leur bonne humeur au quotidien.

Je tiens également à adresser un grand merci au Docteur Eddy Pasquier, au Docteur Marion Le Grand et à Julie pour leur collaboration très enrichissante, leur aide précieuse, leur bienveillance ainsi que pour avoir partagé leur expertise, notamment sur les aspects pharmacologiques du projet.

Je souhaite également remercier l'équipe du Docteur Marie Castets et en particulier Paul et Swann pour leur expertise et leur travail concernant l'analyse transcriptomique réalisée au cours de ce travail. Merci beaucoup pour votre aide et votre disponibilité.

Je remercie l'équipe du Professeur Michel Salzet, en particulier le Docteur Marie Duhamel, Katia, Adrien et Yanis pour leur aide et expertise sur les aspects protéomiques.

J'aimerais également remercier le Professeur Jérôme Kluza pour sa disponibilité et pour le partage de son expertise concernant les analyses du métabolisme énergétique, et ce depuis mon master 2. William, un grand merci à toi également pour ton expertise, ta rigueur, ton organisation et ton aide précieuse concernant les expériences *Seahorse*, j'ai vraiment beaucoup apprécié travailler avec toi.

I would like to thank Dr. Çagatay Tarhan and Dr. Faruk Azam Shaik for their availability, for their help, and for sharing their expertise on microfabrication processes and PDMS devices use. Çagatay, I am also grateful to you for allowing me to have a teaching experience during my thesis.

Je remercie également le docteur Loïc Lemonnier pour le partage de son expertise ainsi que pour son temps précieux consacré à la réalisation d'expériences d'imagerie calcique au cours de ce projet.

Je remercie enfin l'ensemble du personnel de l'Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille, le réseau React4Kids et l'équipe du Professeur Nada Jabado.

Un merci tout particulier à celle qui partage ma vie, et à qui je souhaite plein de courage pour la finalisation de sa thèse.

Enfin, je remercie ma famille, en particulier ma mère et mes grands-parents qui m'ont toujours soutenu et à qui je dédie cette thèse.

Résumé

Mots-clés : Tumeurs cérébrales pédiatriques, Gliome diffus de la ligne médiane (DMG), Oncohistone H3.3 K27M, Épigénétique, Modèles cellulaires isogéniques, Métabolisme des cellules cancéreuses, Réponse aux thérapies

Le traitement des DMG altérés H3 K27, n'ayant pas connu d'amélioration au cours de ces 50 dernières années, figure parmi les plus grands défis de la neuro-oncologie pédiatrique. En 2012, a été découverte une mutation spécifique de l'histone 3 (oncohistone), dite H3.3 K27M, présentant une prévalence très élevée (70-80% des cas) dans les DMG. Bien que l'impact épigénétique de cette mutation ait été décrit, des études demeurent nécessaires afin de mieux comprendre son rôle dans le phénotype agressif et la réponse aux thérapies des cellules DMG.

Afin d'étudier précisément l'impact de la mutation H3.3 K27M sur le phénotype des cellules de DMG, nous avons développé et caractérisé des modèles cellulaires isogéniques complémentaires de gliome pédiatrique de haut grade induits et invalidés pour l'oncohistone. À l'aide de ces modèles, nous souhaitions élucider l'impact de H3.3 K27M sur la biologie des cellules de DMG et leur réponse aux traitements anti-cancéreux, notamment la radiothérapie, unique traitement de référence actuel pour la prise en charge des DMG.

Par la caractérisation de nos lignées cellulaires de gliomes pédiatriques sustentoriels induites pour H3.3 K27M, nous avons montré que l'oncohistone impacte la réponse aux radiations ionisantes et à certaines thérapies ciblées de manière dépendante du contexte cellulaire.

Sur la base de ce constat, nous avons pris le parti de caractériser les impacts biologiques de l'oncohistone dans un contexte cellulaire plus pertinent de DMG. En ce sens, nous avons établi des modèles cellulaires *knock-out* pour H3.3 K27M et les avons caractérisés comparativement à leurs lignées cellulaires parentales mutées. Par des caractérisations omiques (transcriptomique et protéomique) et du métabolisme cellulaire de ces modèles, nous avons notamment identifié un impact de la mutation H3.3 K27M sur le métabolisme lipidique des cellules DMG. De surcroit, dans des modèles de sphéroïdes 3D, cette modification du métabolisme lipidique associée à l'oncohistone semblait conditionnée par des facteurs du microenvironnement encore à l'étude.

D'autre part, une approche fonctionnelle par criblage pharmacologique nous a permis d'identifier des dépendances à certaines voies de réparation des dommages à l'ADN spécifiquement associées à la mutation H3.3 K27M. De plus, la caractérisation radiobiologique de nos modèles, actuellement en cours, indique une radiosensibilité associée à H3.3 K27M, corrélant avec une diminution de l'efficacité de réparation de l'ADN post-irradiation. Au-delà de cet impact sur la réparation des dommages à l'ADN, notre criblage pharmacologique a également révélé une sensibilité exacerbée à certains composés de la famille des glycosides cardiaques induite par H3.3 K27M. Ce résultat apparaît particulièrement intéressant au regard de nos données transcriptomiques montrant un enrichissement en gènes impliqués dans les cardiomyopathies et l'homéostasie ionique parmi les gènes différentiellement exprimés en présence de l'oncohistone. Dans ce contexte, nous avons entrepris l'étude des processus moléculaires et biologiques sous-jacents à cette différence de sensibilité gouvernée par H3.3 K27M.

In fine, nous avons utilisé nos modèles cellulaires isogéniques pour montrer que l'oncohistone H3.3 K27M entraîne des modifications du métabolisme lipidique des cellules de DMG. Ces changements métaboliques pourraient rendre les cellules de DMG altérés H3 K27 plus susceptibles au déclenchement de certaines voies de morts cellulaires (*e.g.* ferroptose) et affecter la réponse à certaines thérapies. De plus, H3.3 K27M semble induire des sensibilités spécifiques, notamment à la radiothérapie et aux glycosides cardiaques. La compréhension des mécanismes moléculaires régissant ces talons d'Achille associés à la présence de la mutation H3.3 K27M pourrait mettre en évidence de nouvelles pistes concernant les processus biologiques régis par l'oncohistone dans les cellules de DMG et mener au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Abstract

Keywords: Pediatric brain tumors, Diffuse midline glioma (DMG), H3.3 K27M oncohistone, Epigenetic, Isogenic cellular models, Cancer cell metabolism, Response to therapies

H3K27-altered DMG treatment is one of the most significant challenges in pediatric neuro-oncology, with no improvement in patient survival over the past 50 years. In 2012, it was shown that DMGs harbor a specific histone 3 mutation (oncohistone) called H3.3 K27M with a very high prevalence (70-80% of cases). Although the H3.3 K27M impact on the epigenetic landscape has been well described, studies are needed to understand better its role in DMG cells' aggressiveness and response to therapies.

To study the H3.3 K27M mutation impact on DMG cell phenotypes precisely, we developed and characterized pediatric high-grade glioma isogenic cellular models induced and knock-out for the oncohistone. Using these models, we aimed to decipher the oncohistone impact on DMG cell biology and response to anti-cancer therapies, including radiation therapy, the only current standard of care for DMGs.

Characterization of our H3.3 K27M-induced pediatric supratentorial glioma cell lines reveals that the oncohistone affects the response to ionizing radiations and specific targeted therapies in a cellular context-dependent way.

Based on these results, we settled to characterize oncohistone biological impacts in a more relevant cellular context of DMG. In that sense, we established H3.3 K27M knock-out cellular models and characterized them regarding their parental DMG H3.3 K27M mutated cell lines. Through omic (transcriptomic and proteomic) and cell metabolism characterizations of these models, we notably showed the H3.3 K27M mutation impact on DMG cells' lipid metabolism. In 3D spheroid models, this H3.3 K27M-induced lipid metabolism rewiring appeared conditioned by microenvironment factors still under investigation.

On the other hand, a functional pharmacological screen identified H3.3 K27M-driven dependencies to specific DNA repair pathways. In addition, ongoing radiobiological characterization of our models indicates an H3.3 K27M-associated radiosensitivity correlating with a decrease in DNA repair efficiency following ionizing radiations. Beyond this DNA repair impact, our pharmacological screen also revealed an H3.3 K27M-related sensitivity to cardiac glycoside drugs. This result makes sense with our transcriptomic data showing enrichment in genes involved in cardiomyopathies and ion homeostasis among differentially expressed genes with the oncohistone. In this context, we began unraveling the molecular and biological processes underlying this H3.3 K27M-driven effect.

Finally, we used our isogenic cellular models to show that the H3.3 K27M oncohistone drives lipid metabolism modifications. These metabolic changes could prime H3K27-altered DMG cells to specific regulated cell death pathways (*e.g.,* ferroptosis) and affect the response to certain therapies. Moreover, the H3.3 K27M seems to drive specific sensitivities, notably to radiation therapy and cardiac glycoside drugs. Understanding the underlying molecular mechanisms governing these H3.3 K27M-associated Achille heels could highlight new insights into the oncohistone role in DMG cells and provide rationales for developing new therapeutic strategies.

Table des matières

INTRODUCTION ..... - 1 -

I GLIOMES PEDIATRIQUES DE HAUT GRADE ET EPIGENETIQUE ..... - 2 -

I.1. Généralités sur les gliomes pédiatriques de haut grade ..... - 2 -

I.1.1. Origines cellulaires et histologie ..... - 2 -

I.1.2. Classification et gradation moléculaires ..... - 3 -

I.2. Les histones 3 et leur régulation épigénétique ..... - 4 -

I.2.1. Les différentes formes de l'histone 3 ..... - 5 -

I.2.1.1. Les histones canoniques H3.1 et H3.2 ..... - 5 -

I.2.1.2. Le variant H3.3 ..... - 6 -

I.2.2. Les modifications épigénétiques des histones 3 ..... - 8 -

I.2.2.1. Différents types de modifications post-traductionnelles ..... - 8 -

I.2.2.2. Régulation dynamique des marques épigénétiques ..... - 10 -

I.2.2.3. Recrutement de facteurs sur les marques épigénétiques ..... - 10 -

I.2.2.4. Régulation métabolique de la dynamique épigénétique ..... - 10 -

I.2.3. Marques apposées sur la lysine 27 de l'histone 3 ..... - 13 -

I.2.3.1. La méthylation de H3K27 ..... - 13 -

I.2.3.2. L'acétylation de H3K27 ..... - 15 -

II LES ONCOHISTONES H3 K27M ..... - 16 -

II.1. Les oncohistones ..... - 16 -

II.1.1. Découverte des oncohistones ..... - 16 -

II.1.2. Les différents types d'oncohistones H3 dans les pHGG ..... - 18 -

II.1.2.1. Mutations sur le résidu glycine 34 ..... - 18 -

II.1.2.2. Mutations sur le résidu lysine 27 ..... - 18 -

II.1.3. Oncohistones et origines cellulaires des pHGG ..... - 19 -

II.2. Impacts épigénétiques des oncohistones H3 K27M ..... - 21 -

II.2.1. Perturbation de l'activité du complexe PRC2 et impact direct sur H3K27me2/3 ..... - 21 -

II.2.2. Remaniements métaboliques et maintien de l'hypométhylation globale ..... - 23 -

II.2.3. Conséquences sur les marques H3K27ac ..... - 25 -

II.2.4. Impact sur les modifications d'histones sur d'autres résidus ..... - 26 -

II.2.4.1. Hausse de H3K36me2 et rôle de frontières épigénétiques ..... - 26 -

II.2.4.2. Hausse de H4K16ac : signature épigénétique des DMG H3 K27M ..... - 28 -

II.2.4.3. Activité des complexes Trithorax et impact sur H3K4me3 ..... - 28 -

II.2.4.4. Impact sur les marques H3K9me3 ..... - 29 -

II.2.5. Impact sur la méthylation de l'ADN ..... - 29 -

II.2.6. Impact sur l'architecture chromatinienne ..... - 30 -

II.3. DMG mutés H3.1 et H3.3 K27M ..... - 30 -

II.3.1. Différences cliniques ..... - 31 -

II.3.2. Différences épigénétiques et transcriptomiques ..... - 31 -

II.3.3. Origines cellulaires ..... - 32 -

II.4. Altérations épigénétiques des DMG $H3^{WT}$ induites par EZHIP ..... - 34 -

II.4.1. Découverte des altérations épigénétiques « K27M-like » ..... - 34 -

II.4.2. Impact de EZHIP sur l'activité du complexe PRC2 ..... - 34 -

II.4.3. Profil clinique des DMG $H3^{WT}$ surexprimant EZHIP ..... - 36 -

II.5. Altérations génomiques partenaires récurrentes ..... - 36 -

II.5.1. La voie TP53 ..... - 36 -

II.5.2. La signalisation du récepteur à activité tyrosine kinase PDGFRA ..... - 37 -

II.5.3. La signalisation des BMP ..... - 38 -

II.5.4. Les chaperonnes d'incorporation des histones ..... - 39 -

III PHENOTYPES CELLULAIRES ASSOCIES A LA MUTATION H3.3 K27M ..... - 40 -

III.1. Blocage de la différenciation ..... - 40 -

III.1.1. Blocage de la dynamique épigénétique requise pour la différenciation cellulaire ..... - 40 -

III.1.2. Signature transcriptionnelle caractéristique d'un état cellulaire indifférencié ..... - 41 -

III.1.3. Conséquences sur le caractère oncogénique ..... - 42 -

III.2. Inhibition de la senescence et prolifération - 43 -
III.2.1. Rôle majeur de la répression de p16^{ink4a} - 43 -
III.2.2. Activation de signalisations oncogéniques - 44 -
III.2.2.1. La voie de signalisation des MAPK - 44 -
III.2.2.2. La voie de signalisation JAK/STAT - 45 -
III.2.2.3. La voie de signalisation NOTCH - 46 -
III.3. Dérégulation du métabolisme cellulaire - 47 -
III.3.1. Métabolisme du glucose et de la glutamine dans le contexte muté H3 K27M - 47 -
III.3.2. État de différenciation et métabolisme énergétique des DMG - 47 -
IV LES THERAPIES DANS LE CONTEXTE DES DMG ALTERES H3K27 - 49 -
IV.1. La radiothérapie : unique traitement de référence des DMG - 50 -
IV.1.1. Prise en charge actuelle et essais cliniques antérieurs - 50 -
IV.1.1.1. Protocole de radiothérapie conventionnel et dans le cadre d'essais cliniques - 50 -
IV.1.1.2. Combinaisons de radio-chimiothérapies / -thérapies ciblées - 51 -
IV.1.2. Radiobiologie des DMG mutés H3 K27M - 52 -
IV.1.2.1. Altérations génomiques et profils de réponse à la radiothérapie - 52 -
IV.1.2.2. Oncohistones H3 K27M et réparation des dommages à l'ADN - 55 -
IV.1.2.3. Impacts métaboliques des oncohistones H3 K27M et réponse à la radiothérapie - 56 -
IV.2. Opportunités thérapeutiques associées aux altérations H3K27 - 57 -
IV.2.1. Les épidrogues dans le DMG - 57 -
IV.2.1.1. Stratégies de restauration du paysage des marques H3K27me2/3 - 57 -
IV.2.1.2. Stratégies de ciblage des acteurs régulant l'acétylation des histones - 59 -
IV.2.2. Ciblage du métabolisme cellulaire dans le DMG - 60 -
IV.2.2.1. Ciblage du métabolisme énergétique - 60 -
IV.2.2.2. Les molécules de la famille des imipridones - 61 -

OBJECTIFS DE LA THESE - 65 -

RESULTATS - 67 -

I CHAPITRE 1 : IMPACT PHENOTYPIQUE DE L'INDUCTION DE LA MUTATION H3.3 K27M DANS DES LIGNEES CELLULAIRES DE GLIOME PEDIATRIQUE SUSTENTORIEL - 68 -
I.1. Préambule - 68 -
I.1.1. Contexte de l'étude et hypothèses initiales - 68 -
I.1.2. Méthodologie adoptée - 69 -
I.2. Article 1 : "H3.3K27M mutation controls cell growth and resistance to therapies in pediatric glioma cell lines" - 69 -
I.3. Projets de collaboration associés - 70 -
I.3.1. Impact phénotypique de la coopération entre l'oncohistone H3.3 K27M et la signalisation des BMP - 70 -
I.3.2. Étude de l'impact du statut mutationnel de H3 sur la réponse à l'ONC201 - 72 -
I.4. Discussion quant aux modèles d'induction - 73 -
I.4.1. Effets épigénétiques de l'induction de la mutation H3.3 K27M dans des lignées cellulaires de gliomes pédiatriques - 73 -
I.4.2. Impacts phénotypiques de l'induction de la mutation H3.3 K27M dans des lignées cellulaires de gliomes pédiatriques - 74 -
I.4.2.1. Induction de H3.3 K27M et croissance cellulaire - 74 -
I.4.2.2. Induction de H3.3 K27M et phénotype invasif - 74 -
I.4.2.3. Induction de H3.3 K27M et réponse aux thérapies anti-cancéreuses - 75 -
I.5. Conclusions concernant nos modèles d'induction et perspectives - 77 -
II CHAPITRE 2 : ÉTABLISSEMENT ET CARACTERISATION COMPARATIVE DE MODELES CELLULAIRES DE DMG INVALIDES POUR LA MUTATION H3.3 K27M - 79 -
II.1. Préambule - 79 -
II.2. Matériels et méthodes - 80 -
II.2.1. Lignées cellulaires et conditions de culture - 80 -
II.2.2. Invalidation de la mutation H3.3 K27M par CRISPR/Cas9 - 80 -
II.2.2.1. Plasmides - 80 -
II.2.2.2. Transfection cellulaire - 81 -
II.2.3. Séquençage de la région du gène *H3F3A* contenant la mutation - 81 -
II.2.3.1. Extraction d'ADN et PCR - 81 -

II.2.3.2. Séquençage Sanger - 81 -
II.2.4. Extraction de protéines et western blot - 82 -
II.2.4.1. Extraction des protéines totales - 82 -
II.2.4.2. Extraction des histones - 82 -
II.2.4.3. Dosage protéique - 82 -
II.2.4.4. Western blot - 82 -
II.2.5. Analyse de la méthylation globale de l'ADN - 83 -
II.2.6. Tests de croissance cellulaire - 84 -
II.2.7. Analyse par *RT-qPCR* - 84 -
II.2.7.1. Extraction des ARN - 84 -
II.2.7.2. TaqMan array - 84 -
II.2.8. Analyse *RNA-seq* - 84 -
II.2.9. Analyse protéomique - 85 -
II.2.9.1. Préparation des échantillons protéiques - 85 -
II.2.9.2. Analyse LC-MS/MS - 86 -
II.2.9.3. Analyse des données - 86 -
II.2.10. Formation de sphéroïdes de taille standardisée - 87 -
II.2.11. Mesure de la consommation d'oxygène sur sphéroïdes - 87 -
II.2.12. Tests de cytotoxicité - 88 -
II.2.13. Marquage des gouttelettes lipidiques - 88 -
II.2.13.1. Dépôt des cellules sur lame de microscopie par cytospin - 88 -
II.2.13.2. Cryosections de sphéroïdes - 89 -
II.2.13.3. Coloration Oil Red O - 89 -
II.3. Résultats - 90 -
II.3.1. Établissement et validation de modèles cellulaires invalidés pour la mutation H3.3 K27M - 90 -
II.3.1.1. Établissement de modèles cellulaires knock-out pour la mutation H3.3 K27M dans les cellules HSJD-DIPG-013 - 90 -
II.3.1.2. Validation de la réversion des altérations épigénétiques caractéristiques dans les cellules de DMG knock-out pour l'oncohistone - 91 -
II.3.1.3. Extension de notre panel de modèles - 94 -
II.3.2. Caractérisation du transcriptome associé à la mutation H3.3 K27M dans nos modèles cellulaires - 95 -
II.3.3. Étude de l'impact de l'oncohistone H3.3K27M sur la croissance des cellules de DMG - 96 -
II.3.4. Caractérisation du protéome associé à la mutation H3.3 K27M dans nos modèles cellulaires - 98 -
II.3.5. Étude de l'impact de l'oncohistone H3.3K27M sur le métabolisme énergétique des cellules de DMG - 99 -
II.3.6. Étude de l'impact de l'oncohistone H3.3K27M sur le métabolisme des lipides - 101 -
II.3.6.1. Impact du KO sur l'expression d'acteurs du métabolisme lipidique - 101 -
II.3.6.2. Impact du KO sur le recours aux acides gras pour alimenter la phosphorylation oxydative - 103 -
II.3.6.3. Impact du KO sur la formation de gouttelettes lipidiques - 104 -
II.3.6.4. Impact du microenvironnement sur la formation des gouttelettes lipidiques induite par l'invalidation de l'oncohistone - 106 -
II.4. Discussion - 108 -
II.4.1. Établissement de modèles KO pour la mutation - 109 -
II.4.2. Pertinence du clone 13CTRL comme contrôle de stratégie - 110 -
II.4.3. Réversion des altérations épigénétiques inhérentes à l'oncohistone - 110 -
II.4.4. Changements transcriptionnels associés à l'oncohistone - 111 -
II.4.5. Protéome associé à l'oncohistone et métabolisme cellulaire - 113 -
II.4.6. Évaluation du métabolisme mitochondrial de type OXPHOS - 115 -
II.4.7. Modification de l'expression d'acteurs du métabolisme lipidique gouvernée par l'oncohistone - 116 -
II.4.8. Évaluation d'une possible dépendance aux acides gras associée à l'oncohistone pour alimenter les aspects bioénergétiques cellulaires - 118 -
II.4.9. Formation hétérogène de gouttelettes lipidiques associée à l'invalidation de l'oncohistone - 119 -
III CHAPITRE 3 : ÉTUDE DE L'IMPACT DE LA MUTATION H3.3 K27M SUR LA REPONSE DES CELLULES DE DMG AUX THERAPIES - 123 -
III.1. Préambule - 123 -
III.2. Matériels et méthodes - 124 -
III.2.1. Criblage pharmacologique - 124 -
III.2.2. Évaluation de la radiosensibilité par test de clonogénicité - 125 -
III.2.3. Western blot - 126 -
III.3. Résultats - 126 -
III.3.1. Évaluation de l'impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la réponse aux drogues des cellules de DMG - 126 -

III.3.1.1. Étude du profil de réponse aux drogues associé à l'oncohistone H3.3 K27M dans les cellules de DMG ..... - 126 -
III.3.1.2. Impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la réponse des cellules de DMG au prexasertib ..... - 128 -
III.3.1.3. Impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la réponse des cellules de DMG aux glycosides cardiaques ..... - 130 -
III.3.1.4. Impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la réponse des cellules de DMG à l'ONC201 ..... - 132 -
III.3.2. Étude préliminaire de l'impact radiobiologique de l'oncohistone H3.3 K27M dans les cellules de DMG ..... - 133 -
III.4. Discussion ..... - 136 -
III.4.1. Évaluation de l'impact de l'oncohistone sur le profil de réponse aux drogues par criblage pharmacologique ..... - 137 -
III.4.2. Profil de réponse aux épidrogues en lien avec les altérations épigénétiques inhérentes à l'oncohistone H3.3 K27M .... - 138 -
III.4.3. Impact de l'oncohistone sur la réponse aux inhibiteurs de la voie des MAPK ..... - 139 -
III.4.4. Identification d'une dépendance à la kinase CHK1 associée à l'oncohistone H3.3 K27M ..... - 140 -
III.4.5. Identification d'une sensibilité aux glycosides cardiaques associée à l'oncohistone H3.3 K27M ..... - 141 -
III.4.6. Impact de l'oncohistone sur la réponse des cellules de DMG à l'ONC201 ..... - 143 -
III.4.7. Méthodes d'évaluation du profil de réponse à la radiothérapie de nos modèles invalidés ..... - 144 -
III.4.8. Évaluation de l'efficacité de réparation des cassures double brin de l'ADN radio-induites ..... - 145 -

CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES ..... - 147 -

BIBLIOGRAPHIE ..... - 154 -

ANNEXES ..... - 177 -

Table des figures

Figure 1. Présentation des différents sous-types de pHGG de la classification de l'OMS CNS5. .....- 4 -
Figure 2. Comparaison des caractéristiques des histones canoniques H3.1 et H3.2 et du variant H3.3. .....- 7 -
Figure 3. Diversité des marques épigénétiques de l'histone 3.....- 9 -
Figure 4. Interconnexions entre le métabolisme cellulaire et la dynamique épigénétique. .....- 11 -
Figure 5. Spécificités des oncohistones H3 K27M et H3 G34R/V caractéristiques des pHGG. .....- 17 -
Figure 6. Origines cellulaires associées aux oncohistones H3 K27M et H3 G34R/V. .....- 20 -
Figure 7. Impact des mutations H3 K27M sur l'activité du complexe PRC2. .....- 23 -
Figure 8. Régulation métabolique du paysage épigénétique associé aux mutations H3 K27M. .....- 24 -
Figure 9. Rôle des marques H3K36me2 dans le maintien des altérations épigénétiques liées à H3K27M. .....- 27 -
Figure 10. Effets « *K27M-like* » induits par la surexpression d'EZHIP. .....- 35 -
Figure 11. H3 K27M et maintien de l'état peu différencié des cellules de DMG. .....- 43 -
Figure 12. Rôles de l'oncohistone H3.3 K27M dans la croissance cellulaire des DMG .....- 46 -
Figure 13. Lien potentiel entre l'oncohistone H3 K27M et le métabolisme énergétique des cellules de DMG- 48 -
Figure 14. Taux de réponse des DMG du tronc cérébral (ou DIPG) aux chimiothérapies cytotoxiques. .....- 52 -
Figure 15. Corrélations entre profil mutationnel de l'histone 3 et réponse à la radiothérapie en clinique .....- 54 -
Figure 16. Effet du ciblage d'EZH2 dans les DMG altérés H3 K27. .....- 58 -
Figure 17. Rationnel de l'efficacité de l'ONC201 dans les DMG altérés H3 K27. .....- 63 -
Figure 18. Évaluation de l'impact phénotypique de BMP7 en fonction de l'oncohistone H3.3 K27M. .....- 71 -
Figure 19. Évaluation de l'impact du profil mutationnel de l'histone 3 sur la réponse à l'ONC201. .....- 72 -
Figure 20. Établissement de modèles cellulaires knock-out pour l'oncohistone H3.3K27M. .....- 90 -
Figure 21. Caractérisation du paysage épigénétique global associé à l'invalidation de la mutation H3.3 K27M dans notre panel de modèles cellulaires. .....- 92 -
Figure 22. Impact transcriptionnel de l'oncohistone H3.3 K27M.....- 95 -
Figure 23. Rôle de l'oncohistone H3.3 K27M dans la croissance des cellules de DMG.....- 97 -
Figure 24. Impact de H3.3 K27M sur l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondrial. .....- 98 -
Figure 25. Impact de la mutation H3.3 K27M sur les paramètres de l'OXPHOS. .....- 100 -
Figure 26. Impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur l'expression d'acteurs du métabolisme des acides gras. .- 102 -
Figure 27. Impact de la mutation H3.3K27M sur le recours aux acides gras pour alimenter l'oxphos. .....- 104 -
Figure 28. Impact de la mutation H3.3 K27M sur la formation de gouttelettes lipidiques. .....- 105 -
Figure 29. Étude préliminaire de l'influence de l'hypoxie et de l'acidose sur la formation de gouttelettes lipidiques associée à l'invalidation de la mutation H3.3 K27M. .....- 107 -
Figure 30. Caractérisation de l'impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur le profil de réponse aux drogues des cellules de DMG. .....- 127 -
Figure 31. Validation de l'impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la réponse des cellules de DMG au prexasertib. .....- 129 -
Figure 32. Validation de l'impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la réponse à la proscillaridine A. .....- 131 -
Figure 33. Impact de la mutation H3.3 K27M sur la réponse des cellules de DMG à l'ONC201. .....- 132 -
Figure 34. Étude préliminaire de l'impact radiobiologique de l'oncohistone H3.3 K27M. .....- 134 -
Figure 35. Développement d'une nouvelle modalité d'étude de la réponse aux radiations ionisantes pour cellules cultivées en suspension. .....- 136 -

Abréviations

53BP1 Tumor suppressor p53-binding protein 1
AC-like Astrocyte Cell-like
ACLY ATP citrate lyase
ACSL Acyl-CoA synthetase long-chain
ACSS Acetyl-CoA synthetase
ACVR1 Activin A receptor, type I
α-KG Alpha Ketoglutarate
ALK2 activin receptor-like kinase-2
AMP 5' adenosine monophosphate
AMPK2α AMP-activated protein kinase
ATM Ataxia-telangiectasia mutated
ATRX alpha-thalassemia retardation, X-linked
AUC area under the curve
BAF BRG1/BRM-associated factor
BCA Bicinchoninic acid
BET Bromo- and Extra-Terminal domain
bFGF Basic Fibroblast Growth Factor
BHE Barrière Hémato Encéphalique
BMI-1 B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
BMP Bone morphogenetic proteins
BRD Bromodomain
BSA bovine serum albumin
CAS9 CRISPR associated protein 9
CBP CREB-binding protein
CDK Cyclin Dependant Kinase
ChIP Chromatin ImmunoPrecipitation
CK Cycle de Krebs
CKI Cyclin Kinase Inhibitor
CNS Central Nervous System
CoA Coenzyme A
CRISPR Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CTRL Controle
CXorf67 chromosome X open reading frame 67
DAXX Death Domain-Associated Protein
DDR DNA damage response
DE Différentiellement exprimé
DIPG Diffuse Intrinsic Pontine Glioma
DMG Diffuse Midline Glioma
DMSO Diméthylsulfoxyde
DNMT DNA Methyltransferase
DO Densité Optique
DOT1L Disruptor of telomeric silencing 1-like
ECAR Extracellular Acidification Rate
EED Embryonic ectoderm development
EGF Epidermal Growth Factor
ELISA Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ERK Extracellular signal-regulated kinases
ERV Endogenous retrovirus
ETC Electron transport chain
EZH2 Enhancer of zeste homolog 2
EZHIP EZH Inhibitory Protein
FCCP Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
FRT Flp recognition target
GBM Glioblastome
GDH Glutamate déshydrogénase
GFAP Flp recognition target
Gy Gray
HAT Histone AcetylTransférase
HDAC Histone Désacétylase
HIF Hypoxia Inducible Factor
HILPDA Hypoxia-Inducible Lipid Droplet-Associated
HIRA Histone cell cycle regulator
HMT Histone Méthyle Transférase
HOX Homeobox gene
HP1 Heterochromatin Protein 1
HRP Horseradish Peroxidase
IC_{50} Inhibitory Concentration 50
IDH Isocitrate dehydrogenase
IPC Intermediate progenitor cells
IRM Imagerie par Résonance Magnétique
JAK Janus kinase
KAT lysine acetyl-transferases
KDM histone lysine demethylase
KMT histone lysine methyltransferase
KO Knock-Out
LDHA L-2-hydroxyglutarate
MAG Myelin-Associated Glycoprotein
MAPK Mitogen-activated protein kinases
MAT méthionine adénosyltransférase
MEK mitogen-activated protein kinase/ERK kinase
MGMT Methylguanine methyltransferase
MLL1 Mixed lineage leukemia 1
NAD Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NAM Nicotinamide
NAMPT Nicotinamide phosphoribosyltransferase
NHEJ Non-Homologous End-Joining
NPAT Nuclear Protein, Coactivator Of Histone Transcription
NSC Neural Stem Cell
NSD nuclear receptor SET domain-containing
OC Olygodendrocyte Cell
OCR Oxygen Consumption Rate
OGDH Oxoglutarate dehydrogenase
OLIG2 Oligodendrocyte transcription factor 2
OMS Organisation Mondiale de la Santé
OPC Oligodendrocyte progenitor cell
ORL Otorhinolaryngologie
OXPHOS Oxidative phosphorylation
PBS phosphate-buffered saline
PCA principal component analyse
PCR Polymerase Chain Reaction
PDGF Platelet-Derived Growth Factor

PDGFR PDGF receptor
PDH Pyruvate Déshydrogénase
PE Platting Efficiency
PFA (ependymoma) posterior fossa group A
pHGG pediatric High Grade Glioma
PI3K phosphoinositide 3-kinase
pLGG pediatric Low Grade Glioma
PPM1D protéine phosphatase 1D
PRC1/2 Polycomb repressive complex
PRKAA2 AMP activated protein kinase-alpha2
RAS rat sarcoma viral oncogene homolog
RGC Radial Glial Cell
RNA-seq RNA sequencing
ROS Reactive oxygen species
SA Accepteur d'épissage
SAH S-adénosyl homocystéine
SAM S-adénosylméthionine
SDHA Succinate dehydrogenase complex, subunit A
SEM Standard error of the mean
SET Su(var)3-9, E(z) and Trithorax
SMARCA4 SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily A, member 4
STAT Signal Transducers and Activators of Transcription
SUZ12 Suppressor of zeste 12 homolog
SWI/SNF Suppressor of variegation [Su(var)] homologs and related
T2A Thosea asigna virus 2A
TP53 Tumor Protein 53
TS Taux de survie
TSM Tumor Stem Medium
TSS Transcription Start Site
UTX Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat X chrmomosome
WB Western Blot
WT Wild Type

INTRODUCTION

I Gliomes pédiatriques de haut grade et épigénétique

I.1. Généralités sur les gliomes pédiatriques de haut grade

On estime que chaque année en France environ 2300 enfants et adolescents sont diagnostiqués pour un cancer. Les types de cancers les plus fréquemment observés en pédiatrie sont les hémopathies malignes (leucémies et lymphomes) et les tumeurs du système nerveux central (SNC). Avec environ 550 nouveaux cas diagnostiqués chaque année selon les derniers chiffres de l'Institut National du Cancer (période 2012-2016), les tumeurs du SNC représentent 25% des cancers de l'enfant (0-17 ans) et sont les tumeurs solides les plus fréquentes en pédiatrie. Dans leur ensemble, les tumeurs pédiatriques du SNC présentent un taux de survie à 5 ans supérieur à 70%. En effet, les tumeurs cérébrales pédiatriques les plus fréquentes sont les gliomes pédiatriques de bas grade (pLGG) et les médulloblastomes (tumeurs embryonnaires), présentant des taux de survie à 5 ans excédant 75% (Pollack et al., 2019). À l'inverse, les gliomes pédiatriques de haut grade (pHGG), représentant 15-20% des tumeurs cérébrales pédiatriques, sont de mauvais pronostic, avec un taux de survie à 2 ans variable en fonction du sous-type considéré mais globalement compris entre 5% et 30%, et demeurent la première cause de mortalité par cancer chez les moins de 19 ans (Mackay et al., 2017; Ostrom et al., 2019).

I.1.1. Origines cellulaires et histologie

Au niveau cérébral, les cellules gliales sont aussi nombreuses que les neurones et partagent une origine cellulaire commune (excepté les cellules de la microglie qui dérivent de précurseurs erythromyéloïdes). La glie se compose de différents types cellulaires différenciés, les principaux au niveau du SNC sont les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales, mais également de cellules progénitrices, telles que les précurseurs oligodendrocytaires (OPC). La proportion de ces cellules varie en fonction des régions du SNC et du stade de développement cérébral (Allen and Lyons, 2018). En effet, au cours du développement embryonnaire les progéniteurs neuraux permettent, dans un premier temps, de générer une grande quantité de neurones avant de générer des progéniteurs intermédiaires et des cellules gliales différenciées. Ces cellules de la glie présentent un rôle crucial dans la formation et la fonctionnalité du SNC (Allen and Lyons, 2018).

Les gliomes sont les tumeurs se développant à partir des cellules de la glie et regroupent une diversité importante d'entités. Leur nomenclature historique se base sur leur localisation anatomique et leurs similarités histologiques avec les cellules gliales saines (astrocytomes, oligodendrogliomes ou encore oligoastrocytomes) (Jones and Baker, 2014; Louis et al., 2007).

I.1.2. Classification et gradation moléculaires

Cette classification a cependant été révisée et enrichie au gré des évolutions technologiques et de l'accumulation de connaissances, en particulier concernant les spécificités moléculaires des différents types de gliomes. En ce sens, la récente 5ème édition de la classification des tumeurs du SNC de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS CNS5) poursuit l'intégration des connaissances moléculaires présentant une pertinence clinique supérieure aux critères historiques (Louis et al., 2021; Pfister et al., 2022). De plus, la recherche sur les tumeurs cérébrales pédiatriques a connu une révolution au cours de ces 10 dernières années et il est désormais communément admis que les gliomes de l'enfant sont des entités distinctes des gliomes de l'adulte avec des *drivers* moléculaires caractéristiques spécifiques (Jones et al., 2016, 2012). Dans ce contexte, la classification OMS CNS5 précise désormais, dans sa nomenclature, l'association particulière d'un type de tumeur à un âge donné par les mentions « *adult-type* » et « *pediatric-type* ».

Les gliomes « *pediatric-type* » sont subdivisés en 2 catégories en fonction du pronostic leur étant associé ; les gliomes pédiatriques diffus de bas grade (pLGG, *i.e.* grades 1 & 2) et de haut grade (pHGG, *i.e.* grades 3 & 4). Contrairement à ce qui est parfois observé chez l'adulte, pour les gliomes pédiatriques il n'y a pas d'évidences cliniques ni histologiques de l'existence de progression d'une lésion de bas grade vers un gliome de haut grade (Jones and Baker, 2014). La gradation des tumeurs avec des grades allant de 1 (tumeurs curables par chirurgie) à 4 (tumeurs malignes associées à une survie réduite et sans thérapies effectives) était historiquement basée sur des critères histologiques uniquement. De nos jours, certains marqueurs moléculaires associés à un pronostic clinique sont désormais considérés comme des critères de gradation. C'est notamment le cas des altérations affectant l'histone 3 (H3 G34 et H3 K27) caractéristiques de certains sous-types de gliomes pédiatriques diffus de haut grade qui engendrent un reclassement systématique vers le grade 4 quelle que soit l'histologie (Louis et al., 2021, 2016). Ainsi, le statut mutationnel de l'histone 3 est désormais au centre de la classification des pHGG. Parmi eux, se distinguent 4 sous-types (Fig. 1) :

- Les gliomes diffus de la ligne médiane altérés H3 K27
- Les gliomes diffus hémisphériques mutés H3 G34
- Les gliomes pédiatriques diffus de haut grade $H3^{WT}$ et IDH^{WT}
- Les gliomes hémisphériques du nourrisson

D'un point de vue anatomique, contrairement aux glioblastomes de l'adulte majoritairement localisés au niveau des hémisphères cérébraux, près de la moitié des pHGG sont localisés au niveau des structures de la ligne médiane que sont le thalamus, le tronc cérébral, le cervelet et moelle épinière (Jones and Baker, 2014). Cette localisation est emblématique du sous-type moléculaire de pHGG caractérisés par une altération spécifique du paysage épigénétique sur

les lysines 27 des histones 3 que sont les gliomes diffus de la ligne médiane (DMG) altérés H3 K27.

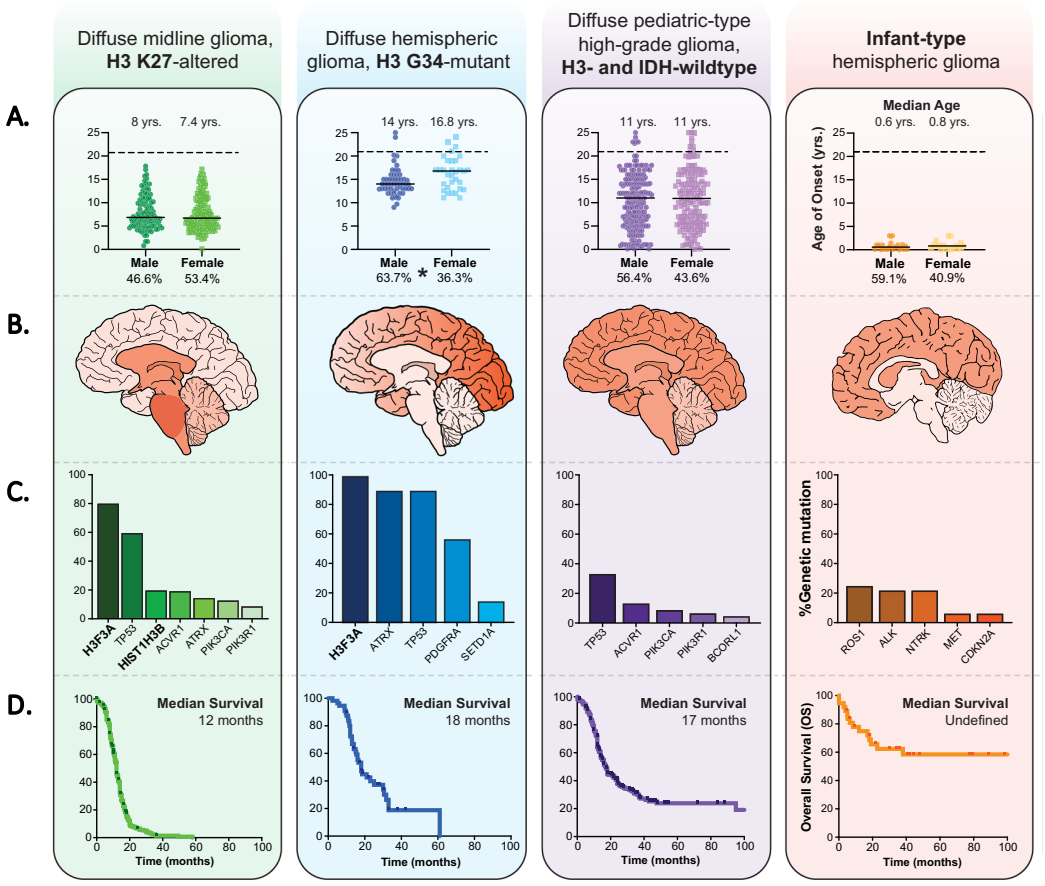


Figure 1. Présentation des différents sous-types de pHGG de la classification de l'OMS CNS5. De gauche à droite sont présentés i) les DMG altérés H3 K27 (sur fond vert), ii) les gliomes diffus hémisphériques mutés H3 G34 (sur fond bleu), iii) les gliomes pédiatriques diffus de haut grade $H3^{WT}$ et IDH^{WT} (sur fond violet) et enfin iv) les gliomes hémisphériques du nourrisson (sur fond orange). Pour chacun de ces sous-types de pHGG, de haut en bas sont présentés : **A.** le graphique représentant l'âge au diagnostic en fonction du sexe (l'âge médian et le pourcentage de patients pour chaque sexe sont précisés au-dessus et en-dessous du graphique respectivement). La ligne en pointillée représente le seuil de classification pédiatrique (21 ans). **B.** Le schéma de l'encéphale humain représentant les localisations tumorales préférentielles en nuance de oranges (les zones plus intenses correspondent aux régions cérébrales les plus fréquemment touchées par le sous-type considéré). **C.** Un diagramme en barres représentant la prévalence des mutations génomiques les plus caractéristiques (hors amplifications et délétions). **D.** Une courbe de Kaplan-Meier représentant le taux de survie des patients en fonction du temps. La valeur de survie médiane (en mois) est indiquée en haut à droite du graphique. (Extrait de Ocasio et al., 2023).

I.2. Les histones 3 et leur régulation épigénétique

De manière générale, l'ensemble des différents sous-types moléculaires de tumeurs cérébrales pédiatriques peuvent être distingués par leur profil de méthylation de l'ADN, qui constitue une signature spécifique et souligne une diversité importante de contextes épigénétiques rencontrée au sein de ces tumeurs. Cette diversité reflète la multitude de types

cellulaires d'origines et de stades de différentiation variés, rencontrée tout particulièrement dans le contexte du développement cérébral (Capper et al., 2018 ; Pfister et al., 2022). De surcroit, gage de l'importance particulière des mécanismes épigénétiques en neuro-oncologie pédiatrique, plus de 60% des pHGG présentent des mutations somatiques de l'histone 3 qui perturbent profondément leurs épigénomes (Bonner et al., 2023).

I.2.1. Les différentes formes de l'histone 3

Le nucléosome est l'unité structurale fondamentale de la chromatine et constitue le premier niveau de compaction de l'ADN (McGinty and Tan, 2015). La partie protéique centrale du nucléosome est un complexe octamérique rassemblant 2 histones de chacun des types principaux : H3, H4, H2A et H2B (Henikoff et al., 2004).

L'histone H3 existe sous différentes formes chez l'Homme et constitue en réalité une famille de protéines, dont les 3 principales isoformes (*i.e.* H3.1, H3.2 et H3.3) sont codées par 15 gènes différents. En effet, on distingue les formes canoniques (*i.e.* H3.1 et H3.2) et les formes variants (*i.e.* H3.3, H3t, H3.X, H3.Y et CENP-A) de l'histone 3. L'ensemble de ces formes ont toutefois des séquences d'acides aminés proches. À titre d'exemple, la forme canonique H3.1 ne se distingue du variant H3.3 que par 5 acides aminés (Szenker et al., 2011). Pour autant, ces différences permettent une reconnaissance spécifique des différentes formes de l'histone 3 par des protéines chaperonnes. Ainsi, les histones 3 présentent des dynamiques d'incorporation et des aires de répartition distinctes inhérentes à leurs fonctions spécifiques.

I.2.1.1. Les histones canoniques H3.1 et H3.2

Durant les phases de réplication, les nucléosomes préexistants sont recyclés et de nouveaux nucléosomes sont produits afin d'assurer l'enroulement d'une quantité doublée d'ADN (Burgess and Zhang, 2013). Ce pic de production de nucléosomes nécessite la synthèse massive d'histones (environ 400 millions/cellule par phase S), notamment H3. La fonction des histones 3 canoniques (H3.1 et H3.2) est notamment de répondre à cette forte demande lors de la réplication. À cette fin, chez l'Homme, les gènes codant les histones 3 canoniques présentent des optimisations structurales, conservées au cours de l'évolution, afin que leur transcription et traduction soient compatibles avec un pic de production spécifique de la phase S. Ainsi, les 13 gènes codant les formes canoniques ne présentent pas d'intron et sont organisés en tandem au niveau de 2 clusters sur les chromosomes 1 et 6 (Szenker et al., 2011). Cette organisation permet une expression simultanée et efficace par concentration des facteurs nécessaires à la transcription et à la maturation des ARNm au niveau de ces clusters. Au rang de ces facteurs, figurent notamment les protéines NPAT et SLBP dont les expressions sont dictées par la progression dans le cycle cellulaire, les gènes les codant étant des cibles des facteurs de transcription E2F. Ainsi, l'activité résiduelle de CDK2 des cellules engagées

dans le cycle cellulaire permet d'initier la synthèse d'histones 3 canoniques dès la phase G1 afin de constituer un pool permettant de débuter la réplication. Puis, à mesure de l'activation de CDK2 et de la libération des facteurs E2F, la synthèse des histones 3 canoniques atteint son paroxysme au cours de la phase S et ces dernières sont alors incorporées à la chromatine en aval des fourches de réplication par des protéines chaperonnes spécifiques (*e.g.* complexe CAF-1) (Armstrong and Spencer, 2021; Burgess and Zhang, 2013). Dans ce contexte, les histones 3 canoniques constituent la majorité des histones 3 du génome, avec une répartition uniforme au niveau de l'ensemble du génome (Fig. 2) (Ocasio et al., 2023).

I.2.1.2. *Le variant H3.3*

L'isoforme H3.3, principal « variant » de l'histone 3 (en opposition aux formes dites canoniques), est codée par 2 gènes distincts présentant des fonctions non-redondantes mais pouvant, dans certains cas, se compenser (Klein and Knoepfler, 2023). Les gènes *H3F3A*, localisé au niveau du chromosome 1 (1q41), et *H3F3B*, au niveau du chromosome 17 (17q25), présentent une structure plus conventionnelle dotée d'introns contrairement aux gènes codant les formes H3 canoniques. De même, leur synthèse et incorporation sont indépendantes de la réplication (Szenker et al., 2011) et la proportion du variant H3.3 par rapport à l'ensemble des histones 3 est variable en fonction du type cellulaire et de la fenêtre de développement considérés (Fig. 2) (Maze et al., 2015). Selon les études et les modèles utilisés, les variants H3.3 comptent ainsi en moyenne pour 20-25% du pool cellulaire d'histones 3 dans les cellules proliférantes. Toutefois, leur accumulation post-mitotique dans certains types cellulaires (*e.g.* neurones corticaux, hépatocytes) peut atteindre plus de 90% des histones 3 totales (Funk et al., 2022; Tvardovskiy et al., 2017). De plus, les histones, en particulier le variant H3.3, présentent une demi-vie importante de l'ordre de plusieurs semaines (Klein and Knoepfler, 2023).

En termes de distribution génomique, les variants H3.3 sont spécifiquement incorporés par les chaperonnes ATRX et DAXX au niveau de régions d'hétérochromatine telles que les télomères ou encore de la chromatine péricentrique. D'autre part, le complexe HIRA permet la déposition et un enrichissement en histones H3.3 au niveau des régions transcriptionnellement actives du génome (*e.g.* corps de gène, promoteur) (Fig. 2) (Szenker et al., 2011). En effet, l'incorporation du variant H3.3 participe à la régulation de programmes transcriptomiques mais également à la stabilité du génome (*e.g.* maintien de l'hétérochromatine télomérique, répression des séquences répétées de types ERV), en particulier lors du développement (embryonnaire et post-natal). À titre d'exemple, au niveau cérébral, les cellules neurales progénitrices (glie radiale et progéniteurs intermédiaires) et les neurones post-mitotiques présentent une expression élevée des gènes *H3F3A* et *H3F3B*. En effet, dans leur récente étude, Funk et collaborateurs ont montré que l'expression et l'accumulation de variants H3.3 sont essentielles à la mise en place de programmes de

différentiation permettant l'établissement d'une identité neuronale au cours du développement fœtal et post-natal. D'un point de vue phénotypique, le variant H3.3 est ainsi essentiel à l'axonogenèse des neurones corticaux (Funk et al., 2022).

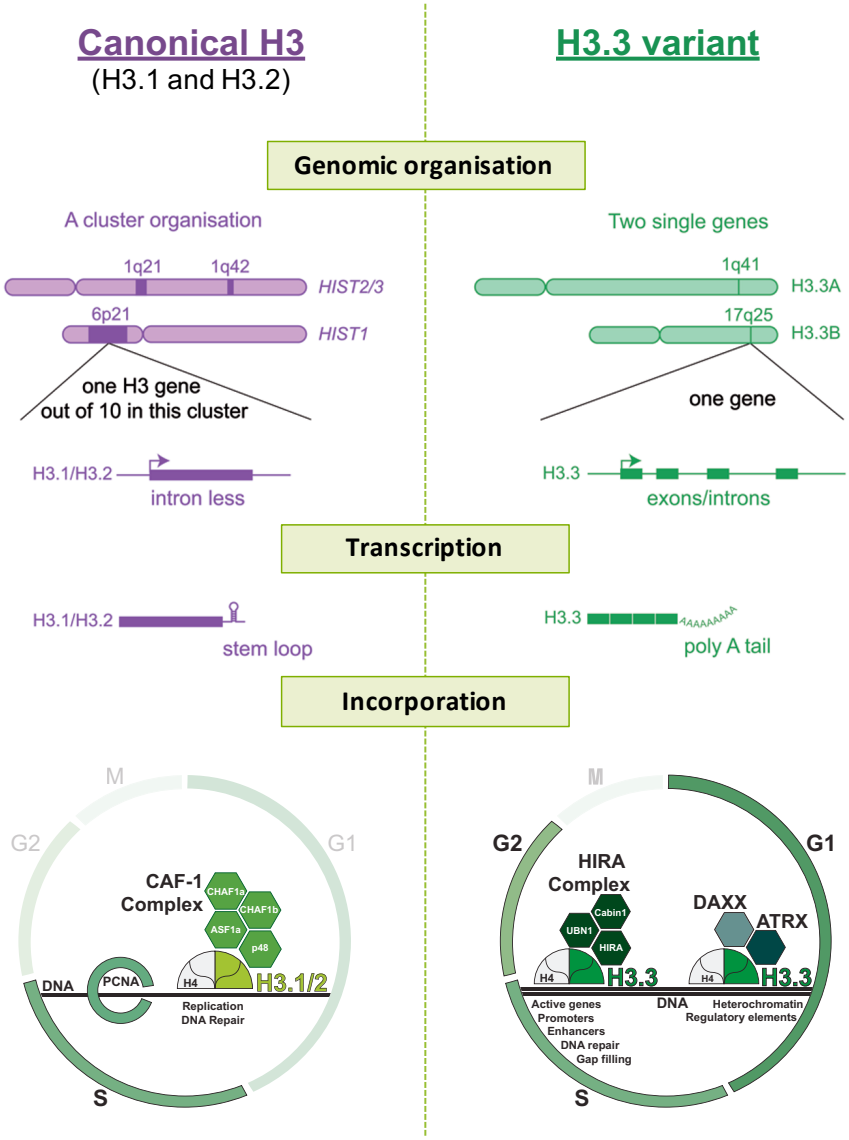


Figure 2. Comparaison des caractéristiques des histones canoniques H3.1 et H3.2 et du variant H3.3. La partie de gauche décrit les caractéristiques des histones H3.1 et H3.2. Les gènes codant les histones 3 canoniques sont disposés en tandem et sous forme de clusters. Ces gènes ne contiennent pas d'intron et sont transcrits en ARN messagers présentant une structure en boucle au niveau de l'extrémité 3' à la place de la queue polyA. Les histones canoniques sont produites et incorporées à la chromatine, de manière uniforme par le complexe CAF-1, au cours de la réplication. La partie de droite décrit les caractéristiques du variant H3.3. L'organisation génomique, la structure génique et les ARN messagers de *H3F3A* et *H3F3B* sont plus classiques (*i.e.* présence d'introns, polyadénylation des ARN messagers). La production et l'incorporation du variant H3.3 est indépendante de la réplication. Le variant H3.3 est majoritairement incorporé au niveau des régions activement transcrites du génomes, par le complexe HIRA, et au niveau des régions centromériques et télomériques (hétérochromatine), par les chaperonnes ATRX et DAXX. (Adapté de Szenker et al., 2011 et de Ocasio et al., 2023).

I.2.2. Les modifications épigénétiques des histones 3

Les histones font l'object de multiples modifications post-traductionnelles, ou marques épigénétiques, influençant l'état de la chromatine et le transcriptome. Les queues N-terminales des histones 3 constituent 25-30% de leur masse et forment des protrusions accessibles en périphérie des nucléosomes. Ainsi, ces queues N-terminales, enrichies en résidus lysines et arginines, sont le siège de la majorité de modifications post-traductionnelles des histones 3 (Cutter and Hayes, 2015).

I.2.2.1. Différents types de modifications post-traductionnelles

Les modifications épigénétiques possibles de l'histone 3 représentent une vaste diversité de modifications post-traductionnelles pouvant être catégorisées en 4 grands groupes : i) les modifications de types acylations concernant majoritairement les lysines, avec comme chef de file l'acétylation (CH_3CO), ii) les marques *ubiquitin-like* des lysines, iii) les marques de méthylation (CH_3) à 3 niveaux (mono-, di- et triméthylations) sur les lysines et arginines et iv) les marques affectant des résidus autres que les lysines (Fig. 3A) (Millán-Zambrano et al., 2022).

À noter – Nomenclature des marques d'histones

Concernant la nomenclature de ces marques d'histones (adoptée pour la suite du manuscrit), il s'agit tout d'abord d'identifier l'histone concernée (H2A, H2B, H3 ou H4), puis le résidu (type d'acide aminé en code une lettre puis position), le type de marque (sous forme abrégée) suivi, le cas échéant, du niveau de modification (*e.g.* me1, me2 et me3 pour les trois niveaux de méthylation).

Ainsi pour la triméthylation des lysines 27 de l'histone 3, nous noterons H3K27me3 ou encore H3K27ac pour l'acétylation des lysines 27 de l'histone 3.

Au-delà de la catégorisation sur la base du groupement chimique ajouté, ces différentes marques peuvent être groupées en fonction de l'état de la chromatine (euchromatine et hétérochromatine) auquel elles sont associées. En particulier, dans ce contexte, ce sont les marques de méthylations et d'acétylations de l'histone 3 qui ont été les plus étudiées. En effet, les marques H3K4me1/2/3, H3K36me2/3, H3K79me2/3, H3K9ac et H3K27ac sont associées à une conformation active de la chromatine (euchromatine) au niveau de promoteurs, de corps de gènes ou encore d'enhancers (Fig. 3B). À l'inverse, les marques H3K9me2/3, H3K27me2/3 sont plutôt associées à une conformation fermée de la chromatine (hétérochromatine) au niveau de gènes ou régions réprimées du génome (*e.g.* éléments répétés, télomères, chromatine péricentrique) (Fig. 3C) (Barth and Imhof, 2010; Zhang et al., 2015; Gates et al., 2017).

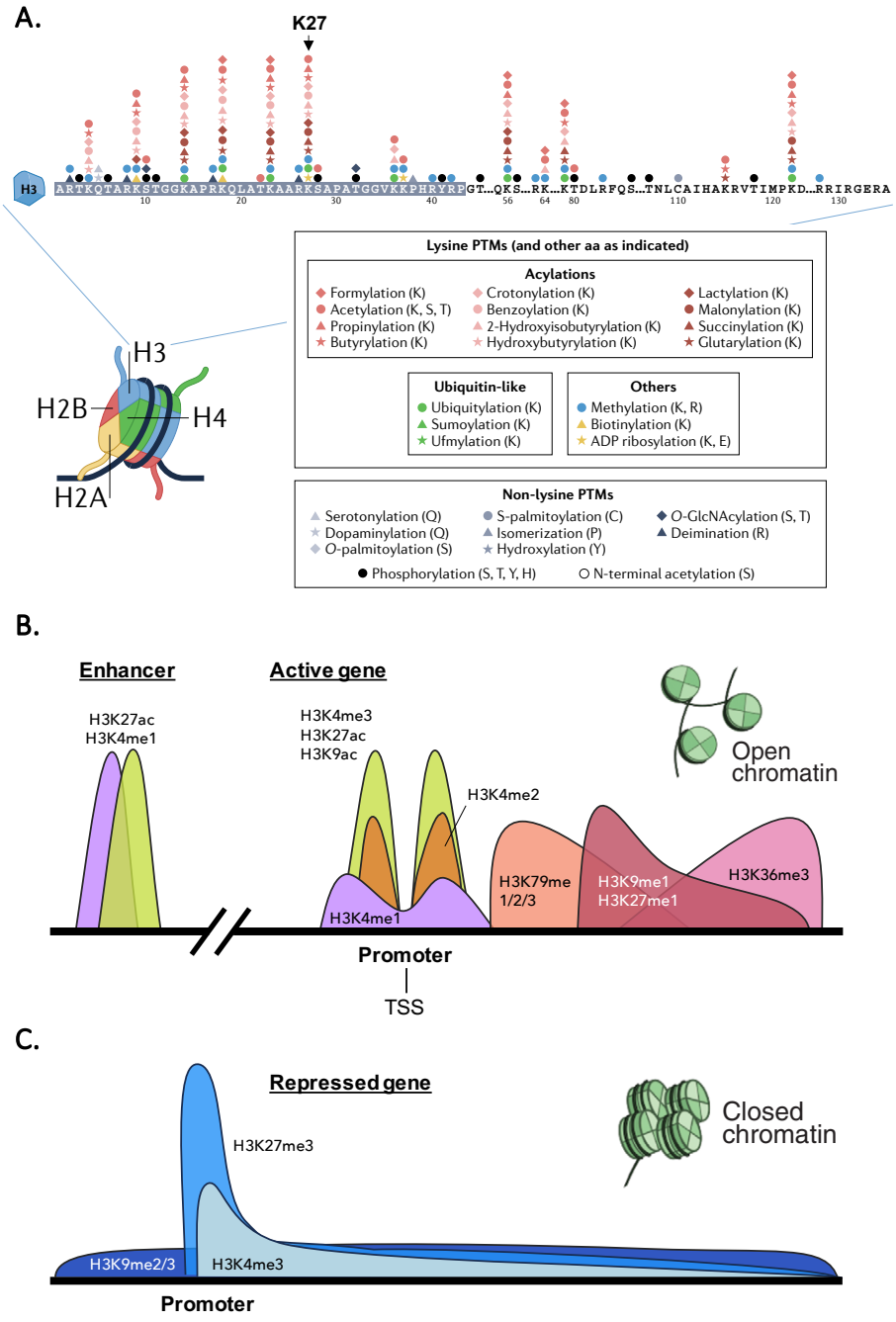


Figure 3. Diversité des marques épigénétiques de l'histone 3. A. L'histone 3 fait l'object de différents types de modifications post-traductionnelles (dites épigénétiques) catégorisées en 4 grands groupes : i) les modifications de types acylations (dont l'acétylation) concernant majoritairement les lysines, ii) les marques *ubiquitin-like* des lysines, iii) les autres marques affectant les lysines, dont la méthylation (CH_3) à 3 niveaux (mono, di- et triméthylations) et iv) les marques affectant des résidus autres que les lysines (*e.g.* phosphorylations). Ces marques sont ici représentées par différents symboles au niveau des résidus de l'histone 3 sur lesquels elles peuvent être apposées. En particulier, le résidu lysine 27 de l'histone 3 peut faire l'object de nombreux types de modifications distincts. Les modifications épigénétiques de l'histone 3 sont également catégorisées en fonctions de leur association avec une conformation ouverte (B.) ou condensée (C.) de la chromatine. **B.** Les enhancers actifs sont caractérisés par la présence des marques H3K27ac et H3K4me1. Au niveau des gènes activement transcrits, des marques H3K4me1/2/3, H3K27ac et H3K9ac sont retrouvées au niveau des promoteurs, encadrant le site d'initiation de la transcription (TSS), et des marques H3K36me3, H3K79me1/2/3 au niveau du corps de gène. **C.** Au niveau des gènes réprimés, un enrichissement en marques associées à l'hétérochromatine, telles

que H3K27me3 ou encore H3K9me2/3, est retrouvé au niveau du promoteur et du corps de gène. (Extrait de Millán-Zambrano et al., 2022 et adapté de Barth and Imhof, 2010).

I.2.2.2. Régulation dynamique des marques épigénétiques

La régulation de ces marques épigénétiques réversibles est régie par des processus dynamiques, reposant sur l'activité d'enzymes spécifiques agissant majoritairement en complexes multiprotéiques (*e.g.* l'histone méthyltransférase EZH2 du complexe PRC2). Les marques de méthylation sont ainsi apposées par des histone méthyltransférases et retirées par des déméthylases qui sont souvent à la fois spécifiques d'un résidu particulier et d'un niveau de méthylation. Globalement, les marques de méthylations sur les histones 3 sont assez stables avec une demi-vie moyenne légèrement supérieure à 1 jour (Barth and Imhof, 2010). Concernant les marques d'acétylations, quant à elles plus labiles (demi-vie moyenne inférieure à 15 minutes), leur apposition est catalysée par des histone acétyltransférases (HAT) et leur retrait par des histone désacétylases (HDAC) avec une spécificité moindre par rapport aux enzymes régulant la méthylation (Shvedunova and Akhtar, 2022).

I.2.2.3. Recrutement de facteurs sur les marques épigénétiques

Au-delà des enzymes catalysant l'apposition ou le retrait des marques, certains facteurs interagissent avec les modifications épigénétiques *via* des domaines spécifiques. Ainsi, les protéines à chromodomaines et à bromodomaines reconnaissent et se fixent respectivement au niveau de résidus lysines méthylés ou acétylés. Le recrutement de facteurs au niveau des marques épigénétiques a une implication fonctionnelle dans de nombreux processus tels que l'extension de l'apposition des marques (*e.g.* interaction entre EED du complexe PRC2 et H3K27me3), la compaction de la chromatine (*e.g.* fixation de HP-1 sur H3K9me3), le recrutement de la machinerie de transcription (*e.g.* recrutement de TAF4 par H3K4me3) ou encore la réparation des dommages à l'ADN (*e.g* fixation de 53BP1 sur H4K20me2) (Millán-Zambrano et al., 2022).

I.2.2.4. Régulation métabolique de la dynamique épigénétique

Les enzymes à l'origine de la dynamique du paysage épigénétique, en particulier les méthylations et les acétylations d'histones, nécessitent des substrats et cofacteurs qui sont des intermédiaires du métabolisme cellulaire (Kinnaird et al., 2016). Ainsi, il existe un contrôle réciproque entre les voies métaboliques, cytosoliques et mitochondriales, et les processus épigénétiques nucléaires (Fig. 4).

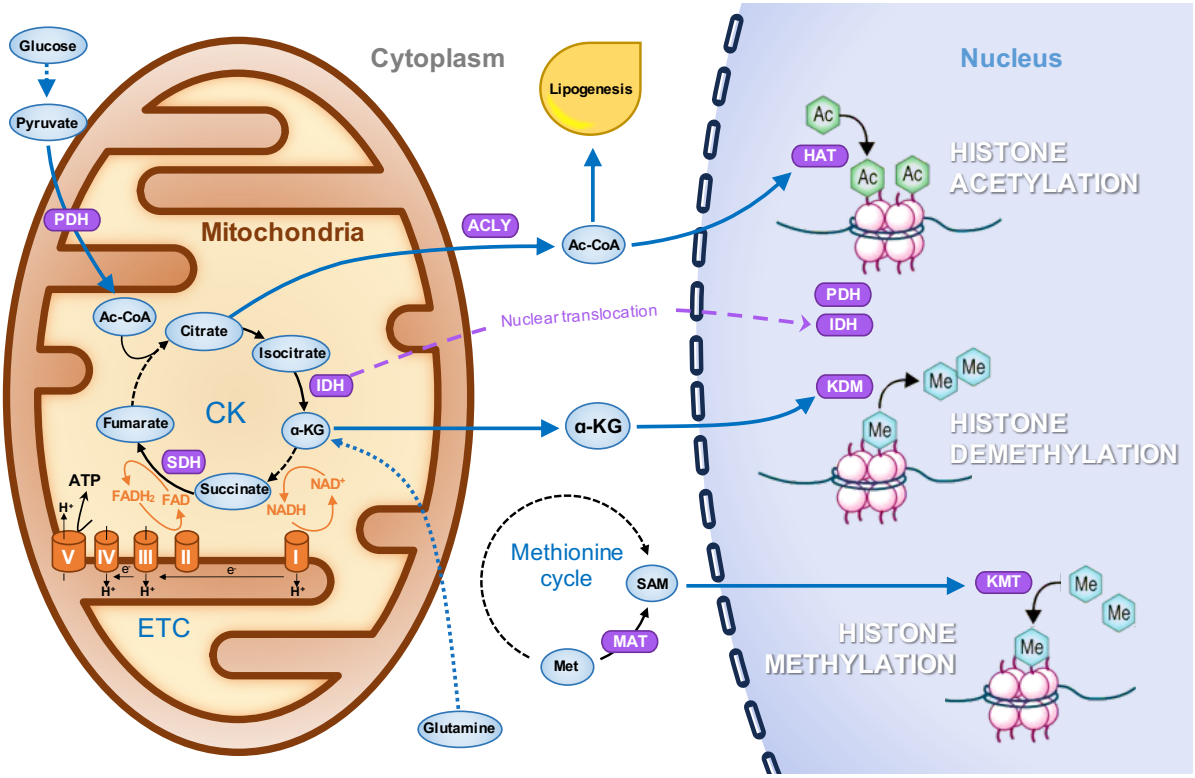


Figure 4. Interconnexions entre le métabolisme cellulaire et la dynamique épigénétique. Au niveau mitochondrial, l'activité du cycle de Krebs (CK) est majoritairement alimentée par le pyruvate produit par la glycolyse après conversion en acétyl-CoA par les pyruvate déshydrogénases (PDH). La glutaminolyse permet également d'en supporter l'activité. Parmi les réactions enzymatiques caractéristiques du cycle de Krebs, la conversion de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate (α-KG) est catalysée par les isocitrate déshydrogénases (IDH) et la conversion du succinate en fumarate par les succinate déshydrogénases (SDH). Cette succession de réactions enzymatiques produit des équivalents réducteurs de types NADH et $FADH_2$ qui alimentent respectivement les complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale (ETC) et permettent *in fine* la production d'ATP par un métabolisme de type OXPHOS. Certains métabolites mitochondriaux, intermédiaires du cycle de Krebs, sont essentiels au fonctionnement de diverses enzymes épigénétiques, en particulier les histone lysine méthyltransférases (KDM) dépendantes de l'α-KG et les histone acétyltransférase (HAT) dont le seul donneur de groupements acétyle (Ac) est l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA ne traversant pas les membranes, c'est l'export cytoplasmique du citrate ensuite converti en acétyl-CoA par l'ATP citrate lyase (ACLY) qui constitue la principale source pour l'acétylation des histones au niveau nucléaire. Ce pool cytoplasmique d'acétyl-CoA est également partagé avec des voies anaboliques telles que la lipogenèse (synthèse des acides gras et du cholestérol). Pour favoriser la production d'α-KG et d'acétyl-CoA à des fins épigénétiques, certaines enzymes mitochondriales (*e.g.* PDH, IDH) peuvent être transloquées au niveau nucléaire. Outre le métabolisme mitochondrial, l'activité du cycle de la méthionine régule également la dynamique épigénétique. Dans ce cycle, la S-adénosyl-méthionine (SAM), unique donneur de groupements méthyle (Me), est généré par les méthionine adénosyltransférases (MAT) à partir de la méthionine (Met) et permet l'activité des histone lysine méthyltransférases (KMT). (Adapté de Martínez-Reyes and Chandel, 2020).

Cycle de la méthionine et méthylations des histones

Dans les cellules eucaryotes, l'unique donneur de groupements méthyle permettant les modifications post-traductionnelles de type méthylation est la S-adénosyl méthionine (SAM), métabolite intermédiaire du cycle de la méthionine dont la synthèse (par les enzymes méthionine adénosyltransférases, MAT) résulte de l'activité combinée du métabolisme de la méthionine et des folates (vitamines) (Kinnaird et al., 2016; Yu et al., 2018). Par l'hydrolyse de

la SAM en S-adénosyl homocystéine (SAH) au niveau de leur domaine catalytique, les histone méthyltransférases catalysent l'ajout d'un groupement méthyle (CH_3) sur leur substrat. De fait, la disponibilité cellulaire en SAM et le ratio SAM/SAH régissent la dynamique de méthylation de la chromatine et, dans ce contexte, certaines enzymes de la famille des MAT (*e.g.* MAT2A) peuvent être relocalisées au niveau nucléaire pour alimenter directement les histone méthyltransférases en SAM (Ryall et al., 2015; Yu et al., 2018).

Cycle de Krebs et déméthylation des histones

La déméthylation des histones est également étroitement liée au métabolisme cellulaire, en particulier au métabolisme mitochondrial. En effet, les lysine déméthylases à domaines Jumonji C (KDM2-7) sont des enzymes de la famille des dioxygenases dépendantes de l'α-cétoglutarate (α-KG), métabolite intermédiaire du cycle de Krebs synthétisé à partir de l'isocitrate par les isocitrate déshydrogénases (IDH1-3) au niveau de la matrice mitochondriale et du cytosol (Martínez-Reyes and Chandel, 2020; Schulze and Harris, 2012). Ainsi, l'α-KG est un métabolite central du métabolisme énergétique mitochondrial étant également exporté au niveau nucléaire pour permettre le remodelage du paysage de méthylation des histones. Par conséquent, la mobilisation du pool cellulaire d'α-KG, majoritairement alimenté et maintenu par la glycolyse et la glutaminolyse (Carey et al., 2015), est répartie entre ces différentes fonctions au regard des besoins cellulaires (Martínez-Reyes and Chandel, 2020; Ryall et al., 2015). À titre d'exemple, une balance d'utilisation de l'α-KG en faveur de la plasticité épigénétique, avec notamment une relocalisation nucléaire d'IDH3 (au dépend des aspects bioénergétiques mitochondriaux), permet le maintien d'une hypométhylation des histones, nécessaire au caractère pluripotent des cellules souches (Carey et al., 2015; Li et al., 2022).

Métabolisme de l'acétyl-CoA et acétylation d'histones

À l'instar de l'α-KG, l'acétyl-CoA figure également au rang des métabolites centraux du métabolisme cellulaire qui sont indispensables à la dynamique épigénétique. En effet, dans les cellules eucaryotes, l'acétyl-CoA est l'unique donneur de groupements acétyles permettant l'acétylation des protéines, en particulier des histones. À elle seule, l'histone 3 présente 13 sites d'acétylation, ce qui représente plusieurs milliards de sites d'acétylation potentiels à l'échelle de l'épigénome (Kinnaird et al., 2016). Dans ce contexte, une fois de plus, il existe une régulation bidirectionnelle de la répartition du pool cellulaire d'acétyl-CoA pour alimenter, d'une part, le métabolisme cellulaire (catabolisme et anabolisme) et, d'autre part, l'acétylation des histones au niveau nucléaire. L'acétyl-CoA peut être généré à partir du pyruvate, majoritairement au niveau mitochondrial par les enzymes de la famille des pyruvate déshydrogénases (PDH) pour alimenter le cycle de Krebs et le métabolisme énergétique de type OXPHOS (phosphorylation oxidative). Toutefois, l'acétyl-CoA étant instable et ne traversant pas les membranes, le pool cytoplasmique et nucléaire résulte de l'export et de la conversion du citrate mitochondrial en acétyl-CoA par l'ATP citrate lyase (ACLY) au niveau

cytoplasmique (Kinnaird et al., 2016; Martínez-Reyes and Chandel, 2020). Ainsi, l'acétyl-CoA est partagé entre le métabolisme énergétique mitochondrial, les voies anaboliques cytoplasmiques, notamment la lipogenèse (acides gras et cholestérol), et les modifications d'acétylation, en particulier des histones au niveau nucléaire. En effet, il a été décrit que l'inhibition de l'utilisation de l'acétyl-CoA pour la synthèse des acides gras induit une hyper acétylation des histones au niveau nucléaire (Yu et al., 2018). Par ailleurs, pour favoriser l'activité des HAT au niveau nucléaire et le maintien d'un état indifférencié, de récentes études ont montré la translocation d'enzymes mitochondriales, dont la PDH, vers le noyau, concomitante à une augmentation de la concentration nucléaire en pyruvate. Cette réorientation de la production de l'acétyl-CoA permet ainsi d'alimenter les HAT pour maintenir un niveau élevé d'acétylation sur les résidus lysine des histones 3 notamment (*i.e.* H3K9ac et H3K27ac) (Khan et al., 2020; Li et al., 2022).

D'autre part, les HDAC de classe III, ou Sirtuins (SIRT1-7), sont également dépendantes du métabolisme mitochondrial pour leur activité puisqu'elles convertissent le NAD^+ en NAM pour catalyser la désacétylation de leurs substrats. Ainsi, les switch métaboliques, influençant le ratio NAD+/NADH, modifient la dynamique de désacétylation des histones (Ryall et al., 2015).

Pour conclure, les processus épigénétiques de méthylation et d'acétylation des histones 3 sont régis par la disponibilité et la répartition cellulaire de métabolites clés, tels que l'α-KG ou encore l'acétyl-CoA. Du fait du recours commun à ces métabolites, la dynamique épigénétique des histones 3 s'inclut dans une régulation intégrée avec le métabolisme énergétique mitochondrial et diverses voies anaboliques telles que la lipogenèse.

I.2.3. Marques apposées sur la lysine 27 de l'histone 3

Comme décrit précédemment, les queues N-terminales des histones 3 font l'object de multiples types de modifications épigénétiques (*e.g.* acylations, méthylations, ubiquitinylations, phosphorylations, etc…) sur divers résidus (Millán-Zambrano et al., 2022). Parmi ces résidus, la lysine 27 est notamment le siège de 2 types de marques épigénétiques antagonistes et exclusives, d'une part les 3 niveaux de méthylations (H3K27me1/2/3) et, d'autre part, l'acétylation (H3K27ac). Ces modifications des lysines 27 des histones 3 figurent parmi les marques les plus étudiées du code épigénétique.

I.2.3.1. La méthylation de H3K27

Les différents niveaux de méthylation de H3K27 corrèlent avec des états de la chromatine différents et présentent des distributions distinctes. Les marques H3K27me1 sont principalement retrouvées au niveau du corps de gènes activement transcrits alors que les marques H3K27me2/3 sont considérées comme des marques répressives plutôt associées à

l'hétérochromatine (Barth and Imhof, 2010; Ferrari et al., 2014; Mozzetta et al., 2015). Globalement, H3K27me2 est la modification la plus abondante des lysines 27 des histone 3 (50-70% des histones 3) et se localise sur de larges régions intergéniques pour prévenir d'une activité transcriptionnelle ou de l'activation inappropriée d'enhancers (Ferrari et al., 2014; Laugesen et al., 2016). Les marques H3K27me3 présentent une distribution plus restreinte (environ 7% des histones 3), particulièrement focalisée au niveau de régions promotrices de gènes réprimés riches en ilots CpG, mais arborent une stabilité importante avec une demi-vie supérieure à 3 jours (Barth and Imhof, 2010; Ferrari et al., 2014).

L'apposition des di- et triméthylations sur les lysines 27 des histones 3 (H3K27me2/3) est catalysée par les lysine méthyltransférases (KMT) à domaine SET que sont EZH1 (KMT6B) et EZH2 (KMT6A), utilisant la SAM comme donneur de groupements méthyle. Leur implication dans l'apposition des marques H3K27me1 demeure moins bien décrite mais semblerait plus spécifiquement associée à EZH1 (Laugesen et al., 2016). D'un point de vue fonctionnel, les méthyltransférases EZH1/2 n'exercent leur activité catalytique que lorsqu'elles sont en complexe avec, au minimum, les protéines SUZ12, EED et RBBP4/7, formant ainsi le cœur du complexe PRC2. En effet, l'interaction entre ces protéines module la conformation du domaine SET d'EZH1/2 vers une forme active (Mozzetta et al., 2015). Au niveau de la chromatine, le complexe PRC2 est particulièrement retrouvé colocalisé avec les marques H3K27me3. En effet, le niveau croissant de méthylation déposé impose une contrainte enzymatique et un temps de résidence accrus. De plus, le chromodomaine de la protéine EED permet la fixation du complexe PRC2 sur les marques H3K27me3 préexistantes. Cette fixation engendre une activation allostérique du complexe, permettant l'extension de l'apposition des marques de méthylation (Mozzetta et al., 2015). S'additionnent à ce complexe minimum d'autres protéines accessoires, définissant les sous-complexes PRC2.1 (avec les protéines accessoires PCL1-3, EPOP et PALI1/2) et PRC2.2 (avec les protéines accessoires AEBP2 et JARID2). Concernant la fonction de ces protéines accessoires, à titre d'exemple, JARID2 semble impliquée dans le recrutement du complexe au niveau de ses *loci* cibles (Healy et al., 2019; Mozzetta et al., 2015). En effet, le complexe PRC2 présente de multiples gènes cibles (> 2000) notamment enrichis en gènes impliqués dans le développement embryonnaire (*e.g.* gènes homéotiques *HOX*) et dans diverses voies de différentiation cellulaire (*e.g. OLIG2* durant la différenciation neuronale) (Bracken et al., 2006).

Bien que relativement stables, les marques de méthylations des lysines 27 des histones 3 sont réversibles. En effet, la déméthylation des marques H3K27me2/3 est principalement catalysée par les histone lysine déméthylases (KDM) à domaine Jumonji C KDM6A (UTX-1) et KDM6B (JMJD-3). Comme précédemment discuté, les KDM6A/B font partie de la famille des dioxygenases dépendantes de l'α-cétoglutarate, leur activité est donc impactée par le métabolisme cellulaire (Greer and Shi, 2012).

I.2.3.2. L'acétylation de H3K27

Parmi les 13 sites d'acétylation potentiels de l'histone 3 figure le résidu lysine 27. Au même titre que les acétylations sur les autres résidus lysines, les marques H3K27ac neutralisent la charge positive des résidus lysines 27, changeant ainsi leurs interactions électrostatiques avec l'ADN ou d'autres acteurs protéiques (Shvedunova and Akhtar, 2022). Globalement, les marques H3K27ac sont considérées comme des marques activatrices car associées à une conformation active de la chromatine, en particulier au niveau de promoteurs, du corps de gènes et d'enhancers actifs (Roadmap Epigenomics Consortium et al., 2015). Ces marques sont apposées par les lysines acétyltransférases KAT3A (CBP) et KAT3B (p300) utilisant l'acétyl-CoA comme donneur de groupements acétyle (Roadmap Epigenomics Consortium et al., 2015; Shvedunova and Akhtar, 2022). Bien que les marques H3K27ac soient des marqueurs des super-enhancers actifs et interagissent avec différentes protéines à bromodomaine (*e.g.* BRD4, TAF1), d'un point de vue fonctionnel, leur implication causale dans la régulation du processus de transcription demeure mal définie (Millán-Zambrano et al., 2022; Shvedunova and Akhtar, 2022).

Par ailleurs, les marques H3K27ac sont particulièrement labiles, avec une demi-vie de l'ordre de quelques minutes (Barth and Imhof, 2010). Le retrait de ces marques est catalysé par les histone lysine désacétylases HDAC1, pouvant être incluses dans divers complexes épigénétiques avec d'autres protéines partenaires (*i.e.* CoREST, NuRD, Sin3B ou MiDAC), et HDAC 3 (Shvedunova and Akhtar, 2022). La désacétylation des histones (notamment du résidu H3K27) produit de l'acétate qui peut être recyclé grâce à la localisation nucléaire d'enzymes de la famille des acyl-CoA synthase short chain (ACSS) pour régénérer de l'acétyl-CoA. Cette source va ainsi maintenir l'alimentation des HAT sans augmenter la demande en acétyl-CoA, partagée avec différentes voies métaboliques (Bulusu et al., 2017).

Points clés

- L'histone 3 est une famille de plusieurs protéines, dont les principales sont codées par 15 gènes différents. On distingue les **formes canoniques**, H3.1 et H3.2, **des variants** de l'histone 3, tel que H3.3, présentant une distribution et des fonctions distinctes.
- Les histones 3 font l'objet d'une grande diversité de modifications épigénétiques réversibles. Ces marques présentent des **distributions caractéristiques**, parfois exclusives du fait de leur **antagonisme** (marques activatrices *vs.* répressives).
- L'incorporation de variants H3.3 à la chromatine et la plasticité épigénétique des marques de méthylations et d'acétylation sur H3K27 jouent un rôle clé dans le **développement et la différentiation cellulaire, en particulier au niveau cérébral.**

- La dynamique du paysage épigénétique de méthylation et d'acétylation des histones 3, notamment sur les lysines 27, fait l'objet d'une **régulation intégrée avec le métabolisme cellulaire** du fait de l'utilisation de métabolites communs (e.g. α-cétoglutarate et acétyl-CoA).

II Les oncohistones H3 K27M

II.1. Les oncohistones

II.1.1. Découverte des oncohistones

En 2012, les équipes du Pr. Nada Jabado et du Pr. Suzanne Baker décrivent pour la première fois la présence de mutations somatiques récurrentes de l'histone 3 dans les pHGG (Schwartzentruber et al., 2012; St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project, 2012). Il s'agit du premier exemple recensé de mutations faux-sens caractéristiques affectant une histone en oncologie (oncohistone) et, plus généralement, en pathologie humaine (Bonner et al., 2023). Ces travaux pionniers ont mis en lumière 2 types quasi pathognomoniques de mutations non-sens de l'histone 3, H3 K27M et H3 G34R/V, et ont rendu, dans les années qui suivirent, son statut mutationnel central dans la classification des sous-types moléculaires de pHGG (Fig. 5A) (Louis et al., 2021; Ocasio et al., 2023).

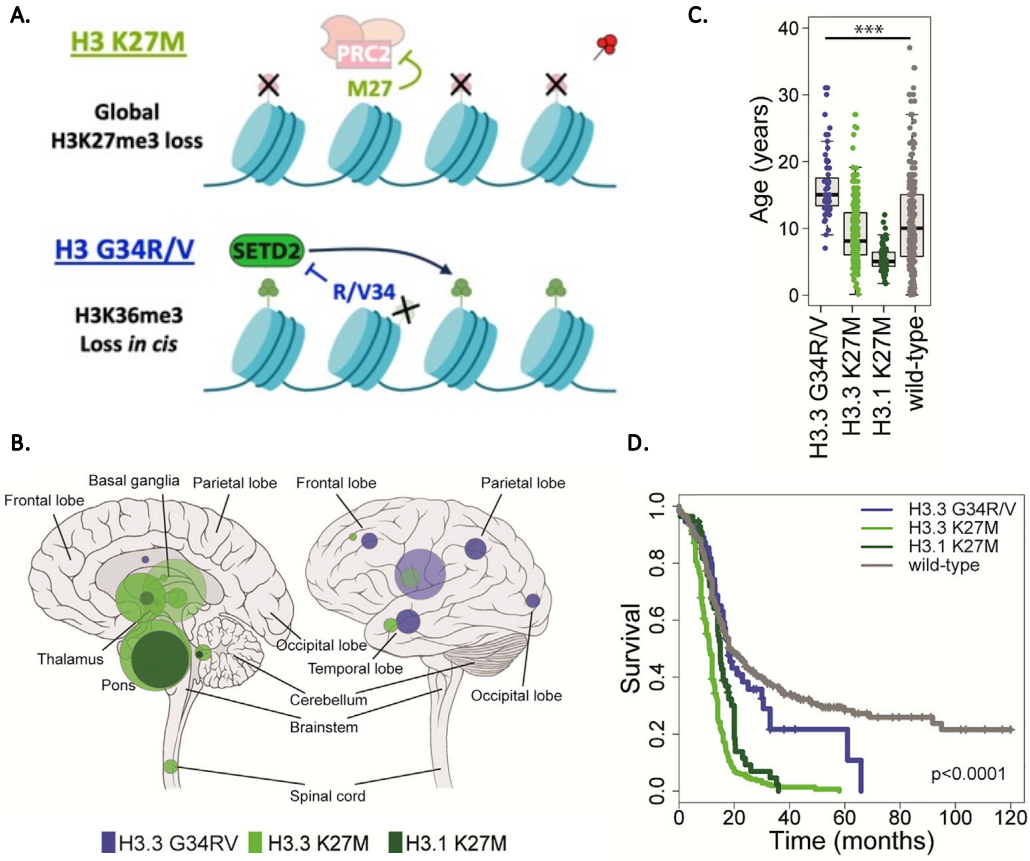


Figure 5. Spécificités des oncohistones H3 K27M et H3 G34R/V caractéristiques des pHGG. A. Schéma simplifié de l'impact épigénétique des oncohistones H3 K27M et H3 G34R/V. Partie supérieure : les mutations de type K27M perturbent l'activité du complexe PRC2 et engendrent une perte globale (en *cis* et en *trans*) des marques de triméthylation de la lysine 27 sur l'ensemble des histones 3 (effet dominant négatif). Partie inférieure : les mutations de types H3 G34R/V empêche l'activité de SETD2 au niveau du résidu K36 de l'histone mutée, induisant une perte des marques H3K36me3 en *cis*. **B.** Localisations anatomiques des pHGG séparées en fonction du statut mutationnel de l'histone 3 (n=441). La coupe sagittale (partie de gauche) présente les structures internes alors que la visualisation externe montre les lobes cérébraux (partie de droite). La localisation des pHGG mutés H3.3 G34R/V est représentée par les cercles bleus, celle des pHGG mutés H3.3 K27M par les cercles vert clair et celle des pHGG mutés H3.1 K27M par les cercles vert foncé. Le rayon des cercles est proportionnel à la prévalence des pHGG présentant une mutation d'histone spécifique pour la région cérébrale concernée (Mackay et al., 2017). **C.** Graphique représentant l'âge d'incidence au diagnostic de patients atteints de pHGG en fonction du statut mutationnel de l'histone 3 (H3.3 G34R/V en bleu, H3.3 K27M en vert clair, H3.1 K27M en vert foncé et $H3^{WT}$ en gris). Les boîtes des whisker plots représentent la médiane, le premier et le troisième quartile (Mackay et al., 2017). **D.** Courbes de Kaplan-Meier présentant la survie des patients atteints de pHGG en fonction du temps (en mois) selon le profil mutationnel de l'histone 3 (H3.3 G34R/V en bleu, H3.3 K27M en vert clair, H3.1 K27M en vert foncé et $H3^{WT}$ en gris) (Extrait de Mackay et al., 2017).

À noter – Diversité et prévalence des mutations d'histones en cancérologie

Depuis la découverte des mutations somatiques de l'histone 3 dans les pHGG, d'autres mutations d'histones ont été observées dans plus de 30 types de tumeurs solides et hémopathies malignes de tous âges, pouvant affecter à la fois les histones principales mais également l'histone *linker* H1. Il apparaît que les mutations somatiques d'histones sont retrouvées dans 11% des cancers, avec une forte prévalence dans les pHGG (> 60%), mais aussi dans les chondrosarcomes (> 60%) ou encore

les cancers de la sphère ORL chez l'adulte (20% des carcinomes de la tête et du cou), soulignant l'importance des altérations épigénétiques en oncologie (Bonner et al., 2023; Hanahan, 2022).

L'histone 3 est celle présentant le plus de mutations récurrentes et le gène *H3F3A*, codant pour le variant H3.3, est le gène d'histone le plus fréquemment muté. Les mutations *hotspot* de l'histone 3 les plus fréquentes sont celles affectant les résidus K27 et K36 de la queue N-terminale, qui sont des sites de modifications épigénétiques bien décrites (Bonner et al., 2023; Millán-Zambrano et al., 2022). Dans ce contexte, la substitution de ces lysines par des résidus méthionines, ou plus rarement par des résidus isoleucines, perturbe directement le paysage épigénétique de di- et triméthylation sur ces résidus et engendre une dérégulation de programmes transcriptomiques associés à la différentiation cellulaire (Lu et al., 2016; Silveira et al., 2019). De plus, les résidus voisins, R26 et G34, impliqués dans la reconnaissance et la fixation des sites K27 et K36 par leurs HMT respectives, sont également des hotspot de mutations, appuyant encore le caractère oncogénique d'une altération de la distribution des marques de méthylations sur les résidus K27 et K36 (Jain et al., 2020a; Justin et al., 2016).

II.1.2. Les différents types d'oncohistones H3 dans les pHGG

II.1.2.1. Mutations sur le résidu glycine 34

La famille des oncohistones H3 G34R/V regroupe des mutations faux-sens mono-alléliques se traduisant par une substitution du résidu glycine en position 34 de la queue N-terminal de l'histone 3 par un résidu arginine ou valine. Parmi les différentes formes de l'histone 3, les mutations H3 G34R/V s'observent exclusivement sur le variant H3.3 (Ocasio et al., 2023). À l'échelle moléculaire, ces oncohistones perturbent les mécanismes d'apposition des marques de méthylation sur les résidus lysines 36 des histones 3 par un effet en *cis* (Fig. 5B) (Jain et al., 2020a; Lewis et al., 2013).

En clinique, les oncohistones de la famille H3 G34R/V sont étroitement associées à une localisation anatomique spécifique au niveau des hémisphères cérébraux et à un pic d'incidence à l'adolescence (Fig. 5C et D). Ces spécificités ont motivé la récente introduction du sous-type moléculaire des « pHGG hémisphériques diffus mutés H3 G34 » dans la classification des tumeurs du SNC de l'OMS (Louis et al., 2021).

II.1.2.2. Mutations sur le résidu lysine 27

La famille des oncohistone H3 K27M provient également de mutations faux-sens mono-alléliques mais qui se traduisent par une substitution du résidu lysine en position 27 de la queue N-terminale de l'histone 3 par un résidu méthionine (Schwartzentruber et al., 2012). Dans de rares cas, des oncohistones H3 K27I (remplacement de la lysine 27 par une isoleucine) ont également été observées (Castel et al., 2015). Ces oncohistones H3 K27M s'observent à la fois sur des formes canoniques (*i.e.* H3.1, H3.2) mais également (plus fréquemment) sur le variant H3.3 de l'histone 3 (Mackay et al., 2017). À l'échelle moléculaire, les mutations K27M

perturbent la dynamique d'apposition des marques épigénétiques sur les lysines 27 des histones 3 par un effet dominant négatif (Fig. 5B) (Bender et al., 2013; Lewis et al., 2013).

En clinique, les oncohistones de la famille H3 K27M sont très caractéristiques d'une localisation au niveau de la ligne médiane (thalamus, tronc cérébral, moelle épinière), en particulier des gliomes diffus infiltrants du tronc cérébral (DIPG), et d'un pic d'incidence à un âge de 7 à 8 ans (Fig. 5C et D) (Ocasio et al., 2023). Ces spécificités ont motivé l'introduction du sous-type moléculaire des « pHGG diffus de la ligne médiane mutés H3 K27 » dans la classification des tumeurs du SNC de l'OMS dès 2016 (Louis et al., 2016). Bien que très caractéristiques des gliomes pédiatriques diffus de la ligne médiane, les mutations H3 K27M sont également retrouvées de manière plus sporadique dans d'autres types de cancers, tels que les leucémies aigues myéloïdes (Boileau et al., 2019; Bonner et al., 2023).

Ainsi ces types d'oncohistones (H3 K27M et H3 G34R/V) sont mutuellement exclusives et présentent des répartitions spatio-temporelles distinctes suggérant des origines cellulaires différentes (Sturm et al., 2012). Ces altérations moléculaires d'histones sont détectées dans plus de 60% des pHGG (Bonner et al., 2023). Les oncohistones H3 G34R/V concernent environ 16% des pHGG hémisphériques et les oncohistones H3 K27M sont retrouvées dans plus de 80% des tumeurs de haut grade localisées au niveau de la ligne médiane, dont les DIPG (Mackay et al., 2017). Au-delà de leur fréquence, plusieurs études sur différentes cohortes ont montré que les oncohistones H3 K27M sont associées à un pronostic particulièrement péjoratif, avec une médiane de survie de 8 à 15 mois (Fig. 5E) (Dufour et al., 2020; Mackay et al., 2017; Sturm et al., 2012). Ce pronostic défavorable est observé quelle que soit la localisation anatomique des tumeurs mutées H3 K27M au niveau de la ligne médiane (i.e. thalamus, tronc cérébral, moelle épinière) (Karremann et al., 2018).

II.1.3. Oncohistones et origines cellulaires des pHGG

Les mutations somatiques d'histones en neuro-oncologie pédiatrique présentent une distribution neuroanatomique et des âges d'incidence caractéristiques. Ces fenêtres spatio-temporelles étroites sont le reflet d'origines cellulaires différentes, permissives aux effets spécifiques des mutations d'histones (Ocasio et al., 2023).

Les pHGG mutés H3 G34R/V sont localisés au niveau hémisphérique avec un âge médian au diagnostic de 18 ans. Au niveau histologique ces tumeurs présentent un profil mixte, avec un compartiment glial et un compartiment neuronal (Sturm et al., 2012). De récentes études ont identifié une population de progéniteurs interneuronaux ($GSX2^+$) comme étant l'origine cellulaire des tumeurs mutées H3 G34R/V (Fig. 6) (C. C. L. Chen et al., 2020; Funato et al., 2021). Dans ces cellules, les impacts épigénétiques des mutations H3 G34R/V répriment les programmes de différenciation terminale et maintiennent dans un état indifférencié (Bressan et al., 2021; Funato et al., 2021). Ces impacts semblent impliqués dans les étapes précoces de la tumorigenèse, avec des altérations partenaires (*i.e.* mutations de

PDGFRA), mais ne semblent pas indispensables au maintien du caractère oncogénique des cellules de pHGG mutés H3 G34 (C. C. L. Chen et al., 2020).

Les pHGG mutés H3 K27M sont localisés au niveau de la ligne médiane avec un âge médian au diagnostic de 10 ans. Plusieurs études suggèrent une origine des tumeurs H3 K27M au niveau de cellules progénitrices issues du rhombencéphale de manière cohérente avec leur localisation au niveau de la ligne médiane (Bressan et al., 2021; Jessa et al., 2022; Larson et al., 2019). En effet, dans des cellules souches neurales (NSC) fœtales humaines dérivées du tronc cérébral, l'induction de la mutation H3 K27M présente un potentiel transformant qui n'est pas retrouvé dans les NSC dérivées du prosencéphale. Plus précisément, Jessa et collaborateurs ont récemment montré que les pHGG mutés H3 K27M présentent des programmes transcriptomiques et une architecture épigénétique de précurseurs oligodendrocytaires (OPC) avec des niveaux de différenciation et des localisations différents en fonction de la forme de l'histone mutée (les différences d'origines cellulaires entre les pHGG H3.1- et H3.3 K27M seront détaillées dans la partie II.3.3.) (Jessa et al., 2022). Par leurs impacts épigénétiques, les mutations H3 K27M empêchent la différenciation des OPC et sont ainsi impliquées dans les étapes précoces de la tumorigenèse (*Cf.* partie III.1.) (Fig. 6). Contrairement aux mutations H3 G34R/V, les oncohistones K27M restent indispensables au maintien du caractère oncogénique des cellules de pHGG (Harutyunyan et al., 2019).

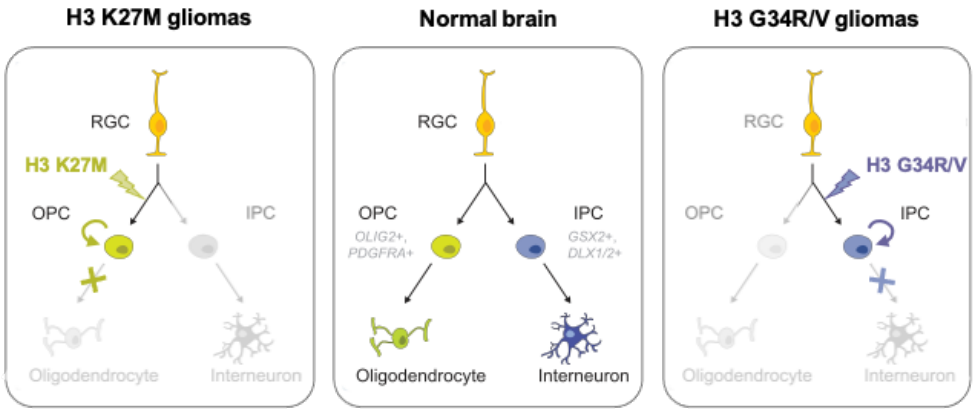


Figure 6. Origines cellulaires associées aux oncohistones H3 K27M et H3 G34R/V. Panel central : Au cours du développement cérébral, les cellules de la glie radiale (RGC) peuvent engendrer des précurseurs oligodendrocytaires (OPC ; OLIG2$^+$ et PDGFRA$^+$), qui se différencieront en oligodendrocytes matures, ou encore des progéniteurs neuraux intermédiaires (IPC ; GSX2$^+$ et DLX1/2$^+$), qui se différencieront en interneurones. **Panel de gauche :** Les mutations H3 K27M bloquent la différenciation des OPC et maintiennent leurs capacités d'auto-renouvellement, constituant une étape primitive de la tumorigenèse. *In fine*, les pHGG mutés H3 K27M conservent des caractéristiques moléculaires d'OPC. **Panel de droite :** Les mutations H3.3 G34R/V bloquent la différenciation d'IPC engagés dans la voie interneuronale, participant aux étapes précoces de la tumorigenèse. *In fine*, les pHGG mutés H3.3 G34R/V conservent des caractéristiques moléculaires de progéniteurs interneuronaux. (Adapté de C. C. L. Chen et al., 2020).

II.2.Impacts épigénétiques des oncohistones H3 K27M

II.2.1. Perturbation de l'activité du complexe PRC2 et impact direct sur H3K27me2/3

Peu après la découverte des oncohistones, il a été montré que les DMG mutés H3 K27M présentaient une perte significative de la marque épigénétique répressive de triméthylation des lysines 27 des histones 3 (H3K27me3) en immunohistochimie s'accompagnant d'un transcriptome spécifique (Fig. 7A) (Bender et al., 2013). Le rationnel moléculaire de cette corrélation a notamment été étudié par Lewis et collaborateurs, qui ont montré, en 2013, que la substitution d'un résidu lysine cible de méthylations (*i.e.* H3K4, K9, K27, K36), par un résidu méthionine (ou isoleucine) au niveau de la queue N-terminale d'une des formes de l'histone 3 est suffisante pour engendrer une perturbation globale de l'apposition des marques de méthylation de ce résidu sur l'ensemble des histones 3 du génome. Cette perturbation globale est la conséquence d'un impact bimodal des mutations K-to-M, avec, d'une part, un effet en *cis*, par suppression du site de méthylation des histones mutées, et, d'autre part, un effet en *trans* sur l'ensemble des histones non mutées par perturbation de l'activité des lysine méthyltransférases à domaine SET (Lewis et al., 2013; Mozzetta et al., 2015). En effet, bien que ne représentant que 3-17% des histones 3 du génome, les oncohistones H3 K27M se comportent en dominants négatifs par interactions hydrophobes entre la chaine latérale de la méthionine en position 27 et le domaine SET d'EZH2 (Lewis et al., 2013). La perturbation de l'activité du complexe PRC2 en résultant a fait l'object de multiples études et de nombreux débats. Suite à la caractérisation structurale par cristallographie de l'interaction entre la queue d'histone mutée et la poche catalytique du domaine SET d'EZH2, il a d'abord été proposé que les histones mutées séquestraient les complexes PRC2 (Justin et al., 2016). Cette théorie a été appuyée i) par l'affinité 16 fois supérieure du complexe PRC2 pour les oncohistones (par rapport à la forme sauvage de H3) qui, bien que minoritaires par rapport aux histones 3 sauvages, sont 100 fois plus abondantes que les complexes PRC2 dans une cellule de DIPG et ii) par l'augmentation du temps de résidence de PRC2 sur de la chromatine dans un contexte muté (Justin et al., 2016; Stafford et al., 2018; Tatavosian et al., 2018).

Cependant, certains *loci* présentent à l'inverse un maintien, voire une hyperméthylation, dans le contexte muté H3 K27M. En effet, plusieurs études ont démontré que PRC2 conservent en réalité une activité essentielle au maintien de la répression de certains gènes suppresseurs de tumeur dans les cellules de DMG mutés H3 K27 (Cordero et al., 2017; Mohammad et al., 2017; Piunti et al., 2017). De surcroit, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine dans des cellules de DIPG montrent une absence de colocalisation entre H3 K27M et les protéines du complexe PRC2. De ces résultats, Piunti et collaborateurs ont suggéré, à l'inverse du modèle de séquestration, un modèle d'exclusion de

PRC2 des régions du génome contenant des nucléosomes mutés, expliquant ainsi la perte de triméthylation globale et son maintien dans certaines régions spécifiques (Piunti et al., 2017).

Ces modèles ont ensuite été conciliés par une notion de temporalité. En effet, des modèles isogéniques inductibles pour l'expression de H3 K27M ont permis d'identifier une interaction transitoire entre PRC2 et les oncohistones. Cette interaction est suivie de la libération des complexes PRC2 présentant une altération persistante de leur activité (Stafford et al., 2018). En ce sens, il a été décrit que l'auto méthylation activatrice d'EZH2, qui facilite l'accès des nucléosomes à sa poche catalytique et favorise la conversion des H3K27me2 en H3K27me3, est abrogée par H3 K27M (Lee et al., 2019). Cette perte d'auto méthylation apparaît cohérente avec l'augmentation du temps de recherche de cible de PRC2 observée en présence d'histones 3 mutées K27M (environ 200 secondes dans contexte non muté et 280 secondes en présence de H3K27M) (Tatavosian et al., 2018). *In fine*, les travaux les plus récents sur ce sujet soutiennent l'hypothèse d'une réduction de méthylation des H3K27 d'un niveau en présence de la mutation. Dans ce modèle, les oncohistones restreignent l'activité optimale de PRC2 à ses cibles de forte affinité (sites de nucléation). Ainsi, l'apposition des marques H3K27me3, qui demandent une forte contrainte catalytique, est confinée au niveau de ces sites. Par conséquent, les régions normalement occupées par les marques H3K27me3 sont occupées par H3K27me2. De même, l'altération de l'activité de PRC2 empêche l'extension de l'apposition des marques H3K27me2, en particulier dans les régions présentant des marques antagonistes, c'est donc les marques H3K27me1 qui occupent ces régions en présence de l'oncohistone (Fig. 7B) (Harutyunyan et al., 2020, 2019).

Étant donné l'interconnexion entre l'activité des complexes Polycomb PRC2 et PRC1, les mutations H3 K27M perturbent indirectement l'activité du complexe PRC1. En effet, la réduction forte de l'occupation du génome par les marques de H3K27me3 reconnues par PRC1 altère son recrutement au niveau de ses cibles (Tatavosian et al., 2018). Toutefois, dans le contexte muté H3 K27M, la protéine BMI-1 du complexe PRC1 est surexprimée et l'apposition des marques H2AK119ub semble augmentée (Balakrishnan et al., 2020).

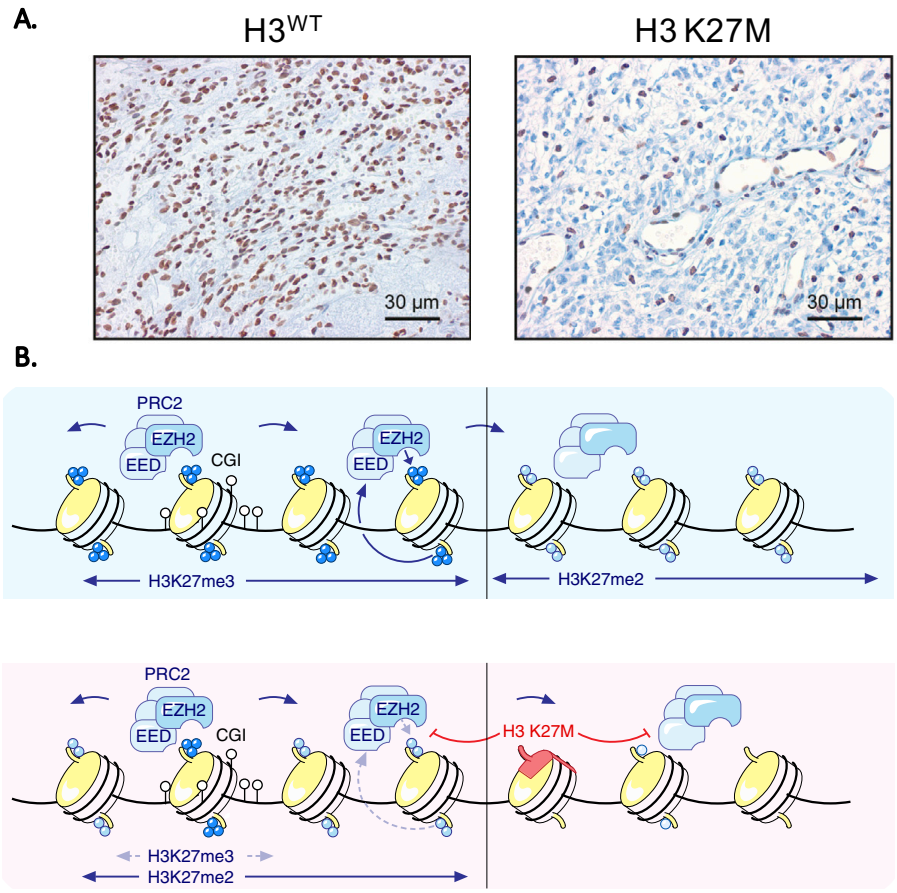


Figure 7. Impact des mutations H3 K27M sur l'activité du complexe PRC2. A. Immunohistochimie contre H3K27me3 montrant la perte globale de cette marque dans les pHGG mutés H3 K27M (à droite) par rapport aux pHGG $H3^{WT}$ (à gauche). **B.** Schéma illustrant le rationnel moléculaire de la perte globale de H3K27me3 inhérente aux mutations H3 K27M. Partie supérieure : En absence de mutation H3 K27M, le complexe PRC2 se fixe au niveau d'îlots CpG non méthylés (CGI), constituant ses sites de nucléation de forte affinité, et EZH2 y appose des marques H3K27me3. La fixation des protéines EED sur ces marques induit l'activation allostérique des complexes PRC2 et en favorise l'expansion. Partie inférieure : En présence des mutations H3 K27M, l'activité optimale du complexe PRC2 est confinée à ses sites de nucléation (recrutement initial). De fait, les oncohistones K27M empêchent l'expansion des marques H3K27me3, remplacées localement par des marques H3K27me2 dont l'apposition nécessite une contrainte enzymatique moins importante. De même, les régions du génome normalement occupées par des marques H3K27me2 se retrouvent occupées par des marques H3K27me1. (Extrait de Bender et al., 2013 et de Harutyunyan et al., 2019)

II.2.2. Remaniements métaboliques et maintien de l'hypométhylation globale

Au-delà de l'impact direct des mutations H3 K27M sur les marques H3K27me3 *via* la perturbation de l'activité du complexe PRC2, il a été décrit que l'activité des enzymes de déméthylation des lysines 27 de l'histone 3 est également nécessaire au maintien de l'hypométhylation. En effet, les principales déméthylases spécifiques des di- et triméthylations du résidu K27 sont KDM6A et KDM6B (Greer and Shi, 2012), des dioxygenases dépendantes de l'α-cétoglutarate de la famille des histone lysine déméthylases à domaine

Jumonji C. Comme précédemment évoqué, ces enzymes utilisent l'α-cétoglutarate comme co-facteur pour catalyser la déméthylation des histones, de fait, leur activité est régie par la disponibilité cellulaire en α-cétoglutarate, métabolite intermédiaire du cycle de Krebs produit par les enzymes IDH (Kinnaird et al., 2016). Dans le contexte des DMG H3K27 mutés, parmi les changements transcriptionnels inhérents à l'impact épigénétique des oncohistones, IDH1 apparaît surexprimée. Par des approches métabolomiques, Chung et collaborateurs ont montré que la surexpression d'IDH1 associée à la mutation H3 K27M s'accompagne de l'augmentation du taux d'α-cétoglutarate provenant du métabolisme du glucose et de la glutamine. Ainsi, le remaniement du métabolisme induit par la mutation H3 K27M favorise la production d'α-cétoglutarate qui permet d'alimenter KDM6A/B et de maintenir l'hypométhylation des H3K27 (Fig. 8). En effet, une perturbation de la production d'α-cétoglutarate ou l'inhibition des déméthylases KDM6A/B entrainent un retour de H3K27me3 dans les cellules de DMG mutées H3K27M (Chung et al., 2020; Hashizume et al., 2014).

D'autre part, la S-adénosyl-méthionine (SAM), synthétisée par les enzymes MAT, étant le seul donneur de groupement méthyle, la méthylation des histones est dépendante de sa disponibilité au niveau cellulaire. Golbourn et collaborateurs ont récemment montré que la mutation H3 K27M réprime l'expression de l'enzyme MAT2A engendrant une diminution du niveau de SAM et du potentiel de méthylation dans les cellules de DMG (Fig. 8). Néanmoins, l'expression résiduelle de MAT2A apparaît nécessaire à la survie des cellules de DMG tout comme l'activité résiduelle de PRC2 (Golbourn et al., 2022).

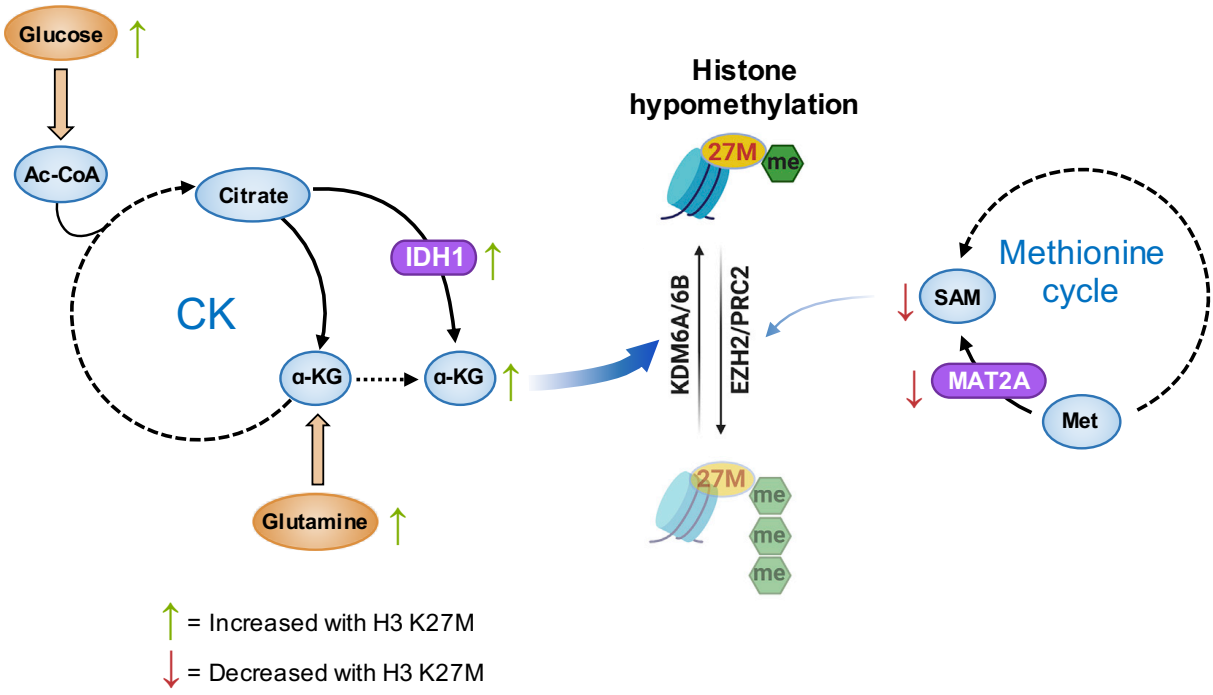


Figure 8. Régulation métabolique du paysage épigénétique associé aux mutations H3 K27M. Les cellules de DMG mutés H3 K27M présentent une dépendance à la glutamine et au glucose pour alimenter le cycle de Krebs (CK). L'augmentation de l'expression d'IDH1 associée à H3 K27M favorise la production d'α-cétoglutarate (α-KG).

La hausse subséquente du niveau d'α-KG supporte l'activité des déméthylases du résidu lysine 27 des histones 3, KDM6A/B. Cette régulation métabolique en faveur de l'activité de KDM6A/B maintien l'hypométhylation inhérente aux mutations H3 K27M. D'autre part, la répression de MAT2A associé à H3 K27M diminue le niveau de S-adénosyl-méthionine (SAM) cellulaire, restreignant la méthylation des lysines 27 des histones 3 par le complexe PRC2. (Adapté de Chung et al., 2020).

À noter - Exclusivité entre les oncohistones et les mutations IDH

Les mutations des enzymes responsables de la synthèse de l'α-KG, IDH1 et IDH2, sont des altérations particulièrement prévalentes dans les gliomes du jeune adulte (70% des gliomes de bas grade et 20% des glioblastomes) (Ocasio et al., 2023; Sulkowski et al., 2017). Dans le glioblastome (GBM), ces mutations sont associées à un pronostic relativement plus favorable avec une médiane de survie supérieure à 3 ans (Ocasio et al., 2023; Sturm et al., 2012). Les enzymes IDH mutées, dont la forme la plus fréquente est $IDH1^{R132H}$, présentent une néo-activité et convertissent l'α-KG en 2-hydroxyglutarate (2-HG), oncométabolite inhibant l'activité des dioxygenases dépendantes de l'α-KG dont les KDM (Sulkowski et al., 2017). Ainsi, ces mutations induisent une altération de l'épigénome des gliomes en étant porteurs, caractérisée par un profil d'hyperméthylation, notamment concernant H3K27me3 (Chung et al., 2020; Sturm et al., 2012).

D'autre part, ces mutations IDH sont plus rarement observées dans les pHGG. Elles apparaissent même exclusives par rapport aux oncohistones H3 K27M (Sturm et al., 2012). Le rationnel moléculaire de cette exclusivité a récemment été décrit par Chung et collaborateurs et relève d'un impact opposé sur le métabolisme de l'α-KG et, de fait, sur la dynamique épigénétique. En effet, les mutations IDH perturbent le métabolisme de l'α-KG induisant l'inhibition des KDM et une hausse de H3K27me3. À l'inverse, les oncohistones H3 K27M favorisent l'expression d'IDH1 et la synthèse de l'α-KG conduisant au maintien d'une hypométhylation des H3K27. De plus, la co-expression des formes mutées $IDH1^{R132H}$ et H3 K27M constitue une léthalité synthétique, expliquant leur exclusivité constatée au niveau clinique (Chung et al., 2020).

Points clés

- Plus de **60% des pHGG** présentent une mutation somatique de l'histone 3.
- Les mutations H3 K27M sont caractéristiques des DMG et corrèlent avec un **pronostic particulièrement péjoratif.**
- L'impact de H3 K27M sur **l'activité du complexe PRC2** et sur le **métabolisme cellulaire** (disponibilité en SAM et en α-KG) engendre et maintient une **hypométhylation globale** des lysines 27 des histones 3.

II.2.3. Conséquences sur les marques H3K27ac

De manière concomitante à la perte globale de H3K27me3, les mutations H3 K27M s'accompagnent d'une hausse du niveau global des marques d'acétylation sur les lysines 27

des histones 3 non mutées (H3K27ac) (Lewis et al., 2013). Toutefois, aucun impact direct des oncohistones sur l'activité des histone acétyltransférases (HAT) responsables de l'apposition des marques H3K27ac (*i.e.* CBP, p300) n'a été décrite à ce jour et le rationnel moléculaire de cette hausse de H3K27ac demeure imprécis. D'abord considérée comme une conséquence de la perte des marques antagonistes de méthylations, cette hypothèse a récemment été remise en question par les travaux de Harpaz et collaborateurs dont les résultats suggèrent que, lors de la mise en place de l'altération du paysage épigénétique suite à l'induction de la mutation H3.3 K27M, la hausse de H3K27ac précède la perte de H3K27me3 (Harpaz et al., 2022). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que cette acétylation concerne en particulier les histones 3 sauvages des nucléosomes hétérotypiques contenant une oncohistone (Lewis et al., 2013; Piunti et al., 2017) et ce, quelle que soit la forme de l'histone 3 mutée (H3.1 ou H3.3) (Furth et al., 2022). Concernant le rôle moléculaire de ces marques d'acétylation, les nucléosomes hétérotypiques H3 K27M – K27ac sont colocalisées avec les protéines à bromodomaines BRD2/4 et d'autres marques épigénétiques activatrices (Piunti et al., 2017). Pour autant, Krug et collaborateurs ont montré que cette hausse du niveau d'acétylation ne s'accompagne pas de changement significatif du nombre d'enhancers et promoteurs actifs et n'altère pas l'architecture épigénétique spécifique de l'origine cellulaire. En effet, dans les cellules mutées H3.3 K27M, l'extension des sites d'acétylation est détectée au niveau de régions intergéniques correspondants à des séquences répétés du génome normalement réprimées (Krug et al., 2019). Globalement, bien que constituant un potentiel talon d'Achille des cellules mutées H3 K27M, le rôle de ces changements de H3K27ac dans leur caractère oncogénique reste mal défini (Krug et al., 2019; Nagaraja et al., 2017; Piunti et al., 2017).

II.2.4. Impact sur les modifications d'histones sur d'autres résidus

Au-delà de l'altération du paysage épigénétique concernant les résidus H3K27 et du fait des interconnexions entre les mécanismes d'apposition et de retrait des différentes marques épigénétiques, les mutations H3 K27M engendrent des modifications d'autres marques à l'échelle de l'épigénome (Zhang et al., 2015).

II.2.4.1. *Hausse de H3K36me2 et rôle de frontières épigénétiques*

Au rang des signatures épigénétiques associés aux mutations H3 K27M figure une hausse des marques de H3K36me2 (An et al., 2020). À l'instar des marques H3K27me3, les altérations du paysage épigénétique concernant les marques de méthylation des lysines 36 des histones 3 (H3K36me2/3) sont également spécifiques de certains types de cancers pédiatriques (Lowe et al., 2019). Ces marques activatrices de H3K36me2, caractéristiques de l'euchromatine, sont antagonistes des marques H3K27me2/3 et en définissent les frontières d'expansion (Fig. 9A) (Harutyunyan et al., 2020). Dans l'étude de Stafford et collaborateurs, un enrichissement en

H3K36me2 est observé sur les histones mutées et les régions concernées sont associées à des gènes up-régulés dans les cellules mutées K27M (Stafford et al., 2018). D'autres part, à l'aide de modèles isogéniques invalidés pour la mutation H3.3 K27M, Harutyunyan et collaborateurs ne montrent pas de différence du niveau global de H3K36me2 mais plutôt un rôle de frontière, nécessaire à l'impact des mutations H3 K27M sur H3K27me2. En effet, la restriction des régions occupées par les marques H3K27me1/2/3 entraine la progression des marques antagonistes H3K36me2 (Fig. 9B). Cette expansion des marques H3K36me2 permet le maintien du confinement de l'activité de PRC2 dans le contexte muté K27M car l'invalidation des 2 principales méthyltransférases des marques H3K36me2 (NSD1/2) restaure les altérations épigénétiques induites par l'oncohistone (Fig. 9C) (Harutyunyan et al., 2020). Au niveau phénotypique, le *knock-down* des méthyltransférases NSD1/2 ou des « *readers* » de la marques H3K36me2, LEDGF et HDGF2, réduit le caractère oncogénique des DMG mutées H3 K27M (Yu et al., 2021). De même, les marques H3K36me3 apparaissent également nécessaires au phénotype oncogénique associé aux oncohistones K27M car l'inhibition de l'activité résiduelle de MAT2A (synthèse de la SAM), précédemment évoquée, altère le paysage de H3K36me3 et réduit la viabilité des cellules de DMG (Golbourn et al., 2022). Ainsi, le rôle de frontières épigénétiques des marques de H3K36me2/3 (vis à vis de H3K27me2/3) et la fixation de facteurs spécifiques, sont nécessaires à l'impact moléculaire et phénotypique des oncohistones H3 K27M (Chaouch et al., 2021; Harutyunyan et al., 2020). Ce rôle de frontières épigénétiques apparait réciproque puisque, dans un contexte muté sur le résidu G34, la restriction des régions occupées par les marques H3K36me2/3 s'accompagne à l'inverse de l'extension de la distribution des marques H3K27me2/3, réprimant l'activité de certains enhancers (Jain et al., 2020a).

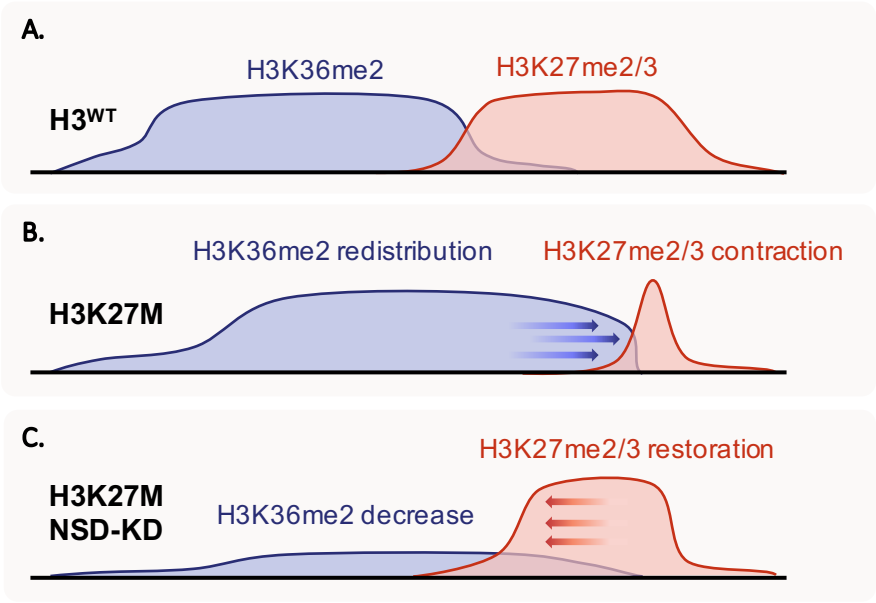


Figure 9. Rôle des marques H3K36me2 dans le maintien des altérations épigénétiques induites par H3K27M.
A. Les marques H3K27me2/3 et H3K36me2 sont antagonistes et définissent réciproquement leurs frontières de

répartition. **B.** En présence d'oncohistones H3 K27M, la restriction des marques H3K27me2/3 au niveau des sites de nucléation de PRC2 engendre une redistribution des marques H3K36me2. **C.** Cette redistribution des marques H3K36me2 est indispensable au maintien de la restriction des marques H3K27me2/3. En effet, le *knock-down* des histones méthyltransférases NSD1/2 autorise l'expansion des marques H3K27me2/3 malgré la présence des oncohistones H3 K27M. (Adapté de Chaouch et al., 2021).

II.2.4.2. *Hausse de H4K16ac : signature épigénétique des DMG H3 K27M*

Outre l'acétylation des lysines 27 des histones 3, les marques d'acétylation d'histones de manière plus globale apparaissent impactées par les mutations H3 K27M (An et al., 2020; Stafford et al., 2018). En ce sens, dans l'étude de Stafford et collaborateurs, la hausse la plus importante d'acétylation concerne la queue N-terminale de l'histone 4 (Stafford et al., 2018). En particulier, la hausse de l'acétylation du résidu lysine 16 de l'histone 4 (H4K16ac) a été identifiée comme une signature des DMG mutés H3 K27M (An et al., 2020).

II.2.4.3. *Activité des complexes Trithorax et impact sur H3K4me3*

À l'instar de l'altération de la dynamique d'activité des complexes Polycomb, Furth et collaborateurs, par une technique d'imagerie sur nucléosomes isolés, ont montré que les mutations H3 K27M modifient également l'activité des complexes Trithorax (Furth et al., 2022). En effet, l'interactome des oncohistones est modifié par rapport à celui des formes sauvages des histones correspondantes. À ce titre, comme discuté précédemment, le complexe PRC2 présente une affinité particulière pour les oncohistones K27M (Siddaway et al., 2022). De la même manière, les oncohistones présentent une interaction directe avec l'histone méthyltransférase MLL1, s'accompagnant d'un enrichissement des marques activatrices H3K4me3 sur les nucléosomes mutés (Furth et al., 2022; Greer and Shi, 2012). Cet enrichissement est observé quel que soit la forme de l'histone mutée (H3.1 ou H3.3) et ne modifie pas le niveau global (sur le génome dans son ensemble) de H3K4me3. Les gènes concernés par la présence de ces nucléosomes K27M-H3K4me3 sont associés à une conformation ouverte de la chromatine et à une hausse de leur expression (Furth et al., 2022). Au-delà des régions promotrices, l'association des marques H3K4me3 avec les oncohistones (en particulier H3.3 K27M) en modifie la distribution, avec notamment une extension au niveau de séquences répétées du génome, comme observé pour les marques H3K27ac (Furth et al., 2022; Krug et al., 2019). D'autre part, les marques H3K4me3 semblent associées aux marques H3K27me3 résiduelles au niveau de régions bivalentes et contribuer aux profils transcriptionnels spécifiquement associés aux oncohistones K27M (Furth et al., 2022; Larson et al., 2019).

II.2.4.4. Impact sur les marques H3K9me3

Les interactions entre les méthyltransférases SUV39H1/2 et SETDB2, responsables des di- et triméthylations sur H3K9, et les histones K27M sont altérées (Siddaway et al., 2022). En ce sens, les nucléosomes contenant une oncohistone K27M présentent une réduction des marques H3K9me3 et un enrichissement en marques antagonistes H3K9ac (Furth et al., 2022; Stafford et al., 2018). À l'inverse de cet effet direct concernant les nucléosomes mutés, Harutyunyan et collaborateurs suggèrent un remplacement compensatoire de la perte globale des H3K27me2 par des marques répressives H3K9me3 (Harutyunyan et al., 2020). Néanmoins, selon les modèles, ces altérations du paysage épigénétique des H3K9me3 ne s'accompagnent pas nécessairement d'un changement de leur niveau global (Stafford et al., 2018).
D'un point de vue plus fonctionnel, dans un contexte muté K27M, la perturbation de l'apposition des marques H3K9me2/3 restaure le paysage épigénétique des marques H3K27me3 (Siddaway et al., 2022). De surcroit, gage de l'implication de H3K9me3 dans le caractère oncogénique associé aux oncohistones, le ciblage de leur apposition constitue un talon d'Achille des pHGG mutés K27M (Siddaway et al., 2022).

II.2.5. Impact sur la méthylation de l'ADN

Par comparaison avec des pHGG $H3^{WT}$, il apparaît que les pHGG H3 K27M présentent une hypométhylation globale de l'ADN avec certains loci spécifiques présentant, à contrario, une hyperméthylation (Bender et al., 2013; Cordero et al., 2017). Toutefois, les comparaisons entre pHGG $H3^{WT}$ et H3 K27M ne permettent pas de découpler l'impact de la mutation des programmes épigénétiques liés à l'origine cellulaire (Jessa et al., 2022). Étant donné les interconnexions entre les modifications d'histones et les processus de méthylation de l'ADN (Cedar and Bergman, 2009), il est possible que le paysage épigénétique imposé par les mutations H3 K27M induisent cette hypométhylation globale de l'ADN. En particulier, il a récemment été montré l'implication des marques H3K36me2, impactées par les mutations H3 K27M, dans les mécanismes de recrutement de DNMT3A (méthylase de l'ADN) au niveau de régions intergéniques (Weinberg et al., 2019). Néanmoins, dans des modèles d'induction de K27M, Bender et collaborateurs n'observent pas d'altération du méthylome et, les études utilisant des modèles isogéniques invalidés pour K27M se sont peu intéressées aux impacts des oncohistones sur la méthylation de l'ADN (Bender et al., 2013; Harutyunyan et al., 2020, 2019). Il apparaît ainsi difficile d'imputer un rôle aux mutations H3 K27M dans l'hypométhylation de l'ADN observée dans les pHGG mutés H3 K27M. Toutefois, la méthylation de l'ADN semble tout de même impliquée dans le caractère oncogénique associé aux mutations H3 K27M, notamment pour le maintien de la répression de gènes suppresseurs de tumeur (*e.g.* $p16^{ink4A}$) (Cordero et al., 2017).

II.2.6. Impact sur l'architecture chromatinienne

Au-delà de la présence de marques épigénétiques associées à différents états de compaction de la chromatine, le niveau d'organisation supérieur du génome réside dans la présence de boucles et, plus largement, de domaines topologiquement associés (TAD) qui permettent le rapprochement fonctionnel de régions linéairement distantes du génome, favorisant la mise en place de programmes d'expression spécifiques (Rowley and Corces, 2018).

Par une caractérisation multi-omics intégrée, Wang et collaborateurs ont identifié une architecture chromatinienne caractéristique des pHGG H3 K27M, permettant le réarrangement d'enhancers actifs en faveur d'un profil transcriptionnel spécifique en comparaison avec des pHGG $H3^{WT}$. Les marques de H3K27ac semblent impliquées dans la mise en place de ces domaines dans les cellules de pHGG mutées K27M (Wang et al., 2021). Étant donné l'impact des oncohistones sur la distribution des marques H3K27ac, ces dernières pourraient impacter l'architecture du génome. Néanmoins, il apparaît encore une fois difficile de distinguer les altérations induites par les mutations H3 K27M de l'architecture chromatinienne associée aux différentes origines cellulaires des pHGG. Il existe probablement une coopération entre un environnement chromatinien permissif, lié à l'origine cellulaire, qui permettrait aux altérations épigénétiques induites par les mutations H3 K27M d'induire leurs effets transcriptionnels.

II.3. DMG mutés H3.1 et H3.3 K27M

Les principales formes de l'histones 3 sont codées par 15 gènes différents et catégorisées comme formes canoniques ou variants, avec des distributions et fonctions spécifiques (précédemment détaillées dans la partie I.2.1.). Dans les DMG, à l'échelle d'une tumeur, la mutation K27M n'affecte qu'un seul des gènes codant l'histone 3 et ce, de manière systématiquement hétérozygote. En effet, la transversion somatique mono-allélique récurrente d'une adénine en thymine au niveau du codon 83 (c.83A>T), se traduisant par la mutation K27M, ne s'observe, de manière exclusive, que sur les gènes *HIST1H3B*, *HIST1H3C* et *HIST2H3C*, codant les formes canoniques H3.1 et H3.2, et sur le gène *H3F3A* codant le variant H3.3 (Mackay et al., 2017; St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project, 2012). En termes de prévalence, 60-70% des DMG présentent une mutation K27M du variant H3.3 (H3.3 K27M), alors que les mutations de la forme canonique H3.1 (H3.1 K27M) concernent 20-25% des cas. Les mutations H3.2 K27M, plus anecdotiques, ne sont retrouvées que dans de très rares cas (Khuong-Quang et al., 2012; Mackay et al., 2017; St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project, 2012; Taylor et al., 2020). Au-delà de cette différence de prévalence, les mutations H3.1- et H3.3 K27M définissent des sous-groupes de DMG distincts.

II.3.1. Différences cliniques

Tout d'abord, les DMG H3.3 et H3.1 K27M sont caractérisés par des âges au diagnostic distincts (*Cf.* Fig. 5C). En effet, les DMG H3.3K27M touchent des patients présentant un âge médian au diagnostic de 7-8 ans alors que les DMG H3.1 K27M sont diagnostiqués chez des patients plus jeunes (âge médian de 5 ans) (Castel et al., 2015; Mackay et al., 2017). S'ajoute à cette fenêtre temporelle caractéristique une répartition neuroanatomique spécifique. Les mutations H3.1 K27M sont très majoritairement cantonnées aux DMG localisés au niveau du tronc cérébral, ou DIPG, alors que les pHGG mutés H3.3 K27M sont retrouvés tout le long de la ligne médiane, comptant pour 60-70% des DMG thalamiques et des DIPG, ainsi que pour une majorité des DMG de la moelle épinière (*Cf.* Fig. 5B) (Sturm et al., 2012; Castel et al., 2015; Karremann et al., 2018).

Toutefois, quelle que soit la forme de l'histone affectée, les oncohistones K27M corrèlent avec un pronostic particulièrement péjoratif à l'échelle des pHGG dans leur globalité (*Cf.* Fig. 5D). En effet, les DMG mutés H3 K27M, en particulier les DIPG, sont les pHGG présentant le pronostic le plus sombre avec une médiane de survie n'excédant pas 1 an et un taux de survie à 2 ans inférieur à 10% (Ocasio et al., 2023; Sturm et al., 2012). À titre de comparaison, les pHGG hémisphériques mutés H3 G34R/V présentent un pronostic relativement moins défavorable avec une médiane de survie de 18 mois et un taux de survie à 2 ans de presque 30% (Mackay et al., 2017). Au-delà du mauvais pronostic associé aux mutations H3 K27M dans leur ensemble, des différences sont observées en fonction du type de mutations K27M considéré. En effet, les mutations du variant H3.3 corrèlent avec un pronostic encore plus péjoratif avec une médiane de survie de 11 mois contre 15 mois pour les DMG mutés H3.1 K27M (Mackay et al., 2017; Werbrouck et al., 2019).

Plusieurs phénotypes, associés au profil mutationnel, pourraient participer à ce pronostic plus péjoratif. En effet, Castel et collaborateurs en 2015 montraient que les DIPG mutés H3.3 K27M présentaient une plus forte propension à former des lésions secondaires par rapport aux DIPG mutés H3.1 K27M. D'autre part, plusieurs études suggèrent une association entre le profil mutationnel de l'histone 3 et le profil de réponse à la radiothérapie, unique traitement de référence dans la prise en charge actuelle des DMG (Castel et al., 2015; Werbrouck et al., 2019; Zhu et al., 2021). Cette corrélation sera abordée plus en détail dans la partie IV.1.2.1.

II.3.2. Différences épigénétiques et transcriptomiques

Au niveau épigénétique, la perte globale des marques H3K27me2/3 est partagée par l'ensemble des DMG mutés H3 K27M, quelle que soit la forme de l'histone 3 affectée (Lewis et al., 2013). Toutefois, les propriétés intrinsèques spécifiques des différentes formes de l'histone 3 (*e.g.* dynamique d'incorporation et distribution), auxquelles s'ajoutent les

différences cliniques précédemment décrites, suggèrent un potentiel impact moléculaire différentiel en fonction de la forme de l'histone 3 mutée.

Tout d'abord, l'ensemble des études s'accordent sur le fait que les oncohistones suivent la même distribution génomique que leurs formes sauvages respectives. En effet, les oncohistones H3.1 K27M présentent une répartition génomique uniforme, cohérente avec une incorporation liée à la réplication, alors qu'un enrichissement, colocalisé avec les variants H3.3 sauvages, au niveau des régions actives du génome est observé pour les oncohistones H3.3 K27M (Nagaraja et al., 2019; Sarthy et al., 2020; Furth et al., 2022). Aussi, plusieurs études semblent indiquer que le taux d'incorporation des oncohistones H3.3 K27M serait supérieur à celui des oncohistones H3.1 K27M, cependant les chiffres sont variables en fonction des études et des méthodes employées (Lewis et al., 2013; Krug et al., 2019; Furth et al., 2022). Bien que semblant moins incorporées au niveau de la chromatine, certaines études ont suggéré que les oncohistones H3.1 K27M induisaient une perte de H3K27me3 plus conséquente que les oncohistones H3.3K27M, sans que le rationnel de cette différence soit clairement établi (Sarthy et al., 2020). D'autre part, les mutations K27M induisent des changements de l'interactome des histones (*e.g.* augmentation de l'affinité pour PRC2). Or, ces changements d'interactions apparaissent également distincts et spécifiques de la forme de l'histone concernée. En effet, à titre d'exemple, les oncohistones H3.1- et H3.3 K27M présentent une affinité particulièrement importante pour les sous-complexes PRC2.1 et PRC2.2, respectivement (Siddaway et al., 2022).

Ces différences de distribution et d'interactome ont motivé l'étude plus fine du paysage épigénétique et du transcriptome associés à chacun des types d'oncohistone K27M. Par comparaison de tumeurs H3.1- et H3.3 K27M, Nagaraja et collaborateurs ont montré que chacune des mutations est associée à l'activation de *super-enhancers* et à la fixation de facteurs de transcription spécifiques. Les enhancers actifs dans les tumeurs H3.3 K27M sont notamment associés à l'activité Rho GTPase et au remodelage du cytosquelette permettant la formation de structures apparentées à des neurites (Nagaraja et al., 2019; Castel et al., 2015). Ce phénotype spécifique des tumeurs H3.3 K27M pourrait participer à leur caractère particulièrement invasif en clinique. Toutefois, à ce jour, les mécanismes biologiques régissant les différences cliniques entre DMG H3.1- et H3.3 K27M demeurent largement méconnus.

II.3.3. Origines cellulaires

Bien que chacun des variants mutés présente des impacts moléculaires propres, initialement associés à leurs distributions et interactomes spécifiques, une étude récente a toutefois révélé le rôle prépondérant de l'origine cellulaire différente entre les DMG H3.1- et H3.3 K27M (Jessa et al., 2022). En effet, plusieurs études ont rapporté que, malgré les altérations du paysage épigénétique induites par les oncohistones, les cellules de DMG préservent une mémoire de l'architecture épigénétique du type cellulaire d'origine (Krug et

al., 2019; Wang et al., 2021). Il a tout d'abord été montré, par l'équipe du Dr. Michelle Monje, que les cellules de DMG, H3.1- et H3.3 K27M, présentaient une identité de précurseurs oligodendrocytaires (OPC), sur la base du paysage de *super-enhancers* actifs et des facteurs de transcription associés (*e.g.* OLIG2) (Monje et al., 2011; Nagaraja et al., 2019, 2017). Plus récemment, par l'intégration d'approches multi-Omics et du profil d'expression des gènes *HOX*, Jessa et collaborateurs ont plus précisément identifié que les DMG sont issus de différents types de cellules progénitrices en fonction de leur localisation anatomique (*e.g.* tronc cérébral *vs.* thalamus) et du type d'oncohistone dont ils sont porteurs (*i.e.* H3.1- *vs.* H3.3 K27M). En effet, parmi les DMG du tronc cérébral (ou DIPG), ceux porteurs d'une mutation H3.1 K27M se développeraient à partir d'OPC primitives (*NKX6-1*$^{+}$) présentant une localisation ventrale (Jessa et al., 2022; Jovanovich et al., 2023). À contrario, les DIPG H3.3 K27M seraient issus de progéniteurs oligodendrocytaires plus engagés dans les programmes de différentiation (*PAX*$^{+}$) et présentant une localisation plus dorsale. Le rationnel d'un avantage sélectif spécifiquement conféré dans des cellules progénitrices distinctes pourrait reposer sur des niveaux de prolifération différents. D'un part, l'expansion rapide des OPC primitives ventrales apparait plutôt propice à l'incorporation des oncohistones de la forme canonique H3.1 (là où les oncohistones H3.3 K27M seraient plus diluées) alors que la prolifération plus réduite des cellules progénitrices dorsales permettrait une accumulation relative des oncohistones du variant H3.3 (Jessa et al., 2022). *In fine*, cette étude démontre, par induction de la mutation H3.1 K27M dans des modèles préalablement invalidés pour H3.3 K27M, que l'impact épigénétique induit par les mutations K27M est globalement identique quel que soit le variant de l'histone affecté. En effet, H3.1- comme H3.3 K27M restreignent la déposition des marques H3K27m3 au niveau des sites de nucléation de PRC2 de la cellule d'origine (Jessa et al., 2022).

Points clés

- Les oncohistones H3 K27M caractéristiques des DMG sont de deux grands types ; celles, majoritaires, **affectant le variant H3.3 (H3.3 K27M)** et celles **affectant la forme canonique H3.1 (H3.1 K27M)**.
- En clinique, **les deux types d'oncohistones K27M définissent des groupes de patients distincts** (âge, localisation tumorale, pronostic). Cependant, les rationnels moléculaires régissant ces différences cliniques sont largement méconnus.
- Les DMG H3.1- et H3.3 K27M présentent une mémoire de l'architecture épigénétique héritée d'**origines cellulaires distinctes**. Néanmoins, dans un contexte cellulaire identique, **les deux formes d'oncohistones K27M ont un impact épigénétique globalement similaire**.

II.4. Altérations épigénétiques des DMG $H3^{WT}$ induites par EZHIP

II.4.1. Découverte des altérations épigénétiques « K27M-like »

Dès 2013, Bender et collaborateurs rapportaient que 3% des pHGG non mutés pour l'histones 3 présentaient tout de même une diminution globale du niveau de H3K27me3 (Bender et al., 2013). Cette propriété s'avère partagée avec 82% des épendymomes de la fosse postérieure pédiatriques, présentant également une dérégulation épigénétique comparable à celle induite par les mutations H3 K27M, alors que seuls 4% en sont effectivement porteurs (Bayliss et al., 2016; Pajtler et al., 2018). Ces données suggèrent l'existence d'un mécanisme alternatif, convergeant vers des effets similaires à ceux induits par les oncohistones. En 2018, Pajtler et collaborateurs ont montré que les épendymomes PFA, caractérisés par une perte globale de H3K27me3, présentent une expression particulièrement élevée du gène *CXorf67* et, dans environ 9% des cas, une mutation somatique récurrente de ce gène (Pajtler et al., 2018). Cette corrélation a été renforcée par l'identification d'une surexpression de *CXorf67* dans la quasi-totalité des DMG non mutés H3 K27M ($H3^{WT}$) présentant une hypométhylation de H3K27 (Castel et al., 2020). Cette corrélation suggère un rôle mécanistique de la protéine CXorf67 dans l'instauration d'un profil épigénétique présentant les mêmes *hallmarks* que celui des DMG mutés H3 K27M.

II.4.2. Impact de EZHIP sur l'activité du complexe PRC2

Suite à ces observations, un lien de causalité a été établi entre la perte globale des marques H3K27me3 et l'expression nucléaire de la protéine codée par le gène *CXorf67* (Jain et al., 2019; Pajtler et al., 2018). Structurellement, la protéine CXorf67 présente une séquence peptidique au niveau C-terminal possédant de fortes similarités avec la queue N-terminal des histones 3 mutées K27M (Fig. 10A). En particulier, la méthionine 406 de la région C-terminale de CXorf67 se comporte telle que la méthionine 27 des queues N-terminales des oncohistones et interagit avec le domaine SET d'EZH2, perturbant drastiquement l'activité du complexe PRC2 (Hübner et al., 2019; Jain et al., 2019). En résulte une dérégulation épigénétique, similaire à celle induite par les mutations K27M, qui se caractérise par une perte globale des marques H3K27me3, s'accompagnant d'une hausse de l'acétylation des lysines 27 des histones 3 (Fig. 10B) (Bayliss et al., 2016; Pajtler et al., 2018; Panwalkar et al., 2021). Cet impact de CXorf67 a engendré la révision de sa nomenclature pour devenir « *EZH Inhibitory Protein* » ou EZHIP (Hübner et al., 2019).

D'autre part, la surexpression d'EZHIP s'accompagne également de l'hyperméthylation de certains *loci*, correspondant majoritairement à des ilots CpG (Jain et al., 2019). Ces sites

hyperméthylés apparaissent largement conservés par rapport à ceux observés dans les DMG mutés H3 K27M (Jessa et al., 2022). En effet, de la même manière que les oncohistones K27M, EZHIP, par son affinité augmentée pour la forme allostériquement activée de PRC2, empêche l'expansion des marques H3K27me3 au-delà des sites de nucléation du complexe (Harutyunyan et al., 2019; Jain et al., 2020b). Subséquemment, l'expression aberrante d'EZHIP est associée à des modifications transcriptionnelles, notamment une répression de $p16^{ink4A}$ (*CDKN2A*), également caractéristique du transcriptome associé aux mutations H3 K27M (Jain et al., 2019; Cordero et al., 2017; Mohammad et al., 2017).

Toutefois, les déterminants de la surexpression aberrante d'EZHIP dans les DMG $H3^{WT}$ demeurent méconnus. Davantage explorée dans les épendymomes PFA, cette surexpression a tout d'abord été associée à une hypométhylation de l'ADN au niveau du promoteur d'*EZHIP* (Pajtler et al., 2018). Plus récemment, Michealraj et collaborateurs ont démontré que l'hypoxie permet le maintien d'un niveau élevé d'expression d'EZHIP dans les épendymomes PFA et constitue un *driver* essentiel de leur altération épigénétique caractéristique (Michealraj et al., 2020).

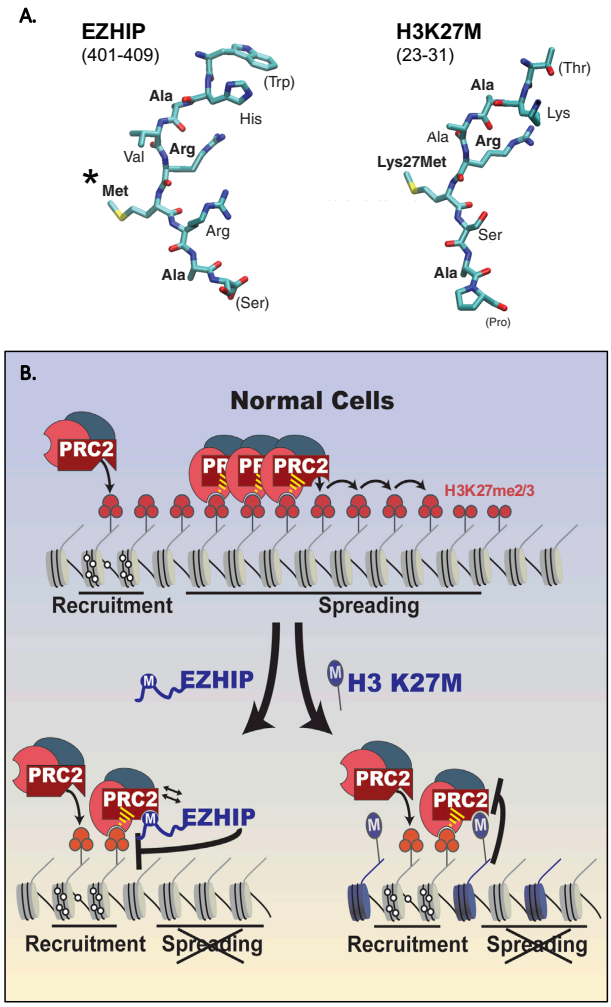


Figure 10. Effets « *K27M-like* » induits par la surexpression d'EZHIP. A. Représentation des peptides 401-409 d'EZHIP (à gauche) et 23-31 de H3K27M (à droite) dans même orientation. Ces deux peptides présentent une

homologie structurale dont les acides aminés conservés apparaissent en gras. La méthionine 406 d'EZHIP (marquée d'une étoile) se comporte telle la méthionine 27 des oncohistones H3 K27M. **B.** Dans le cas physiologique, PRC2 est recruté au niveau d'îlots CpG non méthylés et propage l'apposition des marques H3K27me2/3. EZHIP confine l'activité de PRC2 au niveau de ses sites de nucléation et conduit à des altérations du paysage épigénétique comparables à celles induites par les oncohistones H3 K27M. (Adapté de Hübner et al., 2019 et extrait de Jain et al., 2020b).

II.4.3. Profil clinique des DMG $H3^{WT}$ surexprimant EZHIP

La découverte d'un mécanisme « *K27M-like* » induit par une surexpression aberrante d'EZHIP dans la majorité des DMG $H3^{WT}$ a étendu le spectre des altérations induisant une hypométhylation des H3K27 (Castel et al., 2020). À cet égard, la 5^{e} version de la classification des tumeurs du système nerveux de l'OMS, publiée en 2021, a révisé la nomenclature « *DMG, H3 K27M-mutant* » instaurée en 2016 en « *DMG, H3K27-altered* » afin d'inclure les DMG $H3^{WT}$ présentant une perte de H3K27me3 à ce sous-type de pHGG de grade 4 (Louis et al., 2021; Pfister et al., 2022). Au niveau clinique, cette inclusion se justifie notamment par le pronostic péjoratif associé aux DMG $H3^{WT}$ surexprimant EZHIP, avec une médiane de survie de 16 mois, proche de celle observée pour les DMG mutés H3.1 K27M (Castel et al., 2020). D'ailleurs, une suggestion de reclassification des DMG $H3^{WT}$ au regard de leur pronostic avait déjà été formulée par le passé (Von Bueren et al., 2018). D'autre part, l'âge d'incidence médian des DMG $H3^{WT}$ se situe autour de 10 ans et se rapproche de celui observé pour les DMG H3.3 K27M (Castel et al., 2020).

II.5. Altérations génomiques partenaires récurrentes

Les mutations H3 K27M sont des événements primitifs (voire initiaux) et *drivers* de la tumorigenèse des DMG, affectant l'intégralité des clones tumoraux (Nikbakht et al., 2016). Toutefois, d'autres altérations génomiques caractéristiques récurrentes, parfois sous-clonales, participent également au développement et au phénotype tumoral des DMG, conjointement avec les oncohistones (Mackay et al., 2017; Vinci et al., 2018; L. H. Chen et al., 2020).

II.5.1. La voie TP53

TP53 est le gène le plus fréquemment altéré en cancérologie (42% des cancers tous types confondus) et les DMG ne font pas exception (Kandoth et al., 2013). En ce sens, les mutations somatiques de *TP53* figurent au rang des altérations caractéristiques récurrentes les plus fréquentes des DMG et co-ségrégent en particulier avec les mutations du variant H3.3 (Panditharatna et al., 2015; Lapin et al., 2017; Mackay et al., 2017). En effet, plus de 50% des DMG mutés H3.3 K27M sont également mutés *TP53* et cette association revêt le pronostic le

plus sombre, avec une médiane de survie inférieure à 9 mois (Mackay et al., 2017; Werbrouck et al., 2019).

Durant la tumorigenèse des DMG, ces mutations de *TP53*, dites « partenaires », émergent précocement et coopèrent avec les mutations de l'histone 3 (Nikbakht et al., 2016). En effet, dans des modèles murins de xénogreffes orthotopiques, d'électroporation *in vivo* ou encore transgéniques, l'association de la mutation H3.3 K27M à une perte de fonction de *TP53* est capable, selon le type cellulaire ciblé, d'induire une tumorigenèse au niveau cérébral, alors que chacune de ces altérations seule ne le permettent pas (Haag et al., 2021; Pathania et al., 2017; Pajovic et al., 2020). De manière plus marginale (11% des DMG) et mutuellement exclusive avec les mutations de *TP53*, les mutations non-sens conduisant à des formes tronquées plus stables de la phosphatase PPM1D constituent une autre voie d'altération de l'activité de TP53 et coopèrent également avec d'autres oncogènes (*i.e.* PDGFRA) dans la tumorigenèse des DMG. Toutefois, son association avec la mutation H3.3 K27M n'est pas suffisante pour induire une tumorigenèse au niveau cérébral (Khadka et al., 2022).

Au-delà de leur rôle dans la tumorigenèse, les altérations de la voie TP53 (*i.e.* $TP53^{mut}$ et $PPM1D^{mut}$) sont associées au phénotype radiorésistant des DMG (Werbrouck et al., 2019; Akamandisa et al., 2019).

II.5.2. La signalisation du récepteur à activité tyrosine kinase PDGFRA

Bien que permettant d'initier une tumorigenèse au niveau cérébral dans certains contextes, les tumeurs engendrées par l'association de H3.3 K27M avec la perte de fonction de TP53 ne récapitulent pas strictement l'histologie ni la localisation des DMG. En effet, dans des modèles d'électroporation *in vivo*, ces deux *hits* induisent des tumeurs à progression lente, bien qu'aboutissant tout de même à des lésions de haut grade *in fine* (Pathania et al., 2017). De même, l'induction de la perte de fonction de *TP53* et l'expression de H3.3 K27M sous le contrôle du promoteur de la *Nestin* dans des modèles murins transgéniques conduit à la formation de tumeurs histologiquement apparentées à des médulloblastomes (Larson et al., 2019).

Par ailleurs, PDGFRA est le récepteur à activité tyrosine kinase le plus fréquemment altéré dans les pHGG et des événements récurrents d'amplification de *PDGFRA* sont observés dans près de 40% des DIPG (Zarghooni et al., 2010; Mackay et al., 2017). Sur la base de la fréquence de cette amplification, plusieurs études en ont évalué le rôle au cours de la tumorigenèse des DMG, en association avec la mutation H3.3 K27M et la perte de fonction de *TP53*. L'ensemble de ces travaux rapportent que l'activation aberrante de la voie du PDGF, en coopération avec les deux précédents *hits* (*i.e.* H3.3 K27M et perte de *TP53*), accélère la tumorigenèse, augmente la pénétrance au niveau du tronc cérébral, favorise une histologie de haut grade (*e.g.* apparition de foyers nécrotiques, prolifération vasculaire) et amplifie le

caractère infiltrant des tumeurs (Cordero et al., 2017; Pathania et al., 2017; Patel et al., 2019; Larson et al., 2019). L'ensemble de ces données concourent à montrer le rôle clé de PDGFRA dans la tumorigenèse et le caractère agressif des DMG. En ce sens, même en absence d'altération génomique de *PDGFRA*, les oncohistones H3 K27M en favorisent l'expression en induisant une hypométhylation de son promoteur (Haag et al., 2021). Ces travaux suggèrent que dans les DMG ne présentant pas d'amplification de *PDGFRA*, les mutations H3 K27M permettent le maintien de son expression. De surcroit, le niveau d'expression élevé de PDGFRA est caractéristique d'une population cellulaire (*OPC-like*) indifférenciée et dotée d'une capacité d'auto-renouvellement au sein des DMG (Filbin et al., 2018).

II.5.3. La signalisation des BMP

Au rang des altérations caractéristiques les plus fréquentes des DMG, figurent les mutations affectant le récepteur aux BMP de type I à activité sérine/thréonine kinase ALK2 (codée par le gène *ACVR1*). Les mutations d'*ACVR1* concernent 20-30% des DIPG et co-ségrégent spécifiquement avec les oncohistones H3.1 K27M (Mackay et al., 2017; Kathryn R Taylor et al., 2014; the St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project, 2014). Ces mutations, affectant en particulier le domaine *glycine-serine-rich* et le domaine kinase du récepteur, permettent le maintien d'une activation basale constitutive de la voie des BMP par la phosphorylation des protéines SMAD1/5/8. Suite à leur association à SMAD4, ces protéines SMAD phosphorylées, sont ensuite transloquées au niveau nucléaire pour activer des programmes de transcription associés à la voie des BMP (Kathryn R. Taylor et al., 2014; Fontebasso et al., 2014; Han et al., 2018).

Au cours du développement, les BMP sont des morphogènes formant un gradient le long de l'axe dorso-ventral. De fait, les OPC ventrales *NKX6-1*$^{+}$ à l'origine des DMG mutés H3.1 K27M y présentent un accès restreint. Le rationnel de l'association majoritaire des mutations d'ACVR1 avec les oncohistones H3.1 K27M pourrait ainsi reposer sur la nécessité d'activer la voie des BMP indépendamment des ligands, contrairement au DMG H3.3 K27M prenant leur origine au niveau dorsal (Jessa et al., 2022). En ce sens, les mutations d'*ACVR1* sont des événement précoces au cours de la tumorigenèse, retrouvées dans l'ensemble des clones tumoraux de DMG mutés H3.1 K27M (Nikbakht et al., 2016). D'un point de vue moléculaire, l'oncohistone H3.1 K27M imposerait un environnement permissif aux modifications transcriptionnelles induites par les mutations d'*ACVR1 via* l'activation de la voie des BMP. De surcroit, cette coopération entre H3.1 K27M et ACVR1, en association avec une activation de la voie du PDGF, accélère la tumorigenèse et réduit significativement la survie de modèles de xénogreffes murins (Hoeman et al., 2019). *In fine*, ces données démontrent le rôle des mutations d'*ACVR1* dans la tumorigenèse et le caractère agressif des DMG mutés H3.1 K27M, inhérent à leur fenêtre spatio-temporelle de développement.

II.5.4. Les chaperonnes d'incorporation des histones

De manière concomitante à la découverte des oncohistones, des mutations récurrentes des chaperonnes du variant H3.3, que sont ATRX et DAXX, ont été identifiées dans 30% des pHGG (Schwartzentruber et al., 2012). Au sein des DMG mutés H3K27M, ces mutations perte de fonction affectant ATRX, parfois sous-clonales, sont préférentiellement retrouvées au niveau thalamique et ne concernent que 9% des DIPG (Fontebasso et al., 2014, 2013; Khuong-Quang et al., 2012; Nikbakht et al., 2016).

La co-occurrence des mutations d'histone et des chaperonnes responsables de leur incorporation suggère un potentiel avantage sélectif lié à la modulation du pattern d'incorporation des oncohistones (Furth et al., 2022; Schwartzentruber et al., 2012). D'autre part, en lien avec le rôle des chaperonnes ATRX/DAXX dans l'incorporation du variant H3.3 au niveau de l'hétérochromatine télomérique, ces mutations ont été associées à un mécanisme alternatif d'élongation des télomères et apparaissent, en ce sens, exclusives par rapport aux mutations activatrices de la télomérase (Minasi et al., 2021).

D'un point de vue phénotypique, la perte de fonction d'ATRX coopère avec la mutation H3.3 K27M pour accélérer la tumorigenèse et la formation de gliomes de haut grade en modèles murins (Pathania et al., 2017). Toutefois, les mutations d'ATRX sont associées à un caractère moins invasif et à un profil plus radiosensible, lié à une altération de l'efficacité de réparation des dommages à l'ADN (par NHEJ), se traduisant *in fine* par une survie plus longue des patients atteints de pHGG mutés ATRX (Koschmann et al., 2016).

Points clés

- **La majorité des DMG $H3^{WT}$ présentent une surexpression aberrante d'EZHIP** conduisant à une dérégulation épigénétique « *K27M-like* ».
- Le profil moléculaire caractéristique des cellules de DMG mutés H3 K27M s'explique par des **coopérations entre les oncohistones et d'autres mutations** notamment au cours de la tumorigenèse.
- **Les mutations H3.1- et H3.3 K27M co-ségrégent préférentiellement avec certaines altérations** conférant des avantages sélectifs spécifiques en fonction de l'origine cellulaire (*e.g.* ACVR1).

III Phénotypes cellulaires associés à la mutation H3.3 K27M

Il est désormais acquis que les oncohistones K27M (tout comme la surexpression d'EZHIP) engendrent une dérégulation drastique de la dynamique épigénétique inhérente à la perturbation de l'activité du complexe PRC2. Bien que permettant de créer un environnement permissif à l'impact d'autres altérations au cours de la tumorigenèse (*e.g.* mutations d'ACVR1), *per se*, cette dérégulation épigénétique ne semble induire que de modestes changements transcriptionnels (Harutyunyan et al., 2019; Larson et al., 2019). Ces observations soulèvent la question de l'impact phénotypique des mutations H3 K27M durant la tumorigenèse mais également *a posteriori*. Cette question a majoritairement été adressée dans des modèles mutés H3.3 K27M.

III.1. Blocage de la différenciation

Plusieurs études ont montré que l'induction des mutations H3 K27M engendre des effets pro-tumorigènes exclusivement dans certains contextes cellulaires permissifs (Funato et al., 2014; Haag et al., 2021). En effet, les oncohistones ont un impact oncogénique dans des cellules peu différenciées (*e.g.* NSC, OPC) mais pas dans un contexte différencié (*e.g.* astrocytes, fibroblastes) (Funato et al., 2014). Ceci concorde avec le fait que les DMG mutés H3 K27M émergent de progéniteurs oligodendrocytaires peu différenciés (OPC) et maintiennent ensuite cette identité cellulaire (*Cf.* Fig. 6) (Jessa et al., 2022; Nagaraja et al., 2019).

III.1.1. Blocage de la dynamique épigénétique requise pour la différenciation cellulaire

Au cours du développement cérébral, la dynamique épigénétique contrôle la mise en place de programmes transcriptionnels nécessaires à la différenciation cellulaire (Adefuin et al., 2014). Cette dynamique apparaît compromise par la perturbation de l'activité de PRC2 imposée par H3.3 K27M. En effet, dans un contexte muté, les complexes PRC2 s'accumulent au niveau du promoteur de gènes impliqués dans les processus neurodéveloppementaux, en réprimant ainsi l'expression. De même, l'altération de la distribution des marques H3K27ac par les oncohistones verrouillent l'accessibilité de régions régulatrices de type enhancers impliquées dans la différenciation neurale (Brien et al., 2021). En ce sens, l'inhibition combinée des HDAC et de KDM1A lève ce blocage et permet l'expression de marqueurs de la différenciation gliale et neuronale dans les cellules de DMG (Anastas et al., 2019).

D'autre part, au-delà de son impact direct, la mutation H3.3 K27M contrôle l'expression d'acteurs épigénétiques nécessaires au maintien du blocage de la différentiation. À ce titre, dans les cellules de DMG, BMI1 (sous-unité du complexe PRC1) participe au maintien de l'expression de marqueurs des progéniteurs neurogliaux (*e.g.* OLIG2) et son expression est up-régulée par H3.3 K27M *via* l'hypométhylation de son promoteur (Balakrishnan et al., 2020). Plus récemment, des criblages fonctionnels ont identifié une dépendance des DMG mutés H3 K27M à la sous-unité SMARCA4, du complexe de remodelage de la chromatine BAF (SWI/SNF), dont l'expression est favorisée par la mutation H3.3 K27M (Mo et al., 2022; Panditharatna et al., 2022; Mota et al., 2023). SMARCA4 revêt un rôle fondamental dans l'orchestration de l'activité de facteurs de transcription master régulateurs (e.g. SOX10) sur le réseau d'enhancers imposé par l'oncohistone et maintient ainsi l'état immature *OPC-like* des DMG (Pajovic et al., 2020; Panditharatna et al., 2022; Mo et al., 2022).

III.1.2. Signature transcriptionnelle caractéristique d'un état cellulaire indifférencié

D'un point de vue transcriptionnel, le maintien d'une signature *OPC-like* dépend de l'activité de facteurs de transcription tels que SOX10 (Panditharatna et al., 2022). H3.3 K27M participe au maintien de cette signature immature en favorisant l'expression de SOX10, dont le promoteur est hypométhylé en présence de l'oncohistone. De surcroit, SOX10 est master régulateur de l'exécution du programme transcriptionnel associé à la mutation H3.3 K27M (Pajovic et al., 2020). À travers l'utilisation de différents modèles, des signatures moléculaires récurrentes associées à la mutation H3.3 K27M ont été identifiées et présentent systématiquement des enrichissements en gènes impliqués dans le développement cérébral, la différenciation neuronale ou encore l'axonogenèse dans différents modèles (Cordero et al., 2017; Harutyunyan et al., 2019; Larson et al., 2019). Nombre de ces gènes, dérégulés par H3.3 K27M, sont des cibles des complexes Polycomb et présentent, en absence de la mutation, une bivalence chromatinienne (à la fois H3K27me3 et H3K4me3) au niveau de leurs promoteurs, une caractéristique des gènes impliqués dans les processus dynamiques de différenciation cellulaire (Haag et al., 2021; Larson et al., 2019; Silveira et al., 2019). Au rang des gènes up-régulés en présence de la mutation H3.3 K27M figurent des marqueurs des progéniteurs neurogliaux tels que *OLIG2*, des gènes de la famille des ID (*inhibitors of DNA binding/differenciation*) ou encore des acteurs impliqués dans diverses voies de signalisation associées aux cellules souches (*e.g.* NOTCH, MYC) (Harutyunyan et al., 2019; Pajovic et al., 2020; K.-Y. Chen et al., 2020; Haag et al., 2021). Par ailleurs, les cellules de DMG apparaissent particulièrement dépendantes de l'exécution de ce programme transcriptionnel pour figer leur état indifférencié. En effet, la perturbation du processus de transcription lève le blocage de la différenciation et conduit à l'expression de marqueurs de différenciation gliale (*e.g.*

GFAP) ainsi qu'à la perte du phénotype associé à l'état souche (Dahl et al., 2020; Nagaraja et al., 2017).

III.1.3. Conséquences sur le caractère oncogénique

Au cours de la tumorigenèse des DMG, le blocage de la différentiation causé par H3.3 K27M s'accompagne du maintien des capacités d'auto-renouvellement des OPC (Funato et al., 2014; Pajovic et al., 2020). Par ailleurs, le même effet a également été décrit dans d'autres modèles, tels que les cellules souches hématopoïétiques pré-leucémiques (Boileau et al., 2019). Il apparaît ainsi probable que, lors des étapes précoces de la tumorigenèse, la mutation H3.3 K27M favorise l'expansion des OPC, créant ainsi un pool de cellules plus susceptibles d'accumuler d'autres altérations moléculaires partenaires et d'entrainer le développement d'un DMG (Larson et al., 2019). Corroborant cette hypothèse, l'oncohistone a également été associée à une exacerbation des anomalies mitotiques provoquant une instabilité génomique favorable à l'acquisition d'altérations additionnelles (Bočkaj et al., 2021).

Au-delà de son rôle au cours de la tumorigenèse, le blocage de la différenciation imposé par la mutation H3.3 K27M apparaît réversible et conserve, *a posteriori*, un rôle dans le caractère oncogénique des cellules de DMG. En ce sens, l'invalidation de l'oncohistone dans des cellules de DMG retarde significativement (voire abolit) leur capacité à générer une tumeur en modèle murin de xénogreffes orthotopiques (Harutyunyan et al., 2019; Silveira et al., 2019). De surcroit, l'analyse des tumeurs invalidées pour la mutation indique une hausse de l'expression de marqueurs de différenciation en oligodendrocytes matures tels que la *myelin-associated glycoprotein* (MAG) (Silveira et al., 2019).

In fine, le maintien de l'état souche induit par les oncohistones régit, au moins en partie, le modèle cellulaire hiérarchique retrouvé dans les DMG mutés H3 K27M. Filbin et collaborateurs ont montré, par des approches de *single-cell RNA-seq*, que les DMG se composent d'une majorité (environ 75%) de cellules tumorales *OPC-like* au phénotype peu différencié (*e.g.* capacités prolifératives), cohérent avec la présence ubiquitaire des mutations H3 K27M et de leur impact sur la différentiation (Fig. 11A). Toutefois, deux sous-populations minoritaires (*AC-like* et *OC-like*), dérivant probablement des cellules tumorales *OPC-like*, échappent au blocage de la différenciation et perdent leur capacité à former une tumeur (Filbin et al., 2018). De manière intéressante, en miroir de cette hétérogénéité cellulaire, se superpose une hétérogénéité d'expression de l'oncohistone H3.3 K27M au sein des DMG. Gage du rôle majeur de la mutation H3.3 K27M dans le maintien du blocage de la différenciation, les cellules caractérisées par un niveau élevé d'expression de l'oncohistone présentent un phénotype correspondant au compartiment *OPC-like* décrit par Filbin et collaborateurs (Fig. 11B) (Harpaz et al., 2022). Ces données démontrent l'impact fondamental

des mutations H3 K27M sur le modèle cellulaire hiérarchique des DMG, en particulier *via* l'altération du processus de différenciation cellulaire.

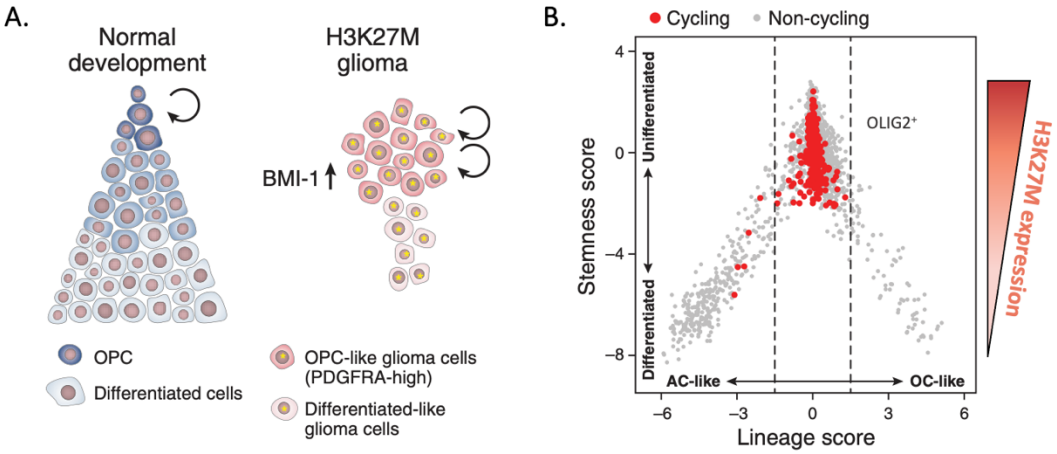


Figure 11. H3 K27M et maintien de l'état peu différencié des cellules de DMG. A. Représentation schématique du modèle cellulaire hiérarchique des DMG mutés H3 K27M en comparaison avec développement normal. La majorité des cellules de DMG mutés H3 K27M présente des similarités moléculaires avec les OPC (*OPC-like glioma cells*) ainsi qu'un niveau élevé d'expression de BMI-1. Ces cellules *OPC-like* se caractérisent notamment par des capacités d'auto-renouvellement exacerbées. D'autre part, une minorité de cellules échappe au blocage de la différenciation associé aux mutations H3 K27M. Ces cellules se répartissent en deux compartiments tumoraux différenciés présentant respectivement des similarités moléculaires avec les astrocytes ou les oligodendrocytes sains (*Differentiated-like glioma cells* : *AC-like* et *OC-like*). **B.** Graphique présentant la répartition de 2259 cellules de DMG muté H3 K27M (*single-cell RNA-seq*) en fonction de leur état de différenciation. Les cellules de DMG indifférenciées de type *OPC-like* (à l'apex) OLIG2 positives sont enrichies en cellules proliférantes (points rouges) et présentent un niveau d'expression de l'oncohistone H3 K27M plus élevé que les cellules différenciées (de type *AC-like* et *OC-like*). (Extrait et adapté de Filbin et al., 2018).

III.2. Inhibition de la senescence et prolifération

III.2.1. Rôle majeur de la répression de p16^{ink4a}

La répression épigénétique de *CDKN2A*, codant notamment p16^{INK4a} (inhibiteur de CDK4/6), figure parmi les *hallmarks* des DMG mutés H3K27M (Georgescu et al., 2020; Kasper and Baker, 2020). De fait, les délétions bi-alléliques de *CDKN2A*, présentes dans différents cancers, sont rarement observées dans les DMG (Mackay et al., 2017).

Au niveau moléculaire, les mutations H3 K27M apparaissent comme les principaux *driver* de cette répression (Cordero et al., 2017; Mohammad et al., 2017). En ce sens, *CDKN2A* figurent parmi les *loci* cibles des complexes *Polycomb* (PRC1 et PRC2) conservant une hyperméthylation en présence des oncohistones (Fig. 12) (Cordero et al., 2017; Silveira et al., 2019). Toutefois, les mécanismes régissant la répression de p16^{INK4a} imputables à la mutation H3.3 K27M diffèrent selon les études (Kasper and Baker, 2020). Alors que Mohammad et collaborateurs identifient un lien direct entre la présence des marques H3K27me3 au niveau de *CDKN2A* et la répression de p16^{INK4a}, Cordero *et al.* suggèrent une répression plus robuste,

impliquant également la méthylation d'ilots CpG au niveau du promoteur de *CDKN2A* (Cordero et al., 2017; Mohammad et al., 2017). Malgré ces différences mécanistiques, les deux études démontrent que la restauration de l'expression de $p16^{INK4a}$ par le ciblage pharmacologique des phénomènes épigénétiques en régissant la répression inhibe significativement la croissance des cellules de DMG. De plus, dans leur modèle murin transgénique de tumorigenèse, Cordero et collaborateurs montrent une implication majeure de la répression de $p16^{INK4a}$ dans le phénotype prolifératif et l'accélération de la tumorigenèse induits par H3.3 K27M. Appuyant le lien entre le phénotype prolifératif induit par H3.3 K27M et la répression de *CDKN2A*, il a été montré que, au sein de l'hétérogénéité cellulaire observée dans les DMG, les cellules à potentiel prolifératif réduit (caractérisées par une expression faible de l'oncohistone H3.3 K27M) présentent un niveau important d'expression de $p16^{INK4a}$ par rapport au cellules exprimant fortement H3.3 K27M (Harpaz et al., 2022).

Plus récemment, Balakrishnan et collaborateurs ont montré que H3.3 K27M réprime également $p16^{INK4a}$ en favorisant l'expression de BMI1 (Balakrishnan et al., 2020). En effet, la dérépression des CKI $p16^{INK4a}$ et $p21^{CIP1}$ induite par l'invalidation (ou le ciblage pharmacologique) de BMI1 déclenche la senescence des cellules de DMG mutés H3.3 K27M. Ces données indiquent, qu'au-delà de son rôle dans le phénotype prolifératif, la mutation H3.3 K27M s'oppose à la senescence des cellules de DMG, notamment *via* la répression de $p16^{INK4a}$ dépendante de BMI1 (Balakrishnan et al., 2020).

In fine, l'ensemble de ces données démontrent le rôle majeur de la répression épigénétique de $p16^{ink4a}$ induite par l'oncohistone H3.3 K27M dans le phénotype prolifératif et l'échappement à la senescence des cellules de DMG (Fig. 12).

III.2.2. Activation de signalisations oncogéniques

III.2.2.1. La voie de signalisation des MAPK

La mutation H3.3 K27M contrôle également l'activation de voies de signalisation oncogéniques impliquées dans la croissance tumorale des DMG (Fig. 12). Au rang des voies de signalisation fréquemment altérées en neuro-oncologie pédiatrique figure la cascade de signalisation des MAPK (Izquierdo et al., 2022). Des signatures épigénétiques et transcriptomiques associées à cette voie de signalisation ont été identifiées dans les DMG mutés H3 K27M (Nagaraja et al., 2017, 2019). Bien que certains DMG présentent une activation de la signalisation des MAPK liée à des altérations génomiques (*e.g.* mutations de *NF1*, mutations ou amplification de *PDGFRA*), il semble toutefois exister, dans l'ensemble les DMG mutés H3 K27M, un mécanisme d'activation indépendant du profil moléculaire (Georgescu et al., 2020; Mackay et al., 2017; Pajovic et al., 2020).

En ce sens, l'induction de la mutation H3.3 K27M dans des OPC humaines engendre une perte des marques H3K27me3 au niveau des promoteurs des gènes *PDGFRA*, *KRAS*, *HRAS*

et *NRAS* (Fig. 12) (Pajovic et al., 2020). Au-delà de favoriser l'expression de ces acteurs moléculaires, l'oncohistone en promeut l'activation. De surcroit, dans un contexte muté H3.3 K27M, le knock-down de chacune des 3 isoformes majeures de RAS (*i.e.* KRAS, HRAS, NRAS) engendre une inhibition significative de la croissance cellulaire (Koncar et al., 2019). La cascade de signalisation préférentiellement induite par H3.3 K27M en aval de RAS implique la phosphorylation activatrice de MEKK2, MEK5 et ERK5 et supporte la croissance tumorale des DMG (Koncar et al., 2019). Ce phénotype est notamment lié à la stabilisation de MYC (phosphorylé sur S62), médiée par ERK5, et l'exécution subséquente de son programme transcriptionnel (Koncar et al., 2019; Pajovic et al., 2020). *In fine*, ces données démontrent que la mutation H3.3 K27M contrôle la croissance tumorale des DMG en stabilisant MYC au travers de l'activation de la signalisation des MAPK (en particulier ERK5) (Fig. 12). Étant donné le rôle pléiotrope du proto-oncogène MYC, l'oncohistone H3.3 K27M pourrait, par sa stabilisation, contrôler d'autres phénotypes cellulaires (*e.g.* métabolisme énergétique) (Miller et al., 2012; Pajovic et al., 2020).

III.2.2.2. *La voie de signalisation JAK/STAT*

Par ailleurs, Koncar et collaborateurs ont également montré que, dans un contexte muté H3 K27M, l'invalidation de ERK5, empêchant la signalisation des MAPK induite par l'oncohistone, conduit à l'activation compensatoire de la voie JAK/STAT (Koncar et al., 2019). Concernant cette voie de signalisation, dans les DMG, STAT3 apparaît i) up-régulé dans l'ensemble du tissu tumoral par rapport au tissu sain adjacent, et ii) associé au phénotype prolifératif et invasif (Georgescu et al., 2020; Park et al., 2020; Zhang et al., 2022). En ce sens, un niveau d'expression élevé de STAT3 corrèle avec une survie globale réduite (Zhang et al., 2022).

En partant d'un criblage de molécules, Zhang et collaborateurs ont identifié une activation de la signalisation JAK/STAT (phosphorylation de STAT3 sur Y705) caractéristique des DMG mutés H3 K27M. D'un point de vue mécanistique, à l'instar de l'axe RAS/MYC, cette activation de STAT3 ainsi que l'exécution du programme transcriptionnel associé apparaissent dépendants de la mutation H3.3 K27M et participent significativement à la croissance tumorale des DMG (Fig. 12) (Zhang et al., 2022). De plus, le ciblage de la signalisation JAK/STAT restaure le niveau de H3K27me3 suggérant un rôle de STAT3 dans le maintien du paysage épigénétique inhérent aux oncohistones K27M, potentiellement *via* ses impacts sur le métabolisme cellulaire décrit dans d'autres modèles (Li et al., 2023; Zhang et al., 2022). Gage supplémentaire de son importance, l'activation de STAT3 est également médiée par d'autres altérations moléculaires (*i.e.* mutations d'ACVR1), en particulier dans les DMG mutés H3.1 K27M (Hoeman et al., 2019). *In fine*, STAT3 étant un régulateur transcriptionnel de MEK5, il existe une interconnexion entre les voies de signalisation JAK/STAT et MAPK induites par les oncohistones (Koncar et al., 2019).

III.2.2.3. La voie de signalisation NOTCH

La voie NOTCH est une signalisation de contact entre cellules juxtaposées présentant un rôle majeur au cours du développement embryonnaire (Kopan and Ilagan, 2009). Dans le contexte des DMG, différents acteurs de la voie NOTCH (*e.g.* récepteurs NOTCH1/3 et ligands DLL1/3) apparaissent surexprimés par rapport au tissu cérébral sain (Taylor et al., 2015). D'un point de vue phénotypique, la voie NOTCH est impliquée dans la croissance des cellules de DMG mutées H3 K27M (K.-Y. Chen et al., 2020; Taylor et al., 2015). De plus, dans divers modèles (incluant les DMG), cette voie impacte la réponse à différents types de thérapies anti-cancéreuses (Martz et al., 2014; Taylor et al., 2015).

Au niveau moléculaire, il a été montré, à l'aide de modèles cellulaires isogéniques invalidés pour la mutation H3.3 K27M, que les oncohistones, par leurs impacts épigénétiques, induisent une accessibilité chromatinienne au niveau d'enhancers correspondant à divers gènes d'acteurs et effecteurs de la voie NOTCH. Par ce biais, la mutation H3.3 K27M contrôle l'expression de ces acteurs, favorise l'activation de la voie NOTCH et promeut ainsi la croissance cellulaire des DMG (Fig. 12) (K.-Y. Chen et al., 2020; Lewis et al., 2022).

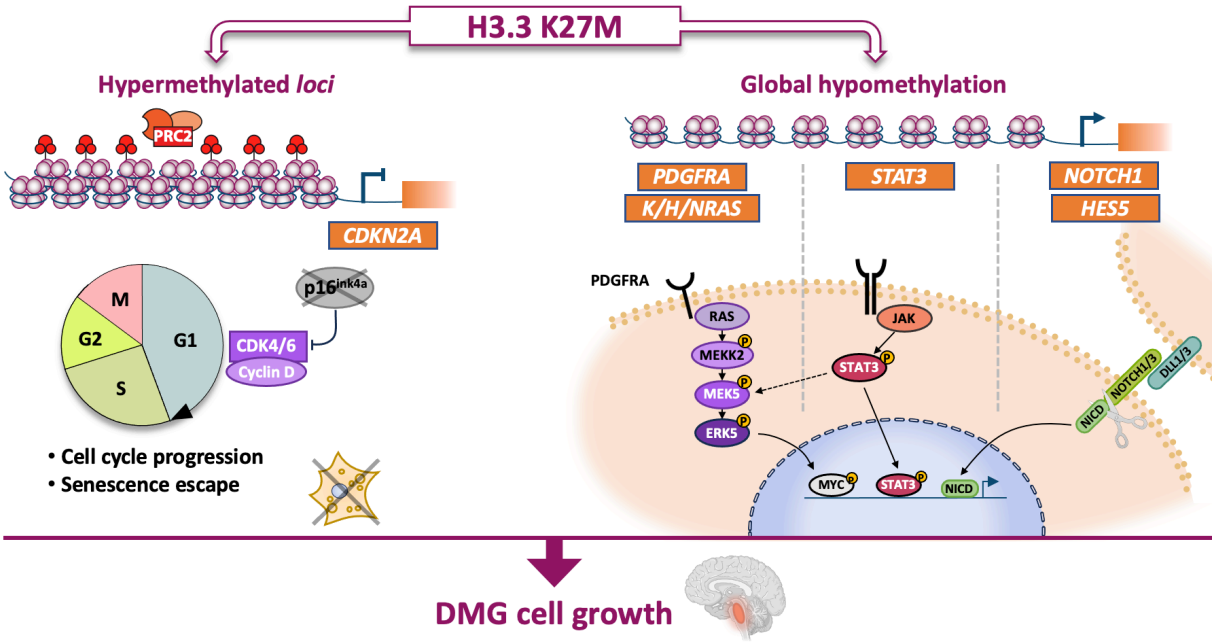


Figure 12. Rôles de l'oncohistone H3.3 K27M dans la croissance cellulaire des DMG. Dans le contexte muté H3 K27M, certains loci (sites de nucléation de PRC2) conservent une hyperméthylation sur les lysines 27 des histones 3. Cette hyperméthylation est associée à une répression du gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* codant notamment $p16^{INK4a}$. Cette répression du *cyclin dependent kinase inhibitor* (CKI) $p16^{INK4a}$ favorise la progression dans le cycle cellulaire et l'échappement à la sénescence des cellules de DMG mutées H3 K27M. D'autre part, l'hypométhylation globale inhérente aux oncohistones H3 K27M favorise l'expression d'acteurs impliqués dans diverses voies de signalisation contrôlant la croissance cellulaire. En favorisant l'expression du récepteur à activité tyrosine kinase *PDGFRA* et des oncogènes *KRAS*, *HRAS* et *NRAS*, la mutation H3.3 K27M induit une activation de la voie des MAPK (MEKK2, MEK5 et ERK5) aboutissant à la stabilisation de MYC. La mutation H3 K27M est également associée à l'activation de la voie JAK/STAT, notamment en favorisant l'expression de STAT3. De plus, les oncohistones H3 K27M induisent l'expression du récepteur NOTCH1 et de HES5, acteurs

moléculaires associés à la voie de signalisation NOTCH. *In fine*, *via* la répression de $p16^{INK4a}$ et l'activation des voies de signalisation MAPK, JAK/STAT et NOTCH, la mutation H3.3 K27M contrôle la croissance des cellules de DMG.

III.3. Dérégulation du métabolisme cellulaire

Dans les DMG, la dérégulation du métabolisme cellulaire figure parmi les *« hallmarks of cancer »* modulés par les oncohistones K27M. En effet, la mutation H3.3 K27M contrôle l'expression d'enzymes impliquées dans diverses voies métaboliques, cytoplasmiques (*e.g.* cycle de la méthionine) et mitochondriales (*e.g.* cycle de Krebs) (*Cf.* Fig. 8) (Chung et al., 2020; Golbourn et al., 2022). Au-delà de leurs impacts épigénétiques (détaillés dans la partie I.2.2.2), ces remaniements métaboliques, associés à la mutation H3.3 K27M, pourraient gouverner les aspects bioénergétiques ainsi que d'autres phénotypes des cellules de DMG.

III.3.1. Métabolisme du glucose et de la glutamine dans le contexte muté H3 K27M

Il a été démontré que la mutation H3.3 K27M gouverne le métabolisme du glucose et de la glutamine en favorisant l'expression de diverses enzymes, telles que le transporteur GLUT3, les glutamate déshydrogénases (GDH) 1/2 ou encore IDH1 (Chung et al., 2020). Ainsi, dans les cellules de DMG, le cycle de Krebs est à la fois alimenté par le pyruvate, produit à partir du glucose, mais également au travers du mécanisme anaplérotique utilisant la glutamine (Chung et al., 2020; Martínez-Reyes and Chandel, 2020). De fait, le métabolome des DMG mutés H3 K27M présente un enrichissement en métabolites intermédiaires du cycle de Krebs (*e.g.* pyruvate, citrate ou encore α-KG), permettant le maintien de leur paysage épigénétique caractéristique (Chung et al., 2020). Par ailleurs, les impacts de la mutation H3.3 K27M sur le métabolisme de la glutamine (et sur le cycle de la méthionine) pourraient également supporter les remaniements du métabolisme des nucléotides dont sont dépendantes les cellules de DMG (Golbourn et al., 2022; Mbah et al., 2022; Pal et al., 2022).

D'un point de vue phénotypique, une privation en glucose et/ou en glutamine, restaurant l'apposition des marques H3K27me3, ralentie significativement la croissance des DMG en modèles murins de xénogreffes orthotopiques (Chung et al., 2020).

III.3.2. État de différenciation et métabolisme énergétique des DMG

Bien que les conséquences épigénétiques de la reprogrammation métabolique associée aux mutations H3 K27M aient été décrites, son impact potentiel sur les aspects bioénergétiques, partageant des métabolites communs, demeure largement inexploré.

Dans un récent *preprint*, Mbah et collaborateurs étudient les différences de métabolisme énergétique entre des cellules de DMG cultivées soit en gliosphères, apparentées au compartiment *OPC-like* peu différencié, soit en conditions adhérentes, apparentées au compartiment différencié *AC-like*. Ces deux états cellulaires présentent des profils métabolomiques et bioénergétiques distincts (Mbah et al., 2022). En particulier, bien que présentant des signatures transcriptionnelles associées à l'OXPHOS, les cellules au profil *OPC-like* (cultivées an gliosphères) apparaissent faiblement énergétiques, avec une activité de la chaîne respiratoire mitochondriale (basale et maximale) et une production d'ATP par la voie glycolytique réduites par rapport aux cellules *AC-like* (différenciées) (Fig. 13A). Comme observé dans d'autres modèles cancéreux, la diminution de la capacité de réserve respiratoire des cellules au profil *OPC-like* corrèle avec des modifications de leur réponse à certaines thérapies anti-cancéreuses *in vitro* (*i.e.* radiothérapie) (Marchetti et al., 2020; Mbah et al., 2022).

Étant donné leur rôle majeur dans le maintien de l'état indifférencié, il apparaît probable que la mutation H3.3 K27M gouverne le phénotype bioénergétique des cellules *OPC-like* (Silveira et al., 2019; Mbah et al., 2022) ; d'autant que cette population cellulaire présente un niveau élevé d'expression des oncohistones, dont l'impact sur le métabolisme du glucose et de la glutamine, deux des sources principales de carbone alimentant les voies bioénergétiques, a été démontré (Chung et al., 2020; Harpaz et al., 2022). De surcroit, cet état faiblement énergétique apparait cohérent avec une forte demande en métabolites (*e.g.* α-KG et acétyl-CoA) mobilisés à des fins épigénétiques dans les DMG (Fig. 13B) (Chung et al., 2020).

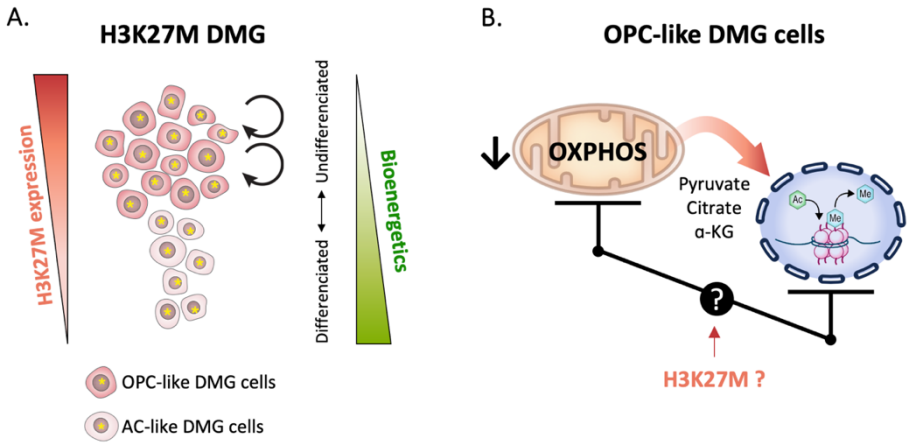


Figure 13. Lien potentiel entre l'oncohistone H3 K27M et le métabolisme énergétique des cellules de DMG. A. L'architecture cellulaire des DMG comporte un compartiment indifférencié (*OPC-like DMG cells*) majoritaire, doté d'une capacité proliférative et présentant un niveau d'expression élevé de l'oncohistone H3 K27M par rapport au compartiment plus différencié (*AC-like DMG cells*). Dans les cellules *OPC-like*, l'activité des voies bioénergétiques (chaîne respiratoire mitochondriale et production d'ATP par la voie glycolytique) apparait réduite par rapport aux cellules *AC-like*. **B.** Schéma illustrant l'hypothèse d'un impact de la mutation H3 K27M sur les aspects bioénergétiques des cellules de DMG. Certains métabolites (*e.g.* pyruvate, citrate, α-KG) sont partagés entre le métabolisme énergétique mitochondrial et la machinerie épigénétique. La mobilisation importante de ces métabolites pour maintenir les altérations épigénétiques imposées par H3 K27M en réduirait la disponibilité pour alimenter le métabolisme OXPHOS. Cette hypothèse pourrait expliquer la diminution du

métabolisme OXPHOS observée dans les cellules de DMG *OPC-like* exprimant fortement l'oncohistone. (Adapté de Filbin et al., 2018).

Points clés

- Les DMG présentent une **hétérogénéité cellulaire :** le compartiment tumoral immature *OPC-like* (majoritaire) est caractérisé par un **niveau élevé d'expression des oncohistones** par rapport aux cellules plus différenciées *OC-* et *AC-like* (minoritaires).
- Les mutations H3 K27M **bloquent la différenciation** des OPC et favorisent le maintien d'un **état cellulaire prolifératif immature** dans les DMG.
- H3.3 K27M **réprime *p16*^{INK4a}** et favorise la **prolifération** et l'**échappement à la senescence** des cellules de DMG.
- H3.3 K27M participe à la croissance tumorale des DMG en induisant la **stabilisation de MYC** (par l'activation de la voie de signalisation des **MAPK**) et l'activation des voies de signalisation **JAK/STAT3** et **NOTCH**.
- En contrôlant **le métabolisme du glucose et de la glutamine**, H3.3 K27M pourrait réguler le métabolisme énergétique des cellules DMG.

IV Les thérapies dans le contexte des DMG altérés H3K27

Notre compréhension fondamentale des altérations moléculaires régissant les DMG mutés H3 K27M a considérablement évolué au cours de ces 10 dernières années, notamment depuis la découverte des oncohistones. Ces avancées de la recherche ont eu un impact sur la classification des pHGG mais également sur leur diagnostic. En effet, la découverte de marqueurs moléculaires spécifiques tend à faire évoluer les pratiques cliniques, en favorisant notamment la réalisation de biopsies stéréotaxiques, dont la pratique s'est répandue et perfectionnée, dans le parcours de soin des patients pour permettre un diagnostic de certitude (Puget et al., 2015; Bailleul et al., 2021). Dorénavant, le diagnostic intégré des DMG s'appuie ainsi idéalement à la fois sur des symptômes neurologiques récurrents (*e.g.* ataxie, neuropathies crâniennes, signes d'atteintes des voies longues), l'âge du patient, la neuro-imagerie et l'histologie, auxquels s'ajoutent des marqueurs moléculaires caractéristiques (*e.g.* mutations H3 K27M, perte de H3K27me3) (Bredlau and Korones, 2014; Louis et al., 2021).

Toutefois, en termes thérapeutiques, les progrès de la recherche n'ont pas encore abouti aux retombées cliniques escomptées et les DMG demeurent incurables et quasi systématiquement fatals, avec un pronostic des plus sombres en cancérologie (*i.e.* taux de survie à 2 ans inférieur à 10% et médiane de survie autour de 11 mois).

IV.1. La radiothérapie : unique traitement de référence des DMG

Du fait de leur localisation et de leur caractère infiltrant, les DMG sont inéligibles à une exérèse chirurgicale complète. Dans ce contexte, depuis maintenant plus de 50 ans, la radiothérapie s'est imposée comme l'unique traitement de référence des DMG. Toutefois, ce traitement par radiothérapie, bien que permettant de réduire les symptômes neurologiques chez certains patients, n'apparait que palliatif et n'apporte qu'un modeste bénéfice de survie d'environ 3-4 mois, quasi systématiquement suivi d'une re-progression tumorale (El-Khouly et al., 2019).

IV.1.1. Prise en charge actuelle et essais cliniques antérieurs

IV.1.1.1. Protocole de radiothérapie conventionnel et dans le cadre d'essais cliniques

Dans les glioblastomes (GBM), le traitement de référence post-chirurgie consiste en l'association d'un protocole fractionné de radiothérapie (par photons) avec une administration concomitante et adjuvante (six cures supplémentaires) de témozolomide (agent alkylant) (Stupp et al., 2005). En l'absence de consensus, les DMG ont historiquement été assimilés aux glioblastomes de l'adulte d'un point de vue thérapeutique (El-Khouly et al., 2019). Inéligibles à l'exérèse chirurgicale, les DMG nouvellement diagnostiqués sont ainsi traités par la radiothérapie (par photons) focale externe conformationnelle 3D en première intention. Dans ce contexte, le schéma conventionnellement utilisé, identique à celui indiqué (post-chirurgie) pour le GBM, consiste en une dose totale de 54-60Gy, délivrée en 30-33 fractions quotidiennes (5 jours par semaines pendant 6 semaines) de 1.8-2Gy (Cohen et al., 2017; Kim and Suh, 2023).

Plusieurs études ont évalué le bénéfice potentiel de schémas de fractionnement différents (*i.e.* hypo- et hyperfractionnés) (Hargrave et al., 2006; Gallitto et al., 2019). Toutefois, même si les schémas hypofractionnés pourraient représenter une alternative intéressante pour la qualité de vie des patients et des familles, ces essais cliniques ne montraient pas d'amélioration de la survie des patients atteints de DMG (Gallitto et al., 2019). Plus récemment, des modalités d'hadronthérapie (*e.g.* proton thérapie) ont également été testées sur des petites cohortes de patients sans montrer, à ce jour, de réel bénéfice par rapport au traitement conventionnel par photons (Muroi et al., 2020).

Bien que différents profils de réponse à la radiothérapie soient observés chez les patients, allant d'une réponse partielle (cas le moins défavorable) à la progression au cours du traitement (cas le plus défavorable), la (re-)progression (majoritairement locale) des DMG

dans une période de quelques mois post-radiothérapie demeure inéluctable (Kim and Suh, 2023; Werbrouck et al., 2019; Zhu et al., 2021). L'option majoritairement retenue par les cliniciens au moment de cette (re-)progression est la ré-irradiation des tumeurs selon un schéma hypofractionné (30-40Gy par fraction de 3-4Gy) (El-Khouly et al., 2019). L'intérêt potentiel de cette approche a été évalué sur des cohortes de patients restreintes ; toutefois, plusieurs études rapportent un bénéfice de cette ré-irradiation en termes de survie (médiane de survie d'environ 17-18 mois) et de qualité de vie pour une majorité des patients (Lobon-Iglesias et al., 2018; Gallitto et al., 2019; Lu et al., 2019; Kim and Suh, 2023). Néanmoins, ici encore, ce bénéfice n'est que transitoire et les DMG reprogressent en moyenne dans les 4-5 mois suivant la ré-irradiation (Lu et al., 2019).

IV.1.1.2. Combinaisons de radio-chimiothérapies / -thérapies ciblées

Utilisée pour le traitement de plus de 50% des tumeurs solides de tous types confondus, la radiothérapie est souvent associée à d'autres modalités thérapeutiques (Schaue and McBride, 2015). En ce sens, de nombreuses chimiothérapies cytotoxiques ont fait l'objet d'essais cliniques en combinaison avec la radiothérapie dans le DMG (Bredlau and Korones, 2014; Vanan and Eisenstat, 2015). À ce titre, la combinaison avec le témozolomide (*i.e.* traitement de référence des GBM de l'adulte) a été largement évaluée. Néanmoins, cette combinaison n'a montré aucun bénéfice en termes de survie chez les patients atteints de DMG (Fig. 14) (Jalali et al., 2010; Chassot et al., 2012; Vanan and Eisenstat, 2015; El-Khouly et al., 2019). Ces résultats pourraient notamment s'expliquer par le niveau d'expression élevée de la O^6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), acteur central de la résistance au témozolomide, dans les cellules mutées H3 K27M (Abe et al., 2020; Hegi et al., 2005).

D'autre part, l'identification d'altérations moléculaires récurrentes ciblables dans les DMG a motivé le lancement d'essais cliniques visant à évaluer l'efficacité de thérapies ciblées en combinaison avec la radiothérapie (Jones et al., 2012; Vanan and Eisenstat, 2015). L'essai clinique de phase II BIOMEDE en est un exemple à l'échelle européenne et proposait, dans sa première version, une approche personnalisée associant à la radiothérapie soit l'erlotinib (inhibiteur de l'EGFR), l'everolimus (inhibiteur de mTOR) ou le dasatinib (inhibiteur multi-kinases) en fonction du profil moléculaire des tumeurs (NCT02233049). Les résultats de cet essai clinique ne montrent cependant pas d'amélioration de la médiane de survie par rapport aux contrôles historiques (radiothérapie seule) (Grill et al., 2023). Plus généralement, à ce jour, aucun essai clinique portant sur une chimiothérapie (Fig. 14) ou une thérapie ciblée n'a encore conclu à une d'augmentation significative de la survie des patients (Vanan and Eisenstat, 2015).

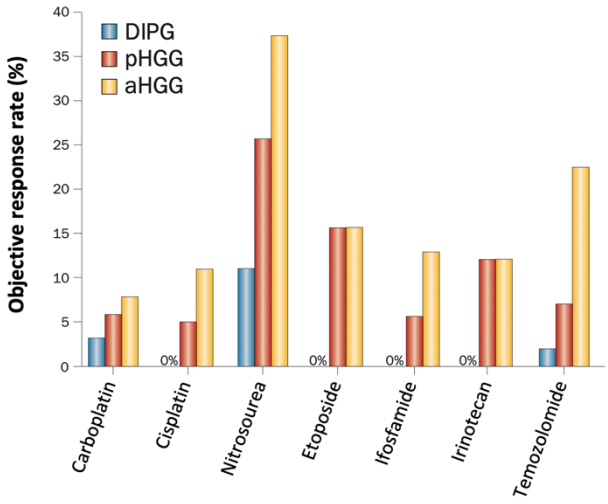


Figure 14. Taux de réponse des DMG du tronc cérébral (ou DIPG) aux chimiothérapies cytotoxiques. Diagramme en barres représentant les taux de réponse à divers agents chimiothérapeutiques obtenus au cours d'essais cliniques dans les DIPG, pHGG (hors DIPG) et HGG de l'adulte (aHGG). Les DIPG apparaissent peu répondeurs à l'ensemble des chimiothérapies cytotoxiques ici évaluées. (Extrait de Jones et al., 2012).

IV.1.2. Radiobiologie des DMG mutés H3 K27M

Fondamentalement, la radiothérapie (externe) consiste en l'application focalisée de rayonnements ionisants (*e.g.* rayons X) au niveau du site tumoral. Ces radiations ionisantes induisent des dommages cellulaires directs, liés à l'ionisation des biomolécules (*e.g.* protéines, lipides, acides nucléiques), ou indirects, en créant un stress oxydant *via* la radiolyse de l'eau et la production subséquente d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), conduisant également à des dommages cellulaires, à l'ADN notamment (Wang et al., 2018). *In fine*, l'accumulation de dommages cellulaires radio-induits provoque l'induction de différents types de morts cellulaires (*e.g.* apoptose, ferroptose) (Adjemian et al., 2020; Lei et al., 2020). Dans ce contexte, la réponse cellulaire à la radiothérapie est multimodale, mettant en jeu divers mécanismes, tels que la réparation des dommages à l'ADN, la détoxification des ROS, la plasticité métabolique ou encore la résistance à différents types de mort cellulaire (Buckley et al., 2020; Rakotomalala et al., 2021b).

IV.1.2.1. Altérations génomiques et profils de réponse à la radiothérapie

Dans le contexte des DMG, certaines altérations génomiques récurrentes affectent les mécanismes gouvernant la radiosensibilité cellulaire et impactent le profil de réponse à la radiothérapie en clinique.

- **Mutations de TP53 et radiorésistance des DMG**

À ce titre, les DMG mutés TP53 (*vs.* $TP53^{WT}$) montrent une propension plus importante à progresser au cours du protocole radiothérapie avec un taux de réponse partielle significativement réduit chez ces patients (Werbrouck et al., 2019). Cette radiorésistance associée aux mutations de TP53 semble reposer sur la perte de certaines fonctions, normalement médiées par la forme sauvage de TP53, mais également sur l'activité propre de la forme mutée (Deland et al., 2021; Werbrouck et al., 2019) ; toutefois, son rationnel biologique précis reste à déterminer.

- **Altérations génomiques favorisant la radiosensibilité**

À contrario, d'autres altérations génomiques sont associées à un profil plus radiosensible. Parmi ces altérations, figurent notamment les mutations récurrentes induisant une perte de fonction de la protéine chaperonne ATRX (Findlay et al., 2022). En effet, Koschmann et collaborateurs ont montré que le *knock-down* d'ATRX augmente la radiosensibilité en altérant l'efficacité de réparation des dommages à l'ADN (par NHEJ). En ce sens, les mutations ATRX sont associées à une meilleure survie chez les patients atteints de pHGG (Koschmann et al., 2016).
D'autre part, les mutations de la kinase ATM pourraient également être associées à un profil plus radiosensible dans les DMG en étant porteurs (Duchatel et al., 2019; Deland et al., 2021).

- **Profil mutationnel de l'histone 3 et réponse à la radiothérapie**

Les liens entre le statut mutationnel de l'histone 3 et la réponse à la radiothérapie des DMG apparaissent plus complexes. Sur une cohorte de 22 patients, Zhu et collaborateurs ont observé que la progression tumorale au cours du traitement de radiothérapie concernait exclusivement des DMG mutés H3.3 K27M. À l'inverse, la majorité des DMG présentant une réponse partielle étaient porteurs de la mutation H3.1 K27M (Fig. 15A) (Zhu et al., 2021). Bien que décrite dans d'autres études, cette dichotomie de profils de réponse à la radiothérapie en fonction du type d'oncohistone K27M apparaît biaisée par la co-ségrégation des mutations de TP53 avec les oncohistones H3.3 K27M (Castel et al., 2015; Werbrouck et al., 2019). Toutefois, la mutation H3.3 K27M (indépendamment de TP53) semblerait tout de même associée à une re-progression post-radiothérapie particulièrement précoce (Fig. 15B) (Werbrouck et al., 2019).
Plus récemment, Deland et collaborateurs ont suggéré que la répression de $p16^{INK4a}$ induite par les oncohistones K27M (quel que soit le variant muté) pourrait exacerber la radiorésistance induite par les mutations de TP53 (Deland et al., 2021). De manière cohérente, les DMG mutés H3.3 K27M et TP53 présentent un pronostic extrêmement péjoratif

(Werbrouck et al., 2019). D'autre part, certaines voies de signalisation (*e.g.* NOTCH et JAK/STAT3), dont l'activation est induite par les oncohistones (*cf.* parties II.2.2.2. et II.2.2.3.), semblent participer au phénotype radiorésistant des cellules de DMG (Taylor et al., 2015; Park et al., 2020).

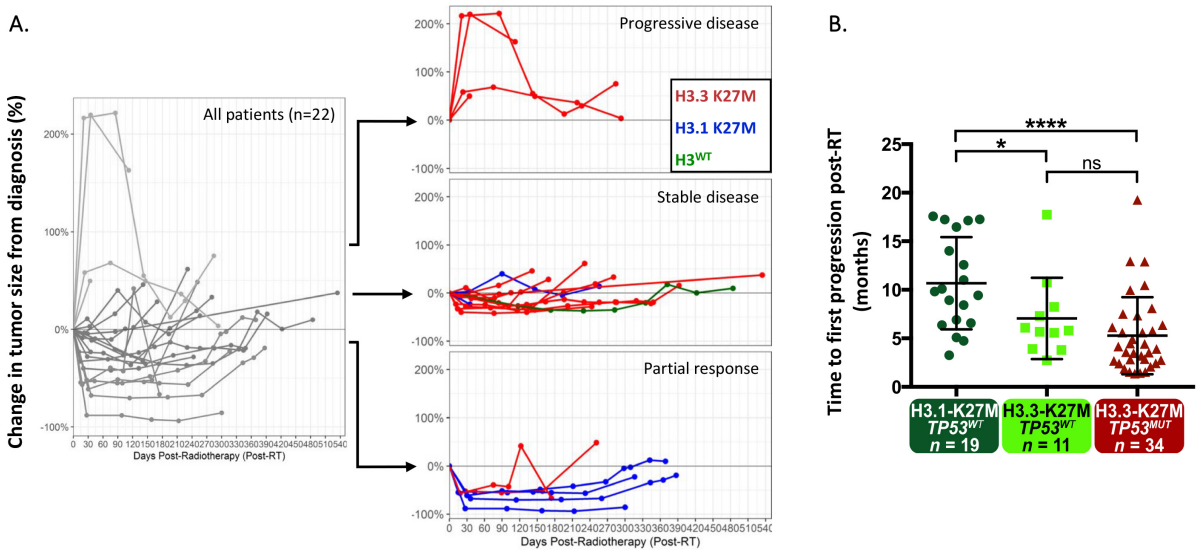


Figure 15. Corrélations entre le profil mutationnel de l'histone 3 et la réponse à la radiothérapie en clinique. **A.** Partie de gauche : Ensemble des courbes de suivi de la taille tumorale (relative à celle mesurée au diagnostic) par neuro-imagerie (IRM) de 22 patients atteints de DMG du tronc cérébral (ou DIPG) après traitement à la radiothérapie (associé ou non à un traitement par chimiothérapies/thérapies ciblées). Partie de droite : les patients sont catégorisés selon leurs profils de réponse à la radiothérapie. De haut en bas : i) Progression de la lésion au cours du traitement (augmentation du volume tumoral et/ou apparition de nouveaux symptômes), ii) Stabilisation de la progression tumorale, iii) Réponse partielle à la radiothérapie (diminution du volume tumoral et/ou la disparition de symptômes). Les courbes correspondant aux DIPG H3.3 K27M, H3.1 K27M et $H3^{WT}$ apparaissent respectivement en rouge, bleu et vert (Zhu et al., 2021). **B.** Graphique représentant le délai (en mois) entre le début du protocole de radiothérapie et la première progression tumorale en fonction du statut mutationnel de H3 (H3.1 et H3.3 K27M) et de *TP53* (WT et MUT). La mutation H3.3 K27M est associée à une (re)progression post-radiothérapie précoce (médiane à 4.5 mois) (Werbrouck et al., 2019). (Extrait de Zhu et al., 2021 et de Werbrouck et al., 2019).

In fine, bien que certaines altérations génomiques (parfois sous-clonales) soient associées à des profils de réponse à la radiothérapie plus ou moins favorables, la radiorésistance innée des DMG, à l'origine de leur (re-)progression précoce, demeure largement inexpliquée. De surcroit, la comparaison d'échantillons biopsiques (pré-traitement) et nécropsiques (post-traitement) de DIPG ne montre pas de changements significatifs de l'architecture clonale des tumeurs, écartant ainsi l'hypothèse d'une radiorésistance uniquement liée à l'expansion d'un clone porteur d'une altération spécifique (Vinci et al., 2018). Ces données suggèrent plutôt l'existence d'un contexte radiorésistant ubiquitaire dans les DMG, demeurant, d'un point de vue mécanistique, largement inexploré, mais auquel pourraient participer les oncohistones K27M.

IV.1.2.2. Oncohistones H3 K27M et réparation des dommages à l'ADN

Les cassures double brin de l'ADN sont majoritairement responsables de la léthalité cellulaire induite par la radiothérapie (Frankenberg-Schwager, 1989). En ce sens, l'efficacité de réparation des dommages à l'ADN figure au rang des principaux paramètres gouvernant la radiosensibilité cellulaire (*Cf.* Rakotomalala et al., 2021b en annexe). Étant donné que la mise en place des mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN (DDR) nécessitent des réarrangements de l'épigénome, il existe des liens étroits entre les processus épigénétiques, la réparation des dommages à l'ADN et ainsi la radiosensibilité (Cabrera-Licona et al., 2021; Dabin et al., 2016; Karakaidos et al., 2020). À titre d'exemple, un pic transitoire de H3K9me3 au niveau des cassures double brin est essentiel à la mise en place du mécanisme de réparation par recombinaison homologue (HR). Dans ce contexte, en perturbant le paysage global des marques H3K9me3 (hyperméthylation), les mutations IDH favorisent la radiosensibilité cellulaire (Sulkowski et al., 2020).

À l'instar des mutations IDH, les oncohistones K27M pourraient ainsi impacter la réponse à la radiothérapie des cellules de DMG en contraignant la dynamique épigénétique, nécessaire à la réparation des dommages à l'ADN, et en modifiant l'expression d'acteurs impliqués dans les voies du DDR. En effet, parmi les marques épigénétiques dont le paysage est altéré par les mutations H3 K27M, certaines présentent un rôle dans la réparation des dommages à l'ADN induits par la radiothérapie. À ce titre, le niveau élevé d'acétylation des histones 3, en particulier sur le résidu lysine 14 (H3K14ac), observé dans les DMG mutés H3 K27M (par rapport à des pHGG $H3^{WT}$) pourrait favoriser la formation du complexe DNA-PK et ainsi la réparation des cassures double brin par NHEJ (Bouquet et al., 2011; Stafford et al., 2018). De même, outre son rôle essentiel dans le maintien du paysage épigénétique imposé par les oncohistones K27M (*cf.* partie I.2.2.2.), les marques H3K36me2 sont également impliquées dans le recrutement précoce des acteurs du mécanisme de NHEJ (*i.e.* Ku70 et NBS1) au niveau des cassures double brin induites par la radiothérapie. En ce sens, la surexpression de SETMAR (histone methyltransferase catalysant de l'apposition de H3K36me2) est associée à des phénomènes de radiorésistance, en particulier dans le GBM de l'adulte (Fnu et al., 2011; Kaur et al., 2020).

Les mutations H3 K27M pourraient également favoriser la réparation des dommages à l'ADN et la radiorésistance des DMG en contrôlant l'expression d'acteurs épigénétiques impliqués dans les mécanismes du DDR, tel que SMARCA4 (Mota et al., 2023 ; Yard et al., 2016).

De manière surprenante au regard des données précédemment évoquées, Zhang et collaborateurs suggèrent que l'induction de la mutation H3.1 K27M, dans des fibroblastes toutefois, diminue le recrutement de facteurs du mécanisme NHEJ (*i.e.* 53BP1) post-irradiation en perturbant le paysage des marques H4K16ac et l'apposition des marques H4K20me2 (An et al., 2020; Zhang et al., 2018). Dans ce modèle, la mutation H3.1 K27M favorise ainsi la radiosensibilité cellulaire (Zhang et al., 2018).

IV.1.2.3. Impacts métaboliques des oncohistones H3 K27M et réponse à la radiothérapie

Dans les DMG, les oncohistones H3 K27M induisent des remaniements du métabolisme cellulaire permettant de soutenir l'activité des KDM, en particulier KDM6A/B, et de maintenir l'hypométhylation des lysines 27 des histones 3 (Chung et al., 2020). Dans d'autres modèles cancéreux, en condition hypoxique, la perte globale des marques H3K27me3 et H3K9me2, liée à la surexpression de KDM6B et KDM3A respectivement, favorise la réparation des dommages à l'ADN et l'acquisition d'un phénotype radiorésistant (Macedo-Silva et al., 2020). En ce sens, *via* ses conséquences épigénétiques, le métabolisme associé aux oncohistones pourrait influencer la réponse à la radiothérapie des DMG.

Par ailleurs, certains profils métaboliques gouvernent la réponse à la radiothérapie en favorisant le maintien de l'homéostasie rédox, la résistance à différents types de morts cellulaires ou encore la biosynthèse de certains composants cellulaires (Tang et al., 2018; Rakotomalala et al., 2021b; McCann et al., 2021). Par exemple, l'orientation du métabolisme de la glutamine vers la biosynthèse des nucléotides, permettant notamment d'alimenter la réparation des dommages à l'ADN, favorise la radiorésistance des GBM de l'adulte (Fu et al., 2019). Bien que largement utilisée pour alimenter le cycle de Krebs, dans les cellules de DMG mutés H3 K27M, la glutamine est également mobilisée pour la synthèse des pyrimidines (Pal et al., 2022). Par ailleurs, un contingent cellulaire élevé de nucléotides puriques a été décrit dans les cellules de DMG *OPC-like* (Mbah et al., 2022). Ce métabolisme particulier des cellules de DMG mutées H3 K27M pourrait impacter leur réponse à la radiothérapie.

In fine, l'ensemble de ces données supportent l'hypothèse d'une influence des mutations H3 K27M sur la radiosensibilité cellulaire, en particulier *via* leurs effets métaboliques et épigénétiques. Toutefois, des études restent nécessaires afin de prouver l'impact potentiel des oncohistones sur le profil de réponse à la radiothérapie des cellules de DMG.

Points clés

- La **radiothérapie palliative** est l'unique traitement de référence des DMG. Bien que certains patients présentent une réponse partielle, il s'en suit quasi systématiquement une **(re-)progression tumorale**.
- Les mutations de TP53 sont associées à un phénotype particulièrement radiorésistant. À l'inverse, les mutations d'ATRX et d'ATM apparaissent plutôt radiosensibilisantes.
- Le **rôle potentiel des oncohistones H3 K27M** dans le profil de réponse à la radiothérapie des DMG demeure largement hypothétique et nécessite de plus amples investigations.

IV.2. Opportunités thérapeutiques associées aux altérations H3K27

Bien que non ciblables en tant que telles, la fréquence des mutations H3 K27M dans les DMG rend le ciblage de leurs conséquences particulièrement attractif. Dans ce contexte, des stratégies thérapeutiques, évaluées pour le traitement des DMG (à des stades pré-cliniques voire cliniques), ont émergé de la compréhension des conséquences moléculaires des oncohistones.

IV.2.1. Les épidrogues dans le DMG

Incontournablement, l'identification et la caractérisation de l'épigénome emblématique des DMG mutés H3 K27M a conduit à l'évaluation de stratégies utilisant des épidrogues dans l'optique de reverser la dérégulation épigénétique inhérentes aux oncohistones.

IV.2.1.1. Stratégies de restauration du paysage des marques H3K27me2/3

- **Ciblage des déméthylases KDM6A/B**

Dès 2014, Hashizume et collaborateurs ont évalué le potentiel thérapeutique de la restauration des effets épigénétique imposés par les mutations H3 K27M. Dans cette optique, leur stratégie a été d'utiliser le GSK-J4, un inhibiteur pharmacologique des KDM6A/B responsables de la déméthylation de H3K27, et ce afin de restaurer le paysage des marques H3K27me2/3 (Hashizume et al., 2014). En effet, de manière cohérente avec le rôle des KDM6A/B dans le maintien de l'hypométhylation caractéristique des DMG, le GSK-J4 induisait un retour progressif des marques H3K27me2/3, s'accompagnant d'effets pré-cliniques spécifiques des DMG mutés H3 K27M intéressants (Hashizume et al., 2014; Chung et al., 2020). Toutefois, bien que traversant la barrière hémato-encéphalique (BHE), à ce jour le GSK-J4 n'est toujours pas en développement clinique, notamment du fait de son instabilité *in vivo* (Katagi et al., 2019*)*.

Relançant le potentiel intérêt du ciblage de KDM6A/B pour restaurer le paysage des marques H3K27me2/3, une récente étude a montré que le GSK-J4 potentialiserait l'effet de la radiothérapie en diminuant l'efficacité de réparation (par recombinaison homologue) des dommages à l'ADN causés par la radiothérapie, et ce *via* la répression de l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes du DDR. Ces effets se traduisent par une efficacité supérieure de l'association entre la radiothérapie et le GSK-J4 par rapport à un traitement de

radiothérapie seul en modèles murins de xénogreffes orthotopiques de cellules de DMG (Katagi et al., 2019).

- **Ciblage de l'activité résiduelle d'EZH2**

Malgré la perturbation de l'activité du complexe PRC2 et la perte globale de H3K27me2/3, le paysage épigénétique imposé par les oncohistones K27M se caractérise tout de même par le maintien de la méthylation, voire l'hyperméthylation, de certains *loci* cible de PRC2. En effet, dans un contexte muté H3 K27M, et bien que confiné à ses cibles de forte affinité, PRC2 conserve un rôle majeur dans la répression de certains gènes suppresseur de tumeur, notamment $p16^{INK4a}$ (Cordero et al., 2017; Mohammad et al., 2017). Dans ce contexte, des stratégies d'inhibition de l'activité d'EZH2, visant à réduire la méthylation de ces *loci*, ont été envisagées. À cet égard, Mohammad et collaborateurs ont montré que l'EPZ6438 et le GSK343 (inhibiteurs pharmacologiques d'EZH2) permettent de restaurer l'expression de $p16^{INK4a}$ et d'inhiber la croissance des cellules de DMG mutés H3 K27M (Fig. 16) (Mohammad et al., 2017). En ce sens, un traitement à l'EPZ6438 améliore significativement la survie de modèles murins de DMG mutés H3 K27M (Zhang et al., 2017).

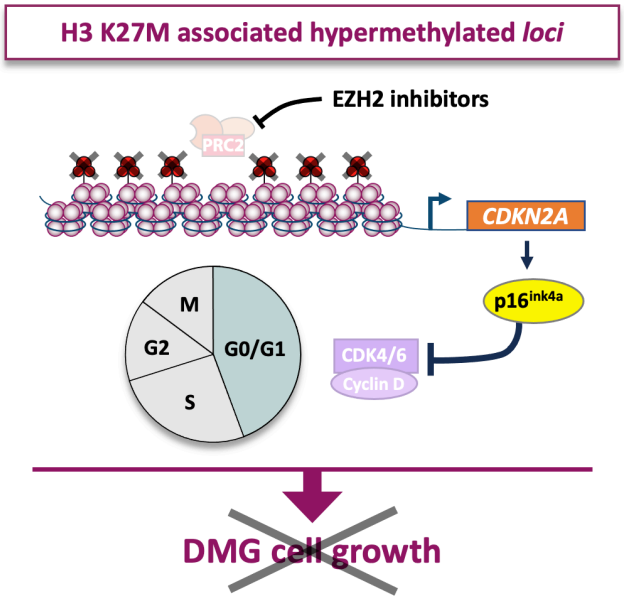


Figure 16. Effet du ciblage d'EZH2 dans les DMG altérés H3 K27. Dans le contexte muté H3 K27M, l'inhibition pharmacologique d'EZH2 réduit l'hyperméthylation des sites de nucléation de PRC2 et restaure l'expression de suppresseurs de tumeurs tels que $p16^{INK4a}$ (codé par *CDKN2A*). En inhibant le couple CDK4/6 – cycline D, $p16^{INK4a}$ empêche alors l'engagement dans le cycle cellulaire et inhibe la croissance cellulaire des DMG.

Par ailleurs, au-delà de l'intérêt du ciblage d'EZH2 dans les cellules de DMG, Keane et collaborateurs suggèrent que l'inhibition d'EZH2 dans la composante microgliale, présente au sein des DMG, permettrait d'en réactiver les fonctions antitumorales (Lin et al., 2018; Lieberman et al., 2019; Keane et al., 2021). Ainsi, ces données supportent un potentiel double

intérêt du ciblage d'EZH2 dans les DMG, *via* son effet direct sur les cellules tumorales mutées H3 K27M, mais également sur les cellules du microenvironnement.

IV.2.1.2. Stratégies de ciblage des acteurs régulant l'acétylation des histones

Bien qu'initialement identifiée comme un effet indirect des mutations H3 K27M, l'altération du paysage d'acétylation des histones (en particulier H3K27ac) constitue une cible thérapeutique dont le développement clinique, pour le traitement des DMG, apparaît plus avancé que celui des stratégies ciblant les marques de H3K27me2/3.

- **Ciblage des protéines à bromodomaines**

Dans les cellules de DMG mutées H3 K27M, la hausse de l'acétylation des lysines 27 des histones 3 (H3K27ac) s'accompagne du recrutement des protéines à bromodomaine BRD2 et BRD4 (Piunti et al., 2017). Ces caractéristiques épigénétiques, inhérentes aux oncohistones, ont motivé l'évaluation du potentiel thérapeutique d'inhibiteurs de protéines à bromodomaine (BETi) pour le traitement des DMG (Leszczynska et al., 2021). À l'échelle moléculaire, les BETi engendrent une diminution des marques H3K27ac, des changements de l'architecture 3D de la chromatine et une perturbation du réseau d'enhancers actifs conduisant à la différenciation des cellules de DMG (Piunti et al., 2017; Wiese et al., 2020; Wang et al., 2021). *In fine*, dans des modèles murins de xénogreffes orthotopiques, le JQ-1 ou encore le I-BET151 (deux pan-BETi) induisent une inhibition significative de la croissance des cellules de DMG, encore plus importante que celle observée avec le GSK-J4 (Piunti et al., 2017). Malgré ces effets pré-cliniques intéressants, l'évaluation de l'efficacité des pan-BETi (*e.g.* OTX015/Birabresib) en clinique a probablement été largement freinée par leur toxicité importante constatée lors de précédents essais cliniques pour d'autres types de cancers (Shorstova et al., 2021).

- **Ciblage des HDAC**

Paradoxalement, les cellules de DMG mutés H3 K27M sont également sensibles à l'inhibition des HDAC, favorisant l'acétylation des histones. En effet, Grasso et collaborateurs ont identifié l'efficacité du panobinostat (inhibiteur pan-HDAC) lors d'un criblage pharmacologique (83 molécules) réalisé sur un panel de 14 lignées cellulaires de DIPG (Grasso et al., 2015). De manière surprenante, la hausse d'acétylation des histones 3 (pan-H3ac) induite par le panobinostat restaure la triméthylation des lysines 27 (H3K27me3) dans les cellules de DIPG mutées H3 K27M (Grasso et al., 2015). En ce sens, une récente étude, visant à identifier de nouvelles opportunités thérapeutiques en oncologie pédiatrique, a montré que

les DMG mutés H3.3 K27M présentent une dépendance à l'activité de l'HDAC2 (Sun et al., 2023). *In vivo*, le panobinostat traverse la BHE et augmente significativement la survie de modèles murins de xénogreffes orthotopiques (Grasso et al., 2015).

Depuis cette étude, plusieurs essais cliniques de phase I évaluant la toxicité de divers inhibiteurs des HDAC (*i.e.* panobinostat, vorinostat, acide valproïque, fimepinostat) sont en cours (voire terminés). De plus, de nombreuses combinaisons pharmacologiques incluant le panobinostat ont fait l'object d'investigations pré-cliniques dans le DMG (Anastas et al., 2019; Lin et al., 2019; Ehteda et al., 2021; Leszczynska et al., 2021). Parmi elles, une synergie avec le marizomib (inhibiteur du protéasome) a été identifiée par criblage d'un panel de 2450 molécules en combinaison avec le panobinostat (Lin et al., 2019). Au niveau moléculaire, l'efficacité de cette combinaison repose sur la perturbation simultanée du flux glycolytique et du métabolisme mitochondrial (de type OXPHOS) des cellules de DMG. Cette perturbation métabolique se traduit par une crise énergétique, notamment caractérisée par une chute drastique de la capacité de réserve respiratoire mitochondriale et du niveau de NAD^+ cellulaire (Lin et al., 2019). Ces données pré-cliniques suggèrent une sensibilité métabolique des cellules de DMG et ont motivé le lancement d'un essai clinique de phase I, visant à déterminer les doses maximales tolérées de chacune des molécules (panobinostat et marizomib) seules et en combo (NCT04341311).

IV.2.2. Ciblage du métabolisme cellulaire dans le DMG

Les cellules de DMG altérés H3K27 présentent diverses dépendances métaboliques associées au maintien de leur paysage épigénétique altéré, ou encore à la biosynthèse de différents composants cellulaires (*e.g.* nucléotides, cholestérol) (Phillips et al., 2019; Chung et al., 2020; Pal et al., 2022; Golbourn et al., 2022).

Par ailleurs, notamment illustré par la crise énergétique à l'origine de la synergie entre le panobinostat et le marizomib, les voies bioénergétiques apparaissent également comme de potentielles cibles d'intérêt pour le traitement des DMG. En ce sens, Lin et collaborateurs ont montré que l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale présente une synergie avec diverses chimiothérapies et thérapies ciblées (*e.g.* vincristine, doxorubicine, everolimus, dasatinib) dans les cellules de DIPG. Ces données suggèrent que le ciblage du métabolisme énergétique mitochondrial pourrait potentialiser la réponse des cellules de DMG à différents types de traitements (Lin et al., 2019).

IV.2.2.1. Ciblage du métabolisme énergétique

À ce jour, le métabolisme énergétique des cellules de DMG demeure relativement peu étudié. Shen et collaborateurs suggèrent que les cellules de DIPG présentent une masse et une activité mitochondriales réduites, favorisant le recours à la voie glycolytique pour

répondre à leurs besoins énergétiques. Dans ce contexte, l'orientation pharmacologique du pyruvate vers le métabolisme mitochondrial (avec le dichloroacétate) augmente la radiosensibilité et réduit la croissance des cellules de DIPG *in vivo* (Shen et al., 2020). De surcroît, l'inhibition concomitante du complexe I de la chaine respiratoire mitochondriale exacerbe ces effets en engendrant probablement à une crise énergétique à l'image de celle observée lors de la combinaison du panobinostat avec le marizomib (Shen et al., 2020; Lin et al., 2019).

D'ailleurs, l'élévation de la biosynthèse du NAD^+ et de l'activité métabolique mitochondriale (*e.g.* expression de PGC-1α, activité de la pyruvate déshydrogénase et du cycle de Krebs) constituent des mécanismes de résistance acquise à cette combinaison (panobinostat et marizomib) (Jane et al., 2020; Lin et al., 2019). De manière intéressante, le ciblage de la nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) ou l'inhibition du métabolisme OXPHOS permettent de contourner cette résistance dans les cellules de DMG (Jane et al., 2020, 2023).

Ces approches, utilisées comme outils de compréhension mécanistique, ont permis de faire la preuve de concept i) de l'impact du métabolisme énergétique sur la réponse aux thérapies des cellules de DMG et ii) de la vulnérabilité des DMG au ciblage du métabolisme énergétique.

IV.2.2.2. Les molécules de la famille des imipridones

Lors d'un essai clinique de phase II (NCT02525692) évaluant un traitement à l'ONC201 (625mg toutes les 3 semaines) sur une cohorte de 17 patients atteints de GBM récurrents, une patiente de 22 ans, présentant une lésion secondaire issu d'un gliome thalamique muté H3.3 K27M, a bénéficié d'un réponse durable avec une régression presque complète de ses deux lésions (85% et 75% de régression) après 8-11 mois de traitement (Arrillaga-Romany et al., 2017). Ce cas clinique a motivé l'évaluation d'un traitement à l'ONC201 plus spécifiquement pour les DMG mutés H3 K27M (NCT03134131 et NCT03416530). Dans ce cadre, l'ONC201 a permis d'obtenir des améliorations radiologiques et cliniques considérables chez de jeunes patients atteints de DIPG mutés H3 K27M (*e.g.* régression du volume tumoral supérieure à 40%, correction complète d'une paralysie faciale) (Chi et al., 2019).

Ces premières données cliniques prometteuses ont motivé l'étude du rationnel mécanistique associé à l'efficacité de l'ONC201 dans les DMG mutés H3 K27M. Cette efficacité semble majoritairement associée à deux mécanismes d'action ; un effet antagoniste sur le récepteur à la dopamine D2 (DRD2) et, surtout, un effet agoniste sur la sous-unité ClpP de la protéase mitochondriale ClpXP (Bonner et al., 2021; Duchatel et al., 2021). Parmi les cibles de ClpXP figurent des protéines du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire mitochondriale (*e.g.* SDHA, IDH3B), dont la dégradation anormale est observée après traitement à l'ONC201 (Ishizawa et al., 2019; Jackson et al., 2023). Le dysfonctionnement subséquent du

métabolisme mitochondrial (*e.g.* abolition du métabolisme OXPHOS, production de ROS mitochondriaux) apparaît largement responsable de l'efficacité de l'ONC201 sur les cellules de DMG (Fig. 17A) (Przystal et al., 2022).

De surcroît, Venneti et collaborateurs ont récemment montré qu'au-delà de son impact sur le métabolisme énergétique mitochondrial, l'ONC201 perturbe les interconnexions entre le métabolisme cellulaire et le paysage épigénétique altéré des DMG. En effet, sous traitement à l'ONC201, l'α-KG produit à partir de la glutamine est converti en L-2-hydroxyglutarate par la LDHA, inhibant l'activité des déméthylases KDM6A/B. Par conséquent, l'ONC201 restaure la triméthylation des lysines 27 des histones 3 (H3K27me3) des cellules H3K27 altérées. Ces perturbations métaboliques et épigénétiques semblent régir la réponse à l'ONC201 des patients en clinique (Fig. 17A) (Venneti et al., 2023).

In fine, l'ONC201 semble procurer un bénéfice de survie inédit dans le traitement des DMG altérés H3K27, permettant d'atteindre une médiane de survie de presque 22 mois par rapport aux 12 mois des contrôles historiques (Fig. 17B) (Venneti et al., 2023). L'ensemble de ces données soulignent l'importance d'identifier et de comprendre les paramètres qui gouvernent le métabolisme des cellules de DMG altérés H3K27, dont le ciblage représente une opportunité thérapeutique inédite.

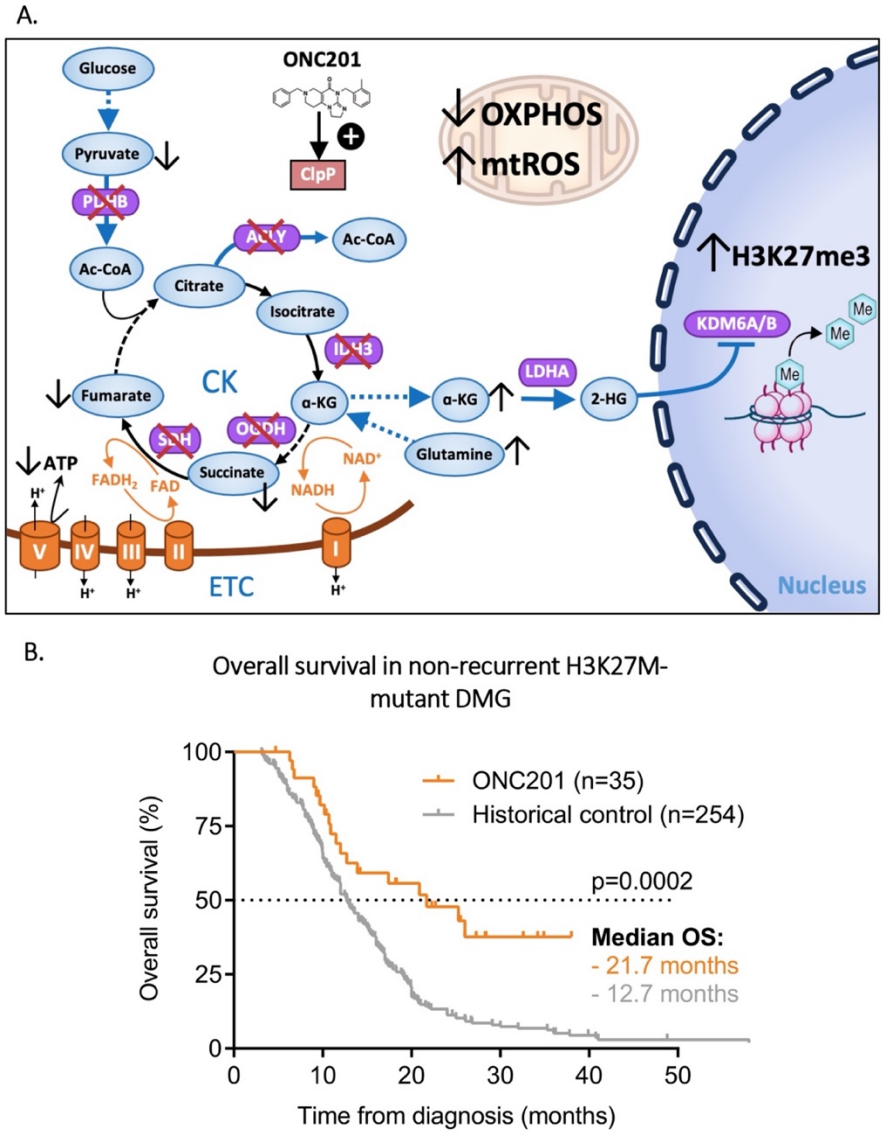


Figure 17. Rationnel de l'efficacité de l'ONC201 dans les DMG altérés H3 K27. A. Schéma illustrant les conséquences cellulaires de l'effet agoniste de l'ONC201 sur la protéase mitochondriale ClpP dans les cellules de DMG altérés H3 K27. Par son effet agoniste sur la protéase mitochondriale ClpP, l'ONC201 induit la dégradation de diverses enzymes du métabolisme (*e.g.* PDHB, ACLY, IDH3A/B, OGDH, SDHA/B) conduisant à des variations du niveau de différents métabolites. Cette perturbation du métabolisme mitochondrial conduit à une abolition du métabolisme de type OXPHOS et à la production de ROS mitochondriaux (mtROS). L'ONC201 induit une hausse du niveau d'α-KG produit à partir de la glutamine et favorise sa conversion en L-2-hydroxyglutarate (2-HG) par la lactate déshydrogénase A (LDHA). Le 2-HG inhibe l'activité des KDM dépendantes de l'α-KG, dont KDM6A/B, et restaure la triméthylation des lysines 27 des histones 3 des DMG altérés H3 K27. **B.** Courbes de Kaplan-Meier représentant la survie globale de patients atteints de DMG altéré H3 K27 inclus dans les essais cliniques NCT03416530 et NCT03134131 (ONC201, n=35) en orange et des contrôles historiques (excluant les décès précoces, n=254) en gris. Dans le cadre de ces essais cliniques, l'ONC201 permet d'atteindre une médiane de survie de 21.7 mois (amélioration de la survie de 9 mois par rapport aux contrôles historiques). (Extrait de Venneti et al., 2023).

Points clés

- L'utilisation d'**épidrogues** permet de reverser certaines **altérations épigénétiques inhérentes aux oncohistones H3 K27M** et a montré des effets pré-cliniques intéressants.
- Les cellules de DMG présentent une vulnérabilité i) à l'induction de **crises énergétiques** et ii) à la perturbation des **interconnexions entre leur métabolisme et leurs altérations épigénétiques**, permettant de restaurer les effets des oncohistones.
- Les **résultats cliniques prometteurs obtenus avec l'ONC201** illustrent le potentiel thérapeutique du ciblage des vulnérabilités métaboliques et épigénétiques des DMG altérés H3K27.

OBJECTIFS DE LA THESE

L'étude de l'**impact de la mutation H3.3 K27M sur le caractère agressif et la réponse aux thérapies des cellules de DMG**, demeurant largement hypothétique, constituait l'objectif principal de ma thèse. Dans le but d'étudier précisément les impacts moléculaires et phénotypiques associés à l'oncohistone, il apparaissait nécessaire de les découpler des différences associées aux contextes cellulaires (*e.g.* origine cellulaire et profil mutationnel), ce que ne permettait pas la simple comparaison entre des lignées cellulaires issues de DMG $H3^{WT}$ et H3.3 K27M. De plus, la majorité des DMG $H3^{WT}$ présentent des altérations épigénétiques « *H3 K27M-like* » liées à d'autres mécanismes alternatifs. Dans ce contexte, les modèles cellulaires isogéniques apparaissaient nécessaires pour comprendre précisément le rôle des oncohistones, en s'affranchissant de référentiels pouvant apporter des biais de différentes natures.

Ainsi, mes travaux de thèse reposaient sur l'**établissement et la caractérisation comparative de modèles cellulaires isogéniques complémentaires**. En effet, dans la continuité des travaux de thèse du Dr. Quentin Bailleul, j'ai poursuivi l'étude de **modèles d'induction de la mutation H3.3 K27M**, établis dans des lignées cellulaires de gliome pédiatrique sustentoriel (initialement $H3^{WT}$). En parallèle, dans l'optique de nous replacer dans un contexte cellulaire de DMG, j'ai établi, **par une approche de *gene editing*, des modèles invalidés pour l'oncohistone**, non disponibles au sein de la communauté scientifique à la genèse de ce projet, et dont la caractérisation a constitué la majorité de mes travaux.

Sur la base de ces modèles, mon projet de thèse ambitionnait d'évaluer l'impact de la mutation H3.3 K27M sur la réponse aux thérapies. Dans ce cadre, nous avons entrepris, d'une part, d'élucider le rôle de l'oncohistone dans la **radiobiologie** des cellules de DMG, et d'autre part, de définir l'impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la **réponse aux composés pharmacologiques** i) de manière globale par criblage et ii) de manière plus ciblée, en particulier concernant l'ONC201, au regard des récents résultats cliniques prometteurs.

Outre l'évaluation de la réponse aux traitements, nous nous sommes également attachés à **identifier les éventuels processus biologiques gouvernés par l'oncohistone potentiellement associés au phénotype agressif des DMG**. Dans ce cadre, l'étude exploratoire de l'impact de l'oncohistone sur la croissance, l'invasion mais surtout sur le métabolisme cellulaire, figurait parmi les objectifs de mon projet de thèse.

Enfin, afin d'**initier la compréhension mécanistique** (émettre des hypothèses concernant les acteurs moléculaires impliqués) des effets biologiques associés à la mutation H3.3 K27M identifiés, ceux-ci seraient mis en regard d'analyses omiques *sans a priori* de nos modèles cellulaires.

RESULTATS

I Chapitre 1 : Impact phénotypique de l'induction de la mutation H3.3 K27M dans des lignées cellulaires de gliome pédiatrique sustentoriel

I.1. Préambule

I.1.1. Contexte de l'étude et hypothèses initiales

Les DMG pédiatriques, au-delà d'être inéligibles à une exérèse chirurgicale complète, sont des tumeurs particulièrement réfractaires aux thérapies anti-cancéreuses (Jones et al., 2012). En effet, faute de réponse aux nombreuses molécules testées lors d'essais cliniques, l'unique traitement de référence pour les DMG est un traitement palliatif de radiothérapie. Systématiquement suivi d'une (re-)progression tumorale, ce traitement n'apporte en effet qu'un modeste bénéfice de survie (quelques mois). Ce phénotype hautement résistant, très caractéristique des DMG, a suscité un engouement pour la compréhension de la biologie de ces tumeurs.

En 2012, la découverte des oncohistones H3 K27M a marqué une avancée majeure dans la caractérisation moléculaire des DMG (Schwartzentruber et al., 2012). La prévalence de ces altérations d'histones a motivé l'étude des perturbations épigénétiques associées. Il est désormais admis que les mutations H3 K27M engendrent une altération drastique de l'épigénome des DMG, notamment caractérisée par une perte globale des marques H3K27me2/3 (Lewis et al., 2013; Bender et al., 2013; Harutyunyan et al., 2019, 2020). Néanmoins, les conséquences transcriptionnelles mais surtout phénotypiques de cette dérégulation épigénétique restent largement méconnues.

Certaines études montrent une association de la mutation H3.3 K27M avec des profils plus radiorésistants en clinique (Castel et al., 2015; Zhu et al., 2021). Cette association a été nuancée par la co-ségrégation entre les oncohistones H3.3 K27M et les mutations de *TP53*, dont le rôle dans la radiorésistance des DMG a été décrit. Dans l'étude de Werbrouck et collaborateurs, la mutation H3.3 K27M semblait tout de même associée à une re-progression post-radiothérapie particulièrement précoce (Werbrouck et al., 2019). Toutefois, à notre connaissance, d'un point de vue expérimental, seules deux études ont évalué l'impact des mutations H3 K27M sur la réponse à la radiothérapie. D'une part, dans l'étude de Funato et collaborateurs, l'induction de la mutation H3.3 K27M dans des cellules neurales progénitrices humaines ne semblait pas impacter la réponse à une dose unique (5Gy) d'irradiation (Funato et al., 2014). D'autre part, l'étude de Zhang et collaborateurs montre une radiosensibilité associée à l'induction de la mutation H3.1 K27M dans des fibroblastes humains (Zhang et al., 2018). Ainsi, de plus amples investigations apparaissent nécessaires pour éclaircir le rôle

putatif des oncohistones K27M dans la réponse à la radiothérapie et, plus globalement, dans la réponse aux thérapies anti-cancéreuses des cellules de DMG.

Dans ce contexte, le laboratoire a entrepris un projet visant à élucider l'implication de la mutation H3.3 K27M dans le phénotype agressif des cellules de gliomes pédiatriques, avec un intérêt particulier pour l'impact sur la réponse aux thérapies anti-cancéreuses.

I.1.2. Méthodologie adoptée

L'identification du transcriptome et des phénotypes spécifiquement imputables à la mutation H3.3 K27M nécessite de comparer des conditions ne différant que par la présence ou l'absence de l'oncohistone. Ainsi, dans l'optique de caractériser l'impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur le phénotype de cellules de gliome pédiatrique, le laboratoire a entrepris le développement de modèles cellulaires isogéniques d'induction de la mutation H3.3 K27M dans trois lignées de cellulaires de gliome pédiatrique sustentoriel initialement non mutées H3 K27M obtenues auprès du Dr. Chris Jones de l'*Institute of Cancer Research* (ICR), Sutton, Royaume-Unis. Parmi elles, la lignée Res259 est issue d'un astrocytome diffus de grade 2 (pLGG) présentant une amplification de *PDGFRA* alors que les lignées SF188 et KNS42 sont issues de glioblastomes multiformes (pHGG) mutés *TP53* (Bax et al., 2009). Ces lignées cellulaires, présentant les altérations moléculaires (*i.e.* mutations de *TP53* et amplification de *PDGFRA*) les plus fréquemment associées à la mutation H3.3 K27M dans les cellules de DMG, constituaient ainsi de bonnes candidates pour l'évaluation des phénotypes imputables à l'oncohistone dans un contexte cancéreux (Mackay et al., 2017; Pathania et al., 2017).

Forts de l'établissement de modèles cellulaires (sur)exprimant stablement soit la forme mutée (H3.3 K27M) soit la forme sauvage du variant H3.3 ($H3.3^{WT}$ en guise de contrôle) pour chacune des trois lignées, nous avons mené une caractérisation phénotypique comparative exploratoire de ces modèles ($H3.3^{WT}$ *vs.* H3.3 K27M). Cette stratégie présente l'avantage de découpler l'impact de la mutation H3.3 K27M des effets associés à l'origine cellulaire et aux autres altérations génomiques (*e.g.* mutations de TP53, amplification de PDGFRA). Nous nous sommes particulièrement focalisés sur la caractérisation de la réponse aux thérapies anti-cancéreuses *in vitro*.

I.2. Article 1 : *"H3.3K27M mutation controls cell growth and resistance to therapies in pediatric glioma cell lines"*

Cet article, en co-premier auteur avec le Dr. Quentin Bailleul, initiateur de l'étude que j'ai poursuivie, présente la caractérisation comparative de nos modèles cellulaires isogéniques induits pour la mutation H3.3 K27M. Dans cette étude, nous identifions une hausse de la croissance cellulaire gouvernée par l'oncohistone, mais surtout son association avec un phénotype plus radiorésistant et un impact sur le profil de réponse aux drogues des cellules de pHGG.

cancers

MDPI

Article

H3.3K27M Mutation Controls Cell Growth and Resistance to Therapies in Pediatric Glioma Cell Lines

Andria Rakotomalala [1,2,†], Quentin Bailleul [1,2,†], Clara Savary [3], Mélanie Arcicasa [1,2], Maud Hamadou [3], Paul Huchedé [3], Audrey Hochart [4], Audrey Restouin [5], Remy Castellano [5], Yves Collette [5], Emma Dieny [3], Audrey Vincent [2], Pierre-Olivier Angrand [2], Xuefen Le Bourhis [2], Pierre Leblond [3,6], Alessandro Furlan [1,2], Marie Castets [3], Eddy Pasquier [5] and Samuel Meignan [1,2,*]

1 Tumorigenesis and Resistance to Treatment Unit, Centre Oscar Lambret, F-59000 Lille, France; andria.rakotomalala.etu@univ-lille.fr (A.R.); quentin.bailleul@roquette.com (Q.B.); m-arcicasa@o-lambret.fr (M.A.); a-furlan@o-lambret.fr (A.F.)
2 University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277-CANTHER—Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France; audrey.vincent@inserm.fr (A.V.); pierre-olivier.angrand@univ-lille1.fr (P.-O.A.); xuefen.le-bourhis@univ-lille.fr (X.L.B.)
3 Lyon Cancer Research Center, Inserm U1052, 69008 Lyon, France; Clara.SAVARY@lyon.unicancer.fr (C.S.); maud.hamadou@etu.univ-lyon1.fr (M.H.); Paul.HUCHEDE@lyon.unicancer.fr (P.H.); emma.dieny@free.fr (E.D.); pierre.leblond@ihope.fr (P.L.); marie.castets@lyon.unicancer.fr (M.C.)
4 CHU Lille, Hematology and Transfusion, F-59000 Lille, France; audrey.hochart@chru-lille.fr
5 Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Aix-Marseille Université, Inserm, CNRS, Institut Paoli Calmettes, 13009 Marseille, France; Audrey.Restouin@inserm.fr (A.R.); Remy.Castellano@inserm.fr (R.C.); Yves.collette@inserm.fr (Y.C.); eddy.pasquier@inserm.fr (E.P.)
6 Lyon Pediatric Hematology and Oncology Institute, 69008 Lyon, France
* Correspondence: s-meignan@o-lambret.fr
† These authors contributed equally to this work.

Simple Summary: Although the involvement of the H3.3K27M mutation in Diffuse Midline Glioma tumorigenesis is now established, its role in their resistance to treatments and, therefore, in their fatal outcome remains poorly documented. Here, thanks to our models of H3.3K27M induction in pediatric glioma cells, we finally shed light on this crucial issue. Hence, we demonstrate here for the first time that H3.3K27M can increase cell radioresistance capabilities independently of TP53 alterations. Moreover, thanks to a drug library screening, we evidenced that this mutation can, depending on the cellular context, drastically modulate the response of these cells to different classes of compounds, thus paving the way for new therapeutic strategies. Altogether, our results provide here the proof that, beyond its role in tumorigenesis, the presence of H3.3K27M mutation by itself alters the response to treatments of pediatric glioma cells.

Abstract: High-grade gliomas represent the most lethal class of pediatric tumors, and their resistance to both radio- and chemotherapy is associated with a poor prognosis. Recurrent mutations affecting histone genes drive the tumorigenesis of some pediatric high-grade gliomas, and H3K27M mutations are notably characteristic of a subtype of gliomas called DMG (Diffuse Midline Gliomas). This dominant negative mutation impairs H3K27 trimethylation, leading to profound epigenetic modifications of genes expression. Even though this mutation was described as a driver event in tumorigenesis, its role in tumor cell resistance to treatments has not been deciphered so far. To tackle this issue, we expressed the H3.3K27M mutated histone in three initially H3K27-unmutated pediatric glioma cell lines, Res259, SF188, and KNS42. First, we validated these new H3.3K27M-expressing models at the molecular level and showed that K27M expression is associated with pleiotropic effects on the transcriptomic signature, largely dependent on cell context. We observed that the mutation triggered an increase in cell growth in Res259 and SF188 cells, associated with higher clonogenic capacities. Interestingly, we evidenced that the mutation confers an increased resistance to ionizing radiations in Res259 and KNS42 cells. Moreover, we showed that H3.3K27M mutation impacts the sensitivity of Res259 cells to specific drugs among a library of 80 anticancerous compounds. Altogether, these data highlight that, beyond its tumorigenic role, H3.3K27M mutation is strongly involved in pediatric glioma cells' resistance to therapies, likely through transcriptomic reprogramming.

check for updates

Citation: Rakotomalala, A.; Bailleul, Q.; Savary, C.; Arcicasa, M.; Hamadou, M.; Huchedé, P.; Hochart, A.; Restouin, A.; Castellano, R.; Collette, Y.; et al. H3.3K27M Mutation Controls Cell Growth and Resistance to Therapies in Pediatric Glioma Cell Lines. *Cancers* **2021**, *13*, 5551. https://doi.org/10.3390/cancers13215551

Academic Editor: Stefano Mastrangelo

Received: 7 October 2021
Accepted: 1 November 2021
Published: 5 November 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/).

Keywords: H3.3K27M; glioma; child; resistance to therapies; radiotherapy

1. Introduction

Tumors of the central nervous system (CNS) are the most frequent solid tumors in children, representing around 25% of pediatric cancers [1]. Among those, glial tumors, or gliomas, represent approximately half of the contingent [2]. They are subdivided into low-grade glioma (LGG, WHO grade I and II) and high-grade glioma (HGG, WHO grade III and IV), which strongly differ in their prognosis, with a 5-year survival of 91% for LGG and only 46% for HGG patients [3]. Among HGG, the Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG), which accounts for 15 to 20% of childhood CNS tumors [4], constitutes a unique entity. Indeed, DIPGs have a dismal prognosis with a median survival of less than 12 months and a 2-year survival rate of around 10% [5]. Surgical resection is precluded by the location in the brainstem and by their highly infiltrative properties.

DIPGs are almost exclusively pediatric and to date, the extrapolation of data obtained from adult glioma patients has proven insufficient to increase the patient's survival [6]. They are extremely resistant to all current therapies, including chemotherapies, targeted therapies and ionizing radiations. Numerous clinical trials have been conducted for 40 years, but none significantly increased patient survival [7]. The current standard of care remains fractionated radiotherapy (1.8 Gy daily for 30 days) [8], which is only palliative.

The discovery of the recurrent H3K27M somatic mutations in histone H3 genes provided new insights into the biology of DIPG [9–12]. These mono-allelic mutations lead to the replacement of a lysine by a methionine in position 27 of the histone H3 proteins. They occur more frequently in the *H3F3A* gene (around 73% of cases), coding the H3.3 variant, but are also found in the *HIST1H3B/C* gene, coding for the H3.1 variant (around 26% of cases). Mutation in the H3.2 variant was also detected in a few tumors (<1% of cases). H3K27M mutations have a dominant-negative effect that results in a global loss of the H3K27me3 epigenetic marks in the genome [13]. They were shown to be an early event and to drive tumorigenesis, in combination with *TP53* mutation and *PDGFRA* amplification [14–16]. Accordingly, the 2016 update of the WHO classification introduced a new entity, the Diffuse Midline Glioma H3K27M mutant [17].

Of note, epigenetic alterations are common in pediatric HGG. Indeed, most H3K27 non-mutated DIPG and PFA (Posterior Fossa A) ependymomas display a similar epigenetic rewiring as Diffuse Midline Glioma H3K27M mutant, notably driven by EZHIP overexpression [18–22]. Furthermore, H3G34R/V mutations are observed in supratentorial pediatric HGGs, and cause other epigenetic alterations responsible for aberrant transcriptional programs in these cancers [9,12,23,24]. Altogether, these data highlight the crucial role of epigenetic alterations for pHGG development. Owing to this context, therapies targeting epigenetic alterations linked to the H3K27M mutations have been evaluated in DIPG cells [25]. For example, promising pre-clinical results were obtained using GSK-J4, an inhibitor of the demethylase JMJD3, which is responsible for the demethylation of H3K27 [26]. However, it seems that this drug is rapidly transformed in vivo in GSK-J1, which has a limited therapeutic potential due to decreased cell permeability [26,27]. In addition, panobinostat, an HDAC inhibitor, was highlighted in a screening of pharmacological molecules against DIPG cells, independently of the H3K27M status [28,29]. However, the ability of this drug to improve the survival of DIPG-xenografted mice was only partial [28,30]. Similarly, the role of the H3.3K27M mutation in the regulation of the Notch pathway led to the evaluation of its inhibition in DIPG models, without a clear demonstration of the efficacy of this approach so far [24,31].

Beyond these targets, to the best of our knowledge, the specific impact of H3K27M mutation in cell resistance to a wide range of therapies has not been elucidated. In that frame, we here evaluate the impact of inducing H3.3K27M mutation in both low- and high-grade pediatric glioma cells. We introduced the K27M-mutated *H3F3A* gene in pLGG

and pHGG cell lines and assessed the consequences on epigenetic marks, gene expression, and biological processes, including cell growth and clonogenicity. Finally, we evaluated, for the first time, the specific impact of the mutation on the response to a wide panel of anticancer drugs but also to ionizing radiations, which remain the standard of care treatment in the clinic.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

Human pediatric high-grade glioma cell lines SF188 and KNS42 (grade IV, glioblastoma multiform) and low-grade glioma cell line Res259 (grade II, diffuse astrocytoma) were kindly provided by Dr Chris Jones (The Institute of Cancer Research, Sutton, UK). Among other genetic alterations, SF188 cells harbor *MYC* and *CCND1* amplifications, KNS42 cells have a low-level copy number gain of *PI3KCA* locus and, Res259 cells harbor an amplification of *PDGFRA* and a deletion of *CDKN2A/B*. A more detailed phenotypic and molecular characterization of these cell lines was previously described by Bax and colleagues [32]. All cell lines were grown as a monolayer in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, non-essential amino acid solution and antibiotics cocktail (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). All cell lines were free of mycoplasma contamination. Cells were incubated in a humid atmosphere at 37 °C with 5% CO_2.

2.2. Molecular Cell Engineering

Cells were dissociated, collected and 1×10^6 cells was transfected using Cell Line NucleofectorTM Kit V (Lonza, Bâle, Switzerland) with 1µg of plasmid containing K27M mutated *H3F3A* gene fused with the *mCherry* gene, and bearing a resistance gene for Hygromycin B. As a control, cells were transfected with a similar plasmid containing the WT *H3F3A* gene. After 2 days, Hygromycin B was added at 400 µg/mL. After 2 weeks of selection, cells were sorted with an ARIA III SORP (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) flow cytometer using the 561 nm laser line and the emission filter 610/20.

2.3. Confocal Microscopy

Cells were seeded in a chambered 8-well coverslip µ-Slide (Ibidi, Gräfelfing, Germany) at a density of 25,000 cells per well. After 24 to 48 h of incubation, cells were labeled with Hoechst (NucBlue, Invitrogen, Waltham, MA, USA) to visualize the cell nuclei. Cells were then observed by confocal laser scanning microscopy (LSM 880, Zeiss, Oberkochen, Germany), using a Laser diode (405 nm) and a Laser line (561 nm), and the respective appropriate emission filters (445/50 and 605/70) with a 20× objective.

2.4. Immunoblotting and Histone Marks Levels Analysis

For western blot analysis, histones were collected using a histone extraction kit (Abcam, Cambridge, UK). Protein concentration was determined by BCA Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were saturated with a solution of bovine serum albumine 5% and washed with TBS-Tween 0.2% solution after antibody incubations. The following primary antibodies were used: Rabbit anti-H3K27M (Abcam ab190631, Cambridge, UK), rabbit anti-H3.3 (Abcam ab97968, Cambridge, UK), rabbit anti-H4 (Cell Signaling 13919, Danvers, MA, USA), rabbit anti-H3K27me1/me2/me3 (Cell Signaling 84932/9728/9733, Danvers, MA, USA), rabbit anti-H3K27ac (Abcam ab195417, Cambridge, UK). All primary antibodies were diluted at $^1/_{1000}$. The secondary anti-rabbit antibody coupled with HRP (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) was diluted at $^1/_{2000}$ in BSA buffer. Signals were revealed using Luminata Crescendo Western HRP Substrate (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) and detected with the Fusion Solo S system (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

Complementarily, to quantify H3K27me1/2/3 and H3K27ac marks, a multiplexed screening of histone H3 post-translational marks was also performed using the Luminex xMAP technology assay through an ActiveMotif service delivery. Briefly, 750,000 cells were

harvested, centrifuged, and pellet samples were sent to ActiveMotif. Relative histone H3 concentrations in the samples were determined using the H3 Total beads. Multiplex assays were performed according to relative abundance using sample volumes normalized for histone H3 concentration. The assay plate was read on the Luminex LX200 Instrument. Samples were tested in duplicate read in a Magpix instrument and data exported as CSV files. Data sets with equivalent H3 Total signals were selected for downstream analysis. Net median fluorescent Intensity (Net MFI) associated with each PTM-specific bead was expressed as a ratio relative to Histone H3 Total signals for each well. Ratio values were averaged for each sample input amount, and percent change in the ratio relative to the reference samples was determined. T-tests at the 95% confidence interval were performed to assess PTM changes. A control lysate was also included to check the multiplex assay execution.

2.5. Growth Assay

Cells were seeded in 96-well plates (250 cells/well for SF188 and Res259 and 500 cells/well for KNS42), and the plate was placed in an Incucyte video microscope (Essen Bioscience, Royston, UK) that measured the cell confluency daily throughout the experiment.

2.6. Cell Cycle Analysis

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

2.7. RNA-Seq Analysis

RNA was extracted using the Nucleospin RNA kit following the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) with on-column DNA digestion. RNA quality was evaluated using the 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent, Santa Clara, CA, USA). RIN scores above 9 were considered acceptable for RNA-seq experiments. RNA libraries were prepared using the TruSeq™ RNA Library Preparation Kit v2 and run on the Illumina NovaSeq 6000 Sequencing System (NovaSeq 6000 SP Reagent Kit, 200 cycles, Illumina, San Diego, CA, USA) to generate 2 × 100 million paired end reads in the iGenSeq Platform of the Paris Brain Institute.

Quality control of human pediatric glioma cell lines SF188, KNS42 and Res259 RNA-seq data was assessed using default parameters of FastQC (version 0.11.9; https://github.com/s-andrews/FastQC; visited on 13 March 2021). Pseudo-alignment based on the human transcriptome annotation Ensembl v96 and transcript-level quantification were performed using Kallisto (version 0.46.1; https://github.com/pachterlab/kallisto; visited on 13 March 2021) [33] with "bias" and "plaintext" parameters. Transcript-level expression was summarized into gene-level expression using tximport R library (version 1.18.0; https://github.com/mikelove/tximport; visited on 13 March 2021) [3] using "type = kallisto", "ignoreTxVersion = True" and "countsFromAbundance = lengthScaledTPM" parameters. The Ensembl v96 annotation used by tximport was provided by the AnnotationHub R library (version 2.22.1; https://github.com/Bioconductor/AnnotationHub; visited on 13 March 2021) [34]. Finally, Transcripts Per Kilobase Million (TPM) expression values were then transformed in $\log^2$(TPM + 2).

Pathway RespOnsive GENes (PROGENy) is a computational method and R software package that infers pathway activity from gene expression data [35]. This approach was built by analyzing large-scale gene expression changes from short-term perturbation experiments to capture the primary response to different stimuli. Z-scores were calculated from gene expression changes for a large compendium of publicly available perturbation experiments that yield a definition of gene expression signatures specific to 11 pathways EGFR, MAPK, PI3K, VEGF, JAK- STAT, TGFb, TNFa, NFkB, Hypoxia, p53-mediated DNA

damage response and Trail (apoptosis). We used the progeny function (progeny R library v.1.14.0; https://github.com/saezlab/progeny; visited on 13 March 2021) on the full gene expression to quantify pathway activation for each cell line. Functional enrichment analyses were undertaken using the integrative web-based application EnrichR (https://maayanlab.cloud/Enrichr; visited on 13 March 2021).

2.8. Zebrafish Embryos Xenografts

For the local dissemination study, AB/TU zebrafish (*Danio rerio*) embryos were raised in a dedicated platform (Animalerie Zebrafish Rockefeller, Université de Lyon). Prior to injection, 2×10^6 Res259-H3.3 and Res259-H3.3K27M cells were harvested, rinsed in serum-free medium and resuspended in 30 µL of PBS. At 48 h post-fecundation, zebrafish embryos were dechorionated with pronase (10165921001, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), anesthetized with tricaine (E10521, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and injected with approximately 20 nL of either Res259-H3.3 or Res259-H3.3K27M cells in the yolk sac. Embryos were further incubated at 28 °C for 48 h in E3 medium. To quantify cells that disseminated locally in the yolk sac, embryos were fixed for 6 h in 4% paraformaldehyde (PFA) at 4 °C. Embryos were then embedded in 1% agarose columns and placed so that the yolk sac faces the lens for Selective Plane Illumination Microscopy (SPIM) imaging using a Zeiss LIGHTSHEET Z.1 with a W Plan-Apochromat 20×/1.0 detection objective (Zeiss, Oberkochen, Germany). Acquisitions were realized using the Zen 2014 SP1 black edition software and 3D reconstructions were made from all z-stacks using Arivis Vision4D 3.4 (Arivis AG, Rostock, Germany). A tumor was qualified as locally disseminated when more than five cells detached from the principal mass were detected.

2.9. Clonogenicity Assay and Ionizing Radiations

Cells were seeded into 12-well culture plates (200 cells/well). Six hours later, cells were irradiated with fractions of 0, 1, 2 or 3 Grays per day for 3 consecutive days using a linear accelerator XSTRAHL 100 (photons of 50 kV, dose rate of 1.25 Gy/min). After irradiation, cells were maintained for 10 days, then colonies were revealed by crystal violet staining. Colonies are defined to consist of at least 50 cells (approximately corresponding to the minimal colony size detectable by eye) and were manually counted using a colony counter pen [36]. The Plating Efficiency (PE) is the ratio (number of colonies counted/number of seeded cells) at 0 Gy and the Survival Fraction (SF) is the ratio (number of colonies after irradiation/(PE × number of seeded cells)). The results were represented as a survival curve (SF depending on the irradiation dose) on a logarithmic scale.

2.10. Screening of Chemotherapeutic Drugs

Drug sensitivity and resistance profiling was performed on human Res259, SF188 and KNS42 cell lines. The drug screening library included 80 substances consisting of a broad range of conventional chemotherapeutics and targeted agents (Table S1). Each compound was tested in four concentrations separated by one log at a constant DMSO level (1%). This allows covering four concentration logs and determining IC50 values. Briefly, 1250 living cells were seeded per well in 96-well plates and incubated in the presence of compounds in a humidified environment at 37 °C and 5% CO_2. As described by Bax et al., PLOS One, 2009, low-grade (i.e., grade II) pediatric glioma Res259 cells displayed a shorter doubling time (approximately 24 h) compared to high grade (i.e., grade IV) glioma SF188 and KNS42 cells (doubling times of 26 h and 48 h, respectively). Therefore, we performed our drug sensitivity assays for 72 h according to the standards [32]. Cell viability was measured using the CellTiter-Glo luminescent assay (Promega, Madison, WI, USA) and the data were normalized to negative control wells (DMSO only). Half-maximal inhibitory concentration values (IC_{50}) were deduced from dose-response curves obtained using GraphPad Prism software.

Subsequently, precise IC_{50} evaluation of the top 4 agents showing resistance in the K27M transfected cells was performed with the same protocol, this time with a range of 8 concentrations with a 2-fold increment between each concentration.

2.11. Statistical Analysis

All statistical analyses and fittings were performed with GraphPad PRISM software. Two-way ANOVA test was systematically applied to evaluate the significance of in vitro assays. Concerning experiments in zebrafish embryos, the Chi-square (χ^2) test was used to assess the differences in the frequency of disseminated tumors compared to the total number of tumors in each group.

3. Results

3.1. Expression of the H3.3K27M Mutation Decreases H3K27 Trimethylation and Triggers Pleiotropic Transcriptomic Changes in Pediatric Glioma Cell Lines

To investigate the impact of the H3.3K27M mutation on pediatric glioma resistance to therapies, we established stable cell lines expressing the *H3F3A* mutated gene fused with the coding sequence for mCherry fluorescent protein in three pediatric gliomas cell lines: Res259 (WHO Grade II), SF188 and KNS42 (both WHO Grade IV). We thus obtained cells expressing an ectopic mutant histone H3.3, that we will refer to as H3.3K27M thereafter. As a control, we introduced a similar construct leading to the expression of the wild-type *H3F3A* gene in cells, thereafter referred to as H3.3.

We validated the nuclear location of our fusion proteins by fluorescence microscopy (Figure 1a and Figure S1A). Over 99% of cells were mCherry-positive as assessed by flow cytometry after amplification (Figure S1B), confirming the stable expression of our transgenes in our glioma cell models.

We next investigated the expression of H3.3K27M or its wild-type counterpart in our cell lines by western blot (uncropped version available in Figure S2). Thanks to an antibody specifically recognizing the K27M mutation, we confirmed the expression of the mutated protein, fused with mCherry at 42 kDa (25 kDa for the mCherry protein + 17 kDa for H3.3 protein) in the three different H3.3K27M cell lines (Figure 1b). Since no band was detected at the size of the endogenous H3.3 protein using this K27M specific antibody, we validated the absence of this mutation in the glioma cell lines that we selected for this study. Western blot against mCherry displayed the same pattern (Figure S1C), and so did the western blot against pan H3.3 (Figure 1b), with the addition of the bands corresponding to the endogenous wild-type H3.3 proteins. Interestingly, the introduction of our constructs triggered a similar expression level of exogenous H3.3 in H3.3K27M and H3.3 control cells for each cell line (Figure 1b), which warrants the goodness of our models to compare the importance of the H3.3K27M mutated protein with respect to its wild-type counterpart. Moreover, we could check that the level of H3.3 endogenous protein was not modified by our approach and that we did not trigger an aberrant overexpression of exogenous proteins (Figure 1b).

Since H3.3K27M mutation drives epigenetic alterations in patients, we further evaluated the level of relevant epigenetic marks in our cell models. We first checked the level of H3K27 tri- (me3), di- (me2) and mono- (me1) methylation by western blot. In all cell lines, the H3.3K27M mutation induced a strong decrease in the level of repressive marks, especially at the H3K27me3 level but also at the H3K27me2 one (Figure 1b). We confirmed the impact of our constructs on the H3K27me3 level using the Luminex® technology to quantify histone post-translational modifications (Active Motif service delivery, Figure S1D). In contrast, both H3K27me1 and H3K27ac levels were not altered by the mutation in the three cell lines (Figure 1b).

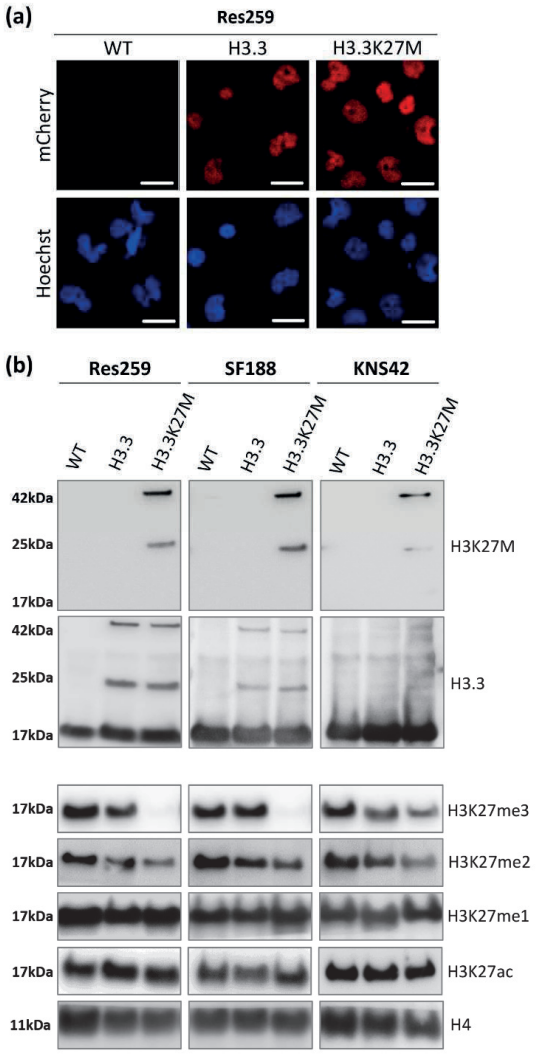


Figure 1. Validation and epigenetic characterization of the H3.3K27M-engineered cell models. (**a**). Microscopy pictures of the Res259 cell line, WT cells or cells expressing the H3F3A mutated (H3.3K27M) or unmutated (H3.3) gene. Fluorescence was acquired for the mCherry signal (top lane) or Hoechst signal (bottom lane). Scale bars 10 µm. (**b**). Western blot of H3K27M and H3.3 was performed on all cell lines. Other epigenetic marks were also evaluated as H3K27me3/me2/me1 and H3K27ac. H4 was used as a loading control.

To obtain a full insight into the molecular repercussions of the H3.3K27M mutation and of the associated epigenetic alterations, we performed a bulk RNAseq analysis to compare the transcriptome of Res259, KNS42 and SF188 cells expressing wild-type or mutant forms of the H3.3 histone. In all cell lines, we observed a wide panel of changes in gene expression patterns, with 1825, 2017, and 1275 genes whose expression was increased or decreased by more than two folds in mutant versus control cell lines in Res259, SF188, and KNS42 cells, respectively. However, only 27 genes were common to all cell lines, without enrichment in a particular signaling pathway (Figure 2a, Table S2). We could not determine whether these genes were differentially expressed in DIPG tumors due to the absence of publicly-available datasets for this rare form of childhood cancer.

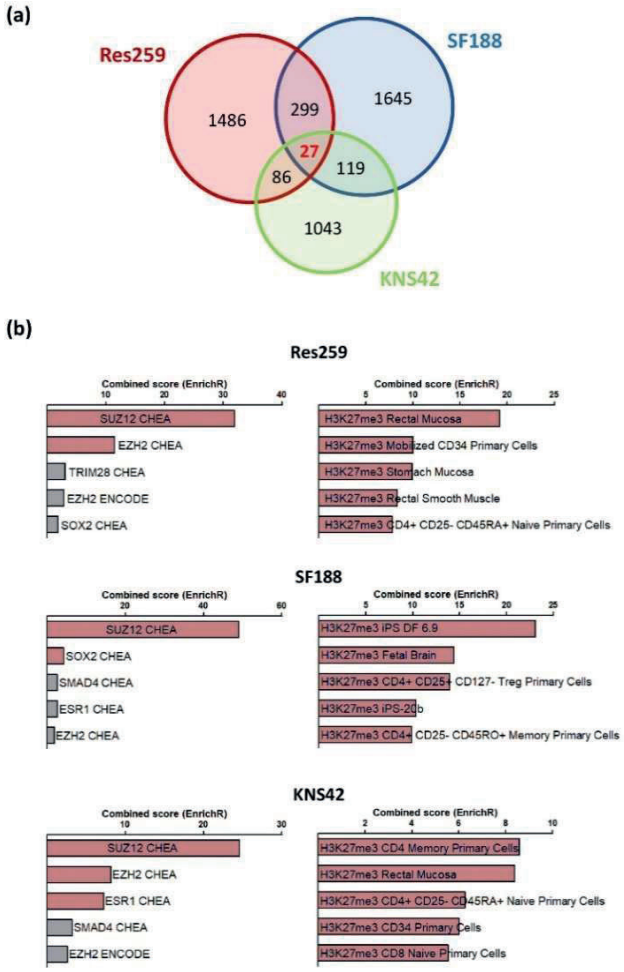


Figure 2. Transcriptomic reprogramming of K27M-expressing glioma cells. (**a**). Venn diagram representation of genes whose expression was changed by more than 2-folds in each H3.3K27M vs. control cell line. (**b**). Bar-graphs obtained via an EnrichR analysis, showing that genes whose expression is changed in each cell line correspond significantly to H3K27me binding regions, defined by Chip-seq analyses in the framework of the ENCODE and ChEA Consensus TFs from ChIP-X (left panel) and Epigenomics Roadmap HM ChIP-seq (right panel) (red bar show significant *p*-value).

Using the EnrichR database, we observed that genes whose expression was changed in each cell line correspond preferentially to an enrichment in signatures associated with H3K27 trimethylation and PRC2 (Polycomb Repressor Complex), when comparing H3.3K27M vs. control cells in the three cell lines (Figure 2b).

Collectively, these results indicate that the stable introduction of the H3.3K27M mutation in glioma cell lines is sufficient to reproduce the epigenetic changes observed in H3K27M mutated gliomas, with subsequent transcriptomic reprogramming that seems to depend on the cellular context.

We then analyzed in silico the activation of distinct pathways using the PROGENy algorithm, a bio-analysis tool developed to infer the activation of specific signaling pathways. We thus observed that the expression of the K27M led to alterations of pathways involved in the regulation of cell proliferation, notably a PI3K-Akt pathway activation in Res259 and SF188 mutant lines as compared to their wild-type counterparts (Figure S3).

3.2. H3.3K27M Increases Cell Growth and Clonogenic Properties of Res259 and SF188 Glioma Cells

We then decided to focus on the impact of the H3.3K27M mutation on glioma cell oncogenic properties. We first monitored cell growth by time-lapse microscopy and showed that Res259 and SF188 but not KNS42 H3.3K27M cells reached confluency before H3.3 control ones (Figure 3a). To further investigate these differences in cell growth, we evaluated cell cycle repartition by flow cytometry. We could not detect any significant differences between H3.3 and H3.3K27M cells for any of the three cell lines, even if we noticed heterogeneity in cell cycle repartition among them (Figures 3b and S4A). These results were consistent with the cell growth curves that displayed similar slopes, even for Res259 and SF188 cells: in both cell lines, the difference between H3.3 and H3.3K27M cells rather relies on an initial delay for H3.3 cells to reach exponential growth.

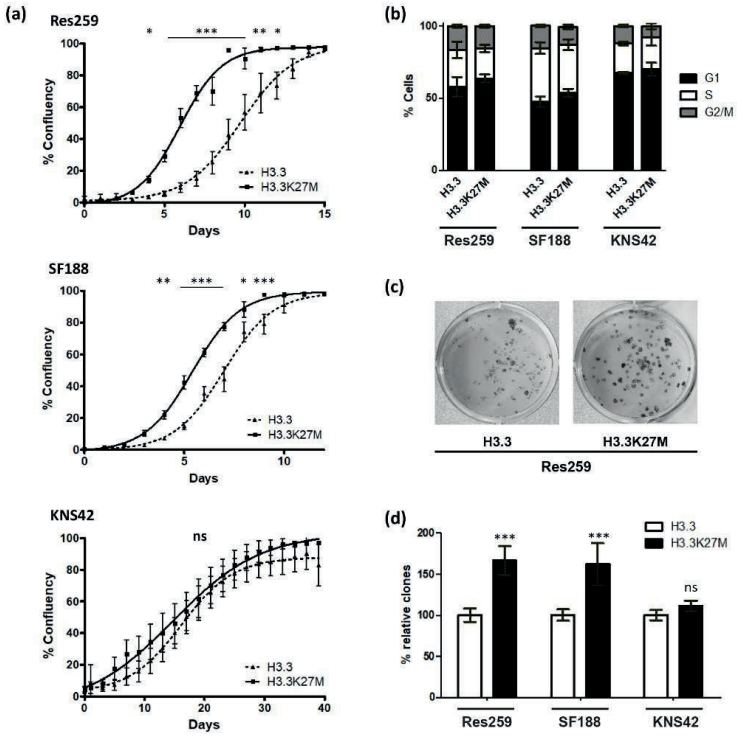


Figure 3. Effects of H3.3K27M induction on cell growth and clonogenic properties. (**a**) Confluency was measured every day using Incucyte. Cell growth curves give the % of confluency as a function of time in days. The assay was conducted in sextuplicate and repeated 3 times. Error bars represent ± SD of sextuplicates. Statistical significance was calculated with an Anova test (*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns—non-significant) (dark line and squares: H3.3K27M; dotted dark line and triangles: H3.3). (**b**) Cell cycle distribution measured by flow cytometry using Vybrant™ DyeCycle™ Violet Stain. (**c**) Pictures of colonies formed by Res259-H3.3 and -H3.3K27M cells 10 days after seeding at low density. (**d**) Percentage of formed colonies normalized to H3.3 condition in each cell line. The experiment was realized in quadruplicate and repeated 3 times. Error bars represents ± SD of quadruplicates. Significance was evaluated using an Anova test. (*** $p < 0.001$, ns—non-significant).

To analyze the clonogenic potential of our cell lines, we then seeded them at low density in 12-well plates and quantified the proportion of cells that could form colonies. This number was much higher for Res259- and SF188-H3.3K27M cells when compared to control cells (66% and 62% increases for Res259 and SF188, respectively) (Figures 3c,d and S4B). In contrast, and in agreement with their cell growth curves, KNS42 cells did not show

significant differences in their ability to form colonies whether they expressed WT H3.3 or H3.3K27M (Figure 3d).

Taken together, these results suggest that H3.3K27M can modify the oncogenic properties of glioma cells, likely due to transcriptomic changes induced by the expression of the mutation.

Given the diffuse nature of DIPG, we then wondered whether H3.3K27M mutation could also impact their in vivo migratory properties. We used a zebrafish xenograft model to evaluate the local dissemination of control and H3.3K27M Res259 cells (Figure S5A,B). We observed a trend suggesting a higher propensity of H3.3K27M mutant cells to locally disseminate, as compared to control cells (52% vs. 27% of disseminating tumors), although this result did not reach statistical significance (Figure S5C).

3.3. H3.3K27M Promotes Resistance to Fractioned Radiotherapy in Res259 and KNS42 Glioma Cells

For more than 40 years, radiotherapy has remained the reference treatment for DIPG, even if these tumors eventually become refractory to this therapy. Thanks to our models, we could investigate whether the H3.3K27M mutation plays a role in this radioresistance.

To address this question, we applied a fractionated protocol of ionizing radiations (0, 1, 2 or 3 Gy) to our cell models every day for 3 consecutive days. After calculating the plating efficiency of each cell line, we were able to quantify the survival rate for each dose of irradiation. No significant difference in the radiosensitivity was observed between H3.3 and H3.3K27M cells in the high-grade glioma SF188 cell line, which displayed an exacerbated basal answer to ionizing radiations, with 80% decrease in survival rate already at 3 × 2 Gy (Figure 4, central panel). On the contrary, we showed that both H3.3K27M low-grade glioma Res259 and high-grade KNS42 cells were significantly more resistant to irradiation when compared to H3.3 cells (Figure 4, top and bottom panels).

These results thus show that H3.3K27M mutation can drive cell resistance to radiotherapy both in low-grade glioma and in high-grade glioma cell lines, which already present a partial radioresistance.

3.4. H3.3K27M Strongly Affects Drug Sensitivity in Low-Grade Glioma Cells

We finally evaluated the impact of the mutation on the Drug Sensitivity/Resistance Profile (DSRP) of glioma cells. A panel of 80 pharmacological agents, including conventional chemotherapeutic drugs and targeted therapies, were tested in our glioma models. The IC50 ratio was determined for each drug in H3.3K27M versus H3.3 cell line pairs. We set the cut-off to >2.5 and <0.4, to conclude on a chemo-resistant or chemo-sensitive effect of the mutation, respectively.

The mutation differentially impacted the DSRP in the three cell lines (Figure 5a). It had very little impact on the drug sensitivity of SF188 and KNS42, with seven and nine drugs showing differential sensitivity, respectively. In sharp contrast, the mutation had a strong impact on the chemo-sensitivity of the Res259 cell line. Indeed, more than 40% of the tested drugs showed differential sensitivity in this cell line, with 22 drugs displaying increased IC_{50} (ratio ranging from 2.5 to 24.1) and 11 drugs displaying decreased IC_{50} (ratio ranging from 0.36 to 0.04). This suggests a global change in DSRP in this cell model.

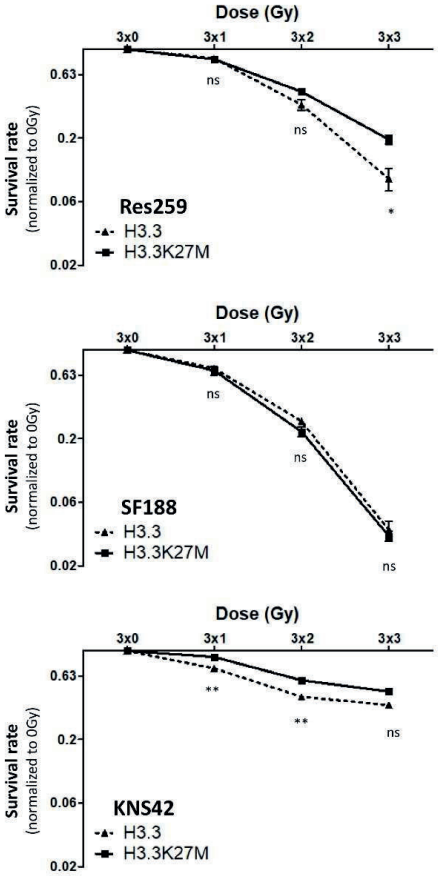


Figure 4. Effect of H3.3K27M induction on cell response to irradiations. The impact of H3.3K27M on cell resistance to ionizing radiations was determined by clonogenic assay. Cells were irradiated with fractions of 0, 1, 2 or 3 Grays per day for 3 consecutive days. After 10 days, colonies were counted. The survival rate (or fraction) is defined as the following ratio: (number of colonies after irradiation/(Plating Efficiency × number of seeded cells)). Results are representative of 3 independent experiments. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns—non-significant.

It is noteworthy that, even if the mutation increases the chemoresistance of KNS42 cell for only six drugs, four of them exhibit a similar trend in the Res259 cells: Temsirolimus, which is an inhibitor of mTOR (IC_{50} ratios of 3.2 and 2.7 for KNS42 and Res259 cell lines, respectively); EPZ5676, that inhibits DOT1L methyltransferase (IC_{50} ratios of 7.3 and 2.9, respectively); Idelalisib, which is an inhibitor of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (IC_{50} ratios of 7.9 and 2.9, respectively), and Alisertib, which is an Aurora A kinase inhibitor (IC_{50} ratios of 24.1 and 19.4, respectively).

We further validated these results by refining the range of concentrations and confirmed the differences between Res259-H3.3 cells and Res259-H3.3K27M cells (Figure 5b).

Collectively, these results show that, beyond its impact on pediatric glioma cell radioresistance, H3.3K27M mutation also alters their DSRP.

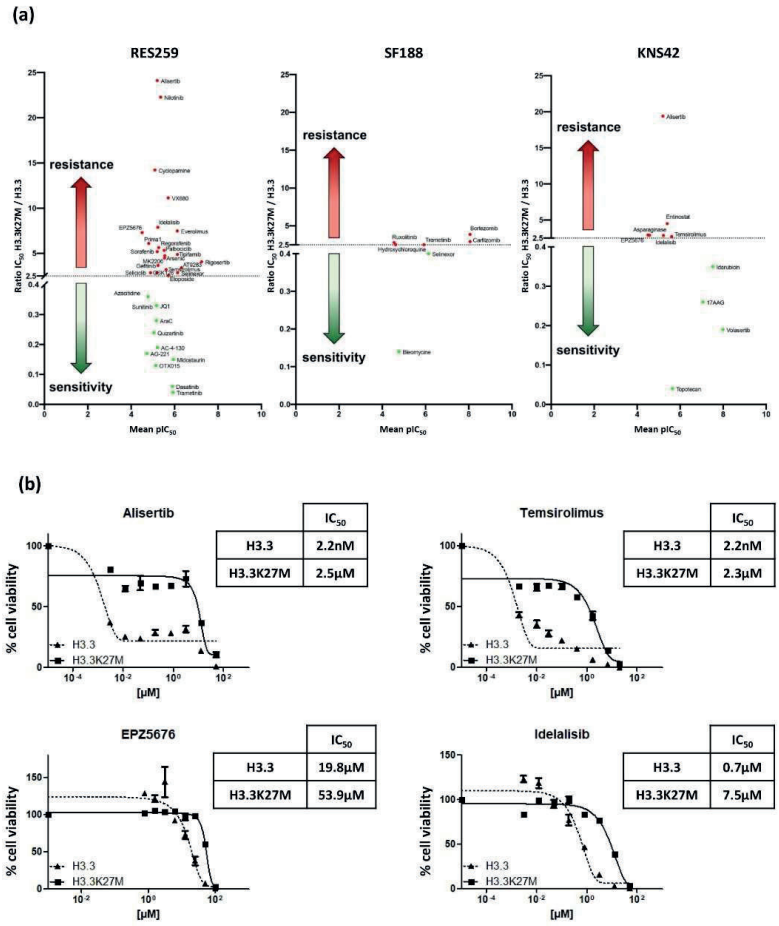


Figure 5. Impact of H3.3K27M on pediatric glioma cell response to a library of antitumoral drugs. (**a**) A library of 80 compounds was tested, each one at 4 different concentrations. Cells were seeded and incubated with compounds for 72 h. The ratio of H3.3K27M/H3.3 IC50 was calculated and reported. Red dots represent a ratio > 2.5 between H3.3K27M and H3.3, i.e., chemoresistance linked to the mutation. Green dots represent a ratio < 0.4, reflecting a chemo-sensitivity conferred by the mutation. (**b**) Res 259 cells were incubated and drugs were added 24 h after incubation. % of viability, relative to the condition 1% DMSO defined as 100% (control), was measured by CellTiter-Glo luminescent assay, 72 h after treatment. The IC_{50} values indicated in the tables were determined by fitting the survival curves. (H3.3 dotted dark line; H3.3K27M dark line).

4. Discussion

Although the H3.3K27M mutation was evidenced in pHGG years ago, and its impact on the epigenetic landscape has been well studied, little is known about its role in resistance to therapies. In order to address this issue, we designed pediatric glioma cell lines, stably expressing the H3.3 protein K27M-mutated or not.

The introduction of the mutation did not impact the endogenous H3.3 protein level, and the transgene expression level appeared similar between H3.3 and H3.3K27M conditions. We confirmed the relevance of our cell models by showing that the introduction of the H3.3K27M protein acted in a dominant manner on the endogenous H3.3 to drive the expected epigenetic modifications, such as the previously described global loss of H3K27me3 [13,15] and the decrease in H3K27me2 [37]. The impact of the H3K27M mutation on H3 acetylation is still controversial, with some studies reporting an increase in this acetylation mark in H3.3K27M DIPG cells [38,39], whereas others failed to identify

significant changes [40,41]. Here, we did not observe any increase in the H3K27ac mark in our glioma background, which highlights the difficulty of drawing a generalist model on this mark.

Thanks to this relevant model generated in three different pediatric glioma cell lines, we were able to investigate the biological consequences of the H3.3K27M mutation. We first showed that the H3.3K27M mutation accelerates cell growth in Res259 and SF188. Although it was suggested from a murine DIPG model that H3.3K27M induced differences in cell cycle repartition, with an increase in the proportion of cells in S phase [42], we could not detect such differences in our models. From the appearance of growth curves, we suggest that H3.3K27M mutation could increase the propensity of cells to grow at low confluency, thereby increasing their proliferation rate in the first phases of our tests. This could explain why other studies, in which seeding concentrations were much higher, did not observe differences in cell growth of H3K27M mutated vs. unmutated cells [24,43]. Consistently, when we seeded cells at a very low density to measure their clonogenic potential, H3.3K27M cells produced a greater number of colonies when compared to control ones. This result also suggests that the K27M mutation could have a positive impact on stemness properties. Along this line, Silveira et al. showed that the inhibition of *H3F3A* expression by shRNA induced cell differentiation, concluding on the role of the mutation to maintain a stem-cell profile [44]. These observations were reinforced by Chen et al., who highlighted the activation of Notch pathway, involved in stemness, in DIPG H3.3K27M cellular models [24].

Of note, we did not observe such differences in proliferation/clonogenic properties between mutant vs. control KNS42 cells, suggesting that the impact of the mutation strongly depends on the cellular context, in line with its varied effect on the transcriptome observed in the different cell lines. Indeed, we observed that, although the introduction of the mutation was sufficient to induce a clear transcriptomic reprogramming of all three cell lines, only 0.5% of genes whose expression was altered by the mutation were common to all three models. Along this line, the increase in proliferative capacity, observed only in Res259 and SF188 cells, may be related to the activation of the PI3K-AKT pathway, evidenced with the PROGENy algorithm. The prediction of the oncogenic impact of the H3.3K27M mutation and the definition of associated therapeutic targets will thus have to take into account the impact of the cross-talk with the epigenetic environment and the cellular context in which it occurs.

In that frame, we then wondered whether the H3.3K27M mutation affected the response of pediatric glioma cells to therapies. Again, we observed a diversity of impact depending on the cellular context in which the H3.3K27M mutation is expressed. Indeed, we showed that Res259 and KNS42, but not SF188, H3.3K27M cells had a higher resistance to ionizing radiations in a fractionated schedule. Interestingly, the higher basal sensitivity to irradiation observed in SF188 mutant cells may suggest that the mutation reinforces radioresistance mechanisms already present in glioma cells such as Res259 and KNS42. In DIPG, resistance to radiotherapy was mostly suggested to result from the highly frequent *TP53* mutations [45]. In this study, since mutant and control Res259 and KNS42 differ only by the presence of the H3.3K27M mutation, our results clearly demonstrate for the first time that this! aberration is also sufficient to drive resistance to radiotherapy, in both low- and high-grade contexts.

Radiotherapy still remains the only standard of care for DIPG. Nevertheless, taking into account its partial and transient efficacy, fighting DIPG chemoresistance represents another challenge that our community must face. In 2015, Grasso and colleagues screened a library of anticancer drugs against 14 patient-derived DIPG cell cultures (one H3K27wt, four H3.1K27M-mutated, and nine H3.3K27M-mutated) and highlighted the efficiency of Panobinostat [28]. However, because of the presence of only one H3K27wt cell culture in their panel, authors were not able to evaluate the role of the mutation in chemoresistance. Our models allowed us to investigate this issue and suggest that the response to panobinostat is not altered by the mutation. Here, for the first time, we evaluated the specific

impact of the H3.3K27M mutation on cell sensitivity/resistance to a representative panel of anticancer drugs. We showed that the mutation significantly altered the resistance to therapies mostly in a low-grade glioma context, with minimal impact in high-grade glioma cells. This suggests that, because of their own molecular alterations, H3.3K27M expression in high-grade glioma cells is less critical than in a low-grade one corresponding to a less aggressive disease. Of note, we report induced resistance to four common drugs in Res259- and KNS42-H3.3K27M cells, among which are idelalisib (PI3K inhibitor) and temsirolimus (mTOR inhibitor) that both target the PI3K-Akt/mTOR pathway. This result may seem contradictory with the extrapolation of the transcriptomic signature using the PROGENy algorithm, which suggests that the mutation H3.3K27M rather leads to the activation of the PI3K-AKT pathway. However, although still largely unknown, several mechanisms of resistance to this pathway have been described. Compensation for AKT inactivation induced by PI3K inhibitors was shown to result from an increase in IL-6 signaling [46], which could be interesting since IL-6 and IL-6R are, respectively, increased by more than six- and three-fold in Res259- and KNS42-H3.3K27M cells compared to control ones.

Furthermore, we also evidenced that H3.3K27M mutation conferred resistance to alisertib and EPZ5676 (also known as pinometostat), which inhibit Aurora kinase and DOT1L methyltransferase (the enzyme responsible for H3K79 methylation marks deposition), respectively.

The resistance to EPZ5676 seems particularly interesting since it suggests that H3K27M-induced alterations may cross-talk with other epigenetic marks so far not investigated in DIPG, such as H3K79me. Thus, it represents a possible target to combine with other Achille's heels of mutated DIPG cells. In this sense, future studies will be aimed at unraveling the H3K79me amount and distribution along the genome in our models in order to better understand the H3.3K27M-mediated resistance to the DOT1L inhibitor EPZ5676, and propose novel therapeutic strategies based on the highlighted mechanisms.

This study was mainly carried out with in vitro models, which allowed us to combine several approaches and to obtain an integrated deeper insight into the role of H3.3K27M mutation in cell physiology and resistance to many therapies.

The processes evidenced in this work, and especially the efficacy of therapies, now require to be validated with in vivo models, notably patient-derived xenografts, in order to fully meet the translational aim of the study. This will be the topic of future investigations.

5. Conclusions

Although further analyses are required, these results highlight the fact that the H3.3K27M mutation can trigger mechanisms of drug/radiation resistance. Elucidation of the cross-talk between epigenetic/cellular contexts will thus be crucial to find the Achilles' heel of tumor cells among the transcriptional alterations induced by the mutation and to devise more effective therapeutic combinations in the management of DMG.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13215551/s1, Figure S1: Validation of the H3.3K27M induction models, Figure S2: Uncropped Western blot, Figure S3: Pathway activation score ratio between K27M and H3.3 conditions in Res259, SF188 and KNS42 glioma cell lines, Figure S4: Impact of the H3.3K27M on cell cycle and clonogenic properties, Figure S5: Local dissemination of Res259-H3.3 and -H3.3K27M xenografts in zebrafish embryos, Table S1: Drug screening list, Table S2: Common genes differentially expressed between H3.3 and H3.3K27M in the three cell lines.

Author Contributions: Conceptualization, S.M. and P.L.; methodology, A.R. (Andria Rakotomalala), Q.B., E.P., S.M.; formal analysis, A.R. (Andria Rakotomalala), Q.B., C.S., M.A., M.H., P.H., E.D., A.F., M.C., E.P., S.M.; investigation, A.R. (Andria Rakotomalala), Q.B., M.A., P.H., A.H., A.R. (Audrey Restouin), R.C., Y.C., E.P.; resources, P.-O.A.; data curation, A.V., C.S., M.C.; writing—original draft preparation, A.R. (Andria Rakotomalala), Q.B., S.M., A.F., M.C.; writing—review and editing, P.L., E.P., X.L.B.; supervision and administration, S.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Wonder Augustine, Warrior Enguerrand, les 111 des arts de Lille, du Ciel Bleu pour Matthieu, and Lions Club charities, and by the Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille. This work was also supported by a grant from Contrat de Plan Etat-Région CPER Cancer 2015–2020.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

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

References

1. Hassan, H.; Pinches, A.; Picton, S.V.; Phillips, R.S. Survival rates and prognostic predictors of high grade brain stem gliomas in childhood: A systematic review and meta-analysis. *J. Neurooncol.* **2017**, *135*, 13–20. [CrossRef] [PubMed]
2. Ostrom, Q.T.; Cioffi, G.; Gittleman, H.; Patil, N.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro Oncol.* **2019**, *21*, v1–v100. [CrossRef] [PubMed]
3. Desandes, E.; Guissou, S.; Chastagner, P.; Lacour, B. Incidence and survival of children with central nervous system primitive tumors in the French National Registry of Childhood Solid Tumors. *Neuro Oncol.* **2014**, *16*, 975–983. [CrossRef]
4. Saratsis, A.M.; Kambhampati, M.; Snyder, K.; Yadavilli, S.; Devaney, J.M.; Harmon, B.; Hall, J.; Raabe, E.H.; An, P.; Weingart, M.; et al. Comparative multidimensional molecular analyses of pediatric diffuse intrinsic pontine glioma reveals distinct molecular subtypes. *Acta Neuropathol.* **2014**, *127*, 881–895. [CrossRef] [PubMed]
5. Hargrave, D.; Bartels, U.; Bouffet, E. Diffuse brainstem glioma in children: Critical review of clinical trials. *Lancet Oncol.* **2006**, *7*, 241–248. [CrossRef]
6. Schroeder, K.M.; Hoeman, C.M.; Becher, O.J. Children are not just little adults: Recent advances in understanding of diffuse intrinsic pontine glioma biology. *Pediatr. Res.* **2014**, *75*, 205–209. [CrossRef]
7. Vanan, M.I.; Eisenstat, D.D. DIPG in Children—What Can We Learn from the Past? *Front. Oncol.* **2015**, *5*, 237. [CrossRef] [PubMed]
8. Freeman, C.R.; Krischer, J.P.; Sanford, R.A.; Cohen, M.E.; Burger, P.C.; del Carpio, R.; Halperin, E.C.; Munoz, L.; Friedman, H.S.; Kun, L.E. Final results of a study of escalating doses of hyperfractionated radiotherapy in brain stem tumors in children: A Pediatric Oncology Group study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1993**, *27*, 197–206. [CrossRef]
9. Schwartzentruber, J.; Korshunov, A.; Liu, X.Y.; Jones, D.T.; Pfaff, E.; Jacob, K.; Sturm, D.; Fontebasso, A.M.; Quang, D.A.; Tonjes, M.; et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* **2012**, *482*, 226–231. [CrossRef]
10. Wu, G.; Broniscer, A.; McEachron, T.A.; Lu, C.; Paugh, B.S.; Becksfort, J.; Qu, C.; Ding, L.; Huether, R.; Parker, M.; et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 251–253. [CrossRef] [PubMed]
11. Castel, D.; Philippe, C.; Calmon, R.; Le Dret, L.; Truffaux, N.; Boddaert, N.; Pages, 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] [PubMed]
12. 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 1000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 520–537.e5. [CrossRef] [PubMed]
13. Bender, S.; Tang, Y.; Lindroth, A.M.; Hovestadt, V.; Jones, D.T.; Kool, M.; Zapatka, M.; Northcott, P.A.; Sturm, D.; Wang, W.; et al. Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell* **2013**, *24*, 660–672. [CrossRef] [PubMed]
14. Nikbakht, H.; Panditharatna, E.; Mikael, L.G.; Li, R.; Gayden, T.; Osmond, M.; Ho, C.Y.; Kambhampati, M.; Hwang, E.I.; Faury, D.; et al. Spatial and temporal homogeneity of driver mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11185. [CrossRef] [PubMed]
15. Funato, K.; Major, T.; Lewis, P.W.; Allis, C.D.; Tabar, V. Use of human embryonic stem cells to model pediatric gliomas with H3.3K27M histone mutation. *Science* **2014**, *346*, 1529–1533. [CrossRef] [PubMed]
16. Pathania, M.; De Jay, N.; Maestro, N.; Harutyunyan, A.S.; Nitarska, J.; Pahlavan, P.; Henderson, S.; Mikael, L.G.; Richard-Londt, A.; Zhang, Y.; et al. H3.3(K27M) Cooperates with Trp53 Loss and PDGFRA Gain in Mouse Embryonic Neural Progenitor Cells to Induce Invasive High-Grade Gliomas. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 684–700.e9. [CrossRef]
17. 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]

18. Castel, D.; Kergrohen, T.; Tauziede-Espariat, A.; Mackay, A.; Ghermaoui, S.; Lechapt, E.; Pfister, S.M.; Kramm, C.M.; Boddaert, N.; Blauwblomme, T.; et al. Histone H3 wild-type DIPG/DMG overexpressing EZHIP extend the spectrum diffuse midline gliomas with PRC2 inhibition beyond H3-K27M mutation. *Acta Neuropathol.* **2020**, *139*, 1109–1113. [CrossRef] [PubMed]
19. Antin, C.; Tauziede-Espariat, A.; Debily, M.A.; Castel, D.; Grill, J.; Pages, M.; Ayrault, O.; Chretien, F.; Gareton, A.; Andreiuolo, F.; et al. EZHIP is a specific diagnostic biomarker for posterior fossa ependymomas, group PFA and diffuse midline gliomas H3-WT with EZHIP overexpression. *Acta Neuropathol. Commun.* **2020**, *8*, 183. [CrossRef] [PubMed]
20. Pajtler, K.W.; Wen, J.; Sill, M.; Lin, T.; Orisme, W.; Tang, B.; Hubner, J.M.; Ramaswamy, V.; Jia, S.; Dalton, J.D.; et al. Molecular heterogeneity and CXorf67 alterations in posterior fossa group A (PFA) ependymomas. *Acta Neuropathol.* **2018**, *136*, 211–226. [CrossRef]
21. Jain, S.U.; Rashoff, A.Q.; Krabbenhoft, S.D.; Hoelper, D.; Do, T.J.; Gibson, T.J.; Lundgren, S.M.; Bondra, E.R.; Deshmukh, S.; Harutyunyan, A.S.; et al. H3 K27M and EZHIP Impede H3K27-Methylation Spreading by Inhibiting Allosterically Stimulated PRC2. *Mol. Cell* **2020**, *80*, 726–735.e7. [CrossRef] [PubMed]
22. Jain, S.U.; Do, T.J.; Lund, P.J.; Rashoff, A.Q.; Diehl, K.L.; Cieslik, M.; Bajic, A.; Juretic, N.; Deshmukh, S.; Venneti, S.; et al. PFA ependymoma-associated protein EZHIP inhibits PRC2 activity through a H3 K27M-like mechanism. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2146. [CrossRef]
23. Lowe, B.R.; Maxham, L.A.; Hamey, J.J.; Wilkins, M.R.; Partridge, J.F. Histone H3 Mutations: An Updated View of Their Role in Chromatin Deregulation and Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 660. [CrossRef] [PubMed]
24. Chen, K.Y.; Bush, K.; Klein, R.H.; Cervantes, V.; Lewis, N.; Naqvi, A.; Carcaboso, A.M.; Lechpammer, M.; Knoepfler, P.S. Reciprocal H3.3 gene editing identifies K27M and G34R mechanisms in pediatric glioma including NOTCH signaling. *Commun. Biol.* **2020**, *3*, 363. [CrossRef] [PubMed]
25. Leszczynska, K.B.; Jayaprakash, C.; Kaminska, B.; Mieczkowski, J. Emerging Advances in Combinatorial Treatments of Epigenetically Altered Pediatric High-Grade H3K27M Gliomas. *Front. Genet.* **2021**, *12*, 742561. [CrossRef] [PubMed]
26. Hashizume, R.; Andor, N.; Ihara, Y.; Lerner, R.; Gan, H.; Chen, X.; Fang, D.; Huang, X.; Tom, M.W.; Ngo, V.; et al. Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 1394–1396. [CrossRef] [PubMed]
27. 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] [PubMed]
28. 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]
29. Lin, G.L.; Wilson, K.M.; Ceribelli, M.; Stanton, B.Z.; Woo, P.J.; Kreimer, S.; Qin, E.Y.; Zhang, X.; Lennon, J.; Nagaraja, S.; et al. Therapeutic strategies for diffuse midline glioma from high-throughput combination drug screening. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*. [CrossRef]
30. Hennika, T.; Hu, G.; Olaciregui, N.G.; Barton, K.L.; Ehteda, A.; Chitranjan, A.; Chang, C.; Gifford, A.J.; Tsoli, M.; Ziegler, D.S.; et al. Pre-Clinical Study of Panobinostat in Xenograft and Genetically Engineered Murine Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Models. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169485. [CrossRef] [PubMed]
31. Taylor, I.C.; Hutt-Cabezas, M.; Brandt, W.D.; Kambhampati, M.; Nazarian, J.; Chang, H.T.; Warren, K.E.; Eberhart, C.G.; Raabe, E.H. Disrupting NOTCH Slows Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Growth, Enhances Radiation Sensitivity, and Shows Combinatorial Efficacy With Bromodomain Inhibition. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2015**, *74*, 778–790. [CrossRef] [PubMed]
32. Bax, D.A.; Little, S.E.; Gaspar, N.; Perryman, L.; Marshall, L.; Viana-Pereira, M.; Jones, T.A.; Williams, R.D.; Grigoriadis, A.; Vassal, G.; et al. Molecular and phenotypic characterisation of paediatric glioma cell lines as models for preclinical drug development. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5209. [CrossRef]
33. Bray, N.L.; Pimentel, H.; Melsted, P.; Pachter, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 525–527. [CrossRef] [PubMed]
34. Soneson, C.; Love, M.I.; Robinson, M.D. Differential analyses for RNA-seq: Transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Research* **2015**, *4*, 1521. [CrossRef]
35. Schubert, M.; Klinger, B.; Klunemann, M.; Sieber, A.; Uhlitz, F.; Sauer, S.; Garnett, M.J.; Bluthgen, N.; Saez-Rodriguez, J. Perturbation-response genes reveal signaling footprints in cancer gene expression. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 20. [CrossRef] [PubMed]
36. Franken, N.A.; Rodermond, H.M.; Stap, J.; Haveman, J.; van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2315–2319. [CrossRef]
37. Harutyunyan, A.S.; Krug, B.; Chen, H.; Papillon-Cavanagh, S.; Zeinieh, M.; De Jay, N.; Deshmukh, S.; Chen, C.C.L.; Belle, J.; Mikael, L.G.; et al. H3K27M induces defective chromatin spread of PRC2-mediated repressive H3K27me2/me3 and is essential for glioma tumorigenesis. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1262. [CrossRef]
38. Krug, B.; De Jay, N.; Harutyunyan, A.S.; Deshmukh, S.; Marchione, D.M.; Guilhamon, P.; Bertrand, K.C.; Mikael, L.G.; McConechy, M.K.; Chen, C.C.L.; et al. Pervasive H3K27 Acetylation Leads to ERV Expression and a Therapeutic Vulnerability in H3K27M Gliomas. *Cancer Cell* **2019**, *35*, 782–797.e8. [CrossRef] [PubMed]

39. Piunti, A.; Hashizume, R.; Morgan, M.A.; Bartom, E.T.; Horbinski, C.M.; Marshall, S.A.; Rendleman, E.J.; Ma, Q.; Takahashi, Y.H.; Woodfin, A.R.; et al. Therapeutic targeting of polycomb and BET bromodomain proteins in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 493–500. [CrossRef] [PubMed]
40. Chan, K.M.; Fang, D.; Gan, H.; Hashizume, R.; Yu, C.; Schroeder, M.; Gupta, N.; Mueller, S.; James, C.D.; Jenkins, R.; et al. The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 985–990. [CrossRef] [PubMed]
41. Lewis, P.W.; Muller, M.M.; Koletsky, M.S.; Cordero, F.; Lin, S.; Banaszynski, L.A.; Garcia, B.A.; Muir, T.W.; Becher, O.J.; Allis, C.D. Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science* **2013**, *340*, 857–861. [CrossRef]
42. Cordero, F.J.; Huang, Z.; Grenier, C.; He, X.; Hu, G.; McLendon, R.E.; Murphy, S.K.; Hashizume, R.; Becher, O.J. Histone H3.3K27M Represses p16 to Accelerate Gliomagenesis in a Murine Model of DIPG. *Mol. Cancer Res.* **2017**, *15*, 1243–1254. [CrossRef] [PubMed]
43. Deng, H.; Zeng, J.; Zhang, T.; Gong, L.; Zhang, H.; Cheung, E.; Jones, C.; Li, G. Histone H3.3K27M Mobilizes Multiple Cancer/Testis (CT) Antigens in Pediatric Glioma. *Mol. Cancer Res.* **2018**, *16*, 623–633. [CrossRef]
44. 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] [PubMed]
45. Werbrouck, C.; Evangelista, C.C.S.; Lobon-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]
46. Kim, J.H.; Kim, W.S.; Park, C. Interleukin-6 mediates resistance to PI3K-pathway-targeted therapy in lymphoma. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 936. [CrossRef] [PubMed]

I.3. Projets de collaboration associés

Au-delà de cette caractérisation initiale publiée en 2021 (Rakotomalala et al., 2021a), nos modèles cellulaires d'induction ont également servi d'autres projets de collaborations. En particulier, ces derniers ont permis d'étudier l'impact phénotypique de la coopération entre la mutation H3.3 K27M et la signalisation des BMP dans un projet mené par l'équipe du Dr. Marie Castets (Centre de recherche en cancérologie de Lyon) (Huchedé et al., 2023 en annexe). D'autre part, dans une récente étude menée par l'équipe du Dr. Matthew D. Dun (University of Newcastle, Australie), ces modèles ont permis d'adresser la question de l'impact du statut mutationnel de l'histone 3 sur la réponse à l'ONC201 (Jackson et al., 2023 en annexe).

I.3.1. Impact phénotypique de la coopération entre l'oncohistone H3.3 K27M et la signalisation des BMP

Il est désormais admis que les oncohistones K27M coopèrent avec d'autres altérations partenaires lors des étapes précoces de la tumorigenèse (Nikbakht et al., 2016; Pathania et al., 2017; Hoeman et al., 2019). Parmi ces altérations partenaires, les mutations activatrices du récepteur ALK2 (codé par *ACVR1*) s'observent dans 20-30% des DMG et co-ségrégent en particulier avec la mutation H3.1 K27M (Mackay et al., 2017). De surcroît, l'oncohistone H3.1 K27M impose un environnement épigénétique permissif aux modifications transcriptionnelles induites par les mutations d'*ACVR1 via* l'activation de la voie des BMP. Cette coopération semble jouer un rôle dans la tumorigenèse des DMG mutés H3.1 K27M et *ACVR1* (Hoeman et al., 2019). Dans les DMG mutés H3.3 K27M, se développant à partir d'OPC dorsaux dans un environnement plus riche en BMP (gradient dorso-ventral), l'activation constitutive d'ALK2 semble moins critique. Toutefois, plusieurs questions restent en suspens, dont celle de l'impact phénotypique de la coopération entre l'oncohistone H3.3 K27M et la signalisation des BMP.

Dans notre précédente étude, BMP7 figurait parmi les 27 gènes différentiellement exprimés (H3.3 K27M vs. $H3.3^{WT}$) communs entre nos trois lignées cellulaires (Res259, SF188 et KNS42) et apparaissait down-régulé avec la mutation H3.3 K27M (Rakotomalala et al., 2021a). Ces résultats apparaissent cohérents avec un potentiel échappement à l'effet suppresseur de tumeur de la signalisation des BMP récemment décrite dans les DMG mutés H3.3 K27M (Sun et al., 2022). En ce sens, un traitement au BMP7 induit une down-régulation de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire spécifique du contexte muté H3.3 K27M.

Dans ce contexte, Huchedé et collaborateurs ont montré que l'impact transcriptionnel de la signalisation induite par BMP7 dans nos modèles d'induction (issus de la lignée Res259) est conditionné par la présence de la mutation H3.3 K27M, tout comme la mutation

H3.1 K27M conditionne l'impact des mutations *ACVR1* (Hoeman et al., 2019; Huchedé et al., 2023). Bien qu'induisant une down-régulation de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, paraissant cohérente avec l'effet suppresseur de tumeur identifié par Sun et collaborateurs, cette coopération entre la signalisation des BMP et la mutation H3.3 K27M dans nos modèles semble engendrer un phénotype quiescent et plus invasif.

Notons que, déjà lors de la caractérisation phénotypique de nos modèles d'induction, l'expression de la mutation H3.3 K27M semblait favoriser la dissémination locale des cellules Res259 xénogreffées chez le zebrafish. Cet effet de la mutation H3.3 K27M sur le caractère invasif apparaissait exacerbée *in vitro* après traitement avec du BMP7 recombinant (Huchedé et al., 2023). L'ensemble de ces travaux suggéraient ainsi qu'il existerait une coopération entre la voie des BMP et la mutation H3.3 K27M et que l'impact phénotypique de l'oncohistone peut être conditionné par le microenvironnement tumoral. De surcroit, il semblerait que l'état de quiescence et invasif lié à l'oncohistone puisse être induit par l'hypoxie et certaines thérapies (*e.g.* ONC201) constituant un potentiel mécanisme de résistance gouverné par la mutation H3.3 K27M (Huchedé et al., 2023).

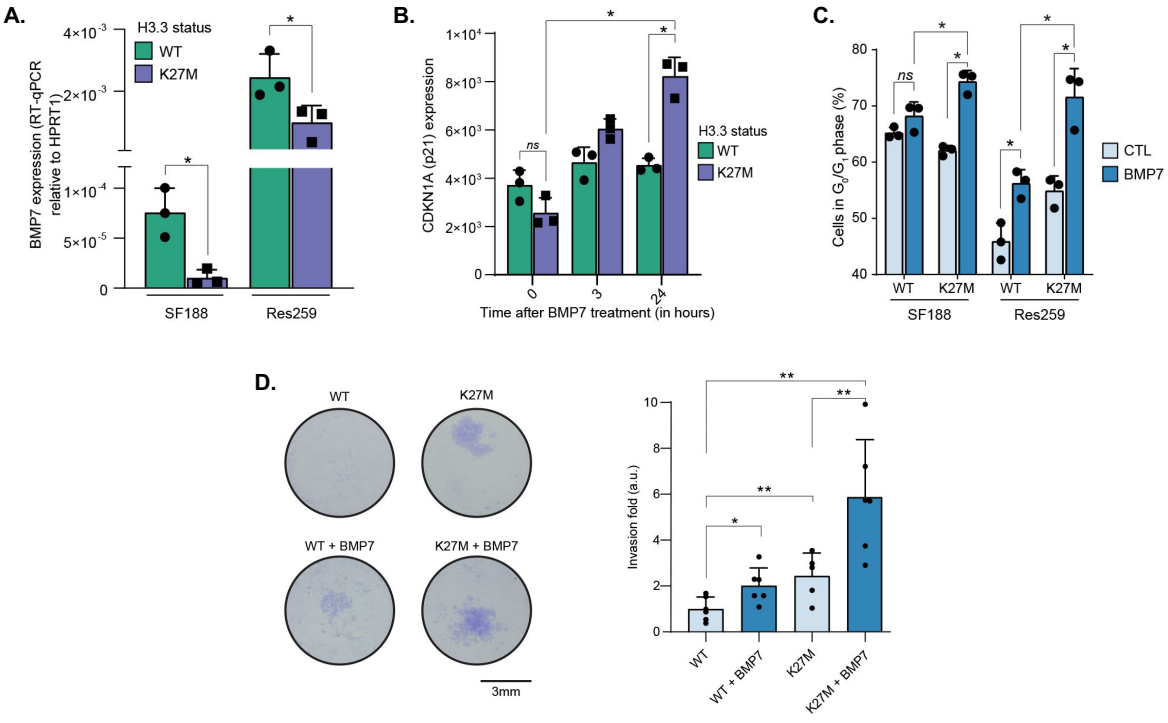


Figure 18. Évaluation de l'impact phénotypique de BMP7 en fonction de l'oncohistone H3.3 K27M. A. Analyse de l'expression de *BMP7* par *RT-qPCR* à partir d'ARN extraits des cellules SF188 ou Res259 surexprimant la forme mutée (K27M) ou la forme sauvage (WT) de l'histone 3. L'expression de BMP7 était normalisée par rapport à celle de *HPRT1* pour chaque condition. Les barres d'erreur représentent les écarts-types obtenus après 3 expériences indépendantes (*, $P < 0.05$). **B.** Expression normalisée de CDKN1A (codant p21) issue d'une analyse transcriptomique réalisée sur les cellules Res259 surexprimant la forme mutée (K27M) ou la forme sauvage (WT) de l'histone 3 après différents temps de traitement au BMP7 (0h, 3h, 24h). Ces données sont issues de trois réplicats biologiques et les barres d'erreur représentent les écarts-types obtenus. (ns, $P > 0.05$; *, $P < 0.05$). **C.** Le graphique représente la quantification des cellules en phase G_0/G_1 issue d'une analyse du cycle cellulaire réalisée par cytométrie en flux après marquage avec du 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) et au DAPI des cellules

Res259 et SF188 surexprimant la forme mutée (K27M) ou la forme sauvage (WT) de l'histone 3, avec (bleu foncé) ou sans (bleu clair) traitement au BMP7 (24h). Les barres d'erreur représentent les écarts-types obtenus sur trois expériences indépendantes (ns, P > 0.05 ; *, P < 0.05). **D.** Évaluation des capacités d'invasion sur Transwell® des cellules Res259 surexprimant la forme mutée (K27M) ou la forme sauvage (WT) de l'histone 3, avec (bleu foncé) ou sans (bleu clair) BMP7 (pré-traitement de 72h puis maintien du traitement pendant les 48h d'expérience). Partie de gauche : images représentatives obtenues après révélation du test pour chacune des conditions. Partie de droite : Quantification de l'invasion obtenue lors de cinq expériences indépendantes. Les barres d'erreur représentent les écarts-types obtenus (*, P < 0.05 ; **, P < 0.01). (Extrait de Huchedé et al., 2023).

I.3.2. Étude de l'impact du statut mutationnel de H3 sur la réponse à l'ONC201

Dans le cadre de son étude visant identifier les facteurs influençant la réponse à l'ONC201 dans les cellules de DMG, l'équipe du Dr. Matthew D. Dun a démontré que celle-ci était bimodale, liée d'une part à un effet antagoniste sur le récepteur DRD2 mais surtout à un effet agoniste sur la protéase mitochondriale ClpP (Duchatel et al., 2021; Jackson et al., 2023).

Toutefois, bien qu'inédit, les premiers bénéfices de l'ONC201 rapportés restaient transitoires et ne concernaient pas la totalité des patients. En ce sens, dans la récente étude menée par l'équipe du Dr. Matthew D. Dun, nous observions des réponses *in vitro* hétérogènes à l'ONC201 au sein d'un panel de 13 lignées cellulaires de DMG présentant des profils moléculaires variés (Jackson et al., 2023).

Dans ce contexte, nous nous sommes interrogés sur l'impact potentiel du statut mutationnel de l'histone 3 sur la réponse à l'ONC201. Tout d'abord, le regroupement des lignées cellulaires selon le statut mutationnel de l'histone 3 ($H3^{WT}$ *vs.* H3.1 K27M *vs.* H3.3 K27M) n'indiquait pas de différence significative de réponse à l'ONC201 entre les groupes. Afin d'étudier la corrélation directe entre la forme de l'oncohistone et la réponse à l'ONC201, nous avons établi des modèles cellulaires d'induction de H3.1 K27M en complément de nos modèles H3.3 K27M déjà disponibles. Forts de ces modèles, les auteurs concluaient à une réponse différentielle des cellules à l'ONC201 selon la forme de l'oncohistone induite.

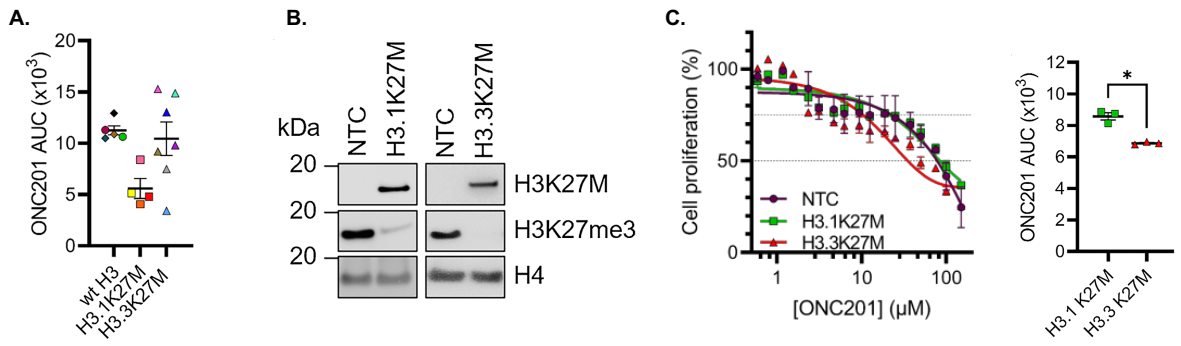


Figure 19. Évaluation de l'impact du profil mutationnel de l'histone 3 sur la réponse à l'ONC201. A. Graphique représentant l'aire sous la courbe (AUC) obtenue après la réalisation test de cytotoxicité de l'ONC201 sur un panel de 16 lignées cellulaires de DMG groupées en fonction de leur statut mutationnel de H3 ; H3WT (n=5), H3.1 K27M (n=4), H3.3 K27M (n=7). Les barres d'erreurs représentent la standard error of the mean (SEM). **B.**

Analyses par western blot dirigés contre l'oncohistone H3 K27M et la triméthylation des lysines 27 des histones 3 (H3K27me3) réalisées sur extractions d'histones provenant de la lignée cellulaire Res259 (non transfectées ; NTC) et des modèles dérivés surexprimant l'oncohistone H3.1 K27M ou H3.3 K27M. La protéine H4 était utilisée comme témoin d'équicharge. **C.** Partie de gauche : Courbes de cytotoxicité de l'ONC201 obtenues pour les cellules Res259 (non transfectées ; NTC) et les modèles surexprimant H3.1 K27M et H3.3 K27M. La viabilité cellulaire était quantifiée à l'aide du bleu de resazurin 96h après traitement. Partie de droite : Graphique représentant l'aire sous la courbe (AUC) obtenue après la réalisation test de cytotoxicité de l'ONC201 sur les cellules Res259 (non transfectées ; NTC) et les modèles surexprimant H3.1 K27M et H3.3 K27M. Les barres d'erreurs représentent la standard error of the mean (SEM). (*, $P < 0.05$). (Extrait de Jackson et al., 2023).

L'étude concluait par ailleurs que certaines voies de signalisation, comme la voie PI3K/AKT, participaient potentiellement à des phénomènes de résistance à l'ONC201 (Jackson et al., 2023). De fait, le ciblage de ces voies représenterait une opportunité de potentialiser l'efficacité de l'ONC201 dans les cellules de DMG altérés H3 K27 et pourrait inspirer de nouvelles combinaisons thérapeutiques, à l'image de celle avec le paxalisib, actuellement en essai clinique de phase II (NCT05009992) et dont le rationnel biologique est étayé par cette étude.

I.4. Discussion quant aux modèles d'induction

I.4.1. Effets épigénétiques de l'induction de la mutation H3.3 K27M dans des lignées cellulaires de gliomes pédiatriques

Dans le but de nous replacer dans un contexte cellulaire proche de celui des DMG, nous avons souhaité établir des modèles induits pour la mutation H3.3 K27M dans des cellules de gliomes pédiatriques sustentoriels (initialement non mutées), faute de lignées cellulaires de DMG $H3^{WT}$, notamment du fait de leur rareté. Ainsi, pour l'établissement de ces modèles, nous avons utilisé les trois lignées cellulaires Res259 (pLGG), SF188 (pHGG) et KNS42 (pHGG) ayant été utilisées parallèlement pour l'induction de la mutation H3.3 K27M (Deng et al., 2018). Ces lignées apparaissaient permissives aux impacts épigénétiques globaux de la mutation H3.3 K27M, dont l'induction engendrait une drastique perte des marques H3K27me3. Néanmoins, la perte de H3K27me3 dans la lignée KNS42 apparaissait plus faible par rapport à celle observée dans les lignées Res259 et SF188. En effet, la lignée KNS42 est issue d'un pHGG hémisphérique muté H3.3 G34V. Dans ce contexte, il apparaît probable que l'impact épigénétique des oncohistones H3.3 G34V, favorisant une activité aberrante de PRC2, s'oppose à celui des oncohistones H3 K27M, expliquant ainsi la perte réduite des marques H3K27me3 dans cette lignée (Jain et al., 2020a). D'autre part, malgré la perte conséquente des marques H3K27me3 nous ne constations pas, de manière surprenante, de hausse concomitante des marques H3K27ac dans nos modèles exprimant l'oncohistone H3.3 K27M. Toutefois, cette absence de différence de niveau global n'exclut pas des changements de distribution de ces marques dans le génome, qu'il serait intéressant d'étudier. En ce sens, nos

modèles induits pour la mutation H3.3 K27M dans la lignée Res259 présentaient une sensibilité exacerbée aux inhibiteurs pan-BET JQ1 et OTX015 (birabresib).

I.4.2. Impacts phénotypiques de l'induction de la mutation H3.3 K27M dans des lignées cellulaires de gliomes pédiatriques

Forts de l'établissement de ces modèles cellulaires reproduisant le contexte épigénétique H3 K27 altéré par l'expression stable de l'oncohistone H3.3 K27M, nous en avons caractérisé certains traits phénotypiques de manière exploratoire et comparative par rapport aux modèles contrôles surexprimant $H3.3^{WT}$ associés. En effet, l'implication du variant H3.3 dans des processus cellulaires tels que la réparation des dommages à l'ADN nécessite de prendre en compte l'impact de sa surexpression, en particulier dans le contexte de l'étude de la réponse aux traitements notamment de radiothérapie (Luijsterburg et al., 2016).

I.4.2.1. Induction de H3.3 K27M et croissance cellulaire

Dans deux des trois lignées cellulaires utilisées (Res259 et SF188), l'induction de la mutation H3.3 K27M accélérait la croissance cellulaire comme rapporté par d'autres études (Funato et al., 2014). L'absence d'effet sur la croissance des cellules KNS42 pourrait s'expliquer par le fait que la mutation H3.3 K27M n'apporte pas d'avantage de croissance supplémentaire dans un contexte présentant déjà de multiples altérations génomiques (*e.g.* mutation de TP53, mutation H3.3 G34V). En ce sens, dans notre étude nous constations un impact phénotypique de la mutation H3.3 K27M globalement plus important dans les cellules de pLGG (Res259) que dans les cellules de pHGG (SF188 et KNS42), présentant d'ores et déjà leurs propres *drivers* moléculaires. Ainsi, l'impact de l'induction mutation H3.3 K27M apparaît largement dépendant du contexte cellulaire (*i.e.* type cellulaire et profil moléculaire), comme montré par d'autres études (Funato et al., 2014; K.-Y. Chen et al., 2020; Haag et al., 2021).

I.4.2.2. Induction de H3.3 K27M et phénotype invasif

Ainsi, pour l'évaluation de certains phénotypes tels que l'invasion cellulaire, nous avons favorisé l'utilisation de nos modèles issus de la lignées Res259 plus permissifs aux impacts de la mutation H3.3 K27M. Lors de tests *in vitro* (tests de blessure), la mutation H3.3 K27M ne semblait pas impacter la migration de nos modèles cellulaires (données non présentées). Toutefois, la mutation H3.3 K27M semblait associée avec un profil plus invasif des cellules en modèles de xénogreffes chez le poisson zèbre, bien que cette tendance n'apparût pas significative. Cette observation suggérait que la mutation H3.3 K27M, bien qu'insuffisante pour induire un phénotype invasif, puisse promouvoir le caractère diffus des gliomes pédiatriques. En ce sens, dans l'étude de Huchedé et collaborateurs, nous avons

observé que la mutation H3.3 K27M induisait l'invasion des cellules Res259 en coopération avec l'activation de la signalisation des BMP (Huchedé et al., 2023). De manière intéressante, ces données montrent que les effets phénotypiques de la mutation H3.3 K27M peuvent être conditionnés par le microenvironnement (*e.g.* présence de BMP2/7) et résulter de coopérations avec d'autres voies de signalisation.

I.4.2.3. *Induction de H3.3 K27M et réponse aux thérapies anti-cancéreuses*

- **Réponse à la radiothérapie**

L'unique traitement de référence actuel pour les DMG altérés H3 K27 demeure un protocole de radiothérapie fractionné (54-60Gy par fraction de 1.8-2Gy). À notre connaissance, notre étude est la première à caractériser l'impact de la mutation H3.3 K27M sur la réponse de cellules de gliomes pédiatriques à un schéma de radiothérapie fractionné.
L'impact de la mutation H3.3 K27M sur la radiosensibilité apparait variable en fonction du contexte cellulaire. En effet, bien que ne présentant aucun effet sur la radiosensibilité des cellules SF188, la mutation H3.3 K27M favorise la radiorésistance des lignées Res259 et KNS42. Ces résultats supportent l'hypothèse d'une radiorésistance associée à la mutation H3.3 K27M, en accord avec les corrélations constatées en clinique (Castel et al., 2015; Werbrouck et al., 2019), et constituent la preuve de concept que la mutation H3.3 K27M peut impacter la réponse à la radiothérapie, indépendamment du statut mutationnel de *TP53*.

À contrario, l'étude de Zhang et collaborateurs montrait une altération du mécanisme NHEJ et une radiosensibilité associée à l'induction de H3 K27M dans des fibroblastes de derme humains (Zhang et al., 2018). Ces divergences de résultats peuvent être liées à plusieurs facteurs, en particulier le contexte cellulaire très différent. Ces données suggèrent qu'en fonction du contexte cellulaire, les mutations H3 K27M pourraient avoir des effets opposés sur la radiosensibilité. Ce constat souligne la nécessité de confirmer nos résultats, obtenus dans des lignées de gliomes pédiatriques sustentoriels, dans un contexte cellulaire de DMG.

- **Profil de réponse aux composés pharmacologiques**

À l'instar de l'impact sur la croissance cellulaire et la réponse à la radiothérapie, l'effet de l'induction de la mutation H3.3 K27M sur le profil de réponse aux composés pharmacologiques (panel de 80 molécules) est très variable selon la lignée cellulaire considérée. En effet, l'induction de la mutation H3.3 K27M modifie significativement le profil de réponse aux drogues de la lignée de pLGG (modification de la réponse à plus de 40% des molécules du panel testé), tandis que les modifications observées dans les lignées de pHGG sont plus anecdotiques. Ces données indiquent que le profil de sensibilité et résistance aux drogues des pHGG semble majoritairement imposé par les *drivers* oncogéniques déjà en place

et que l'oncohistone H3.3 K27M ne modifie pas ou peu les dépendances instaurées. De fait, le ciblage de certaines voies de signalisation, identifiées comme des talons d'Achille spécifiquement associés à la mutation H3.3 K27M dans d'autres modèles, ne présente pas d'efficacité différentielle en fonction de la mutation dans nos lignées cellulaires de pHGG. À ce titre, l'activation de la voie des MAPK induite par la mutation H3.3 K27M dans des NSC et OPC humaines constitue un talon d'Achille spécifiquement associée à l'oncohistone (Koncar et al., 2019; Pajovic et al., 2020). Or, dans nos lignées de pHGG, l'activation de la voie des MAPK était décrite comme gouvernée par d'autres altérations (Bax et al., 2009). De fait, aucun inhibiteur de la voie des MAPK ne présente d'efficacité différentielle selon la mutation dans nos lignées de pHGG (SF188 et KNS42) alors que le trametinib (inhibiteur de MEK) est la molécule présentant l'efficacité la plus exacerbée (IC_{50} plus de 10 fois inférieure) en présence de l'oncohistone (vs. $H3.3^{WT}$) dans notre lignée de pLGG (Res259).

Par ailleurs, l'efficacité de certaines épidrogues également semble impactée par la mutation dans nos modèles. En effet, l'oncohistone H3.3 K27M, bien que n'induisant pas de modification du niveau global de H3K27ac, engendre une sensibilité aux inhibiteurs pan-BET dans la lignée de pLGG. Cette sensibilité suggère une potentielle redistribution des marques H3K27ac ainsi que l'acquisition d'une dépendance aux protéines à bromodomaine. Ces données corroborent les résultats de l'étude de Piunti et collaborateurs révélant l'intérêt thérapeutique des BETi dans les DMG altérés H3 K27 (Piunti et al., 2017). À l'inverse, dans notre lignée de pLGG, la mutation induit une résistance au GSK126 (inhibiteur d'EZH2) contrairement à ce qui a été décrit dans l'étude de Mohammad et collaborateurs (Mohammad et al., 2017). Ces derniers proposaient que la dérépression de $p16^{INK4a}$ soit un mécanisme responsable de l'efficacité de l'inhibition d'EZH2 dans les cellules de DMG, or la lignée cellulaire Res259 présente une délétion de *CDKN2A* (codant notamment $p16^{INK4a}$) (Bax et al., 2009; Mohammad et al., 2017). De surcroit, les sites de nucléation de PRC2 (correspondant aux loci hyperméthylés en présence de l'oncohistone) dans nos lignées de gliomes pédiatriques pourraient diverger par rapport à ceux identifiés dans les cellules de DMG, notamment du fait de leurs origines cellulaires distinctes. Ainsi, dans nos modèles, l'induction de la mutation H3.3 K27M ne récapitulerait pas exactement les effets observés dans un contexte cellulaire de DMG ce qui en constituerait une des principales limites.

Bien que peu nombreuses, certaines molécules présentent une efficacité différentielle en fonction de la mutation à la fois dans la lignée Res259 et dans la lignée KNS42. Parmi elles, nous identifions notamment l'EPZ5676 (pinometostat), un inhibiteur de la méthyltransférase DOT1L spécifique de H3K79. L'impact des mutations H3 K27M sur les marques de méthylation de H3K79 est peu documenté et, à notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir identifié une dépendance à l'activité de DOT1L inhérente aux oncohistones. Ces résultats nécessitent toutefois d'être confirmés dans des cellules de DMG.

- **Réponse à l'ONC201**

Au-delà de notre criblage pharmacologique, dans le cadre de l'étude de Jackson et collaborateurs, nous avons évalué plus spécifiquement l'impact des mutations H3 K27M sur la réponse à l'ONC201 (Jackson et al., 2023). À cet égard, nous avons utilisé nos modèles isogéniques issus de la lignée de pLGG Res259 (induits pour les mutations H3.1 et H3.3 K27M), présentant une pénétrance plus importante des phénotypes associés aux oncohistones (par rapport aux lignées de pHGG) (Rakotomalala et al., 2021a). Dans cette lignée, Jackson et al. concluaient que l'induction de la mutation H3.3 K27M s'accompagnait d'une modeste sensibilisation à l'ONC201 par rapport aux conditions H3.1 K27M.

Lors de la comparaison du panel de lignées cellulaires de DMG ($H3^{WT}$ *vs.* H3.1 K27M *vs.* H3.3 K27M), cette sensibilité spécifiquement associée à la mutation H3.3 K27M n'était toutefois pas constatée et le statut mutationnel de *TP53* apparaissait comme le principal *driver* de la réponse à l'ONC201. Nos cellules de pLGG ne présentant pas d'altération de *TP53*, des études supplémentaires seraient nécessaires afin de déterminer si l'impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la réponse à l'ONC201 est conservée dans un contexte muté *TP53* (caractéristique de la majorité des DMG mutés H3.3 K27M).

De plus, l'effet différentiel de l'induction des oncohistones H3.1 et H3.3 K27M dans nos modèles apparaît surprenant au regard des récentes données suggérant que, dans un même contexte cellulaire, les mutations K27M présentent des conséquences épigénétiques identiques, quelle que soit la forme de l'histone 3 affectée (Jessa et al., 2022). Comme précédemment évoqué, il apparaît probable que, bien qu'informative, l'induction des mutations H3 K27M dans des cellules de pLGG ne permette pas de récapituler exhaustivement les conséquences moléculaires des oncohistones observées dans les cellules de DMG. De fait, nos résultats demandent à être confirmés et approfondis d'un point de vue mécanistique dans un contexte cellulaire de DMG.

I.5. Conclusions concernant nos modèles d'induction et perspectives

L'induction de la mutation H3.3 K27M dans nos lignées cellulaires de gliome pédiatrique sustentoriel Res259 et SF188 engendrait la perte globale des marques H3K27me3 attendue. Nous avons également induit la mutation H3.3 K27M dans la lignée KNS42 ; néanmoins, les conséquences épigénétiques subséquentes apparaissaient atténuées, probablement du fait de la présence de la mutation H3.3 G34V.

La caractérisation phénotypique de nos modèles cellulaires isogéniques d'induction de la mutation H3. K27M *in vitro* nous a permis de faire la preuve de concept de l'impact potentiel de l'oncohistone sur la réponse à certaines thérapies anti-cancéreuses, incluant la radiothérapie et l'ONC201. Par ailleurs, la mutation H3.3 K27M favorise également le

phénotype agressif (*i.e.* croissance et invasion cellulaire) de nos modèles cellulaires, notamment en coopération avec d'autres voies de signalisation (*i.e.* voie des BMP).

Néanmoins, les résultats obtenus étaient très variables en fonction de la lignée cellulaire considérée. En effet, bien qu'informatifs, la limite majeure de ces modèles d'induction réside dans l'impact différentiel de la mutation en fonction du contexte cellulaire (*i.e.* architecture épigénétique inhérente à l'origine cellulaire et *drivers* oncogéniques en place). En ce sens, pour aucun des phénotypes étudiés nous n'obtenions un impact de la mutation partagé par nos trois lignées cellulaires, proscrivant la généralisation de nos conclusions. Étant donné que les oncohistones K27M sont quasi-pathognomoniques des DMG, il apparaît fondamental de confirmer les impacts phénotypiques identifiés et mener les études de compréhension mécanistique dans un contexte cellulaire de DMG.

D'autre part, au regard de l'impact sur le phénotype invasif, d'autres rôles de la mutation H3.3 K27M pourraient être conditionnés par la microenvironnement tumoral et la coopération avec d'autres voies de signalisation. Ainsi, l'étude de l'impact de la mutation H3.3 K27M dans des modèles récapitulant en partie le microenvironnement tumoral (*e.g.* sphéroïdes 3D, xénogreffes orthotopiques en modèles murins) pourrait révéler de nouvelles perspectives quant à son implication dans la réponse aux thérapies et le phénotype agressif des DMG.

Points clés

- **L'induction de la mutation H3.3 K27M** dans des lignées cellulaires de pLGG et pHGG engendre une **perte globale des marques H3K27me3**.
- Les **impacts phénotypiques** engendrés par l'induction de la mutation H3.3 K27M sont **dépendants du contexte cellulaire** (*i.e.* origine cellulaire et drivers oncogéniques en place).
- La mutation H3.3 K27M **peut induire une radiorésistance et modifier le profil de réponse au chimiothérapies et thérapies ciblées** des cellules de gliomes pédiatriques.
- La **coopération entre la mutation H3.3 K27M et le microenvironnement** (*e.g.* voie des BMP) peut impacter le **phénotype invasif** des cellules de gliome pédiatrique.
- Notre étude souligne la nécessité d'explorer l'impact phénotypique de l'oncohistone et les aspects mécanistiques associés **dans un contexte cellulaire de DMG**.

II Chapitre 2 : Établissement et caractérisation comparative de modèles cellulaires de DMG invalidés pour la mutation H3.3 K27M

II.1. Préambule

Nous venons de voir que selon le contexte cellulaire considéré, l'induction de H3 K27M engendre des conséquences biologiques variables et peu généralisables (Funato et al., 2014; Haag et al., 2021; Rakotomalala et al., 2021a). Ces variations, notamment liées à des différences d'origine cellulaire et de coopérations avec d'autres altérations, soulignent la nécessité d'explorer les impacts phénotypiques imputables aux oncohistones H3 K27M dans un contexte cellulaire de DMG.

Dans cette optique, la comparaison entre DMG mutés H3 K27M et DMG $H3^{WT}$ apparaît moins pertinente à plusieurs égards. D'une part, les DMG présentent des origines cellulaires spécifiquement associées à leurs statuts mutationnels de l'histone 3 (Jessa et al., 2022). D'autre part, la majorité des rares DMG $H3^{WT}$ présentent un mécanisme alternatif d'altération de type K27M par surexpression d'EZHIP (Jain et al., 2020b). Dans ce contexte, la stratégie apparaissant la plus adaptée pour imputer précisément à la mutation H3.3 K27M ses rôles phénotypiques semble d'en invalider l'expression dans des cellules de DMG. À ce jour, seules quelques études ont développé ce type de modèles. Ces dernières ont permis de montrer que la mutation H3.3 K27M reste indispensable au maintien du caractère oncogénique des cellules de DMG, au-delà de son rôle lors des étapes précoces de la tumorigenèse (Harutyunyan et al., 2019; Silveira et al., 2019; K.-Y. Chen et al., 2020). Néanmoins, au niveau cellulaire, les processus biologiques gouvernés par l'oncohistone H3.3 K27M, participant au maintien de ce caractère oncogénique des cellules de DMG, demeurent largement inconnus.

Après avoir achevé la caractérisation de nos modèles cellulaires d'induction (*cf.* chapitre 1), la majorité de mon travail de thèse a consisté en l'établissement et la caractérisation comparative de modèles cellulaires isogéniques de DMG invalidés pour la mutation H3.3 K27M. La caractérisation omic sans *a priori* de nos modèles cellulaires *knock-out* (KO) pour l'oncohistone nous a orienté vers l'étude de l'impact de la mutation H3.3 K27M sur le métabolisme énergétique et lipidique des cellules de DMG. À notre connaissance, nos résultats sont les premiers à mettre en lumière un impact de la mutation H3.3 K27M sur le métabolisme des acides gras des cellules de DMG. Ces modifications métaboliques associées à l'oncohistone pourraient constituer de potentiels talons d'Achille ou mécanismes de résistance à certaines thérapies.

II.2. Matériels et méthodes

II.2.1. Lignées cellulaires et conditions de culture

Les lignées cellulaires de DMG du tronc cérébral (ou DIPG) mutés H3.3 K27M HSJD-DIPG-007, 011, 012, 013 et -014 ont été gracieusement fournies par le Dr. Angel Montero Carcaboso (Hôpital Sant Joan de Déu, Barcelone). Les lignées cellulaires SU-DIPG-XIII (DIPG), BT245 (DMG thalamique) et HSJ-019 (DMG thalamique) ainsi que leurs modèles *knock-out* pour la mutation H3.3 K27M respectifs ont été gracieusement fournies par les équipes du Pr. Nada Jabado (McGill University) et du Dr. Keith Ligon (Dana Farber Cancer Institute, Boston). Ces lignées cellulaires étaient cultivées en suspension sur support non adhérent, dans un milieu sans sérum de type Tumor Stem Medium (TSM) issu d'un mélange 1:1 de milieu Neurobasal (-A) et de milieu D-MEM:F-12 (Life Technologies). Ce milieu TSM était supplémenté avec de l'HEPES buffer (10 mM), du pyruvate de sodium (1 mM), des acides aminés non essentiels (100 µM), du GlutaMAX-I supplement (2 mM), de l'antibiotique-antimycosique (100 unités/mL de penicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 250 ng/mL d'amphotericine B), du B-27 supplement sans vitamine A (concentration stock 50X, concentration finale 1X) (Gibco) ainsi que de l'EGF humain (20 ng/mL), du bFGF humain (20 ng/mL), du PDGF-AA humain (10 ng/mL), du PDGF-BB humain (10 ng/mL) et de l'héparine (2 µg/mL) (Peprotech). Les cellules étaient incubées en atmosphère humide à 37°C avec 5% de CO_2. Les modèles cellulaires 13CTRL, 13KO1, 13KO2 et 13KO3 dérivés de la lignée cellulaire HSJD-DIPG-013 (nommé DIPG13 P dans la suite du manuscrit) étaient cultivés dans les mêmes conditions. Toutes ces lignées et modèles cellulaires ont été testés négatifs aux mycoplasmes.

II.2.2. Invalidation de la mutation H3.3 K27M par CRISPR/Cas9

II.2.2.1. Plasmides

Les plasmides ont été synthétisés par la compagnie e-Zyvec (Polyplus). Le plasmide contenant la machinerie CRISPR/Cas9 comprend la séquence codant la Cas9 séparée de la séquence codant la GFP par une séquence codant le peptide autoclivable T2A. Ce plasmide comprend également la séquence codant un ARN guide ciblant la séquence 5' - ACCCCCTCATTTACTTGATT - 3' au niveau de l'intron 2 du gène *H3F3A*. Un autre plasmide contient une matrice de recombinaison composée de deux bras d'homologie (1kb) avec le gène *H3F3A*. Ces bras d'homologie encadrent une cassette de sélection composée d'un site accepteur d'épissage (EN2-SA), d'une séquence codant le peptide autoclivable T2A, d'un gène de résistance à la généticine (aminoglycoside 3'-phosphotransférase) et d'une séquence de

polyadénylation (HSV-TK). Cette cassette de sélection est encadrée par deux sites FRT positionnés dans la même orientation.

II.2.2.2. *Transfection cellulaire*

Après comptage cellulaire, 10^6 cellules des lignées HSJD-DIPG-007, 011, 012, 013 et -014 étaient co-transfectées avec 1µg de chacun des plasmides par électroporation à l'aide du kit *Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V* (Lonza #VCA-1003), selon le protocole du fabricant. L'électroporation était réalisée avec le programme O-017. La sélection avec 0.6 - 0.8 mg/mL de généticine (Life Technologies) était débutée 72h post-transfection pour 10 jours. Les cellules résistantes à la généticine étaient ensuite clonées par dilution limite en plaque 96 puits puis amplifiées.

II.2.3. Séquençage de la région du gène *H3F3A* contenant la mutation

II.2.3.1. *Extraction d'ADN et PCR*

L'ADN génomique était extrait à l'aide du kit *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel #740952) selon les recommandations du fabriquant. Brièvement, les cellules étaient lysées puis L'ADN génomique était adsorbé sur une membrane de silice puis élué dans 50 µL du tampon BE après deux étapes de rinçage. Un dosage de l'ADN génomique obtenu était réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre (DS-11 FX, DeNovix).
Les amplifications par PCR (*Polymerase chain reaction*) de la région de l'exon 2 du gène *H3F3A* contenant la transversion mono-allélique 83A>T (K27M) étaient réalisées avec le couple d'amorce suivant : amorce *forward* 5' - GATTTTGGGTAGACGTAATCTTCA - 3' ; amorce *reverse* 5' - TTTCCTGTTATCCATCTTTTTGTT - 3'. La réaction de PCR était effectuée à l'aide du Platinium™ *PCR Supermix High Fidelity* (Invitrogen #12532) dans un thermocycleur de type CFX96 (Bio-Rad).

II.2.3.2. *Séquençage Sanger*

Les produits de PCR étaient purifiés à l'aide du kit *PCR clean-up* (Macherey-Nagel #740609) selon les conditions du fabricant. Ensuite, 5 µL de produits de PCR purifiés (concentration 12 ng/µL) étaient mélangés à 5µL de l'amorce *forward* (5 µM) dans un tube 1.5 mL et envoyés au service GATC (*Eurofins Genomics*) réalisant un séquençage Sanger de nos échantillons.

II.2.4. Extraction de protéines et western blot

II.2.4.1. Extraction des protéines totales

Les cellules étaient lysées dans du tampon RIPA (Thermo scientific) supplémenté en inhibiteurs de protéases et phosphatases (Thermo scientific). Après 15 minutes de lyse sur glace, le lysat cellulaire était centrifugé à 14 000 x g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu, contenant les protéines, était utilisé pour les analyses.

II.2.4.2. Extraction des histones

Les cellules étaient récoltées et comptées puis centrifugées à 400 x *g* durant 3 minutes afin d'obtenir un culot d'environ 10^7 cellules. La lyse cellulaire et l'extraction des histones étaient réalisées à l'aide du kit *Histone Extraction Kit* (abcam #ab113476), selon le protocole du fabricant.

II.2.4.3. Dosage protéique

Les protéines totales ou histones étaient dosées par la technique BCA (*Bicinchoninic Acid*) en utilisant le réactif *BCA Biorad Protein Assay* (Bio-Rad) selon le protocole du fabricant. Une courbe étalon était tracée à l'aide d'une gamme de concentration de sérum albumine bovine (BSA) allant de 0.14 à 1.4 mg/mL. L'absorbance était lue à 595nm à l'aide d'un lecteur de plaque de type VERSAmax (Molecular Devices). Les valeurs d'absorbances obtenues pour la gamme permettaient de déterminer la concentration en protéines de nos échantillons.

II.2.4.4. Western blot

La même quantité de protéines totales (50µg) ou d'histones (5µg) entre nos conditions était ajoutée à 5µL de tampon NuPAGE *LDS sample buffer* (Invitrogen) et dénaturée à 95°C pendant 5 minutes. Les protéines totales, ou les histones, ainsi dénaturées étaient chargées dans des gels pré-coulés de polyacrylamide 10% ou 12% (NuPAGE, Invitrogen), respectivement, et séparées par électrophorèse durant 1h30 à 130V dans du tampon de migration NuPAGE de type MOPS (protéines totales) ou MES (histones) (Life technologies). Le transfert sur membrane de nitrocellulose (Thermo scientific) était réalisé en conditions humides durant 1h35 minutes à 100V dans un tampon de transfert constitué de Glycine (0.192M), Tri Base (25mM), Sodium dodecyl sulfate (1.3mM) et Méthanol (20%) dans l'H_2O. La membrane de nitrocellulose était ensuite saturée dans une solution de BSA (TBS-Tween 0.2% contenant 5% de BSA), sous agitation durant 1h à température ambiante. Les anticorps primaires étaient dilués dans la solution de BSA (TBS-Tween 0.2% contenant 5% de BSA) selon

les conditions détaillées dans le tableau ci-dessous, puis les membranes étaient incubées une nuit à 4°C sous agitation.

Anticorps	Dilution (WB)	Fournisseur	Référence
H3K27M	1/1000	Abcam	#ab190631
H3K27me3	1/1000	Cell Signaling	#9733
H3K27ac	1/1000	Cell Signaling	#8173
H3K36me2	1/1000	Cell Signaling	#2901
H4K16ac	1/1000	Cell Signaling	#13534
H3K79me3	1/1000	Cell Signaling	#74073
H3K9me3	1/1000	Abcam	#ab184677
H3.3	1/1000	Abcam	#ab97968
H4	1/1000	Cell Signaling	#13919
ACSS3	1/500	Invitrogen	#PA5-80305
ACSL1	1/500	Cell Signaling	#4047
AMPK2α	1/500	Cell Signaling	#2757
ACC	1/500	Cell Signaling	#3676
P(Ser79)-ACC	1/500	Cell Signaling	#11818
Actine	1/5000	Sigma-Aldrich	#A2066

Successivement, trois lavages de 5 minutes au TBS-Tween 0.2% étaient effectués sous agitation. Les anticorps secondaires couplés à la *horseradish peroxidase* (HRP) (Cell Signaling #7076 et #7074) étaient ajoutés (dilués au 1/2000) dans une solution de BSA (TBS-Tween 0.2% contenant 5% de BSA) et incubés 1h sous agitation à température ambiante. De nouveau, trois lavages successifs de 5 minutes au TBS-Tween 0.2% étaient effectués sous agitation avant révélation avec du substrat *Luminata Crescendo Western HRP Substrate* (Merck Millipore). La détection du signal de chimiluminescence était réalisée à l'aide du système Fusion Solo S (Vilber Lourmat). L'analyse de la densitométrie des signaux obtenus était réalisée à l'aide du logiciel imageJ.

II.2.5. Analyse de la méthylation globale de l'ADN

L'ADN génomique était extrait à l'aide du kit *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel #740952) selon les recommandations du fabriquant. La concentration et la pureté (ratio 260/280) de l'ADN génomique extrait étaient mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (DS-11 FX, DeNovix). Pour chaque condition, 100ng d'ADN présentant un ratio 260/280 supérieur à 1.6 étaient utilisés. La méthylation globale de l'ADN était quantifiée à l'aide du kit *MethylFlash Global DNA Methylation (5-mC) ELISA* (Epigentek #P-1030) selon le protocole du fabricant.

II.2.6. Tests de croissance cellulaire

Pour les tests de croissance par comptage cellulaire, 25 000 cellules étaient ensemencées en plaques 96 puits au jour 0. À chaque temps indiqués (J1, J3, J6, J9 et J12), les cellules étaient récoltées, dissociées avec du TrypLE™ Express (Gibco) puis comptées à l'aide du TC20 *Automated Cell Counter* (Bio-Rad). Le nombre de cellules obtenu était normalisé par rapport au nombre de cellules comptées au jour 1 post-ensemencement pour chaque condition.

II.2.7. Analyse par *RT-qPCR*

II.2.7.1. Extraction des ARN

Les ARN étaient isolés et traités avec de la rDNase à l'aide du kit *NucleoSpin RNA* (Macherey-Nagel #740955) selon les conditions du fabricant. Un dosage des ARN était réalisé par spectrophotométrie (DS-11 FX, DeNovix). La rétrotranscription de 1 µg d'ARN en ADN complémentaires (ADNc) était effectuée à l'aide du kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems #4368814) dans un thermocycleur de type CFX96 (Bio-Rad).

II.2.7.2. TaqMan array

L'expression de 48 gènes d'intérêts était évaluée en duplicat dans des plaques *TaqMan Array, Human cyclins & cell cycle regulation, Fast 96-well* (Applied Biosystems #4418768). Dans chaque puits, la réaction de *qPCR* était réalisée dans le *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* (Applied Biosystems #4444557) sur 10ng d'ADNc afin de mesurer l'expression d'un des 48 gènes d'intérêt en duplex avec la GAPDH (utilisée comme gène de ménage). Les cycles de PCR et la lecture de fluorescence étaient réalisés à l'aide de la technologie *StepOnePlus™ Real-Time PCR system* (Applied Biosystems).

II.2.8. Analyse *RNA-seq*

Le protocole utilisé est similaire à celui précédemment décrit dans l'étude de Huchedé et collaborateurs avec quelques adaptations (Huchedé et al., 2023). Pour la préparation de la librairie, 1 µg d'ARN totaux était isolé à l'aide du kit *NucleoSpin RNA* (Macherey-Nagel #740955) selon le protocole du fabricant. La librairie était préparée avec le kit *Illumina Stranded mRNA Prep* (Illumina #20040534) selon les recommandations du fabricant. La qualité des échantillons était évaluée à l'aide de la technologie *TapeStation 4200 automated electrophoresis system* (Agilent) avec des High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent). Les

librairies étaient séquencées (2x76bp) en utilisant le système de séquençage *NovaSeq 6000* (Illumina) selon le protocole standard Illumina.

Le contrôle qualité des *reads* était réalisé en utilisant FastQC (v.0.11.9), suivi du nettoyage des séquences adaptatrices Illumina avec Cutadapt (v.3.4) en utilisant les paramètres -a CTGTCTCTTATACACATCT et -A CTGTCTCTTATACACATCT. Les *reads* étaient ensuite alignés sur le génome humain de référence GRCh38 en utilisant « two-pass » mode STAR (v.2.7.9), avec les annotations Ensembl v104. Les gene counts étaient déterminés avec HTseq-count (v.0.13.5) en utilisant les paramètres suivants : « --order pos » and « --stranded reverse ». Le fichier de gene counts obtenus était ensuite chargé dans R (v 4.2.0). Les gènes présentant des *low count* (*reads* inférieurs à 10 parmi les différentes conditions) ainsi que ceux ne codant pas de protéines étaient éliminés en utilisant les annotations de org.Hs.eg.db (v 3.15.0). Les gene counts filtrés étaient convertis en un objet DESeq2 et normalisés avec vst et la paramètre « blind = FALSE ». Les gènes avec une p-value ajustée (Benjamini-Hochberg) < 0.05 et un log2FoldChange (LFC) > log2(1.5) étaient considérés comme différentiellement exprimés.

L'analyse en composantes principales (PCA) était réalisée sur les expressions normalisées à l'aide du package DESeq2. Par recoupement des listes de gènes différentiellement exprimés entre chacune de nos conditions, les gènes communs à nos trois clones KO (13KO1/2/3) différentiellement exprimés par rapport à la condition parentale (DIPG13 P) et à la condition contrôle (13CTRL) étaient identifiés. Les gènes différentiellement exprimés entre la condition parentale (DIPG13 P) et la condition contrôle (13CTRL) étaient éliminés de la liste. Des analyses Enrich R étaient effectuées sur la liste finale de gènes différentiellement exprimés à l'aide de l'outil ShinyGO (v 0.80).

II.2.9. Analyse protéomique

II.2.9.1. Préparation des échantillons protéiques

Les protéines étaient extraites dans du tampon RIPA et quantifiées par la méthode de Bradford. Une quantité de 80 µg d'extrait protéique était réduite dans du tampon réducteur (dithiothreitol-DTT 0.1 M) à 56°C pendant 40 minutes puis chargée sur des *Amicon ultracentrifugal filters* (Millipore). Un protocole de préparation des échantillons sur filtres était réalisé, incluant une dénaturation dans un tampon d'urée (8M, Tris-HCl 0.1M, pH8) ainsi qu'une alkylation avec 55mM iodoacetamide pendant 20 minutes à l'obscurité. Les protéines étaient ensuite digérées sur la nuit à 37°C avec 40 µg/ml de trypsine (Promega). La digestion était arrêtée avec du TFA 0.5%. Les échantillons étaient dessalés à l'aide de C18 ZipTip (Millipore) puis élués dans 20 µl de tampon d'élution (80% ACN/20% 0.1%TFA). La solution était ensuite séchée à l'aide d'un système de concentration sous-vide de type SpeedVac. Les

échantillons étaient ensuite resolubilisés dans une solution de re-suspension (2% ACN/80% acide formique 0.1%) avant l'analyse LC-MS/MS.

II.2.9.2. *Analyse LC-MS/MS*

Les échantillons étaient séparés par chromatographie liquide en phase inverse à l'aide du système Easy-nLC 1000 (Thermo Scientific) équipé de *trap column* (75 µm ID x 2 cm, Thermo Scientific) et de C18 *packed-tip column* (75 µm ID x 50 cm, Thermo Scientific). Les peptides étaient séparés avec une quantité croissante d'acetonitrile (5-35% sur une période de 100 min) et un flux de 300 nl/min. L'électronébulisation de l'éluat de la chromatographie liquide était réalisée directement à la sortie de la colonne analytique, un voltage de 2.4kV était appliqué par la jonction liquide de la source *nanospray*. Le système de chromatographie était couplé à spectromètre de masse de type Q-Exactive (Thermo Scientific) programmé pour réaliser une acquisition en mode *data-dependent* (top 10). L'analyse MS était effectuée sur une plage m/z de 300 à 1600, avec une résolution de 70 000 FWHM, un AGC de 3e6 ions et un temps d'injection maximal de 120 ms. Pour l'analyse MS/MS, la gamme de masse m/z était comprise entre des valeurs de 200 et 2000, avec un AGC de 5e4 ions, un temps d'injection maximal de 60 ms et une résolution de 17 500 FWHM. La dissociation par collision à haute énergie (HCD) était fixée à 30 %. Les ions précurseurs avec des états de charge supérieurs à +1 et inférieurs à +8 étaient sélectionnés pour la fragmentation, avec un temps d'exclusion dynamique de 25 secondes.

II.2.9.3. *Analyse des données*

L'identification des protéines était réalisée à l'aide du logiciel MaxQuant, en comparant les données de MS/MS avec le protéome complet de l'espèce *Homo sapiens* (Uniprot, version juillet 2018 ; 8054 entrées). Les règles de clivage spécifiques de la trypsine étaient utilisées pour la digestion protéique *in silico* avec deux clivages manqués tolérés. La carbamidométhylation de la cystéine était définie comme une modification fixe. L'acétylation N-terminale et l'oxydation de la méthionine étaient choisies comme modifications variables. Pour les spectres MS, une tolérance de masse initiale de 6 ppm était sélectionnée et la tolérance MS/MS était fixée à 20 ppm pour les données HCD. Pour l'identification, le seuil de *false discovery rate* (FDR) était fixé à 0,01 pour les correspondances spectrales de peptides (PSM). La quantification relative des protéines, sans marquage, était réalisée à l'aide de l'algorithme MaxLFQ intégré à MaxQuant avec les paramètres par défaut. L'analyse des protéines identifiées était réalisée à l'aide du logiciel Perseus (http://www.perseus-framework.org/) (version 1.6.10.43). Le fichier contenant les informations d'identification était utilisé avec les hits de la base de données inversée, et les protéines identifiées avec des peptides modifiés et/ou des contaminants potentiels étaient supprimées. Les intensités LFQ étaient

ensuite transformées en valeurs logarithmiques (log2[x]). L'annotation des lignes était utilisée pour définir les différents groupes. Un test t à deux échantillons a été réalisé à l'aide d'un test t de *Student* avec une p-value de 0,05, les groupes étant maintenus lors de la randomisation. Les résultats ont été normalisés par *z-score* et présentés sous forme d'une clusterisation hiérarchique. Des analyses EnrichR étaient effectuées sur les protéines identifiées comme différentiellement exprimées entre les conditions DIPG13 P, 13CTRL vs. 13KO1, 13KO2, 13KO3 à l'aide de l'outil ShinyGO (v 0.80) en définissant comme background l'ensemble des protéines détectées toutes conditions confondues lors de notre analyse.

II.2.10. Formation de sphéroïdes de taille standardisée

Les cellules étaient ensemencées en plaques 96 puits à fonds ronds à une densité adaptée pour chaque modèle (compte-tenu de leur vitesse de croissance différente) afin d'obtenir *in fine* des sphéroïdes de taille comparable entre les conditions testées. Ainsi, au jour 0, 10 000 cellules de la lignée DIPG13 P, 20 000 cellules du clone contrôle 13CTRL, 25 000 cellules du clone 13KO1, 23 000 cellules du clone 13KO2 et 30 000 cellules du clone 13KO3 étaient ensemencées. Les plaques 96 puits à fonds ronds étaient ensuite centrifugées quotidiennement pendant 8 jours, à 2000 x g durant 5 minutes. Au jour 10, les sphéroïdes étaient mesurés à l'aide d'un scanner de plaques de type Cell^{3}iMager neo (Screen) et du logiciel d'analyse associé. Les sphéroïdes présentaient un diamètre moyen compris entre 650 et 750µm pour l'ensemble des conditions et étaient ensuite utilisés pour nos analyses.

II.2.11. Mesure de la consommation d'oxygène sur sphéroïdes

Les sphéroïdes standardisés de diamètre compris entre 650 et 750 µm étaient générés en plaques 96 puits à fonds ronds comme décrit précédemment (partie II.2.10.). Le jour de l'expérience, les sphéroïdes étaient mesurés à l'aide d'un scanner de plaques de type Cell^{3}iMager neo (Screen) puis transférés dans une plaque d'analyse *Agilent Seahorse XFe96 Spheroid Microplate* (Agilent #102905-100) à l'aide d'un robot pipeteur de type *Assist Plus* muni d'une pipette Voyager 125 (Integra). Une analyse de l'*oxygen consumption rate* (OCR) était ensuite réalisée à l'aide de la technologie *Seahorse XFe96* (Agilent). Au cours de l'expérience, étaient successivement injectés : 2.5 mM d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase), une première dose de FCCP (protonophore découplant la chaîne respiratoire de l'ATP synthase) permettant d'atteindre une concentration finale de 1 µM, une deuxième dose de FCCP permettant d'atteindre une concentration finale de 1.5 µM et enfin 10 µM d'antimycine A (inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale) et 10 µM de roténone (inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale). Cette séquence d'injection permettait d'évaluer les paramètres que sont la respiration basale, la part de la consommation d'O_2 dédiée à la régénération d'ATP à partir d'ADP et de Pi, la

consommation d'O_2 maximale que peut atteindre la chaîne respiratoire (après les injections de FCCP) et enfin la consommation d'oxygène non mitochondriale (après l'injection d'antimycine A et de roténone). En parallèle, l'*extracellular acidification rate* (ECAR) était également mesuré. Pour les expériences d'étude du recours aux acides gras pour alimenter l'OXPHOS, un pré-traitement de 4h des sphéroïdes avec l'étomoxir (inhibiteur de CPT1) à une dose de 3 µM était effectué préalablement à la mesure de l'OCR. Le traitement à l'étomoxir (3 µM) était maintenu au cours de la mesure.

II.2.12. Tests de cytotoxicité

Au jour 0, les cellules étaient ensemencées dans des plaques 384 puits à une densité de 14 000 cellules/puits. Au jour 1 (24 heures post-ensemencement), les cellules étaient traitées pour 96 heures avec une gamme de concentrations croissantes, adaptée à chaque composé. Pour chaque point de concentration, 8 réplicats techniques étaient réalisés. Pendant le traitement, les cellules étaient incubées en atmosphère humide à 37°C avec 5% de CO_2. Après les 96h de traitement, la révélation s'effectuait par la distribution d'une solution de bleu resazurin (150 µg/mL) dans chacun des puits. L'ensemble de ces étapes (ensemencement, préparation de la gamme de concentration, traitement et distribution de la solution de bleu de resazurin) étaient réalisées à l'aide d'un robot pipeteur de type *Assist Plus* équipé d'une pipette électronique Voyager 125 (Integra). Les plaques étaient ensuite incubées 24h à 37°C dans l'obscurité. À l'issue de cette incubation, la densité optique (DO) était lue à 570 et 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque de type *Spectramax plus* (Molecular Devices). La différence de DO (DO à 570 nm – DO à 595 nm) était calculée, permettant de déterminer la viabilité cellulaire, relative à la condition non traitée, pour chaque concentration du composé testé par la formule suivante : 100 x [Valeur moyenne de différence de DO] / [Valeur moyenne de différence de DO pour la condition non traitée].
Une courbe de cytotoxicité était tracée avec, en abscisses, les différents points de concentrations (échelle logarithmique) et, en ordonnées, la viabilité cellulaire relative. La courbe de cytotoxicité était extrapolée par un modèle de régression non linéaire en utilisant le logiciel *GraphPad Prism*.

II.2.13. Marquage des gouttelettes lipidiques

II.2.13.1. Dépôt des cellules sur lame de microscopie par cytospin

Après rinçage au PBS, les cellules étaient dissociées, filtrées sur des tamis de 35 µm puis comptées. A partir du comptage, une solution de 10^6 cellules par mL de PBS était préparée pour chacune des conditions. À partir de cette solution, 1.5 x 10^5 cellules étaient déposées sur lame de microscopie en verre à l'aide du système *Cellspin® II* (Tharmac). Les

spots de cellules étaient ensuite fixés avec une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 15 minutes puis rincés à l'eau distillée. Pour les expériences en conditions hypoxiques, les cellules étaient préalablement incubées en station à hypoxie (Hypoxystation H35, Don Witley) sous 1% O_2, 5% CO_2 et 37°C en atmosphère humide pour 72h.

II.2.13.2. Cryosections de sphéroïdes

Des sphéroïdes de 650-750 µm étaient formés comme décrit dans la partie II.2.10. Pour les expériences évaluant l'impact de l'acidose, les sphéroïdes étaient formés dans du milieu de culture dont le pH avait été préalablement ajusté à 6.5 ou supplémenté avec du bicarbonate de sodium (22mM). Une fois formés, les sphéroïdes étaient récoltés dans des tubes de 1.5 mL puis rincés trois fois successivement dans du PBS. Les sphéroïdes étaient ensuite fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 50 minutes. Après fixation, les sphéroïdes étaient récupérés dans 200 µL de PBS et transférés dans des moules d'histologie de dimensions 7x7x5mm (VWR). Après aspiration du PBS résiduel, les sphéroïdes étaient inclus dans de l'O.C.T medium (Tissue-Tek) puis congelés à l'aide du système Snapfrost® (Excilone). Les cryoblocs obtenus étaient conservés à -80°C avant de réaliser des coupes de 10 µm d'épaisseurs à l'aide d'un cryostat de type CryoStar NX70 (Thermo Scientific) Les lames étaient conservées à -20°C.

II.2.13.3. Coloration Oil Red O

La coloration *Oil Red O* était réalisée à l'aide des réactifs du kit *Oil Red O Stain* (Abcam #ab150678). Les lames étaient rincées dans deux bains successifs d'eau distillées puis du propylène glycol 85% était ajouté pour couvrir l'ensemble des échantillons pendant 2 minutes. Le propylène glycol était ensuite aspiré puis la *Oil Red O staining solution* préchauffée à 60°C était ajoutée sur les échantillons pour 24h. Après aspiration de la solution d'*Oil Red*, une incubation de 5 minutes dans du propylène glycol était effectuée puis les lames étaient rincées plusieurs fois dans l'eau distillée. Les lames étaient ensuite séchées puis un contremarquage avec une solution d'hématoxyline (45 secondes d'incubation) était réalisé. Après plusieurs rinçages dans l'eau distillée, les échantillons étaient montés sous une lamelle de microscopie dans du liquide de montage aqueux de type Fluoromount-G™ (Invitrogen). L'acquisition des images se faisait ensuite à l'aide d'un microscope de type EVOS M5000 (Invitrogen) en RGB avec un objectif x20 ou x40.

II.3. Résultats

II.3.1. Établissement et validation de modèles cellulaires invalidés pour la mutation H3.3 K27M

II.3.1.1. Établissement de modèles cellulaires knock-out pour la mutation H3.3 K27M dans les cellules HSJD-DIPG-013

Afin d'étudier l'impact biologique de la mutation H3.3 K27M dans un contexte cellulaire de DMG, nous avons entrepris le développement des modèles cellulaires invalidés pour l'oncohistone. Sur un panel de cinq lignées cellulaires de DIPG mutés H3.3 K27M présentant des profils mutationnels variés (HSJD-DIPG-007, -011, -012, -013 et -014) (Fig. 20A), nous avons appliqué une stratégie d'édition du génome utilisant la technologie CRISPR/Cas9 et une matrice de recombinaison (contenant l'exon 2 sauvage du gène *H3F3A* et une cassette de sélection), avec pour ambition de corriger l'allèle muté du gène *H3F3A* dans ces lignées (Fig. 20B). La mutation H3.3 K27M étant mono-allélique, la recombinaison homologue pouvait s'effectuer sur l'allèle initialement muté, donnant lieu à des clones H3.3 K27M-KO souhaités, ou sur l'allèle sauvage du gène *H3F3A* (ne différant que d'un nucléotide de l'allèle muté), donnant lieu à des clones dits « contrôles », à savoir toujours porteurs de l'oncohistone mais KO pour l'allèle sauvage de *H3F3A* après avoir subi notre stratégie.

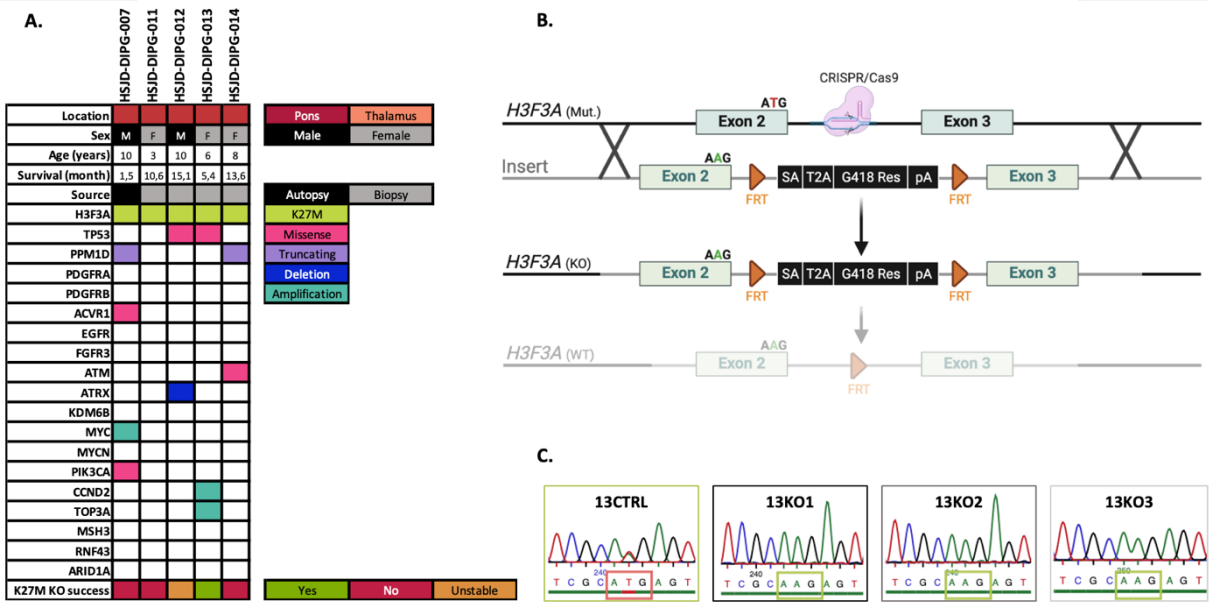


Figure 20. Établissement de modèles cellulaires *knock-out* pour l'oncohistone H3.3K27M. A. *Oncoplot* indiquant la localisation tumorale, les informations patients disponibles et les altérations moléculaires connues concernant les lignées cellulaires de DIPG du panel utilisé pour mettre en œuvre notre stratégie d'invalidation.

B. Schéma de la stratégie d'invalidation de l'allèle muté du gène *H3F3A* (Mut.) dans les lignées cellulaires de DIPG par *gene editing*. Cette stratégie repose sur l'utilisation combinée de la technologie *CRISPR/Cas9* et d'un insert. La technologie *CRISPR/Cas9* est utilisée afin d'effectuer une coupure double brin de l'ADN au niveau de l'intron 2 du gène *H3F3A*. L'insert, quant à lui, est utilisé comme matrice de réparation par recombinaison homologue de cette coupure. Ce dernier comprend, dans l'ordre suivant : un bras d'homologie contenant l'exon 2 non muté (dans lequel le codon AAG, en vert, remplace le codon ATG muté) du gène *H3F3A* (en vert), un site de recombinaison FRT, un site accepteur de l'épissage (SA), une séquence codant un peptide autoclivable selon le mécanisme de *ribosome skipping* (T2A), un gène de résistance à la généticine dépourvu de promoteur (G418 Res), un signal de polyadénylation (pA), un deuxième site de recombinaison FRT dans la même orientation que le premier et enfin un deuxième bras d'homologie contenant l'exon 3 du gène *H3F3A*. Grâce à cette construction, seuls les clones ayant subi l'événement rare de recombinaison homologue deviennent résistants à la généticine et peuvent ainsi être sélectionnés. Une transfection transitoire des clones obtenus avec une construction codant une protéine de fusion entre la flippase et la *green fluorescent protein* (GFP) permet d'exciser la cassette de sélection et d'obtenir des sous-clones présentant deux allèles fonctionnels du gène *H3F3A* après tri cellulaire (clonage des cellules GFP^+). **C.** Chromatogrammes de séquençage Sanger de clones obtenus après application de notre stratégie de *gene editing* dans la lignée HSJD-DIPG-013. Ces données de séquençage valident l'obtention d'un clone contrôle ayant recombiné sur l'allèle sauvage du gène *H3F3A* et donc toujours porteur de la mutation (13CTRL) et de 3 clones réversés indépendants ne présentant plus la mutation au niveau génomique (13KO1, 13KO2 et 13KO3).

Par cette approche, nous avons réussi à obtenir, au sein de la lignée cellulaire HSJD-DIPG-013, trois clones indépendants, montrant une perte stable de la mutation au niveau génomique (13KO1/2/3), et un clone contrôle (13CTRL), présentant toujours la transversion hétérozygote 83A>T (Fig. 20C). Dans l'ensemble de ces clones issus de la lignée HSJD-DIPG-013, nous avons validé l'intégration de notre insert au niveau du gène *H3F3A* par amplification PCR utilisant une amorce sur l'insert et une en aval sur le gène *H3F3A* (données non présentées).

Notre ambition initiale était, *in fine*, d'exciser la cassette de sélection flanquée par des sites FRT afin d'obtenir des « sous-clones » présentant deux allèles du gène *H3F3A* fonctionnels (Fig. 20B). Toutefois, cette étape nécessitait une transfection (transitoire) des clones préalablement obtenus avec une construction codant la flippase, suivie d'un clonage supplémentaire. Malgré de nombreuses mises au point, nos clones présentaient des taux de transfection (<10%) et des capacités de reprise de croissance post-clonage par tri cellulaire très faibles. Dans ce contexte, nous avons mené notre étude sur les modèles KO pour l'oncohistone. De façon surprenante, nos tentatives visant à appliquer cette stratégie de *gene editing*, dès lors éprouvée, dans les autres lignées constituant notre panel ne nous permettaient pas d'aboutir à l'établissement de modèles KO stables.

II.3.1.2. Validation de la réversion des altérations épigénétiques caractéristiques dans les cellules de DMG knock-out pour l'oncohistone

Forts de l'invalidation génomique obtenue, nous avons validé la perte de l'oncohistone H3.3 K27M au niveau protéique, par western blot, dans nos trois clones KO, par rapport à la lignée cellulaire parentale HSJD-DIPG-013 (DIPG13 P) et au clone 13CTRL (Fig. 21A).

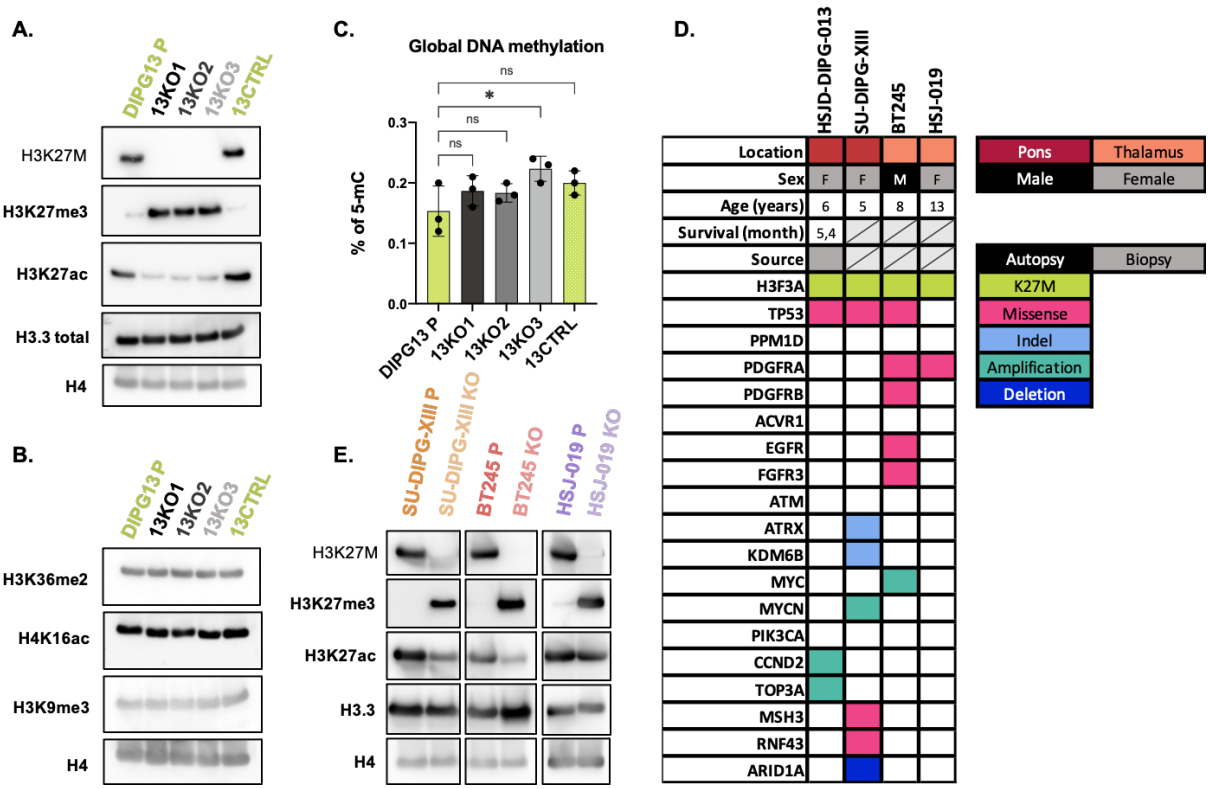


Figure 21. Caractérisation du paysage épigénétique global associé à l'invalidation de la mutation H3.3 K27M dans notre panel de modèles cellulaires. A. Western blot dirigés contre l'oncohistone H3 K27M, la triméthylation des lysines 27 des histones 3 (H3K27me3), l'acétylation des lysines 27 des histones 3 (H3K27ac) et le variant H3.3, réalisés sur extractions d'histones provenant de cellules DIPG13 P, 13CTRL et des 3 clones KO (13KO1, 2 et 3). La protéine H4 était utilisée comme témoin d'équicharge. **B.** Western blot dirigés contre les marques de diméthylation des lysines 36 des histones 3 (H3K36me2), d'acétylation des lysines 16 des histones 4 (H4K16ac) et de triméthylation des lysines 9 des histones 3 (H3K9me3), réalisés sur extractions d'histones provenant de cellules de DIPG13 P, 13CTRL et des 3 clones KO (13KO1, 2 et 3). La protéine H4 était utilisée comme témoin d'équicharge. **C.** Analyse de la méthylation globale de l'ADN à l'aide du kit MethylFlash Global DNA Methylation (5-mC) ELISA (Epigentek) à partir d'ADN extrait des cellules de DIPG13 P, 13CTRL et des 3 clones KO (13KO1, 2 et 3). Les barres d'erreur représentent les écarts-types obtenus après 3 expériences indépendantes et l'analyse statistique était effectuée par l'application d'un test one-way ANOVA (ns, $P > 0,05$; *, $P < 0.05$). **D.** *Oncoplot* indiquant la localisation tumorale, les informations patients disponibles et les mutations somatiques connues concernant les lignées cellulaires de notre panel étendu de modèles KO-H3.3K27M**. E.** Western blot dirigés contre l'oncohistone H3 K27M, les marques de triméthylation (H3K27me3) et d'acétylation (H3K27ac) des lysines 27 des histones 3 et le variant d'histone H3.3, réalisées sur extractions d'histones provenant des cellules SU-DIPG-XIII, BT245, HSJ-019 et de leurs clones KO-H3.3K27M respectifs. La protéine H4 était utilisée comme témoin d'équicharge.

- **Validation des conséquences du KO sur les marques portées par les lysines 27 des histones 3**

En complément, nous avons vérifié que cette perte de l'oncohistone dans nos modèles KO s'accompagnait de la réversion des altérations épigénétiques associées. L'impact épigénétique emblématique de la mutation H3.3 K27M étant la perte globale de la marque H3K27me3 (Bender et al., 2013; Lewis et al., 2013), nous en avons étudié son niveau global

dans nos modèles cellulaires. Comme attendu, nous avons pu montrer par western blot que l'invalidation de la mutation induisait un retour des marques de H3K27me3 dans nos 3 clones réversés par rapport aux cellules parentales et contrôles (Fig. 21A).

Il a également été décrit que cette perte de H3K27me3 s'accompagnait d'une hausse des marques antagonistes H3K27ac (Krug et al., 2019; Lewis et al., 2013). De manière cohérente, dans nos clones KO pour la mutation H3.3 K27M, nous observions également une forte diminution du niveau global des marques H3K27ac par rapport aux cellules parentales et contrôles (Fig. 21A).

D'autre part, étant donné notre stratégie d'invalidation par *knock-out* de l'allèle muté du gène *H3F3A* (et de l'allèle sauvage dans notre modèle 13CTRL), il apparaissait nécessaire de vérifier l'impact de notre stratégie sur le niveau global d'expression du variant d'histone H3.3. Celui-ci apparaissait identique entre la lignée parentale, le clone 13CTRL et les 3 clones KO (Fig. 21A).

- **Impact du KO sur le niveau d'autres marques épigénétiques d'histones**

Du fait des interconnexions entre les mécanismes d'apposition et de retrait des différentes marques épigénétiques et des modifications de l'interactome associées à la mutation K27M, nous avons également caractérisé le niveau global d'autres marques épigénétiques, identifiées par plusieurs études comme signature des cellules de DIPG mutées H3.3K27M. Au rang de ces modifications, figurent l'augmentation de la diméthylation des lysines 36 des histones 3 (H3K36me2) et l'augmentation de l'acétylation des lysines 16 de l'histone 4 (H4K16ac) (An et al., 2020; Stafford et al., 2018). Dans nos modèles, nous ne constations pas de changement du niveau global de ces marques avec l'invalidation de la mutation (Fig. 21B), n'excluant cependant pas de potentielles modifications de leurs localisations à l'échelle de l'épigénome. En effet, certaines études ont montré que l'oncohistone H3.3 K27M engendrait une redistribution des marques H3K36me2 sans en impacter le niveau global (Harutyunyan et al., 2020).

À l'instar de H3K27me3, nous avons également étudié le niveau global d'une autre marque répressive qu'est la triméthylation des lysines 9 des histones 3 (H3K9me3). Quand certaines études suggèrent une réduction des marques H3K9me3 au niveau des nucléosomes porteurs de l'oncohistone (Siddaway et al., 2022), d'autres suggèrent une hausse liée au remplacement compensatoire de la perte de H3K27me2/3 (Harutyunyan et al., 2020). Entre nos modèles cellulaires, nous ne constations pas de variation du niveau de H3K9me3 (Fig. 21B).

- **Impact du KO sur le niveau global de méthylation de l'ADN**

Par ailleurs, il a été décrit dans la littérature que l'hypométhylation associée à la mutation concerne également les cytosines de l'ADN (Bender et al., 2013; Cordero et al., 2017). Dans ce

contexte, nous avons entrepris une étude comparative du taux de la méthylation de l'ADN entre nos cellules H3.3 K27M (DIPG13 P et 13CTRL) et nos clones *knock-out* (Fig. 21C). Cette analyse ne montrait pas de différence significative du niveau global de méthylation de l'ADN entre nos clones KO et les cellules parentales et contrôles. En effet, les clones 13KO1 et 13KO2 conservent un niveau de méthylation de leur ADN autour de 0.2%, comparable au clone contrôle et, seul le clone 13KO3 présentait une légère tendance à l'augmentation de son pourcentage d'ADN méthylé par rapport aux cellules DIPG13 P. Ainsi, dans nos modèles isogéniques, le retrait de la mutation n'engendrait pas d'augmentation notable du niveau de méthylation de l'ADN.

II.3.1.3. *Extension de notre panel de modèles*

Étant donné que nous étions parvenus à établir et valider des modèles KO-H3.3 K27M stables uniquement dans la lignée HSJD-DIPG-013, il apparaissait essentiel d'étendre notre panel de modèles cellulaires afin de mener une étude plus robuste et généralisable. En ce sens, une collaboration avec l'équipe du Pr. Nada Jabado (McGill University, Canada) nous a permis d'obtenir 3 autres modèles KO-H3.3K27M associés à leurs lignées parentales respectives (SU-DIPG-XIII, BT245 et HSJ-019). Ces nouveaux modèles nous ont permis de diversifier notre panel d'un point de vue moléculaire mais également en termes de localisation tumorale avec, *in fine*, un total 2 modèles cellulaires de DIPG (HSJD-DIPG-013 et SU-DIPG-XIII) et 2 modèles cellulaires de DMG thalamiques (BT245 et HSJ-019) (Fig. 21D). Comme attendu, après vérification par western blot, les modèles KO-H3.3K27M dérivés des lignées SU-DIPG-XIII, BT245 et HSJ-019 présentaient une absence de l'oncohistone à l'échelle protéique, s'accompagnant d'un retour conséquent des marques H3K27me3 et d'une diminution des marques H3K27ac par rapport à leurs lignées parentales respectives (Fig. 21E). De plus, le *knock-out* de la mutation dans ces modèles cellulaires ne semblait pas impacter le niveau global du variant H3.3 (Fig. 21E).

Forts de la validation épigénétique de l'ensemble des modèles cellulaires à notre disposition, nous avons choisi, pour la suite de notre étude, de mener, dans un premier temps, une caractérisation prospective de nos 3 clones KO issus de la lignée HSJD-DIPG-013, en comparaison avec les cellules parentales et contrôles. Dans un second temps, les mécanismes moléculaires et processus biologiques imputables à l'oncohistone ainsi identifiés étaient validés sur notre panel étendu de modèles cellulaires.

II.3.2. Caractérisation du transcriptome associé à la mutation H3.3 K27M dans nos modèles cellulaires

Il a été montré dans divers modèles que les impacts épigénétiques de l'oncohistone H3.3K27M s'accompagnent de modifications transcriptionnelles (Bender et al., 2013; Krug et al., 2019; Rakotomalala et al., 2021a; Silveira et al., 2019). Dans l'optique de nous orienter sans *a priori* quant aux processus biologiques impactés par l'oncohistone dans les cellules de DMG, nous avons effectué une étude transcriptomique comparative par *bulk RNA-seq* de nos modèles issus de la lignée HSJ-DIPG-013 en collaboration avec l'équipe du Dr. Marie Castets du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL).

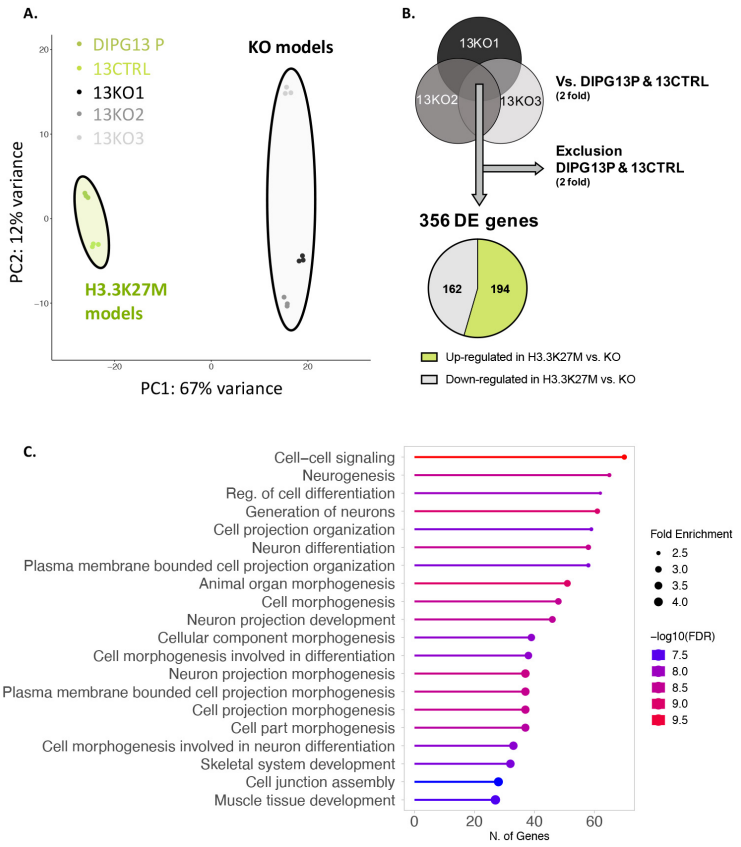


Figure 22. Impact transcriptionnel de l'oncohistone H3.3 K27M. Analyse RNA-seq sur du matériel extrait des cellules DIPG13 P, 13CTRL et des 3 clones KO-H3.3K27M (*i.e.* 13KO1, 13KO2 et 13KO3). Ces expériences ont été réalisées en triplicats biologiques. **A.** Analyse en composante principale (PCA) réalisée à partir de la matrice d'expression normalisée à l'aide de la fonction plotPCA du package R DESeq2. Les clusters observables selon l'axe PC1 étaient détourés et correspondaient aux modèles mutés H3.3K27M et aux modèles KO respectivement. **B.** Représentation schématique de notre sélection des gènes différentiellement exprimés (DE) d'intérêt. À partir de notre analyse d'expression différentielle, nous sélectionnions les gènes DE communs aux trois clone KO (13KO1, 13KO2, 13KO3) retrouvés à la fois lors de la comparaison avec les cellules parentales (DIPG13 P) et le clone contrôle (13CTRL). De cette liste de gènes étaient retirés ceux différentiellement exprimés entre les cellules parentales (IDPG13 P) et le clone contrôle (13CTRL). Cette démarche nous a permis d'obtenir une liste finale de 356 gènes DE entre nos conditions mutées et nos 3 clones KO-H3.3K27M. Parmi ces 356 gènes DE, 194 étaient sur-exprimés et 162 sous-exprimés dans les cellules H3.3K27M par rapport aux cellules KO. **C.** Analyse

fonctionnelle d'enrichissement effectuée à partir des 356 gènes DE précédemment identifiés à l'aide de la banque de données *Gene Ontology Biological Process*.

Tout d'abord, une analyse en composante principale de ces données montrait, d'une part, la clusterisation des cellules parentales (DIPG13 P) avec le clone 13CTRL et, d'autre part, la clusterisation des 3 clones KO-H3.3K27M entre eux sur la composante principale 1 (PC1) (Fig. 22A). Cette analyse indique que le KO de la mutation H3.3 K27M est le principal facteur responsable de la variabilité du profil transcriptomique de nos modèles cellulaires.

Pour identifier les gènes dont l'expression est modifiée par l'oncohistone, nous avons réalisé une analyse d'expression différentielle entre nos conditions. Cette analyse nous a permis d'identifier 356 gènes différentiellement exprimés entre nos trois clones KO (13KO1, 13KO2 et 13KO3) d'une part et les cellules mutées H3.3K27M (DIPG13 P et 13CTRL) d'autre part (Fig. 22B). De façon surprenante, malgré le retour important de la marque répressive de H3K27me3 dans les modèles KO-H3.3K27M, nous constations presque autant de gènes down et up-régulés suite au retrait de la mutation (Fig. 22B). Cette observation, relevée par ailleurs dans d'autres études, pourrait suggérer que l'hyperméthylation locale, confinée au niveau des sites de nucléation de PRC2, induite par la mutation H3.3 K27M (*Cf.* Introduction partie II.2.1.) présenterait un impact sur le transcriptome des cellules de DMG aussi important que celui de la perte globale des marques H3K27me2/3 (Bender et al., 2013).

Afin d'obtenir des informations plus fonctionnelles concernant l'impact transcriptionnel de la mutation H3.3 K27M, nous avons effectué des analyses d'enrichissement sur les 356 gènes différentiellement exprimés (up- et down-régulés) précédemment identifiés (Fig. 22C). En interrogeant la banque de données *Gene Ontology (GO Biological Process)*, sont notamment ressortis des enrichissements associés à la différenciation cellulaire et au développement neural (*e.g. Regulation of cell differentiation, Neuron differentiation*). Ces résultats apparaissent cohérents avec le rôle de l'oncohistone dans le maintien du blocage de la différentiation et des capacités d'auto-renouvellement des cellules de DMG (Silveira et al., 2019).

II.3.3. Étude de l'impact de l'oncohistone H3.3K27M sur la croissance des cellules de DMG

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la croissance de nos différents modèles cellulaires (Fig. 23).

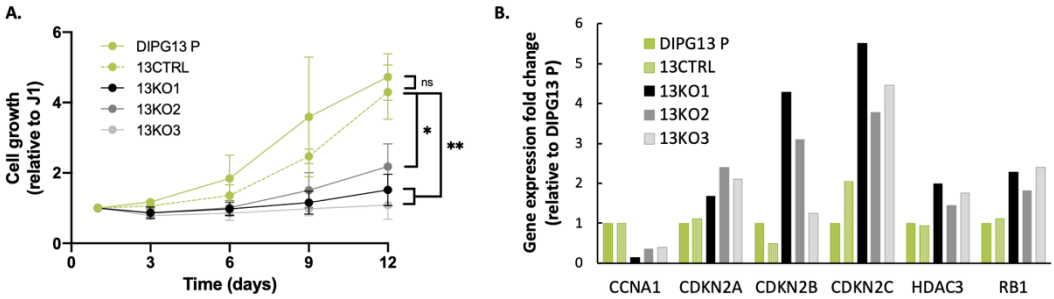


Figure 23. Rôle de l'oncohistone H3.3 K27M dans la croissance des cellules de DMG. A. Courbes de croissance cellulaire établies par comptage à intervalle de temps régulier (de 3 jours). Les résultats étaient normalisés par rapport au nombre de cellules effectivement ensemencé au jour 1 pour chaque condition. Les barres d'erreur représentent les écarts-types obtenus après 3 expériences indépendantes et l'analyse statistique était effectuée par l'application d'un test *nested one-way ANOVA* (ns, P > 0,05 ; *, P < 0.05 ; **, P<0.01). **B.** Analyse de *RT-qPCR array Taqman* sur des gènes impliqués dans la progression dans le cycle cellulaire à partir d'ARN extraits de cellules de DIPG13 P, 13CTRL et des 3 clones KO (13KO1, 13KO2 ,13KO3).

Nous avons ainsi montré que nos modèles cellulaires KO-H3.3 K27M présentaient une inhibition significative de la croissance cellulaire par rapport aux cellules mutées DIPG13 P et 13CTRL (Fig. 23A). Ce rôle de l'oncohistone H3.3 K27M dans le contrôle de la croissance cellulaire est en accord avec les résultats de nos travaux sur les modèles d'induction de H3.3 K27M mais également avec différents modèles décrits dans la littérature (Harutyunyan et al., 2019; Rakotomalala et al., 2021a).

D'un point de vue mécanistique, plusieurs études ont montré le rôle central de la répression épigénétique de $p16^{INK4a}$ dans le phénotype prolifératif associé à l'oncohistone H3.3 K27M (Cordero et al., 2017; Piunti et al., 2017). Par une approche plus ciblée de *Taqman PCR array*, nous avons en effet pu constater que le *knock-out* de la mutation dans nos modèles s'accompagnait effectivement d'une levée de répression de certains CKI tels que *CDKN2A* (codant notamment $p16^{INK4A}$), *CDKN2B* et *CDKN2C* (Fig. 23B), en accord avec le différentiel de croissance cellulaire observé.

Dans leur ensemble, ces résultats confortent la pertinence biologique de nos modèles cellulaires isogéniques invalidés pour la mutation H3.3 K27M. Néanmoins, comme rapporté par ailleurs dans la littérature, les changements transcriptionnels associés à la mutation H3.3 K27M dans nos modèles apparaissent modestes au regard de son impact épigénétique drastique (Harutyunyan et al., 2019). De fait, outre son rôle dans la croissance cellulaire, le profil transcriptomique associé à la mutation H3.3 K27M permettait de n'identifier que peu d'ensemble de gènes différentiellement exprimés suffisamment importants pour nous mettre sur la voie d'impacts phénotypiques liés à l'oncohistone à explorer.

II.3.4. Caractérisation du protéome associé à la mutation H3.3 K27M dans nos modèles cellulaires

Afin de déterminer l'impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur le protéome des cellules de DMG, nous avons complété la caractérisation omic de nos modèles cellulaires issus de la lignée HSJD-DIPG-013 par une étude protéomique en spectrométrie de masse (LC-MS/MS) (Fig. 24). Les analyses protéomiques de nos échantillons étaient réalisées en collaboration avec le laboratoire PRISM (Inserm U1192) dirigé par le Pr. Michel Salzet.

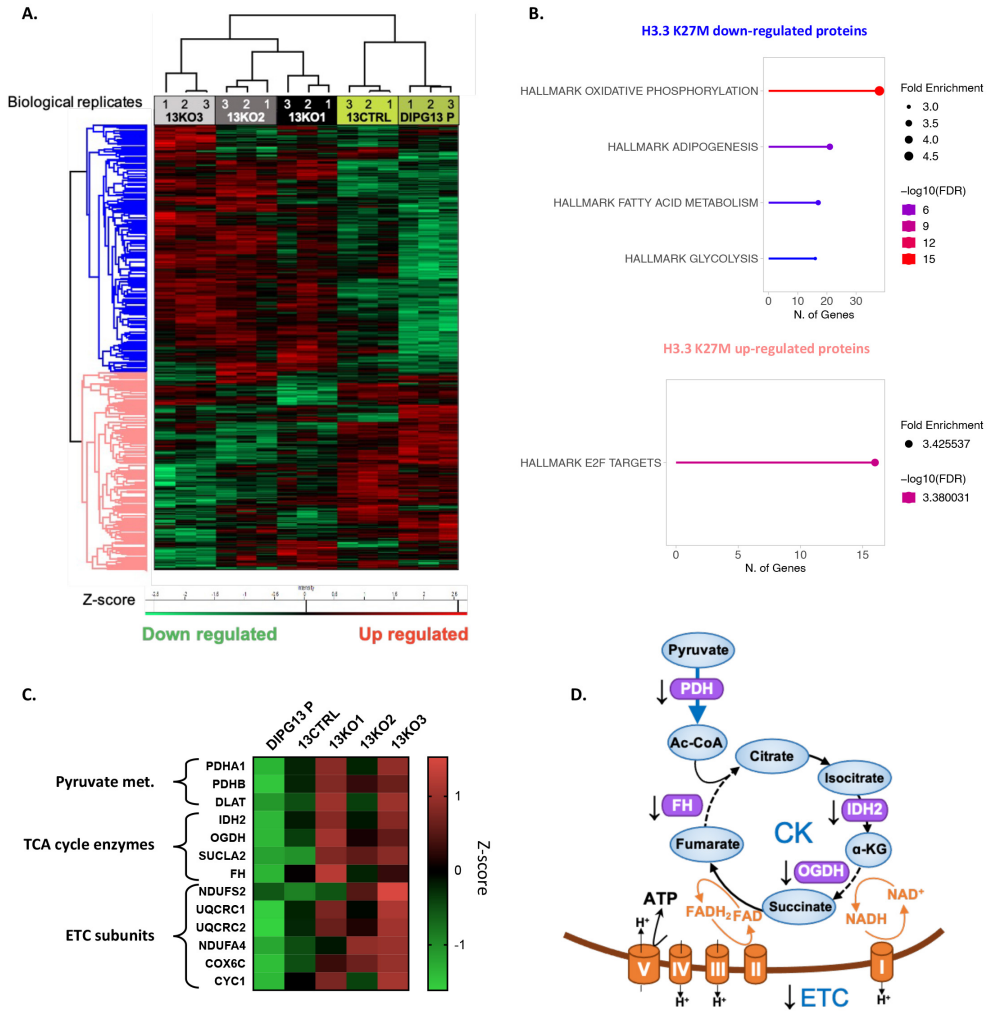


Figure 24. Impact de H3.3 K27M sur l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondrial. A. Analyse protéomique comparative réalisée par LC-MS sur trois extractions protéiques indépendantes issues des modèles de la lignée HSJD-DIPG-013 (DIPG13 P, 13CTRL, 13KO1, 13KO2 et 13KO3). L'identification des protéines détectées à l'aide de l'outil MaxQuant et l'analyse statistique effectuée sur Perseus permettait d'identifier 644 protéines significativement différentiellement exprimées (p-value ≤ 0.01) entre les conditions mutées (DIPG13 P et 13CTRL) et les conditions KO (13KO1, 13KO2 et 13KO3). Sur la base du profil d'expression de ces 644 protéines, une analyse par clusterisation hiérarchique était réalisée et représentée sous la forme d'une *Heatmap* selon les valeurs de Z-score. Deux clusters de protéines apparaissaient, avec d'un côté (en bleu) les protéines sous-exprimées en présence de la mutation et de l'autre (en rose) les protéines sur-exprimées en présence de la mutation. **B.** Analyses fonctionnelles d'enrichissement réalisées sur les protéines

sous-exprimées (partie supérieure) et sur-exprimées (partie inférieure) avec l'oncohistone H3.3 K27M à l'aide de la banque de donnée MSigDB Hallmarks. **C.** *Heatmap* représentant les Z-scores associés à chacun de nos modèles (DIPG13 P, 13CTRL, 13KO1, 13KO2, 13KO3) pour certaines protéines impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondrial de type OXPHOS. **D.** Schéma simplifié du métabolisme mitochondrial de type OXPHOS présentant certaines des protéines identifiées (encadrés violets). Les flèches orientées vers le bas représentant leur down-régulation associée à l'oncohistone H3.3 K27M.

Par cette analyse, nous identifions 644 protéines différentiellement exprimées de façon significative entre nos modèles mutés H3.3K27M (DIPG13 P et 13CTRL) et nos modèles KO (13KO1, 13KO2 et 13KO3). Parmi ces 644 protéines, 357 apparaissaient sous-exprimées en présence de la mutation alors que 287 étaient, à l'inverse, sur-exprimées (Fig. 24A). Pour avoir une vision globale de la fonction des protéines retrouvées dans chacun de ces clusters, nous avons réalisé une analyse fonctionnelle d'enrichissement avec la banque de données *MSigDB Hallmarks* (Fig. 24B).

Les protéines sur-exprimées dans les conditions mutées (DIPG13 P et 13CTRL) par rapport aux conditions KO (13KO1, 13KO2, 13KO3) étaient significativement enrichies en protéines codées par des gènes cibles de E2F, de manière cohérente avec l'impact de la mutation sur la croissance cellulaire de nos modèles (Fig. 24B et 23).

D'autre part, les protéines sous-exprimées en présence de la mutation H3.3 K27M apparaissaient significativement enrichies en protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire énergétique (*i.e. hallmark oxidative phosphorylation* et *hallmark glycolysis*) (Fig. 24B). En effet, l'oncohistone était associée à une expression réduite d'enzymes catalysant la conversion du pyruvate en acetyl-CoA (*e.g.* PDHA1, PDHB, DLAT) et certaines réactions du cycle de Krebs (e.g. IDH2, OGDH, SUCLA2, FH). De plus, certaines sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale apparaissaient également sous-exprimées dans le contexte muté H3.3 K27M (Fig. 24C et D). Ces données suggéraient une diminution du recours au métabolisme mitochondrial de type OXPHOS dans les cellules mutées H3.3 K27M (DIPG13 P et 13CTRL) par rapport aux clones KO (13KO1, 13KO2, 13KO3).

II.3.5. Étude de l'impact de l'oncohistone H3.3K27M sur le métabolisme énergétique des cellules de DMG

Au regard de nos données protéomiques suggérant un impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur le métabolisme cellulaire énergétique, nous avons évalué les paramètres de l'OXPHOS dans nos modèles de la lignée HSJD-DIPG-013 par mesures de la consommation cellulaire en oxygène (*oxygen consumption rate,* OCR) à l'aide de la technologie *Seahorse XFe96* (Agilent) (Fig. 25). Étant donné que nos cellules étaient cultivées en suspension, nous avons développé un workflow permettant de réaliser cette étude sur sphéroïdes (Fig. 25A).

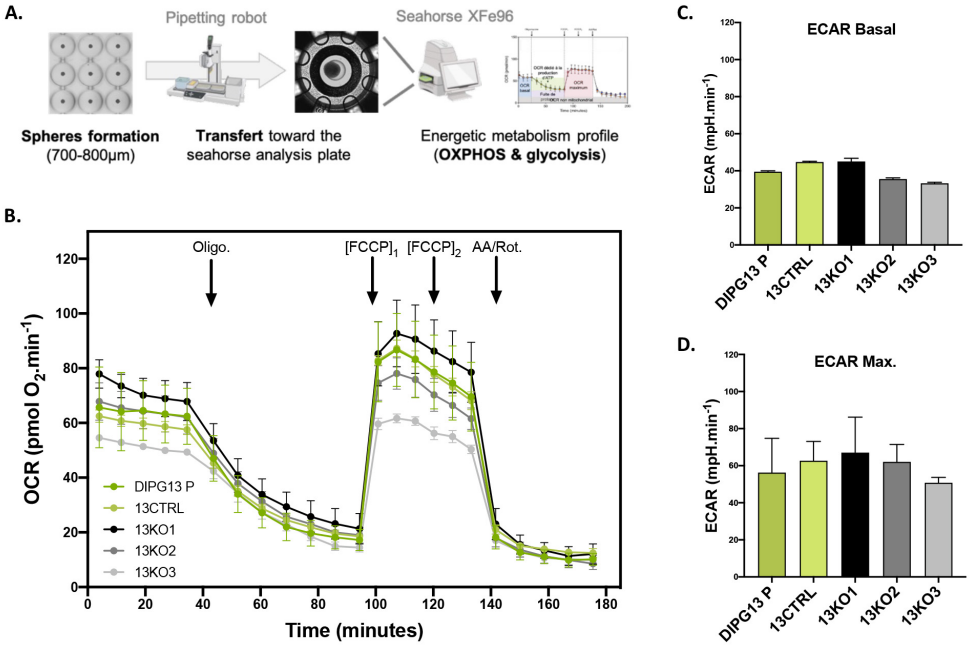


Figure 25. Impact de la mutation H3.3 K27M sur les paramètres de l'OXPHOS. A. Représentation schématique du workflow permettant d'évaluer l'*oxygen consumption rate* (OCR) et de l'*extracellular acidification rate* (ECAR) à l'aide de la technologie *Seahorse XFe96* sur sphéroïdes. Des sphéroïdes de taille standardisée (environ 650-750µm) sont générés en plaque 96 puits à fonds ronds. Le jour de l'analyse, chaque gliosphère est transférée de la plaque 96 puits vers une plaque d'analyse *Seahorse* à l'aide d'un robot pipeteur. Les mesures de l'*oxygen consumption rate* (OCR) et de l'*extracellular acidification rate* (ECAR) sont ensuite effectuées à l'aide de la technologie *Seahorse XFe96*. **B.** Profils d'*oxygen consumption rate* (OCR) de gliosphères (650-750µm) de DIPG13 P *vs.* 13CTRL *vs.* 13KO1 *vs.* 13KO2 *vs.* 13KO3 obtenus à l'aide de la technologie *Seahorse XFe96* (Agilent). Les injections successives d'oligomycine (Oligo. = 2.5mM), de FCCP (FCCP1 = 1µM et FCCP2 = 1.5µM) et d'antimycine A / roténone (AA = 10µM / Rot = 10µM) permettaient de mesurer les différents paramètres de l'OXPHOS. Avant la première injection, l'OCR basal était mesuré. Après l'injection d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase), l'OCR dédié à la production d'ATP pouvait être déduit (différence entre l'OCR basal et le plateau atteint post-injection d'oligomycine). Les injections de FCCP (protonophore découplant la chaine respiratoire de l'ATP synthase) permettaient d'atteindre l'OCR maximal. Enfin, l'injection d'antimycine A et de roténone (inhibiteurs des complexes III et I de la chaine respiratoire mitochondriale) permettait de mesurer la part d'OCR non mitochondrial (ainsi que de déduire la part que représente la fuite de protons au niveau du plateau atteint post-injection d'oligomycine). Les résultats présentés sont issus de 3 expériences indépendantes et les barres d'erreurs représentent la *standard error of the mean* (SEM). **C-D.** Mesures de l'extracellular acidification rate (ECAR) à l'aide de la technologie *seahorse XFe96* sur des gliosphères de DIPG13 P, 13CTRL, 13KO1, 13KO2 et 13KO3 en condition basale (C.) et post-injection d'oligomycine (2.5mM) (D.). Les résultats sont issus de 3 expériences indépendantes et les barres d'erreurs représentent la standard error of the mean (SEM).

Nos résultats montrent une certaine hétérogénéité de profils OXPHOS entre nos 3 modèles H3.3K27M-KO alors que nos modèles mutés donnent des profils similaires (Fig. 25B). Ce manque de clusterisation au sein des modèles KO reflète de potentiels effets clonaux, en particulier pour le clone 13KO3 qui présente une nette diminution de l'OCR basal et maximal. Néanmoins, dans leur ensemble, ces résultats ne montrent pas de différence imputable à la mutation H3.3K27M concernant le métabolisme OXPHOS de nos cellules de DMG.

En parallèle de notre analyse du métabolisme OXPHOS mitochondrial, la technologie *Seahorse XFe96* mesurait également l'*extracellular acidification rate* (ECAR). Ces données d'ECAR, bien que mesurées sur une séquence d'injection d'inhibiteurs spécifiques à l'analyse

du métabolisme OXPHOS, nous ont tout de même permis d'obtenir des informations concernant l'activité glycolytique de nos cellules sur les parties basales (ECAR basal) (Fig. 25C) et post-injection d'oligomycine (ECAR Max.) (Fig. 25D). De la même façon, l'ECAR basal comme l'ECAR Max. apparaissaient globalement identiques entre nos différents modèles.

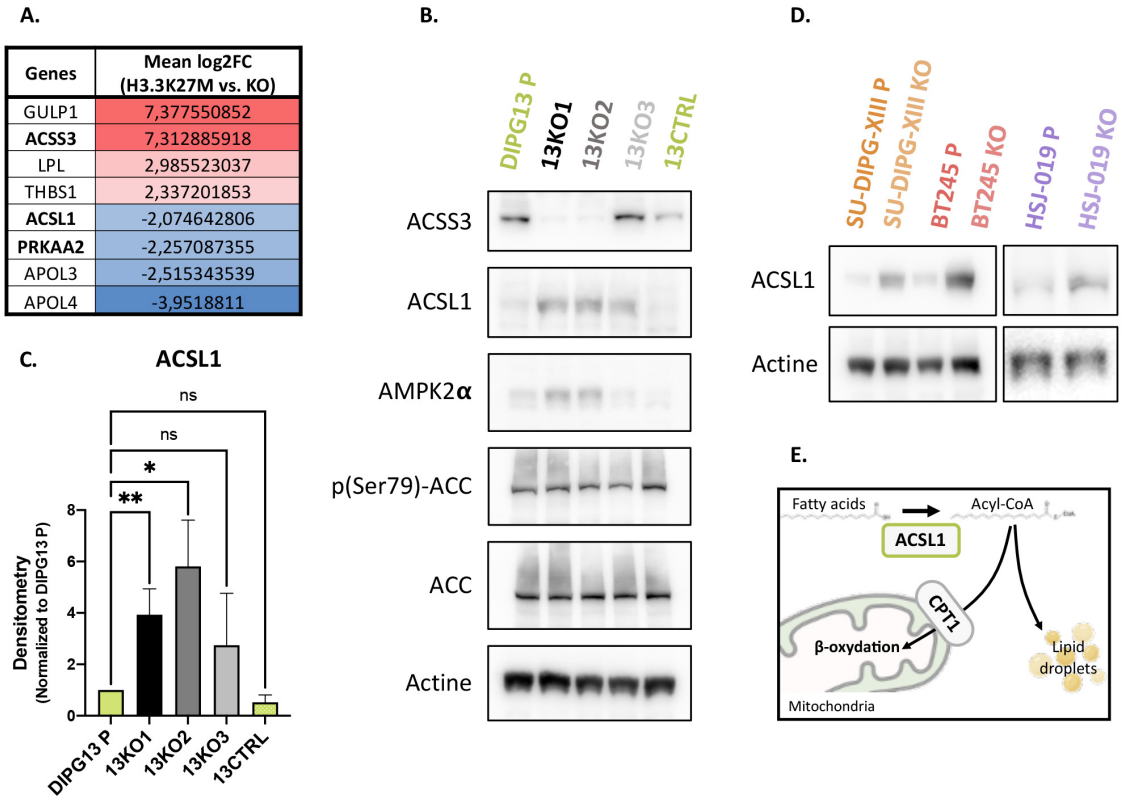
De manière surprenante, malgré des changements protéomiques suggérant une diminution de l'activité du métabolisme OXPHOS en présence de la mutation H3.3 K27M, nos mesures de *l'oxygen consumption rate* (OCR) ne montrent pas de modification du métabolisme énergétique mitochondrial en fonction de la présence/absence de l'oncohistone dans les cellules HSJD-DIPG-013.

II.3.6. Étude de l'impact de l'oncohistone H3.3K27M sur le métabolisme des lipides

II.3.6.1. Impact du KO sur l'expression d'acteurs du métabolisme lipidique

Malgré l'absence d'impact de la mutation H3.3K27M sur l'activité de la chaine respiratoire mitochondriale (dans un milieu de culture riche en nutriments), nos analyses d'expression différentielle (sur nos données transcriptomiques et protéomiques) mettaient en évidence un impact de la mutation sur l'expression d'acteurs impliqués dans le métabolisme et le transport des lipides. En effet, parmi les protéines sous-exprimées en présence de l'oncohistone lors de notre analyse protéomique, un enrichissement significatif en acteurs impliqués dans le métabolisme des acides gras était observé (*i.e. hallmark adipogenesis* et *hallmark fatty acid metabolism*) (Fig. 24B).

D'autre part, certains gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des lipides étaient également retrouvés différentiellement exprimés entre nos conditions mutées et KO lors de notre étude transcriptomique (Fig. 26A). Parmi ces gènes, *ACSS3* (codant l'*Acyl-CoA Synthetase Short chain 3*) apparaissait 150 fois plus exprimé dans les cellules mutées H3.3 K27M par rapport aux cellules KO. À l'inverse, les gènes *ACSL1* (codant l'*Acyl-CoA synthetase Long chain 1*) et *PRKAA2* (codant l'AMPK2α) apparaissaient down-régulés par la mutation. Les protéines ACSS3 et ACSL1 catalysent la synthèse d'acyl-CoA à partir d'acides gras à courtes chaines et à longues chaines respectivement. D'autre part, l'AMPK2α est un senseur énergétique permettant d'orienter le métabolisme des acides gras vers les voies anaboliques ou cataboliques. Ces données transcriptomiques ayant été obtenues préalablement à nos données protéomiques, nous avions entrepris la validation, à l'échelle protéique, du différentiel d'expression pour ces 3 acteurs du métabolisme lipidique (*i.e.* ACSS3, ACSL1, AMPK2α).



Genes	Mean log2FC (H3.3K27M vs. KO)
GULP1	7,377550852
ACSS3	7,312885918
LPL	2,985523037
THBS1	2,337201853
ACSL1	-2,074642806
PRKAA2	-2,257087355
APOL3	-2,515343539
APOL4	-3,9518811

Figure 26. Impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur l'expression d'acteurs du métabolisme des acides gras. A. Tableau regroupant, à partir des données de *RNAseq*, les gènes différentiellement exprimés entre les conditions mutées (DIPG13 P et 13CTRL) et KO (13KO1, 13KO2 et 13KO3) impliqués dans le métabolisme des lipides. La première colonne indique le nom des gènes et la deuxième la moyenne des *fold changes* des 3 clones KO *vs.* le clone 13CTRL en logarithmes base 2 (Mean log2FC). **B.** Western blot dirigées contre l'acyl-CoA synthetase short chain 3 (ACSS3), l'acyl-CoA synthetase long chain 1 (ACSL1), l'AMP-activated protein kinase 2α (AMPK2α), l'acetyl-CoA carboxylase et sa forme phosphorylée sur le résidu sérine 79. Ces analyses étaient réalisées sur des extraits protéiques issus des cellules DIPG13 P, 13CTRL, 13KO1 ,13KO2, et 13KO3. L'actine était utilisée comme contrôle d'équicharge. **C.** Quantification par densitométrie des signaux obtenus en western blot dirigés contre la protéine ACSL1 issus de 6 expériences indépendantes. Les statistiques étaient réalisées par un test *one-way ANOVA* (ns, P > 0,05 ; *, P < 0.05 ; **, P<0.01). Les barres d'erreur représentent les écarts-types à la moyenne. **D.** Western blot dirigé contre l'acyl-CoA synthetase long chain 1 (ACSL1) réalisé sur des extraits protéiques issus des lignées cellulaires SU-DIPG-XIII (P), BT245 (P) et HSJ-019 (P) ainsi que de leurs modèles KO-H3.3 K27M respectifs. L'actine était utilisée comme contrôle d'équicharge. **E.** Représentation schématique simplifiée de la fonction de l'enzyme ACSL1. Les protéines de la famille ACSL (dont ACSL1) catalysent la transformation des acides gras en acyl-CoA. D'une part, les acyl-CoA peuvent être importés par le système de navette acyl-carnitine, impliquant CPT1, au niveau mitochondrial et subir la β-oxydation pour alimenter la chaîne respiratoire mitochondriale. D'autre part, les acyl-CoA peuvent également servir à la synthèse de triglycérides qui sont ensuite stockés sous la forme de gouttelettes lipidiques au niveau cellulaire.

En western blot, nous observions ainsi que seul ACSL1 montrait une tendance d'expression similaire et clusterisée entre nos 3 clones KO issus de la lignée HSJD-DIPG-013 (Fig. 26B et C). Concernant ACSS3 et AMPK2α, malgré un différentiel d'expression intéressant entre les cellules mutées et les clones 13KO1 et 2, le clone 13KO3 présentait une expression comparable à celle des cellules DIPG13 P et 13CTRL (Fig. 26B). Nous avions déjà observé cette hétérogénéité associée au clone 13KO3 en termes d'effets biologiques (*e.g.* profil OXPHOS) mais également d'un point de vue transcriptomique, notamment visible sur l'axe PC2 de notre

analyse en composante principale (Fig. 22A). Nous avons également entrepris d'évaluer si l'expression de la kinase AMPK2α corrélait avec une hausse de son activité, notamment via l'étude du niveau de phosphorylation d'une de ses cibles ; l'acetyl-CoA carboxylase (ACC), enzyme clé de l'anabolisme des lipides. Bien que l'AMPK2α soit surexprimée dans les clones 13KO1 et 13KO2 par rapport aux conditions mutées, nous ne constations pas de différence quant à la phosphorylation de l'ACC (Fig. 26B).

Afin de confirmer la levée de répression d'ACSL1 associée à l'invalidation de la mutation H3.3 K27M, nous avons étendu notre étude de western blot dirigée contre ACSL1 aux modèles issus des lignées cellulaires SU-DIPG-XIII, BT245 et HSJ-019 (Fig. 26D). De manière intéressante, nous retrouvions, dans ces lignées cellulaires, cette surexpression d'ACSL1 accompagnant l'invalidation de l'oncohistone. Au regard du rôle d'ACSL1 dans la synthèse d'acyl-CoA à longues chaînes, nos résultats suggéraient un potentiel impact de la mutation H3.3 K27M sur le recours à la β-oxydation pour alimenter l'OXPHOS ou encore sur la formation de gouttelettes lipidiques (Fig. 26E).

II.3.6.2. *Impact du KO sur le recours aux acides gras pour alimenter la phosphorylation oxydative*

D'un point de vue énergétique, le catabolisme des lipides *via* la β-oxydation figure parmi les voies permettant d'alimenter le métabolisme de type OXPHOS. Les protéines de la famille des ACSL (dont ACSL1) catalysent la transformation des acides gras à longues chaînes en acyl-CoA, forme sous laquelle ils peuvent être importés et oxydés au niveau mitochondrial (Fig. 27A). Même si notre étude globale des paramètres de l'OXPHOS ne montrait pas de différence imputable à l'oncohistone (Fig. 25B), il n'était pas exclu que l'OXPHOS soit alimentée par des substrats différents en fonction de la présence ou de l'absence de la mutation. En ce sens, et étant donné l'impact de la mutation H3.3K27M sur l'expression d'acteurs du métabolisme des acides gras (incluant d'ACSL1), nous avons entrepris l'étude d'un éventuel changement de recours aux acides gras pour alimenter l'OXPHOS en fonction de la mutation H3.3 K27M. Pour ce faire, à l'aide de notre *workflow* d'analyse de l'OCR sur sphéroïdes, nous avons effectué des analyses *Seahorse XFe96* avec ou sans traitement à l'étomoxir, un inhibiteur de la carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) qui permet l'import des lipides à chaînes longues et moyennes au niveau mitochondrial.

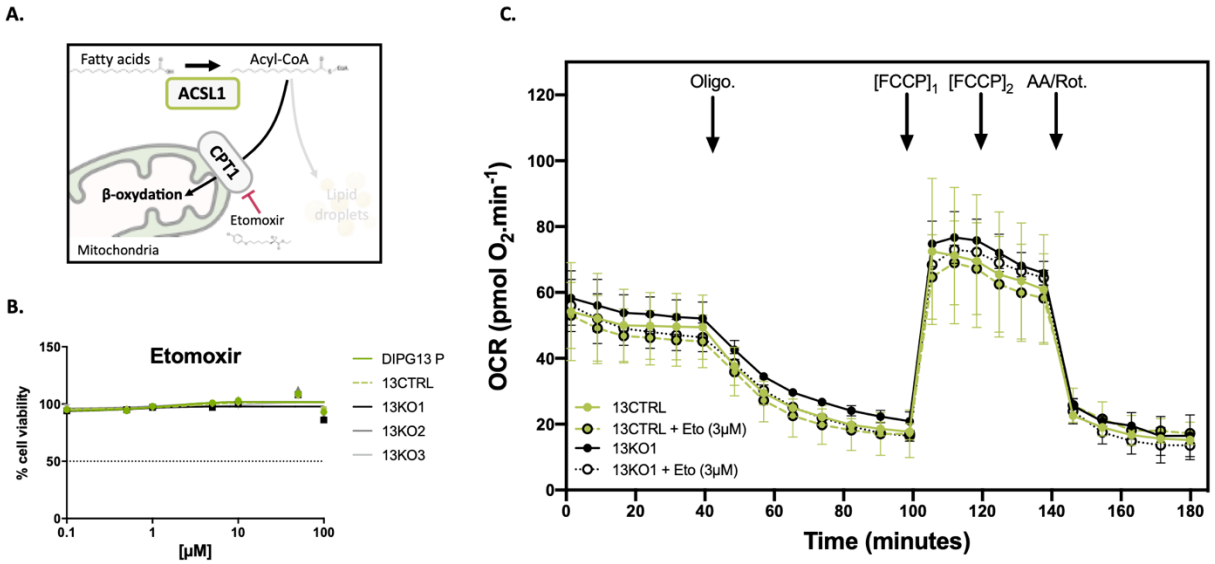


Figure 27. Impact de la mutation H3.3K27M sur le recours aux acides gras pour alimenter l'OXPHOS. A. Schéma simplifié illustrant l'import mitochondrial des acyl-CoA, synthétisés par les protéines de la famille ACSL (dont ACSL1), par le système de navette acyl-carnitine, impliquant la carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1). L'inhibition irréversible de la protéine CPT1 par l'étomoxir empêche l'utilisation mitochondrial des acides gras à chaînes longues et moyennes pour alimenter l'OXPHOS. **B.** Test de cytotoxicité de l'étomoxir sur les modèles cellulaires dérivés de la lignée HSJD-DIPG-013 avec une gamme de doses allant de 100nM à 100µM. La viabilité cellulaire était quantifiée à l'aide du bleu de resazurin 96h après traitement. Les résultats présentés sont issus d'une seule expérience. **C.** Profils d'*oxygen consumption rate* (OCR) de sphéroïdes (650-750µm de diamètre) de 13CTRL *vs.* 13KO1, obtenus à l'aide de la technologie *Seahorse XFe96* (Agilent) avec ou sans traitement à l'étomoxir (3µM). Comme précédemment, les injections successives d'oligomycine (Oligo. = 2.5mM), de FCCP (FCCP1 = 1µM et FCCP2 = 1.5µM) et d'antimycine A / roténone (AA = 10µM / Rot = 10µM) permettaient de mesurer les différents paramètres de l'OXPHOS. Les résultats présentés sont issus de 3 expériences indépendantes et les barres d'erreurs représentent la *standard error of the mean* (SEM).

Préalablement à la réalisation de ces expériences, nous avons testé la sensibilité de nos modèles à l'étomoxir sur une gamme de concentrations allant de 100nM à 100µM (Fig. 27B). L'étomoxir, jusqu'à une dose de 100µM, n'impactait pas la viabilité de nos modèles cellulaires après quatre jours de traitement. Dans un but exploratoire, nous avons réalisé les expériences de mesure de l'OCR +/- étomoxir en comparant le clone 13CTRL (muté H3.3 K27M) au clone 13KO1 (Fig. 27C). Un traitement avec 3µM d'étomoxir apparaissait suffisant pour obtenir une légère réponse en termes d'OCR basal de chacune des conditions (13CTRL et 13KO1) et nous avons donc poursuivi l'étude avec cette dose. Malgré une variabilité importante des résultats obtenus avec le clone 13CTRL, nous n'observions globalement pas d'impact d'un traitement à l'étomoxir sur le profil OXPHOS des cellules 13CTRL et 13KO1, suggérant que la mutation H3.3K27M ne modulait pas le recours aux acides gras pour alimenter le métabolisme OXPHOS.

II.3.6.3. Impact du KO sur la formation de gouttelettes lipidiques

Étant donné l'absence d'impact de la mutation H3.3K27M sur l'utilisation des acides gras pour alimenter l'OXPHOS, nous nous sommes demandés si les changements d'expression

des acteurs du métabolisme lipidique (*e.g.* ACSL1) liés à la mutation corrélaient avec une modification du stockage des lipides sous la forme de gouttelettes lipidiques dans nos modèles cellulaires (Fig. 28A). Pour évaluer qualitativement la présence de gouttelettes lipidiques au niveau cellulaire, nous avons réalisé des colorations *Oil Red O* sur des spots de cellules obtenus après *cytospin* pour l'ensemble de notre panel de modèles (lignées cellulaires HSJD-DIPG-013, SU-DIPG-XIII, BT245, HSJ-019 et modèles KO respectifs) (Fig. 28B).

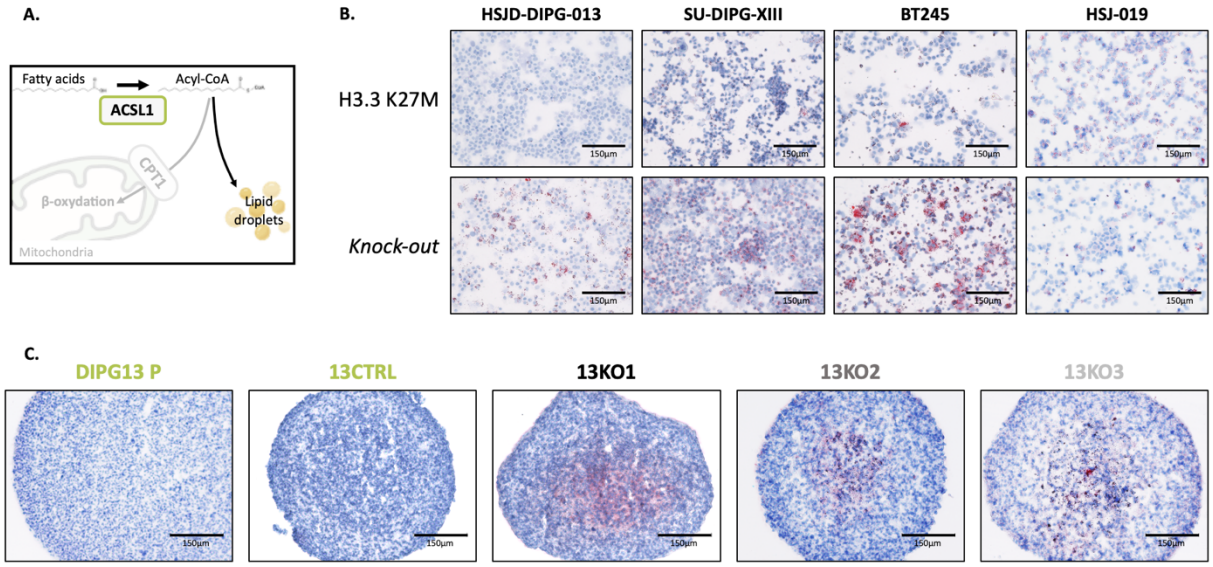


Figure 28. Impact de la mutation H3.3 K27M sur la formation de gouttelettes lipidiques. A. Schéma illustrant le devenir cellulaire des acyl-CoA produits par les enzymes ACSL (dont ACSL1). Outre leur utilisation pour alimenter l'OXPHOS, les acyl-CoA peuvent également servir à la synthèse de triglycérides ensuite stockés sous la forme de gouttelettes lipidiques. **B.** Étude comparative de la présence de gouttelettes lipidiques réalisée par coloration *Oil Red O* sur des spots de cellules obtenus par *cytospin* pour les lignées cellulaires HSJD-DIPG-013 (DIPG13 P), SU-DIPG-XIII (P), BT245 (P), HSJ-019 (P) et leurs modèles KO-H3.3 K27M respectifs (13KO1 pour la lignée HSJD-DIPG-013). Un contremarquage à l'hématoxyline était effectué et les lames observées sur un microscope de type EVOS M5000 avec un objectif x20. **C.** Coloration *Oil Red O* sur cryosections de sphéroïdes issus de la lignée HSJD-DIPG-013 (DIPG13 P) et des modèles cellulaires dérivés (13CTRL, 13KO1, 13KO2, 13KO3). Un contremarquage à l'hématoxyline était effectué et les lames observées sur un microscope de type EVOS M5000 avec un objectif x20.

De manière intéressante, dans les lignées cellulaires HSJD-DIPG-013, SU-DIPG-XIII et BT245, l'invalidation de l'oncohistone H3.3 K27M induisait une augmentation de la formation de gouttelettes lipidiques. Toutefois, cette augmentation apparaissait hétérogène et n'était pas observée dans la lignée HSJ-019.

Dans ce contexte, nous souhaitions élucider les causes de cette forte hétérogénéité. Nos cellules de DMG étaient cultivées en suspension, formant spontanément des sphéroïdes hétérogènes pouvant atteindre des tailles favorables à l'instauration d'une hypoxie et d'une acidose centrale. Ces paramètres ayant été associés à la formation de gouttelettes lipidiques dans d'autres modèles (Dierge et al., 2021; Shakya et al., 2021), nous avons réalisé des colorations à l'*Oil Red O* sur des cryosections de sphéroïdes de taille standardisée, obtenus à partir de chacun de nos modèles cellulaires issus de la lignée HSJD-DIPG-013, et ce afin de

visualiser la présence de gouttelettes lipidiques en fonction de la localisation au sein du sphéroïde (Fig. 28C). Ainsi, nous avons pu observer que les sphéroïdes issus des modèles mutés (DIPG13 P et 13CTRL) ne présentaient pas de gouttelette lipidique. À l'inverse et de manière intéressante, nous observions la présence de gouttelettes lipidiques préférentiellement localisées au centre des sphéroïdes issus des clones KO, phénomène qui pourrait expliquer l'hétérogénéité obtenue précédemment sur cellules dissociées (Fig. 28B).

Dans l'ensemble, ces résultats décrivent pour la première fois, une hausse hétérogène de la présence de gouttelettes lipidiques dans les cellules invalidées pour l'oncohistone H3.3K27M, corrélant avec la surexpression d'ACSL1. L'hétérogénéité observée quant à la présence de ces gouttelettes lipidiques au sein des modèles KO pourrait notamment être liée à l'hypoxie et/ou l'acidose potentiellement retrouvée au cœur de nos sphéroïdes et signifierait que la perturbation du métabolisme lipidique liée à la mutation H3.3 K27M puisse être conditionnée par le microenvironnement.

II.3.6.4. *Impact du microenvironnement sur la formation des gouttelettes lipidiques induite par l'invalidation de l'oncohistone*

Afin d'étudier l'influence potentielle de l'hypoxie sur la formation des gouttelettes lipidiques induites par le KO de l'oncohistone H3.3 K27M, nous avons réalisé des colorations à l'*Oil Red O* sur des cellules préalablement cultivées soit en normoxie soit en conditions hypoxiques 1%O_2 pendant 72h (Fig. 29A).

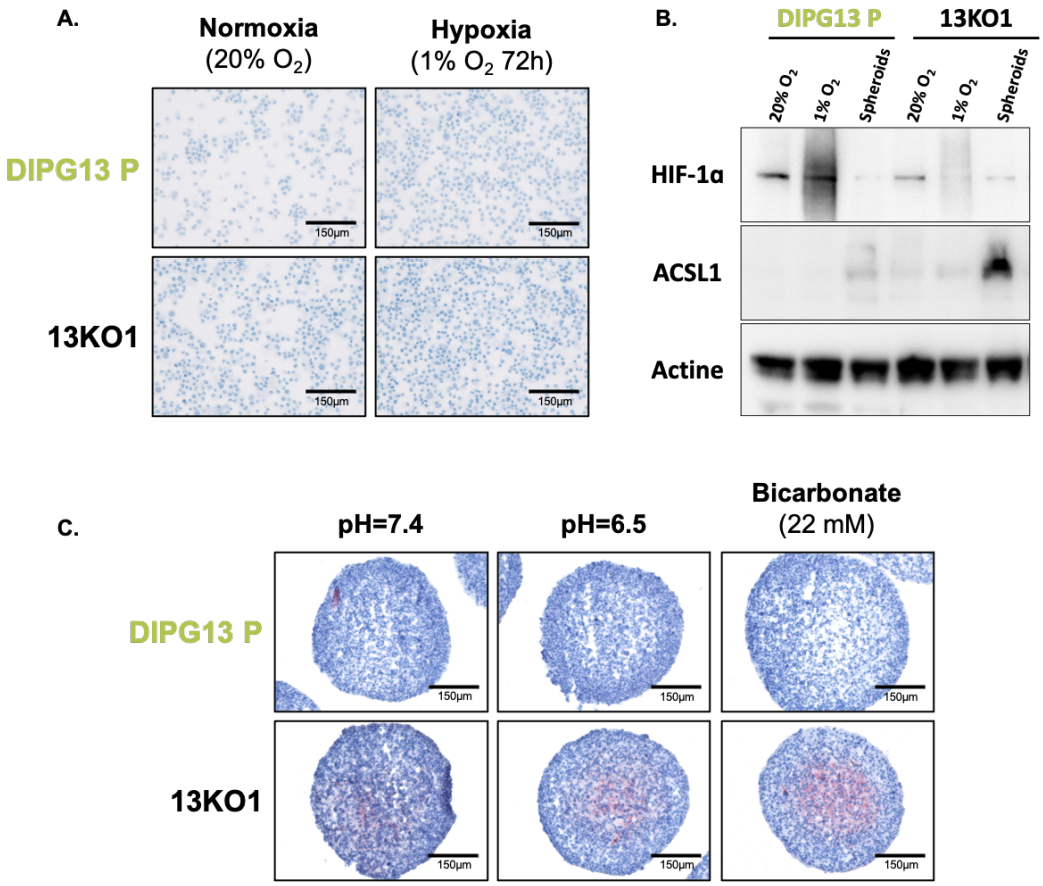


Figure 29. Étude préliminaire de l'influence de l'hypoxie et de l'acidose sur la formation de gouttelettes lipidiques associée à l'invalidation de la mutation H3.3 K27M. A. Coloration *Oil Red O* sur des spots de cellules DIPG13 P et 13KO1, préalablement cultivées en conditions normoxiques ou hypoxiques (1%O_2) sur un temps court (72h), empêchant la formation de sphéroïdes. Un contremarquage à l'hématoxyline était effectué et les lames observées sur un microscope de type EVOS M5000 avec un objectif x20. **B.** Western blot dirigés contre HIF-1α et ACSL1. Ces analyses étaient réalisées sur des extraits protéiques issus i) de cellules DIPG13 P et 13KO1 cultivées en normoxie ou en hypoxie 1%O_2 pendant 72h (absence de sphéroïdes dans la culture) et ii) de sphéroïdes standardisés (650-750 µm) de DIPG13 P et 13KO1. L'actine était utilisée comme contrôle d'équicharge. **C.** Coloration *Oil Red O* sur des cryosections de sphéroïdes dérivés des modèles DIPG13 P et 13KO1, formés (pendant 10 jours) dans leur milieu de culture standard (pH=7.4), ajusté à un pH=6.5 ou complémenté en bicarbonate (22mM). Un contremarquage à l'hématoxyline était effectué et les lames observées sur un microscope de type EVOS M5000 avec un objectif x20.

Lors de cette expérience, les cellules étaient dissociées mécaniquement afin d'éviter la formation de sphéroïdes (hétérogènes). Dans ces conditions, bien que nos résultats soient préliminaires, ni les cellules DIPG13 P ni les cellules 13KO1 ne présentaient de gouttelettes lipidiques, en normoxie comme en hypoxie (1%O_2 pendant 72h).

Pour valider l'instauration d'une hypoxie cellulaire, nous avons vérifié parallèlement la stabilisation du facteur HIF-1α dans nos cellules DIPG13 P et 13KO1 cultivées en conditions hypoxiques 1%O_2 pendant 72h (Fig. 29B). Dans ces conditions, nous vérifions une stabilisation de HIF-1α dans les cellules DIPG13 P, toutefois moins évidente dans les cellules 13KO1. Afin de caractériser l'existence potentielle d'un gradient d'hypoxie dans nos sphéroïdes standardisés (650-750 µm), au centre desquels nous détections la formation de gouttelettes

lipidiques avec l'invalidation de l'oncohistone, nous avons également évalué la stabilisation de HIF-1α dans des sphéroïdes DIPG13 P et 13KO1. De manière surprenante, bien que nos résultats demandent à être reproduits, nous n'observions pas de stabilisation d'HIF-1α dans nos sphéroïdes, suggérant l'absence d'hypoxie en leur centre. Toutefois, nous observions une importante hausse de l'expression d'ACSL1 dans les sphéroïdes du clone 13KO1 (standardisés), par rapport aux cellules 13KO1 cultivées en suspension (plus individualisées) en normoxie, ou en hypoxie 1%O_2 (72h). Cette hausse corrélait avec la formation de gouttelettes lipidiques. En ce sens, l'expression d'ACSL1 dans les sphéroïdes issus des cellules parentales DIPG13 P (H3.3 K27M), ne présentant pas de gouttelettes lipidiques, était nettement plus faible que dans les sphéroïdes KO-H3.3 K27M (Fig. 29B).

L'hypoxie ne semblant pas conditionner la formation des gouttelettes lipidiques associées au KO de la mutation H3.3 K27M, nous avons exploré l'impact potentiel de l'acidose, associée à la formation de gouttelettes lipidiques dans différents types cellulaires (Dierge et al., 2021). Dans cette optique, nous avons initié la formation de sphéroïdes standardisés soit en conditions de pH classiques (pH=7.4), soit dans un milieu acidifié (pH=6.5) ou complémenté en bicarbonate (22mM) afin de neutraliser les ions H^+ produits au cours de la croissance des sphéroïdes. Comme attendu, sur les coupes de sphéroïdes formés dans les conditions de culture classiques, nous observions bien des gouttelettes lipidiques au centre des sphéroïdes de la condition 13KO1 mais pas dans les sphéroïdes issus des cellules mutées DIPG13 P (Fig. 29C). Toutefois, la formation des sphéroïdes dans un contexte d'acidose (pH=6.5) n'induisait pas la formation de gouttelettes lipidiques en périphérie des sphéroïdes 13KO1, de même la complémentation du milieu en bicarbonate ne réduisait pas la formation des gouttelettes lipidiques au centre des sphéroïdes (Fig. 29C).

Ces résultats, bien que préliminaires, ne semblaient pas indiquer d'impact de l'hypoxie ni de l'acidose sur la formation des gouttelettes lipidiques observée avec l'invalidation de l'oncohistone H3.3 K27M.

II.4. Discussion

Depuis 2012, l'étude de l'impact épigénétique de l'oncohistone H3.3 K27M a permis une avancée majeure dans la compréhension de la biologie des DMG. À présent, la question des conséquences phénotypiques de cette altération présente un intérêt fondamental pour déterminer son impact sur le phénotype agressif des DMG, associé à un pronostic des plus sombres en cancérologie pédiatrique. Dans ce travail, nous avons investigué l'impact phénotypique de l'oncohistone H3.3 K27M par une approche de caractérisation comparative de modèles cellulaires isogéniques invalidés pour la mutation.

II.4.1. Établissement de modèles KO pour la mutation

La première étape était d'établir ces modèles cellulaires à partir de lignées de DMG initialement mutées, modèles alors indisponibles au sein de la communauté scientifique à l'heure où nous débutions cette étude. À cette fin, nous avons appliqué une stratégie d'invalidation par KO sur un panel de 5 lignées cellulaires de DIPG présentant une diversité du point de vue de leurs profils moléculaires (*e.g.* mutation de TP53, de PPM1D, d'ACVR1, d'ATM, de PIK3CA ou encore amplification de MYC) représentatif des altérations moléculaires les plus fréquemment observées en clinique. De plus, dans ce panel, quatre des lignées cellulaires (dont la HSJD-DIPG-013) étaient issues de prélèvements biopsiques et naïves de traitements alors que la lignée HSJD-DIPG-007 était issue d'une nécropsie.
Dans ce contexte, il est intéressant de noter que nous sommes parvenus à obtenir des clones KO pour l'oncohistone uniquement dans des lignées cellulaires présentant une altération partenaire de TP53 (HSJD-DIPG-012 et -013). Qui plus est, seule la lignée HSJD-DIPG-013 maintenait cette invalidation stablement au cours du temps. En effet, bien que démontrant une invalidation de la mutation, validée au niveau génomique et protéique, avec restauration du paysage épigénétique associé, les modèles HSJD-DIPG-012 KO-H3.3 K27M opèrent un retour de la mutation au cours du temps pour une raison encore inconnue.

Fait intéressant : bien que notre stratégie s'opère théoriquement avec la même probabilité sur les deux allèles du gène *H3F3A*, *in fine*, seuls 15% des clones recombinés obtenus dans la lignée HSJD-DIPG-013 l'étaient sur l'allèle initialement muté du gène *H3F3A*. De manière surprenante, dans la lignée HSJD-DIPG-007, parmi les 49 clones recombinés obtenus (validés par PCR), pour aucun la recombinaison ne s'était produite sur l'allèle muté, ne conduisant ainsi à l'établissement d'aucun clone KO. Ces éléments suggéraient une dépendance oncogénique à la mutation H3.3 K27M (plus ou moins importante selon la lignée considérée), potentiellement exacerbée dans un contexte $TP53^{WT}$. Ceci pourrait expliquer notre incapacité à générer des clones KO dans les lignées HSJD-DIPG-007 mais aussi HSJD-DIPG-011 et -014 ($TP53^{WT}$).

Notre stratégie de *gene editing* initiale ambitionnait de rétablir l'expression d'un allèle sauvage du gène *H3F3A* par excision de notre cassette de sélection. Malgré un succès dans certains de nos modèles, nous n'avons pas été en mesure d'aboutir à ce résultat pour l'ensemble de nos clones KO du fait de taux de transfection faibles (<10%) et d'une capacité de croissance réduite après clonage par tri cellulaire. Dans ce contexte, nous avons mené notre étude sur nos modèles KO pour la mutation. Afin d'en valider la pertinence, nous avons montré que l'invalidation de l'allèle muté du gène *H3F3A* ne modifiait pas le niveau total du variant H3.3 par rapport à la lignée cellulaire parentale.

Bien que présentant le profil moléculaire le plus fréquemment observé dans les DIPG (association de l'oncohistone H3.3 K27M avec une mutation partenaire de *TP53*), nous ne pouvions mener une étude robuste et généralisable sur la seule lignée HSJD-DIPG-013. Grâce

à une collaboration avec l'équipe du Pr. Nada Jabado (McGill University, Montréal), nous avons pu compléter notre panel de modèles avec trois autres lignées cellulaires et modèles *knock-out* associés (SU-DIPG-XIII, BT245, HSJ-019), élargissant le spectre de profils moléculaires mais surtout de localisations tumorales, avec deux lignées cellulaires de DMG thalamiques (BT245 et HSJ-019). Ces modèles avaient été validés et caractérisés d'un point de vue épigénétique dans de précédentes études de l'équipe du Pr. Nada Jabado (Harutyunyan et al., 2019).

II.4.2. Pertinence du clone 13CTRL comme contrôle de stratégie

Étant donné les étapes de transfection, sélection et clonage inhérentes à notre stratégie d'invalidation de l'oncohistone, nous avons développé, en parallèle de nos modèles KO-H3.3 K27M, un modèle contrôle visant à nous affranchir des biais potentiels apportés par cette stratégie. La mutation H3.3 K27M étant mono-allélique, la recombinaison homologue pouvait avoir lieu sur l'allèle initialement muté du gène *H3F3A*, mais également sur l'allèle sauvage. Dans ce cas, nous obtenions des clones KO pour l'allèle sauvage de *H3F3A* mais toujours porteurs de la mutation H3.3 K27M, que nous considérions comme les contrôles les plus pertinents au regard de nos clones KO-H3.3 K27M. Dans le clone contrôle sélectionné pour nos expériences (13CTRL), le niveau d'expression protéique de la mutation H3.3 K27M apparaissait équivalent à celui observé dans la lignée parentale. De même, le niveau total du variant H3.3 n'apparaissait pas affecté. De manière surprenante, lors de notre analyse transcriptomique, nous ne détections pourtant pas de hausse compensatoire de l'expression du deuxième gène codant variant H3.3 (*H3F3B*) dans ce clone.

D'un point de vue transcriptomique et protéomique, nos analyses en composantes principales et de clusterisation hiérarchiques nous ont permis de montrer une clusterisation entre notre clone contrôle et la lignée parentale d'un côté, et de nos trois clones KO pour H3.3 K27M indépendants de l'autre. Ces résultats montrent que les impacts liés à notre stratégie (transfection, sélection et clonage) ne constituent pas la principale source de différences entre nos modèles cellulaires. De surcroît, ces données semblaient montrer une certaine proximité de notre clone contrôle vis-à-vis de la lignée parentale, justifiant son utilisation comme unique clone contrôle dans nos expériences.

II.4.3. Réversion des altérations épigénétiques inhérentes à l'oncohistone

Après validation de la perte de l'expression de l'oncohistone H3.3 K27M dans nos clones KO, nous avons validé la restauration du niveau global des marques H3K27me3 ainsi que la perte des marques H3K27ac, conformément aux données de la littérature et validant ainsi la pertinence de nos modèles. Outre les marques concernant les lysines 27 des histones

3, nous ne constations pas de différences du niveau d'autres marques (*i.e.* H3K36me2, H4K16ac et H3K9me3) dont des variations avaient pourtant été rapportées dans la littérature (An et al., 2020). Toutefois, l'impact de ces marques dans le contexte muté H3 K27M, en particulier H3K36me2, semblait d'avantage associé à leur redistribution plutôt qu'à la variation de leur niveau global (Harutyunyan et al., 2020), n'indiquant pas de réel antagonisme avec nos résultats.

D'autre part, Bender et collaborateurs ont montré que les DMG mutés H3 K27M présentaient une hypométhylation globale de l'ADN par rapport aux pHGG $H3^{WT}$. Néanmoins, l'implication causale de l'oncohistone dans cette hypométhylation globale n'a pas été établie. Dans leurs modèles induits pour la mutation H3.3 K27M, malgré une réduction importante du niveau de H3K27me3, Bender *et al.* ne montraient pas d'hypométhylation de l'ADN (Bender et al., 2013). En ce sens, dans nos modèles invalidés pour l'oncohistone, malgré une restauration des marques H3K27me3, nous ne constations pas de hausse du niveau global du niveau de méthylation de l'ADN imputable à la mutation H3.3 K27M. Ces données suggèrent que l'hypométhylation observée dans les DMG par rapport aux pHGG $H3^{WT}$ reflète probablement davantage des différences d'origine cellulaire plutôt qu'un impact moléculaire de l'oncohistone. Ainsi, plusieurs études ont montré que l'architecture épigénétique et chromatinienne du type cellulaire d'origine des DMG était conservée malgré la dérégulation importante de l'épigénome des DMG induite par la mutation H3.3 K27M (Krug et al., 2019; Wang et al., 2021; Jessa et al., 2022). Étant donné que les sites de nucléation de PRC2, hyperméthylés en présence de l'oncohistone H3.3 K27M, sont définis par la méthylation de l'ADN (îlots CpG non méthylés), il semblerait que l'état de méthylation de l'ADN associé au contexte cellulaire conditionne l'impact de la mutation H3.3 K27M (Harutyunyan et al., 2019). Cette hypothèse conforte l'idée d'un environnement épigénétique permissif lié à l'origine cellulaire, coopérant avec l'oncohistone et permettant d'induire ses impacts oncogéniques.

II.4.4. Changements transcriptionnels associés à l'oncohistone

Les changements épigénétiques étant impliqués dans la régulation de l'expression génique, il apparaissait probable que les altérations épigénétiques induites par la mutation H3.3 K27M engendrent de profondes modifications transcriptionnelles dans les cellules de DMG. Afin d'identifier les gènes dont la dérégulation de l'expression est strictement associée à l'oncohistone, par recoupement des listes de gènes différentiellement exprimés obtenues de notre analyse *RNA-seq*, nous avons sélectionné les gènes différentiellement exprimés dans nos trois clones KO (13KO1, 13KO2 et 13KO3) à la fois par rapport à la lignée parentale (DIPG13 P) mais également au clone contrôle (13CTRL). Par cette analyse, nous ne constations que 356 gènes différentiellement exprimés entre nos conditions mutées et KO. Cet impact transcriptionnel relativement modeste au regard de l'impact épigénétique drastique de l'oncohistone H3.3 K27M avait déjà été observé dans l'étude de Harutyunyan et

collaborateurs sur les lignées SU-DIPG-XIII et BT245 (Harutyunyan et al., 2019). Par des approches de ChIP-seq intégrées à leurs données transcriptomiques sur leurs modèles isogéniques issus de la lignée BT245, les auteurs montraient une corrélation limitée entre les changements des marques H3K27me3 induits par H3.3 K27M sur le promoteur des gènes et leur expression. En effet, en présence de l'oncohistone, seuls 11% des gènes présentant un gain de H3K27me3 au niveau de leur promoteur sont effectivement down-régulés et seuls 4-5% des gènes concernés par une perte de H3K27me3 au niveau de leur promoteur apparaissent up-régulés (Harutyunyan et al., 2019). Ces observations soulèvent notamment la question des liens entre modifications épigénétiques et expression génique, domaine faisant encore l'objet de débats et de recherches actives (Henikoff and Shilatifard, 2011; Talbert and Henikoff, 2021). Une potentielle explication serait que, dans le contexte muté H3.3 K27M, les régions vacantes de H3K27me3 restent occupées par des marques H3K27me2 maintenant un certain niveau de répression de l'expression génique et n'autorisant que des changements transcriptionnels restreints (Harutyunyan et al., 2020, 2019). Par ailleurs, Krug et collaborateurs ont montré que le lien entre le gain de H3K27ac au niveau d'enhancers actifs, inhérent à l'oncohistone, et la dérépression transcriptionnelle apparaît également partiel et semble majoritairement impacter des régions intergéniques (*e.g.* éléments répétés du génome) (Krug et al., 2019).

De surcroît, bien que le retrait de l'oncohistone H3.3 K27M dans la lignée HSJD-DIPG-013 s'accompagnait du retour des marques répressives H3K27me3 et de la diminution des marques activatrices H3K27ac, parmi les 356 gènes différentiellement exprimés identifiés, nous observions presque autant de gènes sur-exprimés que sous-exprimés avec l'oncohistone. Outre l'hyperméthylation des sites de recrutements de PRC2, les mécanismes à l'origine de la répression génique induite par H3.3 K27M demeurent moins décrits.

Nous avons ainsi effectué des analyses d'enrichissements sur l'ensemble des 356 gènes différentiellement exprimés (up- et down-régulés confondus) afin de nous informer sur leurs possibles impacts fonctionnels. Nous identifions une signature associée au développement et à la différenciation neurale, en accord avec ce qui avait été décrit dans les modèles issus des lignées SU-DIPG-XIII et BT245 (Harutyunyan et al., 2019). Ces données étaient cohérentes avec le blocage de la différenciation cellulaire et le maintien des capacités d'auto-renouvellement imposés par la mutation H3.3 K27M (Silveira et al., 2019). En ce sens, par comparaison de la liste des 356 gènes différentiellement exprimés dans nos modèles avec celle obtenue par Silveira et collaborateurs dans leurs modèles (shRNA), nous identifions une centaine de gènes en commun, notamment enrichis en gènes impliqués dans les processus de différenciation cellulaire. Corroborant une potentielle levée du blocage de différentiation associées à l'oncohistone dans nos modèles KO, au niveau phénotypique, ces derniers présentaient une inhibition de la croissance cellulaire par rapport à nos cellules parentales (DIPG13 P) et au clone contrôle (13CTRL). En corrélation avec cet impact de la mutation H3.3 K27M sur la croissance cellulaire, dans nos modèles, nous observions la répression

caractéristique de *CDKN2A* (codant notamment $p16^{INK4a}$) associée à l'oncohistone, décrite également dans plusieurs études sur différents modèles (Balakrishnan et al., 2020; Cordero et al., 2017; Mohammad et al., 2017).

II.4.5. Protéome associé à l'oncohistone et métabolisme cellulaire

Les modestes impacts transcriptionnels associés à la mutation dans nos modèles nous apportaient peu de nouvelles pistes quant aux phénotypes impactés. En outre, les protéines étant des effecteurs directs des fonctions cellulaires, nous avons complété la caractérisation omique de nos modèles par une étude protéomique en spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Par cette étude, nous identifions 644 protéines significativement différentiellement exprimées entre nos modèles mutés et nos modèles KO, avec 357 protéines sous-exprimées et 287 protéines sur-exprimées avec la mutation H3.3 K27M. Au regard de la littérature, nos données confirmaient l'impact de l'oncohistone sur l'expression de certaines protéines, renforçant encore la pertinence de nos modèles et constituant un contrôle qualité supplémentaire de notre analyse. À titre d'exemple, comme observé dans l'étude Mota *et al.* sur la dépendance des DMG mutés H3 K27M au complexe de remodelage de la chromatine BRG1/BRM-associated factor (BAF), nous observions une surexpression de BRG1 (sous-unité catalytique de BAF codée par *SMARCA4*) en présence de l'oncohistone (Panditharatna et al., 2022; Mo et al., 2022; Mota et al., 2023).

Néanmoins, de manière surprenante, la concordance entre nos données transcriptomiques et protéomiques était très faible. En effet, parmi les protéines sur-exprimées avec H3.3 K27M, seules trois présentaient une surexpression au niveau transcriptionnel (*i.e.* PPP3CA, BCHE et TLE4) et, parmi les protéines sous-exprimées avec H3.3 K27M, une seule était sous-exprimée à l'échelle du transcrit (*i.e.* PURA). De plus, au-delà de notre simple comparaison des listes de gènes et protéines différentiellement exprimés, nous avons mis au regard de chacune des protéines différentiellement exprimées les données transcriptomiques des gènes correspondants. Toutefois, nous n'identifions pas de corrélation positive et certains acteurs présentaient même des effets inverses à l'échelle transcriptomique et protéomique (*i.e.* BCAT1, EDIL3, GAP43, TAGLN3). Ainsi, ces données remettent en question le modèle selon lequel l'oncohistone H3.3 K27M induirait ses effets biologiques uniquement *via* ses conséquences transcriptionnelles subséquentes aux altérations de l'épigénome lui étant inhérentes. À ce jour, l'impact éventuel de l'oncohistone sur les modifications post-traductionnelles du protéome, au-delà des modifications d'histones, n'est pas connu mais pourrait affecter la stabilité de certaines protéines. Dans différents modèles cancéreux, la méthyltransférase EZH2 présente une localisation et des fonctions extranucléaires, favorisant notamment le caractère invasif (Gunawan et al., 2015; Anwar et al., 2018; McMullen et al., 2021). À ce jour, l'impact potentiel des mutations H3 K27M sur de telles fonctions extranucléaires d'EZH2 dans les DMG n'a pas été décrit.

Bien que les causes de ces différences protéomiques associées à la mutation H3.3 K27M nécessitent de plus amples investigations, notre question principale étant de caractériser son impact phénotypique, nous avons mené des analyses fonctionnelles d'enrichissement sur les protéines différentiellement exprimées obtenues. Les protéines sur-exprimées avec l'oncohistone apparaissaient ainsi enrichies en protéines codées par des gènes cibles de E2F, en particulier impliquées dans la réplication de l'ADN telle que la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase δ (POLD1). Ces résultats apparaissaient cohérents avec la hausse de l'expression du gène *RB1* (identifiée lors de notre analyse ciblée par *Taqman array*) et l'inhibition de la croissance cellulaire associées à l'invalidation de l'oncohistone dans nos modèles.

Mais surtout, parmi les protéines sous-exprimées avec la mutation dans nos modèles, plus nombreuses (357 protéines sous-exprimées *vs.* 287 protéines sur-exprimées avec H3.3 K27M), nous identifions des enrichissements quasi-exclusivement orientés vers le métabolisme cellulaire, en particulier centrés sur les voies bioénergétiques (glycolyse et OXPHOS) et le métabolisme des lipides. Confortant nos résultats, Chung et collaborateurs rapportent un enrichissement du protéome associé à l'oncohistone en protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire (*i.e.* glycolyse, métabolisme du pyruvate, cycle de Krebs) dans des modèles isogéniques de cellules souches neurales murines induites pour la mutation H3.3 K27M (Chung et al., 2020). Toutefois, contrairement à ce que nous observons, dans leurs modèles, i) des enrichissements en acteurs impliqués dans le cycle de Krebs, le métabolisme des carbohydrates ou encore le métabolisme des lipides étaient également retrouvés à l'échelle du transcriptome associé à la mutation et ii) ces acteurs impliqués dans la glycolyse et le cycle de Krebs étaient sur-exprimés avec l'oncohistone (tant au niveau transcriptionnel que protéique). En particulier, les auteurs décrivaient une surexpression de l'enzyme IDH1 associée à H3.3 K27M, corrélant avec une hausse du niveau d'α-KG qui permettait d'alimenter KDM6A/B et de maintenir l'hypométhylation des lysines 27 des histones 3 inhérente à l'oncohistone (Chung et al., 2020). Dans notre étude, la mutation H3.3 K27M était davantage associée à la sous-expression des enzymes du cycle de Krebs IDH2 et OGDH, catalysant respectivement la production (réversible) de l'α-KG à partir de l'isocitrate et la conversion de l'α-KG en succinyl-CoA. Ces données suggéraient également de potentiels changements du niveau d'α-KG, gouvernés par l'oncohistone, dans nos modèles. En ce sens, les enzymes mitochondriales PDHB, DLAT ou encore OGDH, sous-exprimées avec la mutation H3.3 K27M dans nos modèles, se retrouvent également dégradées après traitement à l'ONC201, conduisant à une accumulation d'α-KG (Venneti et al., 2023). Par ailleurs, l'impact de l'oncohistone sur l'expression des isoformes de l'IDH, divergent selon les modèles considérés, pourrait ne pas être contradictoire. En effet, IDH1 et IDH2 présentent des localisations subcellulaires différentes, cytoplasmique et mitochondriale respectivement, potentiellement associées à la production de pools d'α-KG dédiés à des fonctions différentes dans les cellules de DMG (Alzial et al., 2022).

II.4.6. Évaluation du métabolisme mitochondrial de type OXPHOS

Les liens entre l'impact métabolique de la mutation H3.3 K27M et l'altération du paysage épigénétique ayant été décrits, nous nous sommes intéressés aux conséquences bioénergétiques de l'oncohistone, jusqu'alors peu explorées. En effet, au-delà de l'impact potentiel sur le niveau d'α-KG, la sous-expression d'enzymes du métabolisme du pyruvate, du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire mitochondriale associée à la mutation H3.3 K27M dans nos modèles suggérait fortement une diminution du recours au métabolisme OXPHOS de nos conditions mutées (DIPG13 P et 13CTRL) par rapport à nos clones KO (13KO1, 13KO2, 13KO3). Cette hypothèse apparaissait cohérente avec une mobilisation importance de certains métabolites pour le maintien des altérations épigénétiques imposées par l'oncohistone aux dépens des aspects bioénergétiques (*Cf.* Fig. 13B). Afin de mesurer l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale dans nos modèles, nous avons opté pour la réalisation de mesures de l'*oxygen consumption rate* (OCR) à l'aide de la technologie *Seahorse*. L'utilisation de cette technologie n'étant pas nativement possible sur cellules en suspension comme l'impose nos lignées de DMG, nous avons entrepris le développement d'un *workflow* permettant de réaliser ces expériences sur sphéroïdes. Ce *workflow* consistait en un protocole de formation de sphéroïdes, de taille standard et reproductible entre nos conditions, compatible avec un transfert automatisé vers une plaque d'analyse *Seahorse*. Après plusieurs expériences de mise au point, nous avons réussi à déterminer une gamme de tailles optimale des sphéroïdes pour réaliser ces analyses (en termes de signal sur bruit et variabilité des mesures), comprise entre 650 et 750 µm (de diamètre). Bien que nous adaptions les conditions d'ensemencement pour chaque modèle afin d'obtenir *in fine* des sphéroïdes de tailles comparables, nous avons mené des tests de normalisation des mesures d'OCR sur la base de dosages de l'ADN ou de protéines après passage en *Seahorse*. Ces tests n'ont toutefois pas permis d'aboutir à une méthode de normalisation satisfaisante. De fait, les résultats étaient considérés comme comparables si les sphéroïdes issus des conditions comparées présentaient des diamètres similaires (+/- 50µm) et un OCR non mitochondrial équivalent. Forts de la mise au point et de l'optimisation de ce protocole, nous avons caractérisé différents paramètres de l'OXPHOS (*i.e.* OCR basal, OCR dédié à la production d'ATP, OCR maximal et capacité de réserve respiratoire) dans l'ensemble de nos modèles issus de la lignée HSJD-DIPG-013.

De manière surprenante au regard de nos données protéomiques, nous ne constations pas de changement des paramètres de l'OXPHOS imputable à l'oncohistone. Bien que les profils OXPHOS de nos conditions mutées (DIPG13 P et 13CTRL) étaient largement similaires, nous constations une très forte hétérogénéité entre nos trois clones KO indépendants, avec le clone 13KO1 semblant présenter un OCR basal et maximal légèrement supérieur aux conditions mutées, alors qu'à l'inverse, le clone 13KO3 présentait une nette diminution de ces paramètres par rapport aux autres modèles. Quant au clone 13KO2, ce dernier présentait un

profil plus proche de celui obtenu pour les conditions mutées. Ces discordances entre nos données protéomiques d'une part, suggérant une diminution du recours au métabolisme OXPHOS associé à la mutation H3.3 K27M, et nos mesures de l'OCR d'autre part, ne montrant pas de différence du profil OXPHOS en fonction de l'oncohistone, pourraient potentiellement s'expliquer en partie par la différence de matériel cellulaire utilisé pour ces deux types d'expériences. En effet, notre étude protéomique avait été effectuée sur des cellules cultivées en suspension selon notre protocole de culture standard, constituant ainsi une population mixte contenant des cellules individualisées et des sphéroïdes de taille hétérogènes. D'autre part, nos analyse *Seahorse* s'effectuaient sur des sphéroïdes calibrés, de taille bien supérieure (650-750µm), et donc certainement plus propices à l'établissement d'un gradient d'oxygène et d'une acidose centrale pouvant affecter le métabolisme cellulaire. Dans ce contexte, la validation par western blot du différentiel d'expression de certains acteurs identifiés lors de notre étude protéomique est actuellement en cours par western blot sur des échantillons protéiques issus de sphéroïdes standardisés.

Dans leur ensemble, ces résultats (protéomiques et métaboliques) demandent à être confirmés sur notre panel étendu de modèles (lignées cellulaires SU-DIPG-XIII, BT245, HSJ-019 et modèles KO respectifs). Le recoupement des protéomes associés à la mutation dans ces différentes lignées cellulaires nous permettra d'identifier les changements d'expression les plus robustes et généralisables et de voir si, parmi eux, demeure la sous-expression des acteurs du métabolisme précédemment identifiés dans la lignée HSJD-DIPG-013. Le cas échéant, une caractérisation métabolique à l'aide de la technologie *Seahorse* des modèles cellulaires dérivés des lignées SU-DIPG-XIII, BT245, HSJ-019 pourrait être particulièrement intéressante, notamment du fait de notre capacité à les cultiver à la fois en conditions adhérentes et sous forme de sphéroïdes, ce qui nous permettrait de comparer les résultats obtenus avec ces deux modalités. Au-delà de nos analyses globales sur populations entières à l'aide de la technologie *Seahorse*, une évaluation du profil énergétique en cellule unique par la méthode SCENITH (*single-cell energetic metabolism by profiling translation inhibition*), basée sur la mesure par cytométrie en flux de l'incorporation cellulaire de la puromycine (proportionnelle à la production d'ATP), serait particulièrement intéressante du fait de l'existence de cette hétérogénéité cellulaire au sein des sphéroïdes (comme montré lors de nos colorations des gouttelettes lipidiques). Cette approche ouvrirait la possibilité d'un couplage potentiel avec d'autres marqueurs, permettant de distinguer des populations cellulaires d'intérêt (*e.g.* marquage des gouttelettes lipidiques) (Argüello et al., 2020).

II.4.7. Modification de l'expression d'acteurs du métabolisme lipidique gouvernée par l'oncohistone

Outre l'enrichissement en protéines impliquées dans la glycolyse et l'OXPHOS, notre étude protéomique dévoilait également un enrichissement en acteurs du métabolisme

lipidique parmi les protéines sous-exprimées avec l'oncohistone. Au rang de ces acteurs, figuraient certaines enzymes clés de la β-oxydation des acides gras (*e.g.* ACADM, HADHA/B, ACAT1) mais également des acteurs centraux de la lipogenèse (*e.g.* FASN). Ces données pointaient pour la première fois un impact de l'oncohistone sur le métabolisme (catabolisme et anabolisme) des lipides. De manière intéressante, et confortant cette hypothèse, nous avions identifié des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des lipides parmi les gènes différentiellement exprimés avec la mutation lors de notre étude transcriptomique préalablement réalisée. Le recoupement de nos listes de gènes et protéines différentiellement exprimés n'identifiait certes pas d'acteurs du métabolisme lipidique en commun ; toutefois, différentes isoformes des mêmes enzymes étaient retrouvées parmi les gènes et les protéines différentiellement exprimées. Cela était notamment le cas pour certaines enzymes de la famille des *long-chain acyl-CoA synthetase* (ACSL) et des *short-chain acyl-CoA synthetase* (ACSS), catalysant la conversion des acides gras à chaîne longue et à chaîne courte en acyl-CoA, respectivement. En effet, lorsque le gène codant l'*acyl-CoA synthetase long-chain family member 1* (ACSL1) était sous-exprimé en présence de la mutation H3.3 K27M, la protéine ACSL3 apparaissait quant à elle sur-exprimée. D'autre part, lorsque le gène *ACSS3* était sur-exprimé en présence de l'oncohistone, les protéines ACSS1 et ACSS2 apparaissaient respectivement sous-exprimée et sur-exprimée dans nos données protéomiques. De manière intéressante, outre son impact potentiel sur la biosynthèse des acides gras, cette surexpression d'ACSS2 pourrait soutenir la hausse d'acétylation des lysines 27 des histones 3 inhérente à l'oncohistone H3.3 K27M. En effet, il a été décrit que ACSS2 permettait la production d'acétyl-CoA par le recyclage de l'acétate au niveau nucléaire pour alimenter l'acétylation des histones, en particulier en conditions hypoxiques (Bulusu et al., 2017). Outre les gènes codant les *acyl-CoA synthetase*, le gène *PRKAA2* codant l'AMPK2α, kinase senseur de l'état énergétique cellulaire orientant le métabolisme des lipides vers le catabolisme ou l'anabolisme, figurait également parmi les gènes différentiellement exprimés avec l'oncohistone (sous-exprimé en l'occurrence). Ce résultat était à la fois intéressant et surprenant au regard de l'étude de Panwalkar et collaborateurs montrant, à l'inverse, une hausse de l'expression génique de *PRKAA2* (codant l'AMPK2α) associée aux altérations épigénétiques (*i.e.* hausse de H3K27ac) subséquentes à la surexpression de EZHIP caractéristique des épendymomes PFA et des DMG $H3^{WT}$ (Panwalkar et al., 2021). Par western blot, nous avons confirmé le différentiel d'expression de ACSS3 (surexpression) et de l'AMPK2α (sous-expression) au niveau protéique de façon dépendante de la présence de l'oncohistone, excepté vis-à-vis du clone 13KO3. Cette hétérogénéité associée au clone 13KO3 était observée d'un point de vue transcriptomique, notamment visible sur l'axe PC2 de notre analyse en composante principale, mais également en termes d'effets biologiques (*e.g.* profil OXPHOS). En revanche, la sous-expression d'ACSL1 dans nos conditions mutées H3.3 K27M (DIPG13 P et 13CTRL) se confirmait au niveau protéique par rapport à l'ensemble de nos clones KO, y compris 13KO3. De surcroit, nous avons confirmé cette sous-expression de la protéine ACSL1 associée à l'oncohistone dans les lignées SU-DIPG-XIII, BT245 et HSJ-019.

Étonnamment, lors de notre étude protéomique, la protéine ACSL1 n'avait été détectée dans aucune de nos conditions, peut-être du fait de son niveau d'expression relativement faible. Cette observation illustre la complémentarité des caractérisations transcriptomique et protéomique de nos modèles. Forts de l'ensemble de ces résultats, nous avons alors entrepris l'exploration de l'impact potentiel de la mutation H3.3 K27M sur les processus du métabolisme lipidique impliquant ACSL1 et les autres protéines d'intérêt identifiées.

II.4.8. Évaluation d'une possible dépendance aux acides gras associée à l'oncohistone pour alimenter les aspects bioénergétiques cellulaires

Au niveau du tissu cérébral sain, les acides gras ne constituent pas une source d'énergie privilégiée par les neurones, toutefois, plusieurs études montrent que les cellules souches neurales (quiescentes) et les cellules gliales ont recours à la β-oxydation des acides gras (Schönfeld and Reiser, 2013; Knobloch et al., 2017; Fecher et al., 2019; Ioannou et al., 2019). Par ailleurs, dans le contexte cancéreux, en particulier dans le glioblastome de l'adulte, plusieurs études ont montré des phénomènes de dépendance à la β-oxydation des acides gras (Lin et al., 2017; Duman et al., 2019; Kant et al., 2020). À ce jour, ce type de phénomènes n'a encore jamais été décrit dans les DMG et nos données suggèrent d'ailleurs, à l'inverse, une répression d'acteurs impliqués dans la β-oxydation des acides gras (*e.g.* ACSL1, ACADM, HADHA/B, ACAT1) gouvernée par l'oncohistone H3.3 K27M (Ma et al., 2021; Zhang et al., 2021).

Dans ce contexte, nous avons étudié l'impact de l'oncohistone sur le recours aux acides gras pour alimenter le métabolisme OXPHOS des cellules de DMG. À cet égard, nous avons tout d'abord évalué la réponse de nos modèles cellulaires issus de la lignée HSJD-DIPG-013 à l'inhibition de l'import mitochondrial des acides gras à chaîne longue et moyenne par un traitement à l'étomoxir. Sur une gamme de doses allant jusque 100 µM, l'étomoxir n'affectait pas la viabilité cellulaire de nos modèles. Ce résultat ne suggérait donc pas de dépendance à la β-oxydation des acides gras en conditions basales dans nos modèles, indépendamment de la présence ou de l'absence de l'oncohistone. Corroborant ces observations, nos analyses exploratoires, comparant les profils OXPHOS des clones CTRL (muté H3.3 K27M) et 13KO1 (KO-H3.3 K27M), avec ou sans traitement à l'étomoxir, indiquaient une très faible implication des acides gras dans les différents paramètres de l'OXPHOS de ces modèles, et ce indépendamment de la présence ou de l'absence de l'oncohistone. Une fois de plus, nos observations phénotypiques apparaissaient surprenantes au regard de nos données protéomiques, suggérant une hausse de la β-oxydation des acides gras avec l'invalidation de la mutation H3.3 K27M.

Une des possibles raisons à cette absence du phénotype suggéré par nos données protéomiques résiderait dans nos conditions de culture cellulaire *in vitro*. D'une part, dans

notre milieu de culture, les seuls acides gras exogènes sont l'acide linoléique et l'acide linolénique, des acides gras poly-insaturés à chaînes longues (PUFAs) figurant parmi les PUFAs les plus abondants au niveau cérébral (Miska and Chandel, 2023). De fait, nos résultats ne reflétaient que le recours à ces PUFAs exogènes et aux acides gras endogènes biosynthétisés par les voies anaboliques, dont certains acteurs apparaissaient différentiellement exprimés avec l'oncohistone (*e.g.* FASN). Nous avons pris le parti de réaliser nos expériences dans ces conditions afin de pouvoir corréler les éventuels changements métaboliques observés avec d'autres effets biologiques identifiés dans les mêmes conditions. Néanmoins, les PUFAs ne sont pas des substrats préférentiels pour la β-oxydation, notamment du fait de la nécessité de réactions enzymatiques supplémentaires pour convertir les doubles liaisons de leur chaîne carbonée en liaisons simples. Même si certaines de ces enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras poly-insaturés (*e.g.* DECR1, ECI1) apparaissaient surexprimées avec l'invalidation de la mutation H3.3 K27M, il serait intéressant de réitérer ces expériences en supplémentant notre milieu avec d'autres acides gras exogènes (*e.g.* acide palmitique), normalement apportés au niveau cérébral par la circulation sanguine (après diffusion au travers de la barrière hémato-encéphalique) et/ou produits par les cellules du microenvironnement tumoral (*e.g.* neurones) (Schönfeld and Reiser, 2013; Ioannou et al., 2019; Miska and Chandel, 2023). D'autre part, notre milieu de culture, contenant près de 4 g/L de glucose, était supplémenté en pyruvate et en glutamine de manière largement supra-physiologique. L'abondance artificielle de ces substrats majeurs du métabolisme OXPHOS pourrait masquer d'éventuelles différences de recours à la β-oxydation des acides gras.

De plus, au regard de la présence des gouttelettes lipidiques dans nos modèles KO pour l'oncohistone, il apparaît probable que les éventuels changements de l'utilisation des acides gras pour alimenter l'OXPHOS soient hétérogènes et conditionnés par le microenvironnement (*e.g.* hypoxie, acidose, gradient de nutriments). Dans ce contexte, comme précédemment évoqué, des approches telles que la technique SCENITH sur sphéroïdes (fraîchement) dissociés pourraient s'avérer particulièrement informatives.

II.4.9. Formation hétérogène de gouttelettes lipidiques associée à l'invalidation de l'oncohistone

Outre leur utilisation pour produire de l'énergie *via* la β-oxydation mitochondriale, les acyl-CoA, produits par les enzymes ACSL (dont ACSL1) à partir des acides gras exogènes et/ou endogènes, peuvent également être stockés sous formes de triglycérides dans des compartiments cellulaires spécialisés que sont les gouttelettes lipidiques (Olzmann and Carvalho, 2019; Zadoorian et al., 2023). Au niveau cérébral, la présence de gouttelettes lipidiques a été décrite dans le contexte physiologique, en particulier dans les cellules de la glie (*e.g.* astrocytes, oligodendrocytes) mais également dans le contexte cancéreux, en

particulier dans le glioblastome de l'adulte (Cruz et al., 2020; Ralhan et al., 2021). Par ailleurs, le rôle clé des enzymes ACSL (incluant ACSL1) dans la formation de ces gouttelettes lipidiques a été décrit dans plusieurs modèles cancéreux (Klasson et al., 2022; Ma et al., 2021). Étant donné que nous observions une hausse de l'expression d'ACSL1 dans l'ensemble de nos modèles invalidés pour H3.3 K27M (lignées cellulaires HSJD-DIPG-013, SU-DIPG-XIII, BT245 et HSJ-019), nous avons étudié l'hypothèse d'un changement du contenu cellulaire en gouttelettes lipidiques en fonction de la présence ou de l'absence de l'oncohistone. Nos premières expériences de coloration des gouttelettes lipidiques (oil red O) étaient réalisées sur des cellules dissociées issues d'une population mixte de cellules individualisées et de sphéroïdes de taille hétérogènes cultivées en suspension selon nos conditions de culture standard. Dans ces conditions, les lignées cellulaires parentales de DMG présentaient très peu de gouttelettes lipidiques alors que, de manière intéressante, le KO de la mutation, associé à une hausse de l'expression d'ACSL1, s'accompagnait d'une hausse hétérogène de la formation de gouttelettes lipidiques, excepté dans la lignée HSJ-019. Ces observations n'étant que qualitatives, des tests de quantification par élution de l'oil red O avec de l'isopropanol et lecture de l'absorbance à 510 nm ont été menés (données non présentées). Toutefois, les valeurs d'absorbance obtenues pour la plupart de nos conditions étaient trop faibles pour se distinguer du bruit de fond. De fait, la mise au point d'une méthode de quantification à partir de nos images de microscopie est actuellement en cours.

Bien qu'intéressante, l'augmentation des gouttelettes lipidiques associée à l'invalidation de la mutation H3.3 K27M apparaissait largement hétérogène. Dans ce contexte, nous avons exploré les causes de cette hétérogénéité. La formation de gouttelettes lipidiques étant notamment favorisée en conditions de stress, telles que l'hypoxie, l'acidose ou encore la privation de nutriments, nous avons poursuivi nos investigations par des analyses sur sphéroïdes de taille standardisée et importante (650-750 µm), modèles récapitulant naturellement ces paramètres du microenvironnement tumoral (Dierge et al., 2021; Ralhan et al., 2021; Shakya et al., 2021). Dans un but exploratoire, ces expériences ont tout d'abord été menées sur des sphéroïdes issus de nos modèles de la lignée HSJD-DIPG-013. En cohérence avec nos précédents résultats, nous ne détections de gouttelettes lipidiques que dans les sphéroïdes KO pour l'oncohistone. De surcroit, ces dernières présentaient une localisation préférentiellement centrale au sein des sphéroïdes (autour de 150 µm de profondeur) et n'étaient quasiment pas retrouvées en périphérie. Cette présence de gouttelettes lipidiques spécifique du centre de modèles 3D a également été observée dans des organoïdes de glioblastome de l'adulte, confortant la pertinence de nos résultats (Shakya et al., 2021). Cette distribution expliquait, au moins en partie, l'hétérogénéité précédemment constatée et semblait indiquer un impact de l'invalidation de l'oncohistone conditionné par le microenvironnement.

Parmi les paramètres potentiellement à l'origine de cette distribution, l'hypoxie a été associée à la formation de gouttelettes lipidiques dans différents modèles, notamment *via* l'expression de l'*hypoxia-inducible lipid droplet-associated* (HILPDA) (Shakya et al., 2021;

VandeKopple et al., 2019). Dans nos données omiques, nous ne retrouvions pas de différentiel d'expression de HILPDA ou d'autre protéines présentes à la surface des gouttelettes lipidiques (*e.g.* périlipines), peut-être du fait de la présence relativement faible des gouttelettes lipidiques dans nos conditions de culture standard. Afin d'évaluer l'impact spécifique de l'hypoxie sur la formation de gouttelettes lipidiques dans nos modèles, nous avons cultivé nos cellules DIPG13 P (mutées H3.3 K27M) et 13KO1 sur un temps court (72h), soit en normoxie soit en hypoxie (1%O_2), après dissociation mécanique afin de les maintenir les plus individualisées possible au cours de l'expérience. Dans ces conditions (cellules globalement individualisées), en normoxie, nous ne détections pas de gouttelettes lipidiques, ni en présence ni en absence de l'oncohistone. Ce résultat confortait l'idée que certains facteurs du microenvironnement, présents dans nos sphéroïdes, conditionnaient la formation des gouttelettes lipidiques spécifiques de nos modèles KO. En ce sens, l'expression d'ACSL1 des cellules 13KO1 était largement augmentée lorsqu'elles étaient cultivées sous forme sphéroïdes standardisés (présentant des gouttelettes lipidiques) par rapport aux conditions de culture en cellules plus individualisées. Cette hausse de l'expression d'ACSL1 spécifique de la culture en sphéroïdes n'était retrouvée que dans une moindre mesure dans les cellules parentales mutées (ne formant pas de gouttelette lipidique). Cette corrélation entre l'expression d'ACSL1 et la formation des gouttelettes lipidiques spécifiques des sphéroïdes KO-H3.3 K27M suggérait un rôle de l'enzyme dans ce phénotype, nécessitant d'être étayé par validation fonctionnelle. Néanmoins, cette expression quasi spécifique de sphéroïdes limite les perspectives d'utilisation de stratégie d'invalidation transitoire par siRNA. De fait, une étude de l'impact de l'inhibition pharmacologique des enzymes ACSL (dont ACSL1), avec la triacsin C, sur la formation des gouttelettes lipidiques est actuellement en cours. D'autre part, nos conditions hypoxiques (1%O_2 pendant 72h) ne permettaient pas de reproduire la formation de gouttelettes lipidiques observées dans nos sphéroïdes issus du clone 13KO1. Ces premiers résultats n'étaient ainsi pas en faveur d'une formation de gouttelettes lipidiques conditionnée par l'hypoxie. Toutefois, il est à noter que nous ne savons pas i) si le temps de culture en conditions hypoxiques utilisé lors de ces expériences (72h) était suffisant pour permettre la formation/accumulation de gouttelettes lipidiques et ii) si le niveau d'hypoxie utilisé (1%O_2) correspond au taux de saturation en oxygène retrouvé au centre de nos sphéroïdes. Ainsi de plus amples investigations avec des temps et des niveaux d'hypoxie supérieurs (*e.g.* 0.1%O_2) sont en cours.

À l'instar de l'hypoxie, plusieurs travaux ont également montré que l'acidose, caractéristique de nombreuses tumeurs, favorise également la formation de gouttelettes lipidiques dans divers modèles cancéreux (Dierge et al., 2021). Afin d'étudier l'impact de l'acidose sur la formation de gouttelettes lipidiques dans nos modèles, nous avons comparé la présence de gouttelettes lipidiques dans des sphéroïdes issus des modèles DIPG13 P et 13KO1 formés dans notre milieu de culture classique (pH=7.4), dans du milieu de culture au pH ajusté à 6.5 (acidose) ou dans du milieu complémenté avec du bicarbonate (22mM) pour neutraliser les protons générés au cours de la culture. Les sphéroïdes DIPG13 P mutés

H3.3 K27M ne présentaient pas de gouttelettes lipidiques quelques soient les conditions. D'autre part, comme attendu, nous observions des gouttelettes lipidiques au centre des sphéroïdes 13KO1 dans nos conditions de pH standard. Toutefois, avec un pH de 6.5 nous n'observions pas de généralisation, ni même d'extension, de la présence des gouttelettes lipidiques au sein des sphéroïdes 13KO1 (vers la périphérie). De même, l'expérience complémentaire en présence de bicarbonate ne réduisait pas la formation des gouttelettes lipidiques au centre des sphéroïdes 13KO1. Ces résultats préliminaires ne suggéraient ainsi aucune influence de l'acidose sur la formation de gouttelettes lipidiques dans nos sphéroïdes invalidés pour l'oncohistone. Au-delà de l'hypoxie et l'acidose, la privation en nutriments constituerait également un paramètre potentiellement présent au centre de nos sphéroïdes pouvant impacter la formation de gouttelettes lipidiques (Rambold et al., 2015). Ainsi, l'élucidation des paramètres régissant la formation de ces gouttelettes lipidiques spécifiquement au centre de nos sphéroïdes KO-H3.3 K27M nécessite de plus amples investigations, actuellement en cours.

Dans leur ensemble, ces résultats montrent pour la première fois l'impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la dynamique de formation des gouttelettes lipidiques dans les cellules de DMG. Cet impact était mis en lumière par la formation de gouttelettes lipidiques, probablement conditionnée par le microenvironnement, au centre de modèles sphéroïdes de DMG invalidés pour l'oncohistone. Cette accumulation de gouttelettes lipidiques, spécifique de nos modèles invalidés, pourrait refléter une diminution de la demande en acides gras associée à l'inhibition de leur croissance cellulaire, processus nécessitant la génération de biomasse, en particulier la production de membranes. Une autre hypothèse serait que l'invalidation de l'oncohistone permettrait de réorienter l'acétyl-CoA normalement dédié au maintien d'un niveau élevé d'acétylation des histones vers la lipogenèse (acides gras et cholestérol), conduisant à un stockage des lipides produits sous forme de gouttelettes lipidiques (*Cf.* Fig. 4). Dans une récente étude, Minami et collaborateurs ont montré que la $p16^{INK4a}$ régulait le métabolisme lipidique des glioblastomes de l'adulte. En effet, les auteurs démontraient qu'en présence de $p16^{INK4a}$, les PUFAs sont préférentiellement stockés dans des gouttelettes lipidiques alors qu'en l'absence de $p16^{INK4a}$ (délétion de *CDKN2A*), les PUFAs sont plutôt incorporés dans les membranes (Minami et al., 2023). Or, dans les DMG, il a été montré que l'oncohistone H3.3 K27M gouverne la répression de $p16^{INK4a}$ (Balakrishnan et al., 2020; Cordero et al., 2017; Mohammad et al., 2017). De manière cohérente avec les travaux de Minami *et al.*, l'invalidation de H3.3 K27M dans nos modèles cellulaires de DMG s'accompagnait de la dérépression de *CDKN2A* et de la formation de gouttelettes lipidiques. Par ailleurs, corroborant également nos résultats, Shakya et collaborateurs ont décrit une formation spécifique de gouttelettes lipidiques au centre d'organoïdes de glioblastome de l'adulte. De manière intéressante, ces derniers ont également montré que ces gouttelettes lipidiques étaient retrouvées sur des coupes de tumeurs de patients, en particulier au niveau des régions péri-nécrotiques. De plus, dans cette même étude, la présence de gouttelettes lipidiques au centre des organoïdes était associée à un état cellulaire plus différencié et des

capacités d'auto-renouvellement réduites alors que l'absence de gouttelettes lipidiques était associée à un profil de cellules souches cancéreuses (Shakya et al., 2021). Étant donné le rôle de l'oncohistone dans le blocage de la différenciation cellulaire, ces données sont en parfait accord avec l'apparition de gouttelettes lipidiques dans nos cellules de DMG KO-H3.3 K27M, présentant d'ailleurs une inhibition de la croissance cellulaire. En effet, dans nos modèles de DMG, la hausse importante de la formation de gouttelettes lipidiques pourrait être associée à une levée du blocage de la différenciation induite par l'invalidation de l'oncohistone. Outre l'invalidation de la mutation H3.3 K27M, une hétérogénéité de l'expression de l'oncohistone a été décrite dans les DMG, le plus haut niveau d'expression étant retrouvé dans les cellules tumorales indifférenciées de type OPC-like (majoritaires) et un niveau d'expression réduit plutôt associé au cellules tumorales plus différenciées de type AC-like (Harpaz et al., 2022). L'existence de cette sous-population minoritaire de cellules plus différenciées (AC-like), même en présence de la mutation H3.3 K27M, pourrait être à l'origine de la présence des rares gouttelettes lipidiques observées dans nos lignées parentales (en particulier SU-DIPG-XIII et BT245) et ouvre la porte à une possible perspective de validation de nos résultats sur coupes de tissus de patients atteint de DMG H3 K27 altérés.

Notons que, la formation de gouttelettes lipidiques ayant notamment été décrite comme un mécanisme protecteur de la lipotoxicité et de la peroxydation lipidique en conditions de stress (Cruz et al., 2020; Ralhan et al., 2021), celle-ci pourrait impacter ainsi la réponse de nos modèles à divers types de thérapies anti-cancéreuses.

III Chapitre 3 : Étude de l'impact de la mutation H3.3 K27M sur la réponse des cellules de DMG aux thérapies

III.1. Préambule

En parallèle de cette caractérisation phénotypique de nos modèles KO et plus spécifiquement du rôle de la mutation H3.3 K27M sur le métabolisme lipidique des cellules de DMG, nous avons adressé la question cruciale de l'impact de l'oncohistone sur la réponse de ces cellules aux thérapies. En effet, la compréhension des mécanismes gouvernant cette réponse constitue un challenge majeur de la recherche en neuro-oncologie pédiatrique.

Malgré de nombreux essais cliniques, les DMG se sont montrés globalement peu répondeurs aux chimiothérapies et thérapies ciblées évaluées jusqu'alors (Grill et al., 2023; Hargrave et al., 2006). Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'impact putatif de l'oncohistone sur le profil de réponse aux drogues des cellules de DMG, avec l'idée que l'identification et la compréhension d'éventuelles résistances ou sensibilités associées à l'oncohistone H3.3 K27M pourraient mettre en lumière de nouvelles opportunités

thérapeutiques. Lors de nos précédents travaux, l'induction de l'oncohistone dans des cellules de gliomes pédiatriques hémisphériques induisait une modification de leur profil de réponse aux drogues, avec toutefois peu de recoupement entre nos lignées cellulaires (Rakotomalala et al., 2021a). Ces différences associées au contexte cellulaire supportaient la nécessité d'évaluer cet impact sur la réponse aux drogues dans des cellules de DMG altérés H3 K27.

D'autre part, l'unique traitement de référence des DMG altérés H3 K27 demeure un protocole de radiothérapie palliative, ne procurant qu'un modeste bénéfice de survie de 3-4 mois (El-Khouly et al., 2019). Bien que l'impact sur la réponse à la radiothérapie de certaines altérations moléculaires caractéristiques des DMG (*e.g. TP53*, *ATRX*) ait été décrit, le rôle putatif de l'oncohistone H3.3 K27M demeure peu documenté. Nous avons précédemment montré un impact de la mutation H3.3 K27M sur la radiosensibilité de cellules de gliomes pédiatriques hémisphériques induites pour l'oncohistone, toutefois variable en fonction du contexte cellulaire (Rakotomalala et al., 2021a). D'un point de vue mécanistique, plusieurs études ont récemment décrit des perturbations, ou la mise en place aberrante, du mécanisme NHEJ associées à la mutation H3.3 K27M (Bočkaj et al., 2021; Giacomini et al., 2024). Cependant, à notre connaissance, seule une étude suggérait que la perturbation du mécanisme NHEJ associée à l'induction de l'oncohistone H3.1 K27M impactait la radiosensibilité, et cela, dans des fibroblastes (Zhang et al., 2018). Dans ce contexte, l'étude de l'impact radiobiologique de l'oncohistone H3.3 K27M nécessitait d'être éclairci dans un contexte cellulaire plus pertinent de DMG.

Dans ce chapitre, basé sur l'utilisation de nos modèles cellulaires de DMG invalidés pour la mutation H3.3 K27M, nous avons mené une étude préliminaire de l'impact de l'oncohistone sur la réponse à certaines chimiothérapies, thérapies ciblées et molécules d'intérêt dans le cadre du repositionnement pharmacologique, mais aussi à la radiothérapie.

III.2. Matériels et méthodes

III.2.1. Criblage pharmacologique

La librairie de composés pharmacologiques testée comprenait 110 molécules, incluant des chimiothérapies conventionnelles, des épidrogues, des thérapies ciblées et molécules d'autres natures dans le cadre du repositionnement pharmacologique (Tableau 1 en annexe). Pour chacun des composés, des gammes de six points de concentrations recouvrant 3 log (*i.e.*, 1 nM – 1 µM, 10 nM – 10 µM ou 100 nM – 100 µM selon les composés) étaient utilisées. Dans un premier temps, grâce à une plateforme robotisée, équipée d'un distributeur acoustique Echo550® (Labcyte), les 110 agents pharmacologiques de la librairie étaient distribués de façon précise à quantité constante de DMSO dans des plaques 384 puits à fonds ronds. Les cellules étaient ensuite ensemencées à raison de 14 000 cellules viables par puits dans ces plaques. Une centrifugation brève était alors effectuée avant d'incuber les plaques à 37°C en

atmosphère humide avec 5% de CO_2 pendant 96h. *In fine*, par utilisation d'un spectrophotomètre Pherastar® (BMG), la viabilité cellulaire était mesurée par bioluminescence à l'aide du *CellTiter Glo® 2.0 assay* (Promega) puis normalisée par rapport à la viabilité cellulaire du contrôle DMSO (1%) de la condition concernée. Les courbes de cytotoxicité étaient extrapolées par un modèle de régression non linéaire et les aires sous la courbe (AUC) déterminées à l'aide des logiciels R Studio (packages drc, ggplot2 et PharmacoGx) et *GraphPad Prism*.

III.2.2. Évaluation de la radiosensibilité par test de clonogénicité

Une couche d'agar *low melting* (Fischer bioreagent) 0,6% était distribuée à raison de 300 µL par puits dans des plaques 24 puits. Les plaques étaient réservées au réfrigérateur à 4°C pendant 10 minutes. Les cellules étaient récoltées puis centrifugées pendant 3 minutes à 400 x *g.* Le surnageant était aspiré et les cellules dissociées avec du TrypLE *express* 1 X (Gibco) durant 5 minutes à 37°C puis filtrées sur des tamis de 35 µm. Les cellules viables étaient ensuite comptées après coloration au bleu de Trypan grâce au TC20 Automated Cell Counter (Biorad). Le nombre de cellules ensemencées était adapté pour chaque dose de radiothérapie ; 12 000 cellules pour les conditions 0 et 1Gy, 24 000 cellules pour les conditions 2 et 3Gy, 36 000 cellules pour les conditions 4 et 5Gy. L'ensemencement était réalisé par-dessus la première couche d'agar 0,6%, dans 300 µL de milieu de culture à 0,3% d'agar. Les plaques 24 puits étaient ensuite laissées 10 minutes au réfrigérateur à 4°C et, une fois l'agar 0,3% figé, remises en culture à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO_2. Après 24h, les cellules étaient exposées à des doses de 0Gy, 1Gy, 2Gy, 3Gy, 4Gy ou 5Gy d'irradiations ionisantes dans le service de radiothérapie du Centre Oscar Lambret, à l'aide d'un accélérateur linéaire de type XSTRAHL 100 (photons de 50kV, débit dose de 1,25Gy/minute) en utilisant un collimateur de 15 cm de diamètre et le filtre n°2. Les cellules étaient ensuite incubées 28 jours à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO_2. La révélation des colonies formées s'effectuait par distribution de 60µL d'une solution de sels de tétrazolium à 5 mg/mL (sigma aldrich) dans les différents puits. Après 8h d'incubation à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO_2, les plaques étaient scannées et les sphères étaient quantifiées à partir des images obtenues à l'aide du logiciel *ImageJ*. Tout d'abord, le dénombrement des sphères obtenues dans la condition 0Gy permettait de calculer le *plating efficiency* (PE) par la formule suivante : *PE = Nombre de colonies à 0Gy / Nombre de cellules ensemencées*. Ensuite, un taux de survie relatif (TS) pour chacune des doses d'irradiations était calculé par la formule suivante : *TS = Nombre de colonies après irradiation / (PE x Nombre de cellules ensemencées)*. Les résultats étaient présentés sous la forme d'une courbe de survie représentant le taux de survie en échelle logarithmique en fonction de la dose d'irradiation reçue.

III.2.3. Western blot

Les cellules étaient irradiées à une dose de 2Gy comme décrit ci-dessus. Aux temps indiqués, les cellules étaient récoltées, rincées dans du PBS puis conservées sous la forme de culots secs à -80°C. Les histones étaient extraites à l'aide du kit *Histone Extraction Kit* (abcam #ab113476), selon le protocole du fabricant puis dosées comme précédemment décrit (*cf.* partie II.2.4.3.). Le western blot était réalisé comme décrit dans la partie II.2.4.4. L'anticorps primaire dirigé contre la phosphorylation de le sérine 39 de H2AX (Merck Millipore #05-636) était utilisé au 1/1000 dans une solution de BSA (TBS-Tween 0,2% contenant 5% de BSA). L'anticorps secondaire couplé à la *horseradish peroxidase* (HRP) (Cell Signaling #7076) était ajouté (dilués au 1/2000) dans une solution de BSA (TBS-Tween 0,2% contenant 5% de BSA).

Le détail des autres méthodes a été décrit précédemment dans le chapitre 2 (*cf.* II.2. Matériels et méthodes).

III.3. Résultats

III.3.1. Évaluation de l'impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la réponse aux drogues des cellules de DMG

III.3.1.1. Étude du profil de réponse aux drogues associé à l'oncohistone H3.3 K27M dans les cellules de DMG

Dans ce contexte, nous avons évalué l'impact de la mutation H3.3 K27M sur le profil de réponse aux drogues des cellules de DMG. Dans cette optique, nous avons mené une analyse fonctionnelle à grande échelle par criblage pharmacologique sur nos modèles cellulaires de la lignée HSJD-DIPG-013, comme nous l'avions précédemment fait dans nos modèles induits pour l'oncohistone (Rakotomalala et al., 2021a). Ce criblage pharmacologique, réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. Eddy Pasquier du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), portait sur une librairie de 108 molécules contenant des chimiothérapies cytotoxiques, des thérapies ciblées, des épidrogues et des composés d'autres natures dans le cadre du repositionnement pharmacologique. Ce criblage revêtait deux principaux objectifs ; d'une part évaluer l'impact de la mutation H3.3 K27M sur le profil de réponse aux drogues dans un contexte cellulaire de DMG et, d'autre part, mettre en lumière des voies de signalisation et mécanismes moléculaires impactés par l'oncohistone et impliqués dans le maintien du caractère oncogénique des DMG. Nous avons ainsi comparé la réponse de nos cellules DIPG13 P, 13CTRL (mutées H3.3 K27M) et de nos trois clone KO à cette librairie de 108 composés (Fig. 30).

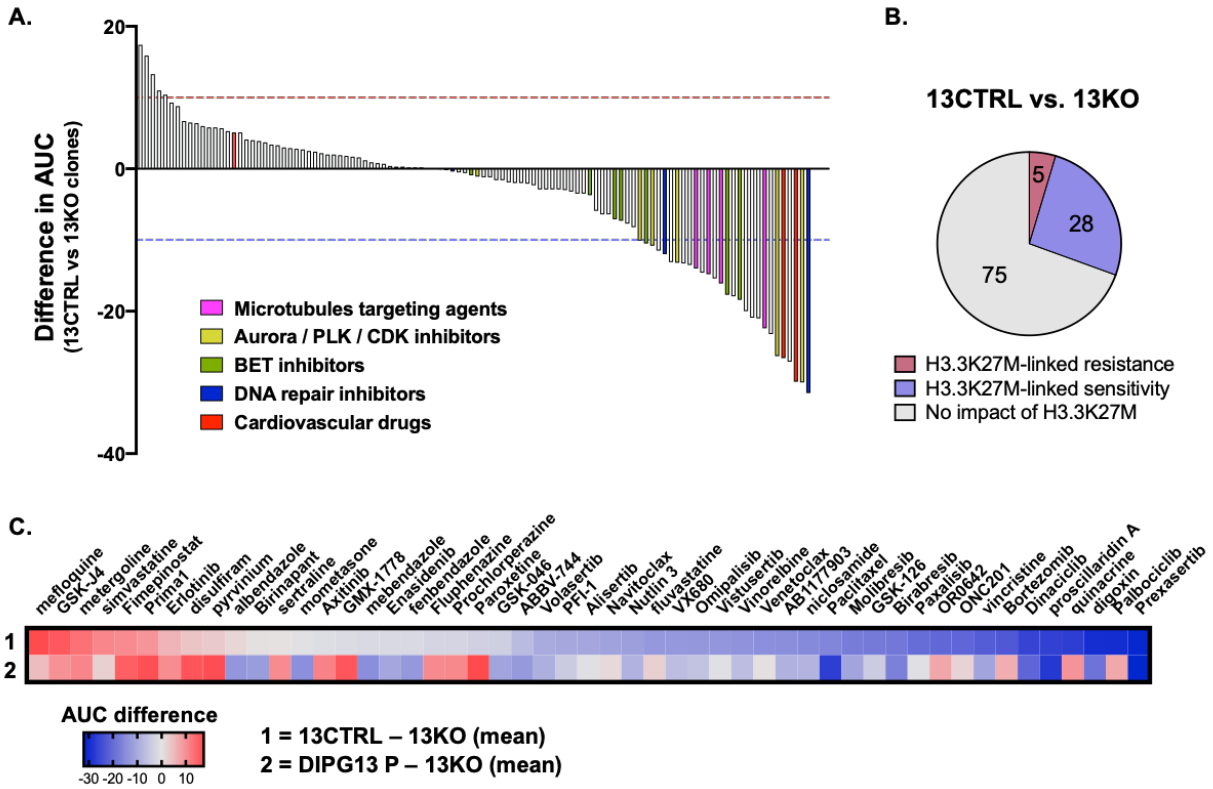


Figure 30. Caractérisation de l'impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur le profil de réponse aux drogues des cellules de DMG. A. Waterfall plot synthétisant les résultats obtenus lors du criblage pharmacologique (108 composés) effectué sur nos modèles de la lignées HSJD-DIPG-013 (DIPG13 P, 13CTRL, 13KO1, 13KO2, 13KO3). Le graphique représente la différence entre l'aire sous la courbe (AUC) obtenue pour la condition 13CTRL (mutée H3.3 K27M) et l'AUC moyenne de nos modèles KO (13KO1, 13KO2 et 13KO3) pour chacun des composés testés. Nous considérions que la mutation H3.3 K27M conférait une résistance aux composés dont la différence d'AUC était supérieure à 10 (ligne en pointillés rouges) et une sensibilité aux composés dont la différence d'AUC était inférieure à -10 (ligne en pointillés bleus). **B.** Diagramme de répartition montrant la proportion de molécules pour lesquelles l'oncohistone confère une résistance, une sensibilité ou n'impacte pas l'efficacité. **C.** Liste des composés présentant une efficacité diminuée (en rouge) ou exacerbée (en bleu) en présence de l'oncohistone. Le gradient de couleur reflétait la différence d'AUC observée entre le clone 13CTRL et les 3 clones KO (moyenne).

Entre notre clone 13CTRL et nos clones KO, la majorité des composés (environ 70%) ne présentaient pas d'efficacité différentielle, alors que nous observions une différence de réponse pour 33 des composés testés (Fig. 30). En effet, le clone 13CTRL (muté H3.3 K27M) présentait une résistance à 5 de ces 33 composés et une sensibilité exacerbée aux 28 autres par rapport aux clones KO (Fig. 30B). Ces résultats semblent indiquer que la mutation H3.3 K27M induisait plus de dépendances que de résistances sur cette librairie de 108 composés.

Parmi les cinq composés dont l'efficacité était atténuée en présence de l'oncohistone, nous ne retrouvions pas d'enrichissement de famille ou classe de composés spécifique (Fig. 30C). De manière surprenante par rapport aux données de la littérature, le GSK-J4 (inhibiteur des KDM6A/B) était retrouvé parmi ces cinq composés présentant une efficacité réduite dans le clone 13CTRL (avec la même tendance dans les cellules DIPG13 P) (Hashizume

et al., 2014). Il était à noter qu'aucune chimiothérapie cytotoxique ni thérapie ciblée évaluée au cours d'essais cliniques dans le DMG n'était observée parmi ces cinq composés.

Par ailleurs, parmi les molécules dont l'efficacité était exacerbée dans le clone 13CTRL (par rapport aux clones KO), nous observions un enrichissement spécifique de certaines familles de composés (Fig. 30C). Nous retrouvions en effet les chimiothérapies cytotoxiques du panel ciblant les microtubules (*i.e.* vincristine, paclitaxel, vinorelbine, AB1177903) ainsi que diverses thérapies ciblées inhibant les kinases du cycle cellulaire et de la mitose (*i.e.* palbociclib, dinaciclib, alisertib, volasertib, VX680). La plupart de ces composés présentaient la même tendance lors de la comparaison avec les cellules DIPG13 P. Ces résultats étaient cohérents avec l'impact de l'oncohistone sur la croissance cellulaire précédemment observé dans nos modèles (*Cf.* Fig. 23). De plus, certaines épidrogues présentaient également une efficacité exacerbée avec l'oncohistone, en particulier les inhibiteurs pan-BET de la librairie (*i.e.* birabresib, molibresib, PFI-1) ainsi qu'un inhibiteur d'EZH2 (*i.e.* GSK-126), dont les rationnels d'efficacité dans les DMG sont confirmés par d'autres études, en particulier vis-à-vis de l'impact épigénétique de l'oncohistone (Piunti et al., 2017; Mohammad et al., 2017).

Dans leur ensemble, ces résultats de criblage pharmacologique montraient un impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur le profil de réponse aux drogues de nos modèles cellulaires de DMG *in vitro*. Toutefois, l'oncohistone n'était pas associée à un profil particulièrement chimiorésistant mais plutôt à l'acquisition de diverses dépendances, se traduisant par une sensibilité exacerbée des cellules de DMG mutées H3.3 K27M à certaines familles de composés (*e.g.* chimiothérapies ciblant les microtubules, inhibiteurs pan-BET).

III.3.1.2. Impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la réponse des cellules de DMG au prexasertib

De manière intéressante au regard de l'impact potentiel de la mutation H3.3 K27M sur les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN, le prexasertib, inhibiteur de la kinase CHK1, était le composé présentant l'efficacité la plus impactée par l'oncohistone dans nos modèles (Fig. 30C et 31A). Les résultats du criblage étant exploratoires (une seule expérience), nous avons entrepris la validation de l'efficacité différentielle du prexasertib en fonction de l'oncohistone (Fig. 31B).

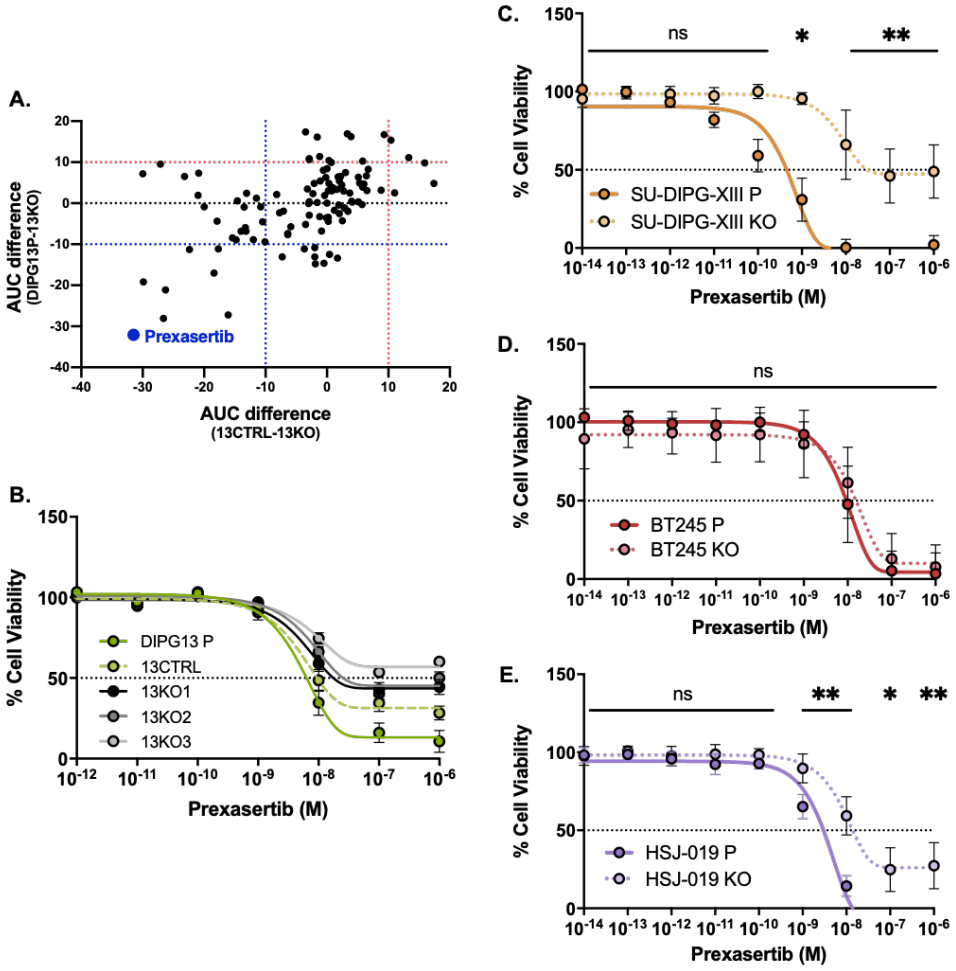


Figure 31. Validation de l'impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la réponse des cellules de DMG au prexasertib. A. Graphique représentant les différences d'aire sous la courbe (AUC) entre le clone 13CTRL et les clones KO (AUC moyenne) en abscisse et entre les cellules parentales (DIPG13 P) et les clones KO en ordonnées pour chacun des 108 composés de notre criblage pharmacologique. Les lignes en pointillés bleus représentent le seuil (différence d'AUC inférieure ou égale à -10) en-deçà duquel l'efficacité des composés était considérée comme exacerbée dans nos conditions mutées H3.3 K27M (sensibilités associées à H3.3 K27M) et celles en pointillés rouges, le seuil (différence d'AUC supérieure ou égale à 10) au-delà duquel l'efficacité des composés était considérée comme réduite dans nos conditions mutées H3.3 K27M (résistances associées à H3.3 K27M). Le prexasertib (inhibiteur de CHK1) était indiqué en bleu. **B.** Test de cytotoxicité du prexasertib sur les modèles cellulaires dérivés de la lignée HSJD-DIPG-013 avec une gamme de doses allant de 1 pM à 1 µM. Les résultats sont issus de trois expériences indépendantes et les barres d'erreur représentent la *standard error of the mean* (SEM). **C-E.** Test de cytotoxicité du prexasertib avec une gamme de concentration allant de 0.01 pM à 1 µM sur les cellules SU-DIPG-XIII et leur clone KO (C.), les cellules BT245 et leur clone KO associé (D.), les cellules HSJ-019 et leur clone KO associé (E.). Les résultats présentés sont issus de six expériences indépendantes, les barres d'erreur représentent la *standard error of the mean* (SEM) et l'analyse statistique était effectuée par l'application d'un test *two-way ANOVA* (ns, P > 0,05 ; *, P < 0.05 ; **, P<0.01).

Lors de ces expériences de validation, nous observions une cytotoxicité du prexasertib à partir de 10 nM dans l'ensemble des cellules HSJD-DIPG-013, mutées comme KO. Toutefois, comme lors du criblage pharmacologique, les clones KO apparaissaient moins sensibles au prexasertib que les cellules DIPG13 P et 13CTRL. Néanmoins, la différence de réponse entre nos conditions mutées et KO pour H3.3 K27M apparaissait plus atténuée que lors du crible et s'observait en particulier aux plus fortes doses de prexasertib utilisées (0.1 et 1 µM), pour

lesquelles la viabilité cellulaire de nos clones KO atteignait une valeur plancher de 45-60%. Par ailleurs, bien que nous observions une clusterisation des profils de réponse au prexasertib de nos trois modèles KO, nos modèles mutés (DIPG13 P et 13CTRL) présentaient des profils de réponse différents. En effet, le clone 13CTRL montrait une réponse au prexasertib intermédiaire entre celle des clones KO et celle des cellules DIPG13 P, plus sensibles. Au regard de ces résultats mitigés et dans l'optique de confirmer l'impact de l'oncohistone sur la réponse au prexasertib, nous avons étendu nos expériences de validation aux lignées SU-DIPG-XIII, BT245, HSJ-019 et à leurs clones KO respectifs (Fig. 31B-D). De manière intéressante, nous retrouvions la diminution de l'efficacité du prexasertib associée à l'invalidation de la mutation H3.3 K27M dans les lignées cellulaires SU-DIPG-XIII (Fig. 31B) et HSJ-019 (Fig. 31C). À contrario, dans la lignée BT245 l'invalidation de l'oncohistone ne modifiait pas la réponse au prexasertib (Fig. 31D).

Ces résultats identifiaient une dépendance exacerbée à la kinase CHK1 en présence de l'oncohistone dans trois des quatre lignées cellulaires de DMG de notre panel (HSJD-DIPG-013, SU-DIPG-XIII et HSJ-019). Cette dépendance pourrait être liée au stress réplicatif et à la résolution aberrante du blocage des fourches de réplication associés à l'oncohistone (Zhang et al., 2018; Bočkaj et al., 2021; Giacomini et al., 2024).

III.3.1.3. Impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la réponse des cellules de DMG aux glycosides cardiaques

Parmi les composés dont l'efficacité apparaissait fortement impactée par l'oncohistone H3.3 K27M lors de notre criblage pharmacologique, ressortaient également deux composés de la famille des glycosides cardiaques ciblant la pompe sodium/potassium ATPase (Na^+/K^+-ATPase). En effet, la proscillaridine A et la digoxine figuraient parmi les hits pharmacologiques présentant une efficacité exacerbée à la fois dans les cellules DIPG13 P et 13CTRL par rapport aux clones KO (Fig. 30C et 32A). De manière intéressante, parmi les gènes identifiés comme surexprimés avec l'oncohistone H3.3 K27M lors de notre analyse transcriptomique, nous identifions des enrichissements en gènes impliqués dans diverses cardiomyopathies et dans la signalisation calcique (Fig. 32B). Ces observations supportaient un potentiel impact de la mutation H3.3 K27M sur l'homéostasie et/ou la signalisation ionique des cellules de DMG. Dans ce contexte, nous avons tout d'abord validé le différentiel d'efficacité de la proscillaridine A observé lors du criblage pharmacologique (Fig. 32C).

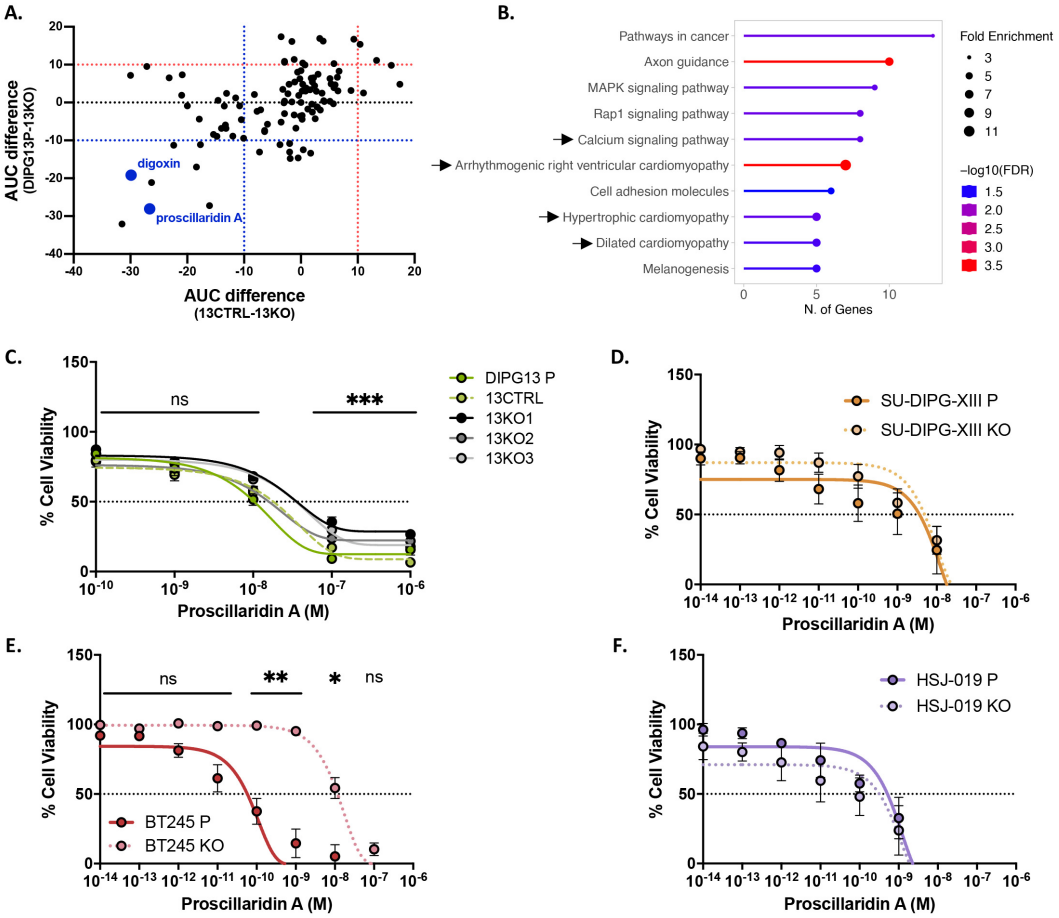


Figure 32. Validation de l'impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la réponse à la proscillaridine A. A. Graphique représentant les différences d'aire sous la courbe (AUC) entre le clone 13CTRL et les clones KO (AUC moyenne) en abscisse et entre les cellules parentales (DIPG13 P) et les clones KO en ordonnées pour chacun des 108 composés de notre criblage pharmacologique. Les lignes en pointillés bleus représentent le seuil (différence d'AUC inférieure ou égale à -10) en-deçà duquel l'efficacité des composés était considérée comme exacerbée dans nos conditions mutées H3.3 K27M (sensibilités associées à H3.3 K27M) et celles en pointillés rouges, le seuil (différence d'AUC supérieure ou égale à 10) au-delà duquel l'efficacité des composés était considérée comme réduite dans nos conditions mutées H3.3 K27M (résistances associées à H3.3 K27M). Les glycosides cardiaques du panel étaient indiqués en bleu. **B.** Analyse fonctionnelle d'enrichissement effectuée à partir des 194 gènes surexprimés avec l'oncohistone H3.3 K27M dans nos modèles DIPG13 P et 13CTRL *vs.* 13KO1, 13KO2 et 13KO3. Cette analyse était réalisée à l'aide de la banque de données *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)*. **C.** Test de cytotoxicité de la proscillaridin A sur les modèles cellulaires dérivés de la lignée HSJD-DIPG-013 avec une gamme de doses allant de 0.1 nM à 1 µM. Les résultats présentés sont issus de six expériences indépendantes, les barres d'erreur représentent la *standard error of the mean* (SEM) et l'analyse statistique était effectuée par l'application d'un test *two-way ANOVA* (ns, P > 0,05 ; ***, P<0.001). **D-F.** Test de cytotoxicité de la proscillaridine A avec une gamme de concentration allant de 0.01 pM à 1 µM sur les cellules SU-DIPG-XIII et leur clone KO (D.), les cellules BT245 et leur clone KO associé (E.), les cellules HSJ-019 et leur clone KO associé (F.). Les résultats présentés sont issus de six expériences indépendantes, les barres d'erreur représentent la *standard error of the mean* (SEM) et l'analyse statistique était effectuée par l'application d'un test *two-way ANOVA* (ns, P > 0,05 ; *, P < 0.05 ; **, P<0.01).

Nous confirmions la sensibilité exacerbée à la proscillaridine A des cellules DIPG13 P et 13CTRL par rapport à nos trois clones 13KO. Toutefois, comme pour le prexasertib, lors de nos tests de cytotoxicité de validation, la différence observée apparaissait amoindrie par rapport aux résultats du crible. En parallèle, nous avons évalué la réponse à la proscillaridine A dans

les lignées SU-DIPG-XIII, BT245, HSJ-019 et leurs clones KO associés (Fig. 32C-F). Dans les lignées cellulaires SU-DIPG-XIII et HSJ-019, l'invalidation de l'oncohistone ne modifiait pas la réponse à la proscillaridine A (Fig. 32D et F). À contrario, dans la lignée BT245, nous constations un écart de plus de 2 log entre l'IC_{50} des cellules parentales et des cellules KO (Fig. 32E). En effet, l'invalidation de l'oncohistone réduisait drastiquement l'efficacité de la proscillaridine A dans cette lignée, de manière cohérente avec ce que nous observions dans la lignée HSJD-DIPG-013.

Dans l'ensemble, ces résultats montraient une toxicité importante de la proscillaridine A sur les cellules de DMG *in vitro*, avec des IC_{50} globalement comprises entre 0.1 et 10 nM pour nos lignées parentales. De manière intéressante, dans deux de nos quatre lignées cellulaires de DMG (HSJD-DIPG-013 et BT245), l'oncohistone H3.3 K27M était associée à une sensibilité exacerbée à la proscillaridine A. Ces données pharmacologiques, suggérant l'impact de la mutation H3.3 K27M sur la réponse aux glycosides cardiaques, étaient, de plus, supportées par des enrichissements en acteurs impliqués dans certaines cardiomyopathies parmi les gènes surexprimés avec l'oncohistone.

III.3.1.4. Impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la réponse des cellules de DMG à l'ONC201

Du fait des récents résultats de l'ONC201 en clinique (*Cf.* Fig. 17B) et dans la continuité des travaux menés avec nos modèles d'induction (*Cf.* chapitre 1, partie I.3.2.), nous avons poursuivi nos investigations concernant l'impact putatif de l'oncohistone sur la réponse des cellules de DMG à l'ONC201 (Fig. 33).

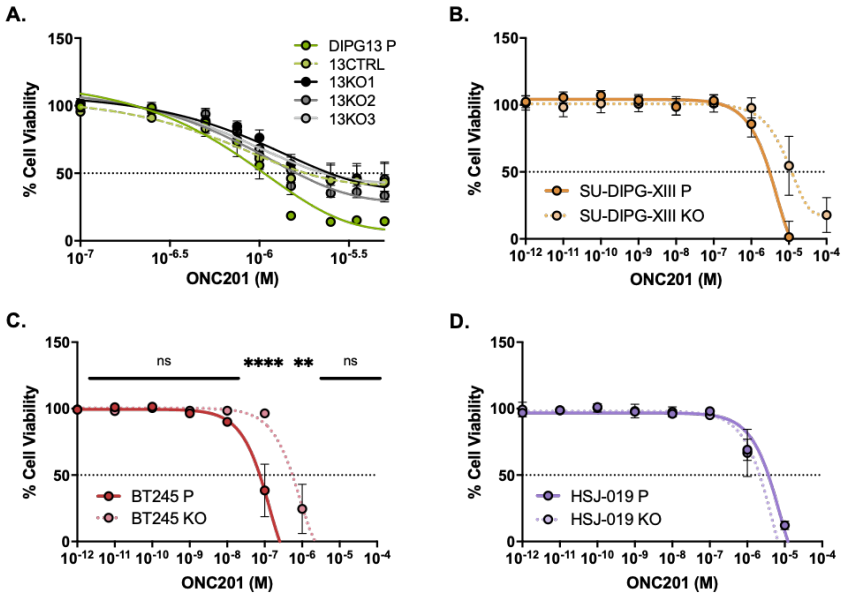


Figure 33. Impact de la mutation H3.3 K27M sur la réponse des cellules de DMG à l'ONC201. A. Test de cytotoxicité de l'ONC201 sur les modèles cellulaires dérivés de la lignée HSJD-DIPG-013 avec une gamme de

doses allant de 0.1 µM à 5 µM. Les résultats sont issus de six expériences indépendantes et les barres d'erreur représentent la *standard error of the mean* (SEM). **B.** Test de cytotoxicité de l'ONC201 avec une gamme de concentration allant de 1 pM à 100 µM sur les cellules SU-DIPG-XIII et leur clone KO. Les résultats sont issus de quatre expériences indépendantes et les barres d'erreur représentent la *standard error of the mean* (SEM). **C.** Test de cytotoxicité de l'ONC201 avec une gamme de concentration allant de 1 pM à 100 µM sur les cellules BT245 et leur clone KO associé. Les résultats sont issus de 5 expériences indépendantes, les barres d'erreur représentent la *standard error of the mean* (SEM) et l'analyse statistique était effectuée par l'application d'un test *two-way ANOVA* (ns, P > 0,05 ; *, P < 0.05 ; **, P<0.01 ; ***, P<0.001 ; ****, P<0.0001). **D.** Test de cytotoxicité de l'ONC201 avec une gamme de concentration allant de 1 pM à 100 µM sur les cellules HSJ-019 et leur clone KO associé. Les résultats présentés sont issus de six expériences indépendantes, les barres d'erreur représentent la *standard error of the mean* (SEM).

Lors de notre criblage pharmacologique, nous ne constations pas de clusterisation de la réponse à l'ONC201 en fonction de l'oncohistone dans nos modèles de la lignée HSJD-DIPG-013 (Fig. 30C). Or, lors de tests de cytotoxicité complémentaires, les cellules DIPG13 P présentaient une sensibilité exacerbée à l'ONC201, alors que le profil de réponse du clone 13CTRL apparaissait similaire à celui des clones 13KO (Fig. 33A). Face aux différences de résultats obtenus entre nos modèles mutés H3.3 K27M de la lignée HSJD-DIPG-013, nous avons évalué la réponse à l'ONC201 des lignées cellulaires SU-DIPG-XIII, BT245, HSJ-019 et de leurs clones KO-H3.3 K27M respectifs (Fig. 33B-D). De manière intéressante, dans les lignées cellulaires SU-DIPG-XIII et BT245, l'invalidation de l'oncohistone diminuait l'efficacité de l'ONC201 (Fig. 33B et C). Ces résultats corroboraient la tendance obtenue entre les cellules DIPG13 P et les clones 13KO. Cependant, la sensibilité exacerbée associée à la mutation H3.3 K27M n'était pas retrouvée dans la lignée HSJ-019 (Fig. 33D).

Dans l'ensemble, ces résultats montraient une efficacité de l'ONC201 plus importante en présence de l'oncohistone dans certaines lignées cellulaires de DMG. Toutefois, les altérations H3 K27 ne semblaient pas constituer le principal déterminant de la réponse à l'ONC201. En effet, malgré l'invalidation de H3.3 K27M (toutes lignées confondues), l'ONC201 conservait une efficacité importante sur les cellules de DMG *in vitro*.

III.3.2. Étude préliminaire de l'impact radiobiologique de l'oncohistone H3.3 K27M dans les cellules de DMG

À ce jour, la radiothérapie demeure l'unique traitement de référence des DMG altérés H3 K27 (El-Khouly et al., 2019). Dans ce contexte, l'évaluation de l'impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la radiobiologie des cellules de DMG constituait un des principaux sujets de ma thèse. À cet égard, dans la continuité des travaux menés dans nos modèles induits pour la mutation H3.3 K27M, nous avons évalué le profil de réponse à la radiothérapie de nos modèles invalidés pour l'oncohistone. Nos cellules de DMG étant cultivées en suspension, nous avons opté pour la réalisation de tests de clonogénicité post-irradiation en conditions semi-solides dans de l'agar mou. Nous avons tout d'abord soumis nos différents modèles de la lignée HSJD-

DIPG-013 à un protocole de radiothérapie monodose, avec des doses allant de 0 à 5Gy (Fig. 34A).

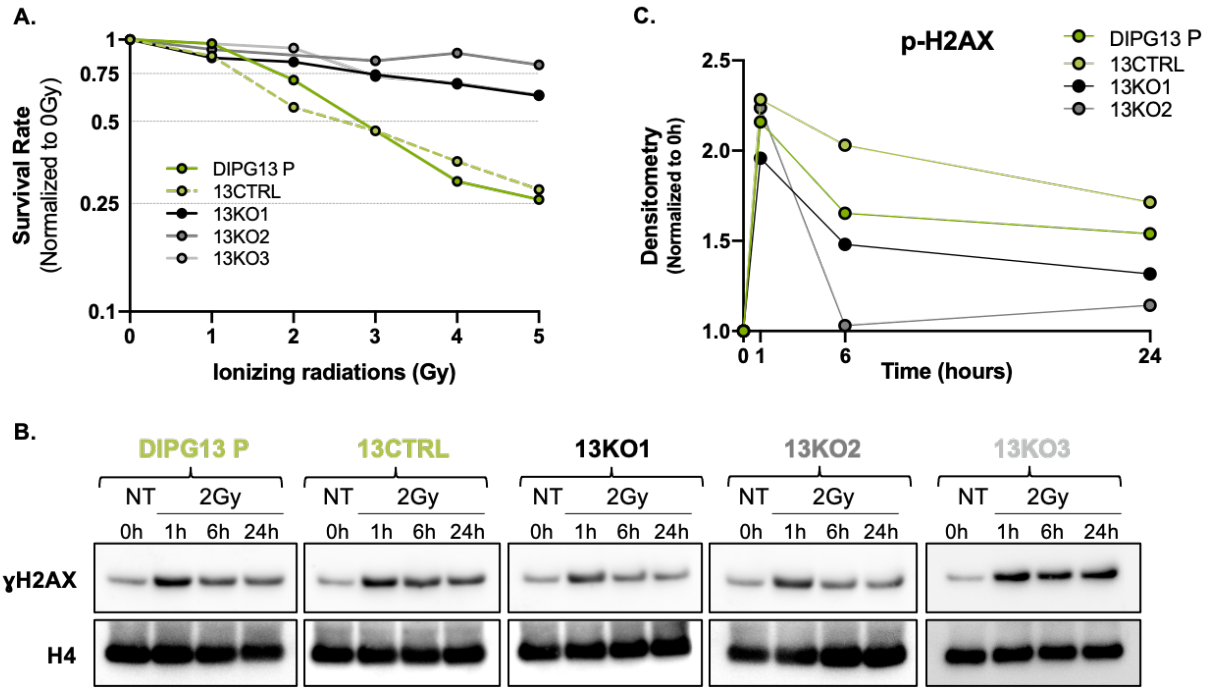


Figure 34. Étude préliminaire de l'impact radiobiologique de l'oncohistone H3.3 K27M. A. Courbes de fraction de survie post-irradiation (schéma monodose) obtenues par test de clonogénicité sur nos modèles de la lignée cellulaire HSJD-DIPG-013. Les cellules étaient irradiées aux doses indiquées puis les colonies formées étaient révélées et dénombrées 20 jours post-irradiation. Les résultats présentés sont issus d'une seule expérience préliminaire. **B.** Western blot dirigé contre la forme phosphorylée (Ser139) de l'histone H2AX après irradiation des cellules DIPG13 P, 13CTRL et des trois clones KO à une dose de 2Gy et à différents temps post-irradiation (0h, 1h, 5h et 24h). L'histone H4 était utilisée comme témoin d'équicharge. **C.** Densitométrie de l'analyse par western blot dirigée contre la forme phosphorylée (Ser139) de l'histone H2AX après irradiation des cellules DIPG13 P, 13CTRL et des 3 clones KO à une dose de 2Gy et à différents temps post-irradiation (0h, 1h, 6h et 24h). Les résultats étaient normalisés sur la condition non irradiée (0h) pour chacune des conditions. Le résultat présenté est issu de deux expériences indépendantes.

De manière surprenante, à l'inverse de ce que nous observions préalablement dans nos modèles induits pour la mutation H3.3 K27M, cette première expérience préliminaire semblait indiquer une radiosensibilité exacerbée associée à l'oncohistone. Toutefois, la confirmation de cette tendance intéressante a été compromise par des limites d'ordre technique. En effet, le test de clonogénicité en agar n'apparaissait pas optimal pour évaluer la radiosensibilité de nos modèles cellulaires dérivés de la lignée HSJD-DIPG-013. Même en conditions non irradiées, les cellules HSJD-DIPG-013 présentaient de fortes difficultés à croître dans l'agar, se manifestant par l'absence de colonies à 14 jours post-ensemencement et l'émergence de rares colonies à 21 jours post ensemencement (ayant permis d'obtenir les résultats présentés en Fig. 34A). Ainsi, ces premiers résultats nécessiteront d'être reproduits puis confirmés par optimisation, en cours, de notre protocole de test de clonogénicité en agar et/ou par d'autres modalités (*Cf.* encadré « à noter » ci-après).

D'un point de vue plus mécanistique, la réparation des dommages à l'ADN figure parmi les principaux mécanismes moléculaires régissant la réponse à la radiothérapie (Rakotomalala et al., 2021b en annexe). À ce jour, bien que certaines études aient suggéré que les oncohistones H3 K27M perturbaient la mise en place du mécanisme de réparation des cassures double brin par *non-homologous end-joining* (NHEJ) dans différents modèles, l'impact de la mutation H3.3 K27M sur l'efficacité de réparation des dommages à l'ADN radio-induits dans des cellules de DMG demeure méconnu. Dans ce contexte, nous avons initié l'étude comparative de l'efficacité de réparation des dommages à l'ADN, en particulier des cassures double brin, générés par la radiothérapie entre nos différents modèles cellulaires de la lignée HSJD-DIPG-013. À cet égard, nous avons mesuré le niveau de phosphorylation de l'histone H2AX sur la serine 139 (ɣH2AX) par western blot, selon une cinétique (0h, 1h, 6h, 24h) post-irradiation (2Gy), pour l'ensemble de nos modèles HSJD-DIPG-013 (Fig. 34B). Un pic de ɣH2AX était observé une heure post-irradiation pour l'ensemble des modèles, suggérant une reconnaissance efficace des cassures double brin induites par la radiothérapie, en présence comme en l'absence de l'oncohistone. Néanmoins, la cinétique d'extinction du signal ɣH2AX, reflétant la résolution des cassures, semblait différente entre nos modèles. En effet, à 6h et 24h post-irradiation, les clones 13KO1 et 13KO2 présentaient des niveaux de phosphorylation de H2AX (ser139) plus proches de leurs niveaux de base respectifs (retour au niveau basal dès 6h pour 13KO2) par rapport aux modèles mutés (DIPG13 P et 13CTRL), pour lesquels le niveau de phosphorylation de H2AX (ser139) restait plus de 1.5 fois supérieur au niveau basal jusque 24h post-irradiation (Fig. 34C). Notons que, de nouveau, le clone 13KO3 présentait un profil très différent des autres conditions, avec un maintien du pic de phosphorylation de H2AX (ser139) jusque 24h post-irradiation (Fig. 34B). Globalement, nous constations une clusterisation insuffisante au sein de nos modèles mutés et invalidés pour la mutation. Ainsi, malgré une tendance potentiellement intéressante, suggérant une altération de l'efficacité de réparation des cassures double brin induites par la radiothérapie dans nos conditions mutées H3.3 K27M par rapport aux clones 13KO1 et 13KO2, ces expériences demandent à être reproduites afin de valider ces résultats.

À noter – Développement d'un test de clonogénicité en microchambres de PDMS

Nous avons entrepris le développement d'une nouvelle modalité de test clonogénicité adaptée à l'étude de la réponse à la radiothérapie de nos modèles cellulaires de DMG (et plus largement aux lignées cellulaires cultivées en suspension). Cette modalité repose sur l'utilisation de supports en polydiméthylsiloxane (PDMS) produits à l'aide de moules en silicium fabriqués à façon en collaboration avec les Dr. Cagatay Tarhan et Faruk Azam Shaik (Smmil-e project) (Fig. 35A). Ces supports de PDMS nous permettent de compartimenter des puits en microchambres hexagonales (250µm) au nombre de 1500 ± 10 par puits (en plaques 24 puits). Après production de ces supports, nous avons entamé la mise au point de divers paramètres du protocole tels que les densités d'ensemencement ou encore les modalités de *read-out* (méthode et temporalité) sur un panel de 8 lignées cellulaires de DMG (*i.e.* HSJD-DIPG-007, -011, -012, -013, -014, SU-DIPG-XIII, BT245 et HSJ-019). Forts de ces mises au point,

nous avons réalisé des premiers tests de réponse aux radiations ionisantes avec les cellules HSJD-DIPG-007, capables de former des colonies dans les deux modalités (Fig. 35B et C). Avec ces cellules, nous observions un effet-dose avec un profil proche de celui obtenu avec la méthode de référence en agar, confortant ainsi la pertinence de notre protocole (Fig. 35C). Néanmoins, la radiosensibilité des cellules HSJD-DIPG-007 en microchambres de PDMS apparaissait atténuée par rapport à celle observée en agar. Cette différence pourrait être liée au stress mécanique et à la restriction de la diffusion des facteurs solubles imposés par l'agar. Nous avons également évalué l'effet d'un composé radiosensibilisant (AZD1390, inhibiteur de la kinase ATM) sur le profil de réponse des cellules HSJD-DIPG-007 dans les deux modalités (Fig. 35C). Dans les deux cas, nous observions une radiosensibilisation des cellules HSJD-DIPG-007, bien que plus modeste lors de nos expériences en microchambres de PDMS. Nous poursuivons actuellement nos mises au point sur les autres lignées cellulaires de DMG, notamment les modèles HSJD-DIPG-013.

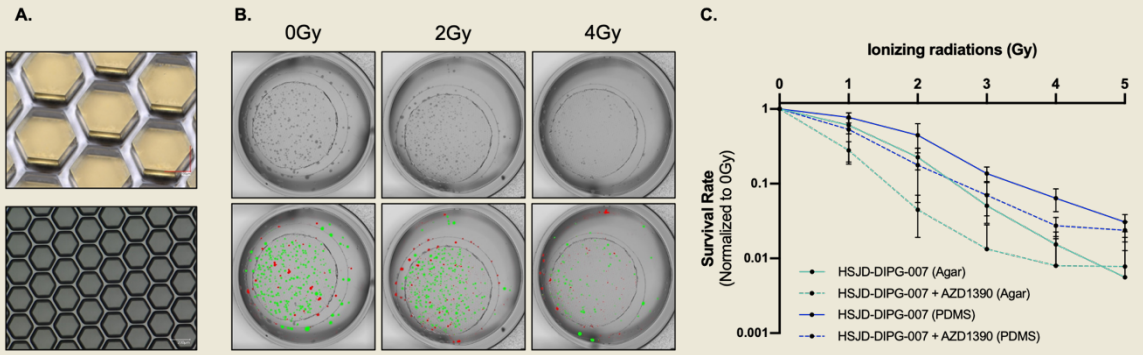


Figure 35. Développement d'une nouvelle modalité d'étude de la réponse aux radiations ionisantes pour cellules cultivées en suspension. A. Moule en silicium permettant la fabrication de microchambres (250µm) hexagonales en polydiméthylsiloxane (PDMS) adaptées pour une utilisation en plaques 24 puits. **B.** Test de clonogénicité post-irradiations en supports PDMS avec la lignée HSJD-DIPG-007. Les images étaient prises 14 jours après irradiation à l'aide d'un scanner de plaque de type Cell$_3$imager (Screen) sans nécessité de marquage préalable (partie supérieure) et les gliosphères formées étaient dénombrées à l'aide du module d'analyse associé au scanner (partie inférieure). Les objets en vert étaient comptabilisés comme colonies alors que les objets en rouge étaient exclus **C.** Détermination de courbes de fractions de survie post-irradiation (0-5Gy) par test de clonogénicité en agar (courbes turquoises) *vs.* en microchambres de PDMS (courbes bleues) sur les cellules HSJD-DIPG-007, avec (courbes en pointillés) ou sans (courbes pleines) AZD1390 (10 nM), visant à comparer les profils de radiosensibilité obtenus par ces 2 modalités. Les résultats présentés sont issus de quatre expériences indépendantes et les barres d'erreurs représentent les écarts-types obtenus.

III.4. Discussion

Depuis sa découverte en 2012, de nombreuses études se sont intéressées au rôle de l'oncohistone H3.3 K27M au cours de la tumorigenèse des DMG. Toutefois, outre le maintien de capacités d'auto-renouvellement, les impacts biologiques associés à ce blocage de la différenciation demeurent peu documentés. Il a été décrit dans de nombreux modèles cancéreux que le compartiment tumoral peu différencié présente des capacités de résistance aux thérapies anti-cancéreuses exacerbées (Diehn et al., 2009; Lytle et al., 2018). Or, le modèle cellulaire hiérarchique des DMG est constitué d'une majorité de cellules tumorales de type *OPC-like*, au caractère souche, notamment du fait du blocage de la différenciation imposé par

les oncohistones H3 K27M (ou la surexpression d'EZHIP) (Filbin et al., 2018; Harpaz et al., 2022).

D'un point de vue clinique, les DMG altérés H3 K27, inéligibles à une exérèse chirurgicale complète, apparaissent, de surcroît, peu répondeurs à la grande majorité des chimiothérapies cytotoxiques et thérapies ciblées évaluées en essais cliniques jusqu'alors (Grill et al., 2023; Hargrave et al., 2006). De fait, la radiothérapie constitue l'unique modalité de traitement de référence pour la prise en charge des DMG. Néanmoins, bien que conférant dans certains cas un soulagement transitoire des symptômes, des phénomènes de radiorésistance supportent systématiquement la (re)progression tumorale (Kim and Suh, 2023). Ces données soulevaient la question de l'impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur le phénotype résistant et, plus largement, la réponse aux thérapies des DMG.

Dans ce contexte, nos modèles cellulaires isogéniques constituaient de bons outils pour imputer à la mutation H3.3 K27M son impact sur la réponse aux thérapies, en découplant ses effets propres de ceux associés aux autres altérations, telles que les mutations de *TP53*. En effet, les mutations de *TP53*, qui co-ségrégent en particulier avec la mutation H3.3 K27M, ont été identifiées comme des *drivers* de la résistance des cellules de DMG à la radiothérapie et à l'ONC201 (Jackson et al., 2023; Werbrouck et al., 2019).

III.4.1. Évaluation de l'impact de l'oncohistone sur le profil de réponse aux drogues par criblage pharmacologique

Dans cette optique, nous sommes partis d'une approche globale par criblage pharmacologique. Ce type d'approche a déjà été utilisée par plusieurs études sur diverses lignées cellulaires de DMG dans le but d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques (Grasso et al., 2015; Lin et al., 2019; Carvalho et al., 2020; Zhang et al., 2022). Ces criblages pharmacologiques sont notamment à l'origine de l'identification de l'efficacité du panobinostat et de sa combinaison avec le marizomib, actuellement en essai clinique de phase I (NCT04341311) dans le DMG (Grasso et al., 2015; Lin et al., 2019). D'autre part, Carvalho et collaborateurs (*preprint*) ont identifié des dépendances associées aux différentes altérations génomiques récurrentes des pHGG sustentoriels et DMG par criblage pharmacologique (Carvalho et al., 2020).

Pour notre étude, le criblage était effectué sur un panel ciblé de 108 composés, représentatifs des différentes familles de molécules anti-cancéreuses (incluant des chimiothérapies cytotoxiques, des thérapies ciblées, des épidrogues) et incluant également des molécules présentant un intérêt potentiel pour le repositionnement pharmacologique en cancérologie (e.g. antihelminthiques, statines, β-bloquants). Au travers de ce criblage exploratoire, notre objectif principal était d'avoir une vue d'ensemble sur les résistances et dépendances associées à l'oncohistone. Ainsi, parmi ces composés, certains avaient précédemment échoué à améliorer la survie des patients atteints de DMG, seuls ou en

combinaisons, lors d'essais cliniques passés (*e.g.* SN38, vincristine, erlotinib, everolimus) (Grill et al., 2023; Hargrave et al., 2006) alors que d'autres sont actuellement en essais cliniques dans le DMG (*e.g.* panobinostat, ONC201) (Lin et al., 2019; Venneti et al., 2023).

D'un point de vue général, lors de notre criblage, l'IC_{50} était atteinte pour presque 70% des molécules testées dans la lignée parentale HSJD-DIPG-013 (DIPG13 P), y compris pour certaines chimiothérapies cytotoxiques et thérapies ciblées ayant échoué à améliorer la survie des patients lors d'essais cliniques passés (*e.g.* SN38, everolimus). Ces observations ne supportaient pas l'hypothèse d'une chimiorésistance intrinsèque aux cellules de DMG *in vitro*, d'autant que la lignée cellulaire HSJD-DIPG-013 présentait le profil moléculaire associé au pronostic le plus péjoratif en clinique (H3.3 K27M et TP53 muté) (Werbrouck et al., 2019). Ces résultats apparaissaient cohérents avec l'étude de Veringa et collaborateurs réalisée sur un panel de cultures primaires de pHGG et DIPG, pour lesquels une IC_{50} était atteinte pour 50% des composés testés (Veringa et al., 2013). Il était tout de même à noter que parmi les drogues pour lesquelles l'IC_{50} n'était pas atteinte dans notre étude (même jusqu'à une dose de 100 µM pour certaines), figuraient plus de 40% des chimiothérapies cytotoxiques du panel (*e.g.* gemcitabine, topotecan, etoposide).

Lors de la comparaison des données de criblage entre nos conditions, nous observions une clusterisation de réponse au sein des modèles mutés (H3.3 K27M) et des modèles KO-H3.3 K27M pour une majorité des composés. En ce sens, seuls 14 composés présentaient une efficacité différentielle entre les conditions DIPG13 P et 13CTRL, avec des différences d'AUC globalement faibles, alors que nous identifions une efficacité différentielle pour 33 et 28 des composés lors de la comparaison des conditions 13CTRL *vs.* 13KO et DIPG13 P vs. 13KO, respectivement. Globalement, la mutation H3.3 K27M engendrait plus de dépendances, associées à des vulnérabilités thérapeutiques *in vitro*, que de résistances. Ainsi, ces résultats ne montraient pas de phénotype globalement chimiorésistant imputable à l'oncohistone *in vitro*. Néanmoins, nous ne pouvons exclure l'existence potentielle de mécanismes de résistance impliquant la mutation H3.3 K27M associés au microenvironnement tumoral, comme précédemment suggéré dans l'étude de Huchedé *et al.* avec nos modèles d'induction (Huchedé et al., 2023). De même, certaines vulnérabilités thérapeutiques pourraient nécessiter certains facteurs du microenvironnement pour être révélées. Nos précédents résultats concernant l'impact de l'oncohistone sur le métabolisme lipidique des cellules de DMG appuient cette hypothèse.

III.4.2. Profil de réponse aux épidrogues en lien avec les altérations épigénétiques inhérentes à l'oncohistone H3.3 K27M

De manière cohérente avec la hausse de H3K27ac inhérente à la mutation H3.3 K27M, nous identifions une sensibilité exacerbée aux inhibiteurs pan-BET associée à l'oncohistone, comme précédemment décrit dans la littérature (Piunti et al., 2017). Cette sensibilité

exacerbée aux inhibiteurs pan-BET (notamment JQ1 et birabresib) avait également été observée avec l'induction de la mutation H3.3 K27M dans la lignée Res259 (Rakotomalala et al., 2021a). D'autre part, en accord avec les effets oncogéniques de l'hyperméthylation des sites de nucléation de PRC2 induits par la mutation H3.3 K27M, le GSK-126, inhibiteur d'EZH2, présentait une efficacité exacerbée en présence de l'oncohistone, en particulier dans le clone 13CTRL.

À l'inverse, bien que l'activité des KDM6A/B, soutenue par les remaniements métaboliques associés à la mutation H3.3 K27M (*Cf.* Fig. 8), ait été associée au maintien de la perte globale de H3K27me3 caractéristique des DMG altérés H3 K27 (Chung et al., 2020; Hashizume et al., 2014), de manière surprenante, le GSK-J4 (inhibiteur des KDM6A/B) présentait une efficacité réduite en présence de l'oncohistone dans nos modèles.

III.4.3. Impact de l'oncohistone sur la réponse aux inhibiteurs de la voie des MAPK

Dans les DMG, plusieurs études ont montré que la mutation H3.3 K27M gouvernait l'activation des voies de signalisation des MAPK et JAK/STAT, se traduisant par des dépendances et vulnérabilités thérapeutiques associées à l'oncohistone (Koncar et al., 2019; Pajovic et al., 2020; Zhang et al., 2022). En ce sens, parmi les gènes surexprimés avec la mutation H3.3 K27M dans nos modèles cellulaires de la lignée HSJD-DIPG-013, nous retrouvions un enrichissement en gènes associés à la voie des MAPK. De surcroit, lors de notre étude sur nos modèles induits pour la mutation H3.3 K27M, cette dernière était associée à une forte augmentation de la sensibilité au trametinib (inhibiteur de MEK) dans la lignée cellulaire de pLGG (Res259). La librairie de composés utilisée pour notre criblage pharmacologique sur nos modèles invalidés pour H3.3 K27M ne contenait pas d'inhibiteur de la voie JAK/STAT mais plusieurs inhibiteurs de la voie des MAPK (*e.g.* doramapimod, trametinib, selumetinib). De manière surprenante, aucun de ces inhibiteurs de la voie de signalisation des MAPK ne présentait de différentiel d'efficacité en fonction de l'oncohistone dans la lignée HSJD-DIPG-013. Toutefois, Koncar et collaborateurs ont montré que l'activation de la voie MAPK concernait principalement la cascade impliquant MEK5 et ERK5 (Koncar et al., 2019). Or, dans notre panel de composés, les inhibiteurs de la voie MAPK ciblaient plus particulièrement MEK1/2 (*i.e.* trametinib, selumetinib, mirdametinib) et p38 MAPK (*i.e.* doramapimod, ralimetinib). Par ailleurs, les différences observées quant à l'impact de l'oncohistone entre nos modèles induits (dans la lignée Res259) et invalidés (dans la lignée HSJD-DIPG-013) concernant la réponse au trametinib pourraient être liées à une activation de la voie des MAPK passant par des intermédiaires de signalisation préférentiels distincts en fonction du type cellulaire.

III.4.4. Identification d'une dépendance à la kinase CHK1 associée à l'oncohistone H3.3 K27M

Lors de notre criblage, le prexasertib, un inhibiteur compétitif de l'ATP sélectif de la kinase CHK1, ressortait comme la molécule dont l'efficacité était la plus impactée par la mutation H3.3 K27M. En effet, la présence de l'oncohistone était associée à une sensibilité exacerbée au prexasertib, indiquant une dépendance à la kinase CHK1, acteur central de la mise en place des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN (Goudelock et al., 2003; Sørensen et al., 2005; Zhang and Hunter, 2014). Dans nos cellules de DMG, l'efficacité *in vitro* du prexasertib en monothérapie suggérait un recours à la kinase CHK1 du fait de dommages à l'ADN probablement liés au stress réplicatif. En ce sens, lors de nos expériences de validation, nous observions que la réponse au prexasertib de nos modèles de la lignée HSJD-DIPG-013 corrélait avec leur profil de croissance cellulaire. En effet, les cellules parentales DIPG13 P, présentant la croissance cellulaire la plus rapide, étaient les plus sensibles. Les cellules 13CTRL présentaient un profil de réponse intermédiaire entre les cellules DIPG13 P et les clones 13KO1 et 13KO2, tout comme pour leur croissance cellulaire. De plus, les cellules 13KO3, dont l'inhibition de la croissance cellulaire était la plus exacerbée, présentait le profil le moins sensible au prexasertib (Fig. 23A et 31B). Cette corrélation permettait également d'expliquer l'absence d'effet de la mutation H3.3 K27M sur la sensibilité au prexasertib de la lignée BT245, dont le clone KO présente une croissance cellulaire très proche de la lignée parentale en culture. De manière cohérente avec cette hypothèse, l'inhibition de la croissance cellulaire associée à l'invalidation de l'oncohistone était observée dans les lignées SU-DIPG-XIII et HSJ-019. Ainsi, ces observations questionnaient l'existence d'un réel fondement mécanistique à ce différentiel de sensibilité au prexasertib associé à l'oncohistone, ou d'une simple conséquence de son impact sur la croissance cellulaire. Toutefois, dans des modèles cellulaires induits pour la mutation H3.1 K27M, Zhang et collaborateurs ont montré une interaction entre H3.1 K27M et CHK1, associée à une altération la mise en place du mécanisme NHEJ post-irradiation (Zhang et al., 2018). De plus, bien que très préliminaires, nos premiers résultats de cinétique de γH2AX post-irradiation suggéraient une potentielle altération de la réparation des cassures double brin de l'ADN radio-induites associée à l'oncohistone. Dans ce contexte, des expériences visant à comparer l'efficacité du prexasertib combiné à la radiothérapie sont en cours dans nos différents modèles. Un différentiel de radio-sensibilisation associée au prexasertib entre nos conditions H3.3 K27M et KO nous informerait sur une potentielle dépendance à la kinase CHK1 associée à l'oncohistone pour la réparation des dommages à l'ADN radio-induits. Dans l'étude de Werbrouck et collaborateurs, le ciblage de la kinase CHK1 avec le prexasertib était associé à une radio-sensibilisation spécifique des cellules de DMG mutées TP53, associée à la transgression des checkpoints (G1/S, intra-S et G2/M) du cycle cellulaire même en présence de dommages à l'ADN (Werbrouck et al., 2019). Nos modèles isogéniques d'invalidation de la

mutation H3.3 K27M nous permettront d'étudier un potentiel effet radiosensibilisant du prexasertib associé à l'oncohistone, dans des contextes cellulaires mutés TP53 (HSJD-DIPG-013, SU-DIPG-XIII, BT245) comme $TP53^{WT}$ (HSJ-019). Par ailleurs, notre panel de composés comprenait également un inhibiteur de la kinase ATR (le berzosertib), senseur des dommages à l'ADN (*e.g.* fourche de réplication bloquées, cassures double-brin), activatrice de CHK1. Néanmoins, nous ne constations pas de différence de réponse au berzosertib associé à la mutation H3.3 K27M dans nos modèles de la lignée HSJD-DIPG-013. Ces résultats apparaissent surprenants car peu de mécanismes alternatifs d'activation de CHK1 ont été décrits à ce jour (Goto et al., 2015).

III.4.5. Identification d'une sensibilité aux glycosides cardiaques associée à l'oncohistone H3.3 K27M

Outre les composés anti-cancéreux (chimiothérapies cytotoxiques et thérapies ciblées), notre panel de composés comprenait également des molécules d'intérêt pour le repositionnement pharmacologique. Parmi ces molécules, la proscillaridine A et la digoxine, deux glycosides cardiaques inhibiteurs de la pompe sodium/potassium ATPase (pompe Na^+/K^+-ATPase), étaient les composés présentant l'efficacité la plus exacerbée avec l'oncohistone derrière le prexasertib. Cet impact différentiel en fonction de l'oncohistone validé pour ces deux molécules de la même famille (données non montrées pour la digoxine) renforçait notre intérêt pour les mécanismes associés. Les glycosides cardiaques sont utilisés en clinique depuis plus de 200 ans pour les insuffisances et certaines arythmies cardiaques. En effet, l'inhibition de la pompe Na^+/K^+-ATPase engendre une accumulation du calcium intra-cellulaire, favorisant la contraction des cardiomyocytes (Prassas and Diamandis, 2008). De manière intéressante, les gènes surexprimés avec la mutation H3.3 K27M dans nos cellules de DMG étaient enrichis en gènes associés à certaines cardiomyopathies et à la signalisation calcique, suggérant que cette sensibilité exacerbée en présence de l'oncohistone était probablement liée, au moins en partie, à l'impact *on-target* des glycosides cardiaques sur la pompe Na^+/K^+-ATPase. Dans nos données protéomiques, la sous-unité catalytique α_3 et les isoformes β_1 et β_2 de la sous-unité β de la pompe Na^+/K^+-ATPase apparaissaient sous-exprimées en présence de la mutation H3.3 K27M. Forts de ces résultats, en collaboration avec le Dr. Loïc Lemonnier (Inserm U1003, Université de Lille), nous avons entrepris des analyses comparatives du taux de calcium cellulaire basal et après stimulation (à l'acétylcholine dans un premier temps) de nos modèles cellulaires de DMG (mutés H3.3 K27M *vs.* KO), avec ou sans traitement à la proscillaridine A. Ces expériences sont actuellement en cours.

Par ailleurs, divers mécanismes potentiellement responsables de l'efficacité des glycosides cardiaques en cancérologie ont été décrits. Au regard des impacts connus de la mutation H3.3 K27M, certains présentent un intérêt particulier. À ce titre, dans des cellules

de leucémie lymphoblastique aigue, la proscillaridine A induisait une différenciation en favorisant la dégradation de MYC et en induisant une perte globale de l'acétylation des histones 3 (incluant H3K27ac) (Da Costa et al., 2019). Comme précédemment discuté, la mutation H3.3 K27M induit une hausse globale des marques H3K27ac et une stabilisation de MYC dans les cellules de DMG (Lewis et al., 2013; Koncar et al., 2019; Pajovic et al., 2020). Dans ce contexte, la proscillaridine A pourrait reverser l'impact de l'oncohistone sur les marques H3K27ac et empêcher la mise en place des programmes transcriptomiques associés à MYC. Des premiers résultats préliminaires semble montrer une réversion des altérations épigénétiques inhérentes à l'oncohistone concernant les marques des résidus lysine 27 des histone 3 avec le traitement à la proscillaridine A dans les cellules DIPG13 P. Une autre étude a également montré que les glycosides cardiaques diminuaient le niveau de STAT3 (et sa phosphorylation) dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (*e.g.* HeLa, A549) (Du et al., 2021). Or, dans les cellules de DMG, Zhang et collaborateurs ont montré que la mutation H3.3 K27M induisait une activation de STAT3 (Zhang et al., 2022). Par ailleurs, des études ont également décrit des perturbations des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN induites par les glycosides cardiaques, notamment une perturbation de l'activation de CHK1, de manière intéressante au regard de l'efficacité différentielle observée pour le prexasertib dans nos cellules de DMG en fonction de l'oncohistone (Ainembabazi et al., 2023). Ainsi, l'effet pléiotrope de la proscillaridine A pourrait expliquer son efficacité exacerbée dans un contexte muté H3.3 K27M. Toutefois, la sensibilité exacerbée à la proscillaridine A associée à l'oncohistone n'était retrouvée que dans deux (HSJD-DIPG-013 et BT245) des quatre lignées cellulaires de DMG utilisées et nous ne constations pas de corrélation entre la présence d'altérations génomiques spécifiques et la sensibilité aux glycosides cardiaques associée à l'oncohistone. Il est intéressant de noter que nous n'observions pas de cytotoxicité de la proscillaridine A (même gamme de concentrations) sur une lignée cellulaire d'astrocytes sains immortalisés.

Ces résultats concernant les glycosides cardiaque pourraient indiquer un impact original de la mutation H3.3 K27M sur l'homéostasie et/ou la signalisation ionique. Outre nos expériences *in vitro*, ces potentiels changements de l'homéostasie et de la signalisation ionique pourraient laisser entrevoir un rôle de l'oncohistone dans la réponse aux neurotransmetteurs et la dépolarisation membranaire des cellules de DMG incluses dans le réseau neuronal par des synapses de type neurone-gliome, décrites dans les DMG par l'équipe du Pr. Michelle Monje et favorisant la croissance tumorale (Venkatesh et al., 2019; Taylor et al., 2023). En ce sens, dans nos données transcriptomiques, différents canaux potassiques dépendant du voltage apparaissaient différentiellement exprimés avec la mutation H3.3 K27M.

III.4.6. Impact de l'oncohistone sur la réponse des cellules de DMG à l'ONC201

Dans le domaine de la neuro-oncologie, le potentiel clinique de l'ONC201 a été mis en lumière chez une patiente jeune adulte atteinte d'un gliome thalamique muté H3.3 K27M (Arrillaga-Romany et al., 2017). De fait, divers essais cliniques visant à évaluer l'efficacité de l'ONC201 dans le DMG ont été lancés et les premiers résultats obtenus apparaissent prometteurs (Venneti et al., 2023). Toutefois, l'impact potentiel de la mutation H3.3 K27M sur la réponse l'ONC201 demeure à établir.

Au niveau moléculaire, l'efficacité de l'ONC201 dans le DMG semble largement associée à son effet agoniste sur la protéase mitochondriale ClpP et la perturbation subséquente du métabolisme mitochondrial (Duchatel et al., 2021; Przystal et al., 2022; Jackson et al., 2023). Dans l'étude de Jackson et collaborateurs, sur un panel de 12 lignées cellulaires de DMG, la sensibilité à l'ONC201 corrélait avec le ratio d'expression protéique de ClpP sur celle de la SDHA, une de ses cibles. En effet, plus l'expression (relative) de ClpP était élevée par rapport à celle de sa cible, plus la sensibilité à l'ONC201 de la lignée de DMG concernée était importante (Jackson et al., 2023). Dans nos données protéomiques, ni l'expression de ClpP ni celle de la SDHA ne variait avec l'oncohistone. Toutefois, d'autres cibles de la protéase ClpP apparaissaient sous-exprimées avec l'oncohistone, notamment la OGDH ou encore la sous-unité NDUFS2 du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Ishizawa et al., 2019). En supposant que cette corrélation puisse être appliquée à d'autres cibles de ClpP, la mutation H3.3 K27M pourrait favoriser la sensibilité à l'ONC201 en réduisant l'expression de certaines des cibles de ClpP.

D'autre part, l'ONC201 présente également un effet antagoniste sur les récepteurs à la dopamine DRD2/3/4. Sur le panel de lignées DMG utilisé dans l'étude de Jackson *et al*., un niveau d'expression élevé de DRD2 corrélait avec une sensibilité à l'ONC201. Dans nos données transcriptomiques, l'oncohistone était associée à une sous-expression de *DRD2*, plutôt en faveur cette fois d'un profil moins sensible à l'ONC201 dans le contexte muté H3.3 K27M.

Lors de l'étude comparative de la réponse à l'ONC201 dans nos modèles isogéniques de DMG invalidés pour la mutation H3.3 K27M par rapport aux cellules parentales mutées associées, nous constations une sensibilité exacerbée à l'ONC201 avec la mutation H3.3 K27M excepté pour une des lignées (HSJ-019). Nous remarquions que cette lignée cellulaire était l'unique à ne pas présenter de mutation de *TP53* parmi celles utilisées, toutefois, les causes de cette différence sont à définir. Lors d'expériences préliminaires, ces résultats tendaient à se confirmer avec l'ONC206, un autre composé de la famille des imipridones (données non montrées). Toutefois, les modèles invalidés restaient tout de même sensibles à l'ONC201 (IC_{50} comprises entre 0.1 et 10 µM selon les lignées), ne faisant pas de l'oncohistone et des altérations épigénétiques lui étant inhérentes les principaux déterminants de la réponse des

DMG aux molécules de la famille des imipridones. Aussi, la conclusion quant à l'impact de l'oncohistone sur la réponse à l'ONC201 dans la lignée HSJD-DIPG-013 était mitigée de par le manque de clusterisation entre les cellules parentales (DIPG13 P) et le clone 13CTRL, présentant un profil de réponse similaire aux clones KO. Étant donné que la sensibilité associée à l'oncohistone était retrouvée dans deux autres lignées cellulaires, il apparaissait probable qu'il s'agisse d'un effet clonal des cellules 13CTRL.

III.4.7. Méthodes d'évaluation du profil de réponse à la radiothérapie de nos modèles invalidés

Outre l'étude de l'impact de l'oncohistone H3.3 K27M sur la réponse aux drogues, nous avons également adressé la question de son impact sur la radiosensibilité des cellules de DMG. Avec nos modèles cellulaires de pHGG induits pour la mutation H3.3 K27M, nous constations une radiorésistance associée à l'oncohistone dans deux de nos trois lignées cellulaires (Rakotomalala et al., 2021a). Dans la continuité de ces travaux, nous avons évalué la réponse à la radiothérapie de nos modèles cellulaires invalidés pour l'oncohistone issus de la lignée HSJD-DIPG-013. Ces cellules étant cultivées en suspension, nous avons réalisé cette étude par test de clonogénicité post-irradiation, non pas en 2D, mais en agar mou, technique de référence dans ce contexte (Franken et al., 2006) et par ailleurs utilisée au laboratoire sur d'autres modèles cellulaires. De manière surprenante, lors de notre premier test préliminaire, nous observions une sensibilité à la radiothérapie associée à l'oncohistone, tendance inverse par rapport aux expériences menées dans nos modèles d'induction. Toutefois, ces résultats devaient être pris avec prudence et n'ont, à ce jour, pas encore pu être confirmés du fait de l'inadéquation de notre protocole de test de clonogénicité en agar avec la lignée HSJD-DIPG-013 et ses clones dérivés. En effet, pour ces cellules, le nombre de colonies comptées par rapport à la densité cellulaire initialement ensemencée était extrêmement faible, même en conditions non irradiées, se traduisant par un *plating efficiency* quasiment nul (<1% voire 0.1%). Cette inadéquation du test de clonogénicité en agar avait également été constaté pour d'autres modèles cellulaires de DMG (Werbrouck et al., 2019). Une alternative consistait en la réalisation d'un test de clonogénicité en conditions adhérentes, dans un milieu contenant du sérum de veau fœtal. Toutefois, les cellules HSJD-DIPG-013 ne conservaient leur profil adhérent que très transitoirement et formaient des colonies diffuses, empêchant leur dénombrement correct par cette modalité. De surcroit, la culture des cellules de DMG en conditions adhérentes peut induire la différenciation et modifier leur réponse aux thérapies, n'en faisant pas une option optimale (Mbah et al., 2022; Meel et al., 2017). Dans ce contexte, en parallèle de l'optimisation de notre protocole de test de clonogénicité en agar, nous avons développé une nouvelle modalité de test de clonogénicité en suspension dans des microchambres de PDMS qui pourrait permettre d'outrepasser cette limite technique (*Cf.* encadré « À noter » partie résultats III.3.2.). Dans le même temps, nous avons mené des mises

au point sur les lignées cellulaires SU-DIPG-XIII, BT245, HSJ-019 et leurs modèles KO respectifs afin de déterminer si notre protocole de test de clonogénicité en agar mou était applicable à ces modèles cellulaires. Ces tests indiquaient la possibilité d'évaluer la réponse à la radiothérapie des lignées BT245, HSJ-019 et des clones KO-H3.3 K27M associés par ce test. Ainsi les expériences visant à comparer la réponse à la radiothérapie des modèles KO-H3.3 K27M par rapport aux cellules parentales sont en cours pour ces deux lignées cellulaires et devraient nous permettre d'obtenir une première information concernant le rôle de l'oncohistone sur la radiosensibilité des cellules de DMG. À contrario, les tests de clonogénicité, en agar mou comme en conditions adhérentes, se révélaient difficilement applicables à la lignée SU-DIPG-XIII (et son clone KO), formant des colonies trop diffuses pour être dénombrées dans les deux cas. Ainsi, pour la lignée SU-DIPG-XIII, comme pour la lignée HSJD-DIPG-013, des optimisations du protocole de test de clonogénicité en agar et/ou le développement d'une méthode alternative (microchambres de PDMS) sont en cours.

III.4.8. Évaluation de l'efficacité de réparation des cassures double brin de l'ADN radio-induites

D'un point de vue mécanistique, l'efficacité de réparation des dommages à l'ADN (en particulier les cassures double brin) est un des paramètres majeurs gouvernant la réponse à la radiothérapie (Rakotomalala et al., 2021b). Par ailleurs, il a été décrit que l'oncohistone H3.3 K27M présente une distribution similaire à celle du variant H3.3 sauvage, ce dernier étant notamment incorporé au niveau des dommages à l'ADN (Luijsterburg et al., 2016; Nagaraja et al., 2019). Des études ont montré que, par leurs interactomes modifiés et leurs effets épigénétiques, les oncohistones H3 K27M perturbent la mise en place du mécanisme de réparation par NHEJ (Giacomini et al., 2024; Zhang et al., 2018). En effet, Zhang et collaborateurs décrivaient une interaction entre l'oncohistone H3.1 K27M et la protéine FANCD2, une cible des kinases ATR et CHK1, impliquée dans la coordination de différentes voies de réparation des dommages à l'ADN (e.g. *nucleotide excision repair, homologous recombination*) et notamment activée après irradiation (Moldovan and D'Andrea, 2009). Le recrutement aberrant de FANCD2 par H3.1 K27M perturbe le recrutement du facteur 53PB1 (impliqué dans le mécanisme NHEJ) post-irradiation, se traduisant par une radiosensibilité associée à H3.1 K27M (Zhang et al., 2018). D'autre part, Giacomini *et al.* ont récemment montré un recrutement aberrant de la protéine PNKP au niveau des fourches de réplication bloquées en présence de l'oncohistone H3.3 K27M. Ce recrutement était à l'inverse associé au recrutement de 53BP1 et à la mise en place aberrante du mécanisme NHEJ (Giacomini et al., 2024).

Dans ce contexte, nous avons initié l'étude de l'impact de la mutation H3.3 K27M sur l'efficacité de réparation des cassures double brin de l'ADN radio-induites dans nos modèles invalidés pour l'oncohistone. La détection et l'initiation de la réparation des cassures double

brin de l'ADN reposent notamment sur la phosphorylation de H2AX sur la sérine 139 (γH2AX). La résolution des cassures s'accompagne d'une extinction du signal γH2AX (Sulkowski et al., 2020 ; Granzotto et al., 2016). Ainsi, en première approche, nous avons évalué le niveau de phosphorylation de H2AX sur la sérine 139 (γH2AX), en cinétique post-irradiation (Fig. 34B et C). Pour ces expériences, nous avons soumis nos cellules à une irradiation de 2 Gy, dose approximativement équivalente à une fraction de radiothérapie du protocole standard chez les patients (Kim and Suh, 2023). Concernant les points de cinétique, nous utilisions une condition non irradiée comme référence du niveau basal de γH2AX, pouvant être différent entre nos modèles, notamment du fait de probables différences de stress réplicatif ou encore de niveau basal de viabilité cellulaire. Il a été décrit que le niveau de γH2AX culmine dès quelques minutes (environ 10 minutes) post-irradiation (Granzotto et al., 2016). Dans ce contexte, un temps court post-irradiation (1h) nous permettait d'avoir une information sur la capacité de détection des cassures ou sur la quantité de cassures induites, bien que nous ne puissions différencier ces deux paramètres par cette seule approche. Durant ma thèse, j'ai mis au point un protocole de *comet assay* qui permettra, en complément de l'analyse cinétique du niveau de γH2AX, de distinguer ces deux paramètres au besoin. Nous avons également réalisé un temps intermédiaire de 6h post-irradiation, puisqu'il a été décrit que la majorité des cassures double brin détectées sont réparées dans les quelques heures suivant l'irradiation (Frankenberg-Schwager, 1989). *In fine*, le dernier point de cinétique était 24h et nous informait sur la quantité de cassures double brin résiduelles non réparées entre deux fractions de radiothérapie. Nos premiers résultats montraient une détection des cassures double brin efficace dans l'ensemble des conditions en présence comme en absence de l'oncohistone. Concernant la phase de réparation, nous constations une forte hétérogénéité entre nos clones 13KO. En effet, alors que le clone 13KO2 montrait une réparation particulièrement efficace, le clone 13KO3 montrait à l'inverse une absence totale de réparation même à 24h post-irradiation, ne faisant pas sens avec la radiorésistance observée lors de nos expériences préliminaires de tests de clonogénicité. Le clone 13KO1 présentait une première phase de réparation (50% des cassures), puis une légère diminution du signal γH2AX entre 6h et 24h. Nos cellules mutées H3.3 K27M présentaient également des profils différents. Ce manque de clusterisation au sein de nos modèles mutés et invalidés nous empêchait pour l'heure de conclure quant au rôle de l'oncohistone sur l'efficacité de réparation des cassures double brin radio-induites ; toutefois il était tout de même à noter que le niveau de γH2AX résiduel à 24h apparaissait supérieur dans les conditions DIPG13 P et 13CTRL par rapport aux conditions 13KO1 et 13KO2. Ces résultats demandent à être confirmés à la fois dans les modèles issus de la lignée HSJD-DIPG-013, mais également dans les lignées SU-DIPG-XIII, BT245, HSJ-019 et modèles KO-H3.3 K27M associés afin de tirer des conclusions.

CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

L'objectif principal de ma thèse était d'étudier le rôle phénotypique de la mutation H3.3 K27M dans des modèles cellulaires isogéniques complémentaires induits ou invalidés pour l'oncohistone. Dans un premier temps, nos modèles d'induction de la mutation H3.3 K27M nous ont permis de faire la preuve de concept de son impact sur le phénotype agressif (*i.e.* croissance et invasion cellulaires) et la réponse aux thérapies anti-cancéreuses (incluant la radiothérapie) de cellules de gliome pédiatrique sustentoriel, à la fois lors de notre étude initiale puis au travers de projets de collaborations. En outre, les résultats obtenus avec nos modèles d'induction montraient i) des différences d'impact de la mutation H3.3 K27M en fonction du contexte cellulaire (*i.e.* architecture épigénétique inhérente à l'origine cellulaire et *drivers* oncogéniques en place) et ii) que certains effets biologiques associés à l'oncohistone pouvaient être conditionnés par le microenvironnement.

Le succès de l'établissement et l'obtention (au travers d'une collaboration) de modèles stablement invalidés pour la mutation H3.3 K27M nous ont permis d'explorer le rôle phénotypique de l'oncohistone dans un contexte cellulaire plus pertinent de DMG et d'en initier la compréhension mécanistique. La caractérisation omique comparative (transcriptomique et protéomique) des modèles invalidés pour la mutation H3.3 K27M établis au laboratoire remettait en perspective les liens entre les altérations épigénétiques, le transcriptome et le protéome associés à l'oncohistone. En effet, malgré une perte drastique des marques répressives H3K27me3, inhérente à l'oncohistone, les changements transcriptomiques associés se révélaient modestes, avec presque autant de gènes sous-exprimés que sur-exprimés avec la mutation H3.3 K27M. Ces observations supportaient l'hypothèse d'un impact épigénétique de la mutation H3.3 K27M principalement au niveau de régions non codantes du génome (*e.g.* éléments répétés de type ERV), mais soulevait également la question du lien de causalité entre la régulation épigénétique et le processus de transcription. D'autre part, nous n'identifions quasiment pas d'acteur commun entre le transcriptome et le protéome associés à la mutation H3.3 K27M, suggérant que l'impact transcriptionnel de cette dernière n'était pas nécessairement à l'origine des différences observées à l'échelle protéique. Ces données soulevaient en effet la question de l'impact de l'oncohistone sur les mécanismes de régulations traductionnelles et post-traductionnelles dans les cellules de DMG. Par ailleurs, il apparaît probable que l'oncohistone (ou son invalidation) impose un remaniement du paysage épigénétique n'induisant que de mineurs changements transcriptionnels dans nos conditions expérimentales de base, mais pouvant être spécifiquement exacerbés, et se traduire à l'échelle protéique, dans certaines conditions microenvironnementales.

Outre ces divergences, de manière intéressante et originale, nos approches omiques se sont révélées complémentaires dans la mise en évidence de l'impact de la mutation H3.3 K27M sur l'expression d'acteurs du métabolisme lipidique (*i.e.* β-oxydation et lipogenèse) des cellules de DMG. D'un point de vue phénotypique, le recours à la β-oxydation

des acides gras pour alimenter le métabolisme OXPHOS apparaissait très faible dans nos cellules de DMG et, de manière surprenante au regard de nos données omiques, ne variait pas en fonction de la mutation H3.3 K27M. Il apparaitrait intéressant de réitérer nos expériences de tests de cytotoxicité de l'étomoxir et de mesures de l'*oxygen consumption rate* (OCR), avec ou sans étomoxir, dans des conditions i) réduites en nutriments, plus proches de la physio-pathologie, et ii) supplémentées en acides gras exogènes (*e.g.* acide palmitique) afin de s'assurer que nos conditions expérimentales (supra-physiologiques en milieu riche en glucose, glutamine et pyruvate) ne masquent pas l'impact potentiel de l'oncohistone sur le recours à la β-oxydation des acides gras.

Bien que ne s'accompagnant pas de changements du recours au catabolisme des acides gras pour alimenter l'OXPHOS, la restauration de l'expression d'acteurs du métabolisme lipidique, notamment ACSL1, corrélait avec une hausse de la formation de gouttelettes lipidiques dans nos modèles invalidés pour l'oncohistone. Pour compléter ces résultats intéressants, une étude lipidomique (par la technologie Spidermass), actuellement en cours sur nos modèles de la lignée HSJD-DIPG-013, permettra d'identifier plus précisément les classes de lipides différentiellement représentées dans les cellules de DMG en fonction de l'oncohistone.

Cette formation de gouttelettes lipidiques s'observait spécifiquement au centre de modèles sphéroïdes 3D et apparaissait ainsi conditionnée par des facteurs microenvironnementaux. Au rang des paramètres ayant été décrits comme impactant la formation de gouttelettes lipidiques et potentiellement présents au sein de nos sphéroïdes figuraient notamment l'hypoxie et l'acidose. Nos premières expériences ne suggéraient toutefois pas d'implication de ces deux paramètres dans la formation des gouttelettes lipidiques liées à l'invalidation de l'oncohistone. Néanmoins, le niveau d'hypoxie potentiellement rencontré au centre de nos sphéroïdes étant inconnu, des expériences exploratoires avec différents niveaux d'oxygène, plus proches de la physioxie cérébrale (4-5% O_2) ou, à l'inverse, d'une hypoxie plus sévère (0.1% O_2), sont actuellement en cours. Par ailleurs, la privation en nutriments, potentiellement observée au centre de nos sphéroïdes, figure également parmi les paramètres à explorer. Dans l'optique d'évaluer l'influence d'une privation en nutriments sur la formation de gouttelettes lipidiques constatée en absence de l'oncohistone, des colorations *oil red* sur nos différents modèles cultivés dans du milieu réduit en nutriments (*e.g.* glucose, glutamine ou les deux) seront informatives. *In fine*, l'élucidation des paramètres gouvernant la formation des gouttelettes lipidiques (ainsi que la hausse d'expression d'ACSL1) associées au KO de l'oncohistone permettra d'envisager des expériences d'invalidation transitoire par *siRNA* contre ACSL1, pour l'heure incompatibles avec notre protocole de formation de sphéroïdes. Ces expériences de validations fonctionnelles permettraient de démontrer l'éventuel rôle causal d'ACSL1 sur la formation des gouttelettes lipidiques dans nos clones KO-H3.3 K27M. Dans l'optique d'obtenir une première information, nous sommes actuellement en train d'évaluer, de manière moins spécifique,

l'impact sur la formation de gouttelettes lipidiques d'une inhibition pharmacologique des enzymes ACSL, à l'aide de la triacsin C, au sein de nos sphéroïdes.

Par ailleurs, l'existence dans les DMG des paramètres physico-chimiques potentiellement retrouvés au centre de nos sphéroïdes (i.e. régions hypoxiques, acidose) demeurant à ce jour hypothétique, l'impact de l'oncohistone sur la formation de gouttelettes lipidiques nécessitera d'être confirmé *in vivo*. Dans ce contexte, des premières études de faisabilité de xénogreffes orthotopiques de nos modèles cellulaires chez la souris ont été réalisées. Par la suite, la comparaison par colorations *oil red* sur coupes de tumeurs (H3.3 K27M *vs.* KO) permettra de valider l'impact de l'oncohistone sur la formation de gouttelettes lipidiques *in vivo*. De plus, l'existence d'une hétérogénéité d'expression de la mutation H3.3 K27M au sein des DMG en étant porteurs laisse espérer une validation de nos résultats sur tissus de patients, notamment par des expériences de co-marquages entre l'oncohistone et les gouttelettes lipidiques (ou marqueurs associés).

Étant donné l'impact des remaniements du métabolisme lipidique sur le caractère agressif de divers modèles cancéreux (*e.g.* glioblastome) (Miska and Chandel, 2023), des expériences de co-marquages sur coupes de sphéroïdes permettront d'établir des corrélations entre la modification du métabolisme lipidique associée à l'oncohistone et d'autres phénotypes. À l'image de ce que proposait Shakya *et al.* dans le glioblastome de l'adulte, la formation de gouttelettes lipidiques pourrait être associée à un profil plus différencié et des capacités d'auto-renouvellement réduites. En ce sens, la probable différenciation des cellules tumorales *OPC-like* engendrée par le KO de H3.3 K27M pourrait s'accompagner d'une hausse de la lipogenèse et de la formation de ces gouttelettes lipidiques ; ce d'autant plus qu'au niveau du système nerveux central, la fonction principale des oligodendrocytes différenciés consiste en la formation de gaines de myéline, constituées à 80% de lipides (Ralhan et al., 2021). Ainsi, des co-marquages sur coupes de sphéroïdes (ou marquages sur coupes sériées) des gouttelettes lipidiques, à l'aide de sondes fluorescentes (*e.g.* LipiBright^{TM}), avec des marqueurs de différenciation (*e.g. myelin-associated glycoprotein*) et de prolifération (*e.g.* Ki67) permettraient de valider cette hypothèse. De même, un co-marquage des gouttelettes lipidiques avec la protéine ACSL1 permettra de renforcer la corrélation préalablement observée.

Au-delà de son association probable avec la différenciation des cellules de DMG, la formation de gouttelettes lipidiques a été décrite comme un mécanisme protecteur de la lipotoxicité et de la peroxydation lipidique, impactant notamment la réponse à certains types de thérapies anti-cancéreuses (Cruz et al., 2020; Ralhan et al., 2021). En effet, ces dernières années, la voie de mort cellulaire régulée par ferroptose, étroitement liée au métabolisme et à la peroxydation lipidique, a suscité un certain engouement dans le domaine de la cancérologie, du fait de son implication dans la réponse à certaines thérapies, en particulier la radiothérapie, unique traitement de référence des DMG (Lei et al., 2020). De manière intéressante, certains acteurs identifiés comme différentiellement exprimés lors de nos caractérisations omiques (*e.g.* ACSL1, ACSL3), ainsi que la formation de gouttelettes lipidiques,

ont été associés à des variations de la susceptibilité à cette modalité de mort cellulaire (Zhang et al., 2021; Beatty et al., 2021; Klasson et al., 2022; Kim et al., 2023). Dans ce contexte, nos résultats originaux de recherche fondamentale soulèvent plusieurs questions ; L'absence de formation de gouttelettes lipidiques associée à l'oncohistone H3.3 K27M s'accompagne-t-elle d'une accumulation d'acides gras libres au niveau cellulaire ? Prédispose-t-elle les cellules mutées à certains types de morts cellulaires (*e.g.* la ferroptose) ? Engendre-t-elle une sensibilité spécifique à certaines thérapies (*e.g.* radiothérapie) ?

L'étude de l'impact de l'oncohistone sur la réponse aux thérapies, en particulier la radiothérapie, constituait un des principaux objectifs de ma thèse. Lors d'expériences préliminaires, la mutation H3.3 K27M semblait favoriser la radiosensibilité des cellules de DMG. Toutefois, des étapes de développement technique seront nécessaires pour confirmer ce premier résultat. En effet, à ce jour, nous ne disposons pas de test permettant l'évaluation de la réponse à la radiothérapie, de manière optimale, de nos cellules de la lignée HSJD-DIPG-013, en raison de l'inadéquation de notre protocole de test de clonogénicité en agar. De fait, des adaptations de ce protocole (*e.g.* densité cellulaire ensemencée, concentration de l'agar) sont en cours en parallèle du développement d'une nouvelle modalité de test de clonogénicité basée sur l'utilisation de microchambres de PDMS. Par ailleurs, notre premier résultat nécessitera également d'être confirmé sur l'ensemble des modèles dont nous disposons. Ces expériences sont d'ailleurs en cours dans les lignées cellulaires BT245 et HSJ-019, pour lesquels notre protocole de test de clonogénicité standard apparaissait adapté.

D'un point de vue mécanistique, au regard de nos résultats concernant l'impact de l'oncohistone sur le métabolisme des lipides, il apparaitrait intéressant de déterminer si la ferroptose figure parmi les morts cellulaires induites par la radiothérapie dans les cellules de DMG. À cet égard, des expériences combinant la radiothérapie à la ferrostatine-1 (inhibiteur de la ferroptose) sont envisagées dans nos cellules de DMG. De même, des premières expériences comparant la réponse de nos modèles cellulaires (H3.3 K27M *vs.* KO) à deux inducteurs pharmacologiques de la ferroptose (*i.e.* Erastin et RSL-3) sont en cours par tests de cytotoxicité mais également sur sphéroïdes de taille standardisée. En parallèle, l'évaluation la peroxydation lipidique au sein de sphéroïdes préalablement irradiés et incubés avec des sondes telles que C11-BODIPY^{TM} ou encore Liperfluo permettront d'initier l'étude des éventuels liens entre l'impact de la mutation H3.3 K27M sur le métabolisme lipidique et la réponse à la radiothérapie des cellules de DMG.

D'autre part, notre analyse comparative par criblage pharmacologique ne montrait pas de résistance globale aux agents anti-cancéreux associées à l'oncohistone. Toutefois, nous identifions plusieurs hits dont l'efficacité était augmentée en présence de la mutation H3.3 K27M. À ce titre, le prexasertib nous indiquait une dépendance exacerbée à la kinase CHK1 pour la croissance des cellules mutées H3.3 K27M dans certaines lignées de DMG. Au

regard des lignées cellulaires concernées et des profils de réponse obtenus, cette dépendance exacerbée pourrait être liée au stress réplicatif et à l'impact de la mutation H3.3 K27M sur la croissance cellulaire préalablement observé.

De manière plus originale, l'efficacité exacerbée des glycosides cardiaques en présence de l'oncohistone en suggérait l'impact sur l'homéostasie et la signalisation ionique des cellules de DMG. Ces effets associés à la mutation H3.3 K27M étaient toutefois variables en fonction de la lignée cellulaire considérée et les causes de cette variabilité restent à définir. Au regard, de ces résultats, nous avons entrepris des expériences d'imagerie calcique en temps réel, à l'aide de la sonde ratiométrique Fura-2, afin de comparer le taux de calcium cytoplasmique, basal ou après stimulation, en fonction de l'oncohistone H3.3 K27M, avec ou sans pré-traitement à la proscillaridine A. Nos premières expériences semblaient indiquer un impact de l'oncohistone sur la libération de calcium au niveau cytoplasmique après stimulation avec l'acétylcholine. Par la suite, il sera intéressant de tester des stimulations avec d'autres neurotransmetteurs produits par les cellules de DMG (*e.g.* dopamine) ou impliqués dans les interactions avec les neurones *via* les synapses gliome-neurones (*e.g.* glutamate). D'autre part, étant donné que la dépolarisation membranaire des cellules de DMG supporte leur croissance *in vivo*, l'évaluation de l'impact de l'oncohistone sur les flux calciques induits par une dépolarisation membranaire pourrait être intéressante (Venkatesh et al., 2019; Taylor et al., 2023). En complément de ces premières expériences, un *phospho-protein array* permettra d'obtenir un aperçu global de l'impact du traitement à la proscillaridine A sur la signalisation cellulaire, notamment sur la signalisation calcique (*e.g.* déphosphorylation de NFAT), et certaines voies métaboliques.

Outre ces hits pharmacologiques, que nous considérons dans un premier temps comme des outils de compréhension mécanistique, l'ONC201 présentait également une efficacité exacerbée associée à la mutation H3.3 K27M dans certaines lignées de DMG. Toutefois, nos modèles KO-H3.3 K27M restaient tout de même sensibles à l'ONC201 (IC_{50} comprises entre 0.1 et 10 µM selon les lignées), remettant en cause l'hypothèse selon laquelle l'efficacité de cette molécule serait dépendante de la réversion des altérations épigénétiques inhérentes à l'oncohistone (*Cf.* introduction partie IV.2.2.2.). Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier l'impact d'un traitement à l'ONC201 sur le paysage épigénétique global de nos modèles cellulaires (H3.3 K27M *vs.* KO), notamment dans la lignée cellulaire HSJ-019 pour laquelle le différentiel de réponse n'est pas observé en fonction de l'oncohistone. Par ailleurs, l'étude de l'expression des protéines cibles de la ClpP (*e.g.* OGDH, NDUFS2), identifiées comme différentiellement exprimées dans nos modèles issus de la lignée HSJD-DIPG-013, dans l'ensemble des modèles cellulaires de notre panel pourrait permettre d'identifier d'éventuelles corrélations avec le différentiel de réponse à l'ONC201 observé. Le cas échéant, des études de validation fonctionnelle à l'aide de *siRNA* permettraient d'établir un lien de causalité entre l'expression de ces protéines et l'impact de l'oncohistone sur la réponse à l'ONC201. D'autre part, une caractérisation métabolomique (par GC-MS) de nos modèles cellulaires, avec ou sans traitement à l'ONC201, permettrait d'étudier l'éventuel

impact de l'oncohistone sur les perturbations métaboliques induites par l'ONC201 (*e.g.* production de 2-HG) (Venneti et al., 2023).

In fine, la découverte de ces phénotypes associés à la mutation H3.3 K27M (*i.e.* altération du métabolisme lipidique, radiosensibilité, sensibilité exacerbée au ciblage de certains acteurs), rendue possible par la caractérisation de nos modèles cellulaires isogéniques au cours de ma thèse, constitue une base robuste pour les travaux à venir de l'équipe. Gageons que la compréhension des rationnels mécanistiques sous-jacents pourra mener à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des DMG.

BIBLIOGRAPHIE

Abe, H., Natsumeda, M., Okada, M., Watanabe, J., Tsukamoto, Y., Kanemaru, Y., Yoshimura, J., Oishi, M., Hashizume, R., Kakita, A., Fujii, Y., 2020. MGMT Expression Contributes to Temozolomide Resistance in H3K27M-Mutant Diffuse Midline Gliomas. Front. Oncol. 9, 1568. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01568

Adefuin, A.M.D., Kimura, A., Noguchi, H., Nakashima, K., Namihira, M., 2014. Epigenetic mechanisms regulating differentiation of neural stem/precursor cells. Epigenomics 6, 637–649. https://doi.org/10.2217/epi.14.53

Adjemian, S., Oltean, T., Martens, S., Wiernicki, B., Goossens, V., Vanden Berghe, T., Cappe, B., Ladik, M., Riquet, F.B., Heyndrickx, L., Bridelance, J., Vuylsteke, M., Vandecasteele, K., Vandenabeele, P., 2020. Ionizing radiation results in a mixture of cellular outcomes including mitotic catastrophe, senescence, methuosis, and iron-dependent cell death. Cell Death Dis 11, 1003. https://doi.org/10.1038/s41419-020-03209-y

Ainembabazi, D., Zhang, Y., Turchi, J.J., 2023. The mechanistic role of cardiac glycosides in DNA damage response and repair signaling. Cell. Mol. Life Sci. 80, 250. https://doi.org/10.1007/s00018-023-04910-9

Akamandisa, M.P., Nie, K., Nahta, R., Hambardzumyan, D., Castellino, R.C., 2019. Inhibition of mutant PPM1D enhances DNA damage response and growth suppressive effects of ionizing radiation in diffuse intrinsic pontine glioma. Neuro-Oncology 21, 786–799. https://doi.org/10.1093/neuonc/noz053

Allen, N.J., Lyons, D.A., 2018. Glia as architects of central nervous system formation and function. Science 362, 181–185. https://doi.org/10.1126/science.aat0473

Alzial, G., Renoult, O., Paris, F., Gratas, C., Clavreul, A., Pecqueur, C., 2022. Wild-type isocitrate dehydrogenase under the spotlight in glioblastoma. Oncogene 41, 613–621. https://doi.org/10.1038/s41388-021-02056-1

An, S., Camarillo, J.M., Huang, T.Y.-T., Li, D., Morris, J.A., Zoltek, M.A., Qi, J., Behbahani, M., Kambhampati, M., Kelleher, N.L., Nazarian, J., Thomas, P.M., Saratsis, A.M., 2020. Histone tail analysis reveals H3K36me2 and H4K16ac as epigenetic signatures of diffuse intrinsic pontine glioma. J Exp Clin Cancer Res 39, 261. https://doi.org/10.1186/s13046-020-01773-x

Anastas, J.N., Zee, B.M., Kalin, J.H., Kim, M., Guo, R., Alexandrescu, S., Blanco, M.A., Giera, S., Gillespie, S.M., Das, J., Wu, M., Nocco, S., Bonal, D.M., Nguyen, Q.-D., Suva, M.L., Bernstein, B.E., Alani, R., Golub, T.R., Cole, P.A., Filbin, M.G., Shi, Y., 2019. Re-programing Chromatin with a Bifunctional LSD1/HDAC Inhibitor Induces Therapeutic Differentiation in DIPG. Cancer Cell 36, 528-544.e10. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.09.005

Anwar, T., Arellano-Garcia, C., Ropa, J., Chen, Y.-C., Kim, H.S., Yoon, E., Grigsby, S., Basrur, V., Nesvizhskii, A.I., Muntean, A., Gonzalez, M.E., Kidwell, K.M., Nikolovska-Coleska, Z., Kleer, C.G., 2018. p38-mediated phosphorylation at T367 induces EZH2 cytoplasmic localization to promote breast cancer metastasis. Nat Commun 9, 2801. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05078-8

Argüello, R.J., Combes, A.J., Char, R., Gigan, J.-P., Baaziz, A.I., Bousiquot, E., Camosseto, V., Samad, B., Tsui, J., Yan, P., Boissonneau, S., Figarella-Branger, D., Gatti, E., Tabouret, E., Krummel, M.F., Pierre, P., 2020. SCENITH: A Flow Cytometry-Based Method to Functionally Profile Energy Metabolism with Single-Cell Resolution. Cell Metabolism 32, 1063-1075.e7. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.11.007

Armstrong, C., Spencer, S.L., 2021. Replication-dependent histone biosynthesis is coupled to cell-cycle commitment. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 118, e2100178118. https://doi.org/10.1073/pnas.2100178118

Arrillaga-Romany, I., Chi, A.S., Allen, J.E., Oster, W., Wen, P.Y., Batchelor, T.T., 2017. A phase 2 study of the first imipridone ONC201, a selective DRD2 antagonist for oncology, administered every three weeks in recurrent glioblastoma. Oncotarget 8, 79298–79304. https://doi.org/10.18632/oncotarget.17837

Bailleul, Q., Rakotomalala, A., Ferry, I., Leblond, P., Meignan, S., Furlan, A., 2021. L'art de la guerre appliqué aux DIPG: Connais ton ennemi. Med Sci (Paris) 37, 159–166. https://doi.org/10.1051/medsci/2020279

Balakrishnan, I., Danis, E., Pierce, A., Madhavan, K., Wang, D., Dahl, N., Sanford, B., Birks, D.K., Davidson, N., Metselaar, D.S., Meel, M.H., Lemma, R., Donson, A., Vijmasi, T., Katagi, H., Sola, I., Fosmire, S., Alimova, I., Steiner, J., Gilani, A., Hulleman, E., Serkova, N.J., Hashizume, R., Hawkins, C., Carcaboso, A.M., Gupta, N., Monje, M., Jabado, N., Jones, K., Foreman, N., Green, A., Vibhakar, R., Venkataraman, S., 2020.

Senescence Induced by BMI1 Inhibition Is a Therapeutic Vulnerability in H3K27M-Mutant DIPG. Cell Reports 33, 108286. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108286

Barth, T.K., Imhof, A., 2010. Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. Trends in Biochemical Sciences 35, 618–626. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.006

Bax, D.A., Little, S.E., Gaspar, N., Perryman, L., Marshall, L., Viana-Pereira, M., Jones, T.A., Williams, R.D., Grigoriadis, A., Vassal, G., Workman, P., Sheer, D., Reis, R.M., Pearson, A.D.J., Hargrave, D., Jones, C., 2009. Molecular and Phenotypic Characterisation of Paediatric Glioma Cell Lines as Models for Preclinical Drug Development. PLoS ONE 4, e5209. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005209

Bayliss, J., Mukherjee, P., Lu, C., Jain, S.U., Chung, C., Martinez, D., Sabari, B., Margol, A.S., Panwalkar, P., Parolia, A., Pekmezci, M., McEachin, R.C., Cieslik, M., Tamrazi, B., Garcia, B.A., La Rocca, G., Santi, M., Lewis, P.W., Hawkins, C., Melnick, A., David Allis, C., Thompson, C.B., Chinnaiyan, A.M., Judkins, A.R., Venneti, S., 2016. Lowered H3K27me3 and DNA hypomethylation define poorly prognostic pediatric posterior fossa ependymomas. Sci. Transl. Med. 8. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah6904

Beatty, A., Singh, T., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Samovich, S., Nicolas, E., Maslar, K., Zhou, Y., Cai, K.Q., Tan, Y., Doll, S., Conrad, M., Subramanian, A., Bayır, H., Kagan, V.E., Rennefahrt, U., Peterson, J.R., 2021. Ferroptotic cell death triggered by conjugated linolenic acids is mediated by ACSL1. Nat Commun 12, 2244. https://doi.org/10.1038/s41467-021-22471-y

Bender, S., Tang, Y., Lindroth, A.M., Hovestadt, V., Jones, D.T.W., Kool, M., Zapatka, M., Northcott, P.A., Sturm, D., Wang, W., Radlwimmer, B., Højfeldt, J.W., Truffaux, N., Castel, D., Schubert, S., Ryzhova, M., Şeker-Cin, H., Gronych, J., Johann, P.D., Stark, S., Meyer, J., Milde, T., Schuhmann, M., Ebinger, M., Monoranu, C.-M., Ponnuswami, A., Chen, S., Jones, C., Witt, O., Collins, V.P., von Deimling, A., Jabado, N., Puget, S., Grill, J., Helin, K., Korshunov, A., Lichter, P., Monje, M., Plass, C., Cho, Y.-J., Pfister, S.M., 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

Bočkaj, I., Martini, T.E.I., de Camargo Magalhães, E.S., Bakker, P.L., Meeuwsen-de Boer, T.G.J., Armandari, I., Meuleman, S.L., Mondria, M.T., Stok, C., Kok, Y.P., Bakker, B., Wardenaar, R., Seiler, J., Broekhuis, M.J.C., van den Bos, H., Spierings, D.C.J., Ringnalda, F.C.A., Clevers, H., Schüller, U., van Vugt, M.A.T.M., Foijer, F., Bruggeman, S.W.M., 2021. The H3.3K27M oncohistone affects replication stress outcome and provokes genomic instability in pediatric glioma. PLoS Genet 17, e1009868. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009868

Boileau, M., Shirinian, M., Gayden, T., Harutyunyan, A.S., Chen, C.C.L., Mikael, L.G., Duncan, H.M., Neumann, A.L., Arreba-Tutusaus, P., De Jay, N., Zeinieh, M., Rossokhata, K., Zhang, Y., Nikbakht, H., Mouawad, C., Massoud, R., Frey, F., Nasr, R., El Cheikh, J., El Sabban, M., Kleinman, C.L., Mahfouz, R., Minden, M.D., Jabado, N., Bazarbachi, A., Eppert, K., 2019. Mutant H3 histones drive human pre-leukemic hematopoietic stem cell expansion and promote leukemic aggressiveness. Nat Commun 10, 2891. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10705-z

Bonner, E.R., Dawood, A., Gordish-Dressman, H., Eze, A., Bhattacharya, S., Yadavilli, S., Mueller, S., Waszak, S.M., Nazarian, J., 2023. Pan-cancer atlas of somatic core and linker histone mutations. npj Genom. Med. 8, 23. https://doi.org/10.1038/s41525-023-00367-8

Bonner, E.R., Waszak, S.M., Grotzer, M.A., Mueller, S., Nazarian, J., 2021. Mechanisms of imipridones in targeting mitochondrial metabolism in cancer cells. Neuro-Oncology 23, 542–556. https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa283

Bouquet, F., Ousset, M., Biard, D., Fallone, F., Dauvillier, S., Frit, P., Salles, B., Muller, C., 2011. A DNA-dependent stress response involving DNA-PK occurs in hypoxic cells and contributes to cellular adaptation to hypoxia. Journal of Cell Science 124, 1943–1951. https://doi.org/10.1242/jcs.078030

Bracken, A.P., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, K.H., Helin, K., 2006. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. Genes Dev. 20, 1123–1136. https://doi.org/10.1101/gad.381706

Bredlau, A.L., Korones, D.N., 2014. Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas, in: Advances in Cancer Research. Elsevier, pp. 235–259. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800249-0.00006-8

Bressan, R.B., Southgate, B., Ferguson, K.M., Blin, C., Grant, V., Alfazema, N., Wills, J.C., Marques-Torrejon, M.A., Morrison, G.M., Ashmore, J., Robertson, F., Williams, C.A.C., Bradley, L., Von Kriegsheim, A., Anderson, R.A., Tomlinson, S.R., Pollard, S.M., 2021. Regional identity of human neural stem cells determines oncogenic responses to histone H3.3 mutants. Cell Stem Cell 28, 877-893.e9. https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.01.016

Brien, G.L., Bressan, R.B., Monger, C., Gannon, D., Lagan, E., Doherty, A.M., Healy, E., Neikes, H., Fitzpatrick, D.J., Deevy, O., Grant, V., Marqués-Torrejón, M.-A., Alfazema, N., Pollard, S.M., Bracken, A.P., 2021. Simultaneous disruption of PRC2 and enhancer function underlies histone H3.3-K27M oncogenic activity in human hindbrain neural stem cells. Nat Genet 53, 1221–1232. https://doi.org/10.1038/s41588-021-00897-w

Buckley, A.M., Lynam-Lennon, N., O'Neill, H., O'Sullivan, J., 2020. Targeting hallmarks of cancer to enhance radiosensitivity in gastrointestinal cancers. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 17, 298–313. https://doi.org/10.1038/s41575-019-0247-2

Bulusu, V., Tumanov, S., Michalopoulou, E., Van Den Broek, N.J., MacKay, G., Nixon, C., Dhayade, S., Schug, Z.T., Vande Voorde, J., Blyth, K., Gottlieb, E., Vazquez, A., Kamphorst, J.J., 2017. Acetate Recapturing by Nuclear Acetyl-CoA Synthetase 2 Prevents Loss of Histone Acetylation during Oxygen and Serum Limitation. Cell Reports 18, 647–658. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.055

Burgess, R.J., Zhang, Z., 2013. Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. Nat Struct Mol Biol 20, 14–22. https://doi.org/10.1038/nsmb.2461

Cabrera-Licona, A., Pérez-Añorve, I.X., Flores-Fortis, M., Moral-Hernández, O. del, González-de la Rosa, C.H., Suárez-Sánchez, R., Chávez-Saldaña, M., Aréchaga-Ocampo, E., 2021. Deciphering the epigenetic network in cancer radioresistance. Radiotherapy and Oncology 159, 48–59. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2021.03.012

Campbell, S., Ismail, I.H., Young, L.C., Poirier, G.G., Hendzel, M.J., 2013. Polycomb repressive complex 2 contributes to DNA double-strand break repair. Cell Cycle 12, 2675–2683. https://doi.org/10.4161/cc.25795

Capper, D., Jones, D., Sill, M. *et al.* DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature* 555, 469–474 (2018). https://doi.org/10.1038/nature26000

Carey, B.W., Finley, L.W.S., Cross, J.R., Allis, C.D., Thompson, C.B., 2015. Intracellular α-ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. Nature 518, 413–416. https://doi.org/10.1038/nature13981

Carvalho, D.M., Temelso, S., Mackay, A., Pemberton, H.N., Rogers, R., Kessler, K., Izquierdo, E., Bjerke, L., Salom, J.F., Clarke, M., Grabovska, Y., Burford, A., Olaciregui, N.G., Boult, J.K., Molinari, V., Fofana, M., Proszek, P., Potente, E.F., Taylor, K.R., Chandler, C., Zebian, B., Bhangoo, R., Martin, A.J., Dabbous, B., Stapleton, S., Hettige, S., Marshall, L.V., Carceller, F., Mandeville, H.C., Vaidya, S.J., Al-Sarraj, S., Bridges, L.R., Johnston, R., Cryan, J., Farrell, M., Crimmins, D., Caird, J., Pears, J., Pericoli, G., Miele, E., Mastronuzzi, A., Locatelli, F., Carai, A., Robinson, S.P., Hubank, M., Monje, M., Moore, A.S., Hassall, T.E., Carcaboso, A.M., Lord, C.J., Vinci, M., Jones, C., 2020. Drug screening linked to molecular profiling identifies novel dependencies in patient-derived primary cultures of paediatric high grade glioma and DIPG (preprint). Cancer Biology. https://doi.org/10.1101/2020.12.29.424674

Castel, D., Kergrohen, T., Tauziède-Espariat, A., Mackay, A., Ghermaoui, S., Lechapt, E., Pfister, S.M., Kramm, C.M., Boddaert, N., Blauwblomme, T., Puget, S., Beccaria, K., Jones, C., Jones, D.T.W., Varlet, P., Grill, J., Debily, M.-A., 2020. Histone H3 wild-type DIPG/DMG overexpressing EZHIP extend the spectrum diffuse midline gliomas with PRC2 inhibition beyond H3-K27M mutation. Acta Neuropathol 139, 1109–1113. https://doi.org/10.1007/s00401-020-02142-w

Castel, D., Philippe, C., Calmon, R., Le Dret, L., Truffaux, N., Boddaert, N., Pagès, M., Taylor, K.R., Saulnier, P., Lacroix, L., Mackay, A., Jones, C., Sainte-Rose, C., Blauwblomme, T., Andreiuolo, F., Puget, S., Grill, J., Varlet, P., Debily, M.-A., 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

Cedar, H., Bergman, Y., 2009. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. Nat Rev Genet 10, 295–304. https://doi.org/10.1038/nrg2540

Chaouch, A., Berlandi, J., Chen, C.C.L., Frey, F., Badini, S., Harutyunyan, A.S., Chen, X., Krug, B., Hébert, S., Jeibmann, A., Lu, C., Kleinman, C.L., Hasselblatt, M., Lasko, P., Shirinian, M., Jabado, N., 2021. Histone H3.3 K27M and K36M mutations de-repress transposable elements through perturbation of antagonistic chromatin marks. Molecular Cell 81, 4876-4890.e7. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.10.008

Chassot, A., Canale, S., Varlet, P., Puget, S., Roujeau, T., Negretti, L., Dhermain, F., Rialland, X., Raquin, M.A., Grill, J., Dufour, C., 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, C.C.L., Deshmukh, S., Jessa, S., Hadjadj, D., Lisi, V., Andrade, A.F., Faury, D., Jawhar, W., Dali, R., Suzuki, H., Pathania, M., A, D., Dubois, F., Woodward, E., Hébert, S., Coutelier, M., Karamchandani, J., Albrecht, S., Brandner, S., De Jay, N., Gayden, T., Bajic, A., Harutyunyan, A.S., Marchione, D.M., Mikael, L.G., Juretic, N., Zeinieh, M., Russo, C., Maestro, N., Bassenden, A.V., Hauser, P., Virga, J., Bognar, L., Klekner, A., Zapotocky, M., Vicha, A., Krskova, L., Vanova, K., Zamecnik, J., Sumerauer, D., Ekert, P.G., Ziegler, D.S., Ellezam, B., Filbin, M.G., Blanchette, M., Hansford, J.R., Khuong-Quang, D.-A., Berghuis, A.M., Weil, A.G., Garcia, B.A., Garzia, L., Mack, S.C., Beroukhim, R., Ligon, K.L., Taylor, M.D., Bandopadhayay, P., Kramm, C., Pfister, S.M., Korshunov, A., Sturm, D., Jones, D.T.W., Salomoni, P., Kleinman, C.L., Jabado, N., 2020. Histone H3.3G34-Mutant Interneuron Progenitors Co-opt PDGFRA for Gliomagenesis. Cell 183, 1617-1633.e22. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.012

Chen, K.-Y., Bush, K., Klein, R.H., Cervantes, V., Lewis, N., Naqvi, A., Carcaboso, A.M., Lechpammer, M., Knoepfler, P.S., 2020. Reciprocal H3.3 gene editing identifies K27M and G34R mechanisms in pediatric glioma including NOTCH signaling. Commun Biol 3, 363. https://doi.org/10.1038/s42003-020-1076-0

Chen, L.H., Pan, C., Diplas, B.H., Xu, Cheng, Hansen, L.J., Wu, Y., Chen, X., Geng, Y., Sun, T., Sun, Y., Zhang, P., Wu, Z., Zhang, J., Li, D., Zhang, Y., Wu, W., Wang, Y., Li, G., Yang, J., Wang, X., Xu, Ce, Wang, S., Waitkus, M.S., He, Y., McLendon, R.E., Ashley, D.M., Yan, H., Zhang, L., 2020. The integrated genomic and epigenomic landscape of brainstem glioma. Nat Commun 11, 3077. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16682-y

Chi, A.S., Tarapore, R.S., Hall, M.D., Shonka, N., Gardner, S., Umemura, Y., Sumrall, A., Khatib, Z., Mueller, S., Kline, C., Zaky, W., Khatua, S., Weathers, S.-P., Odia, Y., Niazi, T.N., Daghistani, D., Cherrick, I., Korones, D., Karajannis, M.A., Kong, X.-T., Minturn, J., Waanders, A., Arillaga-Romany, I., Batchelor, T., Wen, P.Y., Merdinger, K., Schalop, L., Stogniew, M., Allen, J.E., Oster, W., Mehta, M.P., 2019. Pediatric and adult H3 K27M-mutant diffuse midline glioma treated with the selective DRD2 antagonist ONC201. J Neurooncol 145, 97–105. https://doi.org/10.1007/s11060-019-03271-3

Chung, C., Sweha, S.R., Pratt, D., Tamrazi, B., Panwalkar, P., Banda, A., Bayliss, J., Hawes, D., Yang, F., Lee, H.-J., Shan, M., Cieslik, M., Qin, T., Werner, C.K., Wahl, D.R., Lyssiotis, C.A., Bian, Z., Shotwell, J.B., Yadav, V.N., Koschmann, C., Chinnaiyan, A.M., Blüml, S., Judkins, A.R., Venneti, S., 2020. Integrated Metabolic and Epigenomic Reprograming by H3K27M Mutations in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas. Cancer Cell 38, 334-349.e9. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.07.008

Cohen, K.J., Jabado, N., Grill, J., 2017. Diffuse intrinsic pontine gliomas—current management and new biologic insights. Is there a glimmer of hope? Neuro-Oncology 19, 1025–1034. https://doi.org/10.1093/neuonc/nox021

Cordero, F.J., Huang, Z., Grenier, C., He, X., Hu, G., McLendon, R.E., Murphy, S.K., Hashizume, R., Becher, O.J., 2017. Histone H3.3K27M Represses *p16* to Accelerate Gliomagenesis in a Murine Model of DIPG. Molecular Cancer Research 15, 1243–1254. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0389

Cruz, A.L.S., Barreto, E.D.A., Fazolini, N.P.B., Viola, J.P.B., Bozza, P.T., 2020. Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. Cell Death Dis 11, 105. https://doi.org/10.1038/s41419-020-2297-3

Cutter, A.R., Hayes, J.J., 2015. A brief review of nucleosome structure. FEBS Letters 589, 2914–2922. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.016

Da Costa, E.M., Armaos, G., McInnes, G., Beaudry, A., Moquin-Beaudry, G., Bertrand-Lehouillier, V., Caron, M., Richer, C., St-Onge, P., Johnson, J.R., Krogan, N., Sai, Y., Downey, M., Rafei, M., Boileau, M., Eppert, K., Flores-Díaz, E., Haman, A., Hoang, T., Sinnett, D., Beauséjour, C., McGraw, S., Raynal, N.J.-M., 2019.

Heart failure drug proscillaridin A targets MYC overexpressing leukemia through global loss of lysine acetylation. J Exp Clin Cancer Res 38, 251. https://doi.org/10.1186/s13046-019-1242-8

Dabin, J., Fortuny, A., Polo, S.E., 2016. Epigenome Maintenance in Response to DNA Damage. Molecular Cell 62, 712–727. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.006

Dahl, N.A., Danis, E., Balakrishnan, I., Wang, D., Pierce, A., Walker, F.M., Gilani, A., Serkova, N.J., Madhavan, K., Fosmire, S., Green, A.L., Foreman, N.K., Venkataraman, S., Vibhakar, R., 2020. Super Elongation Complex as a Targetable Dependency in Diffuse Midline Glioma. Cell Reports 31, 107485. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.049

Deland, K., Starr, B.F., Mercer, J.S., Byemerwa, J., Crabtree, D.M., Williams, N.T., Luo, L., Ma, Y., Chen, M., Becher, O.J., Kirsch, D.G., 2021. Tumor genotype dictates radiosensitization after Atm deletion in primary brainstem glioma models. Journal of Clinical Investigation 131, e142158. https://doi.org/10.1172/JCI142158

Deng, H., Zeng, J., Zhang, T., Gong, L., Zhang, H., Cheung, E., Jones, C., Li, G., 2018. Histone H3.3K27M Mobilizes Multiple Cancer/Testis (CT) Antigens in Pediatric Glioma. Molecular Cancer Research 16, 623–633. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0460

Diehn, M., Cho, R.W., Lobo, N.A., Kalisky, T., Dorie, M.J., Kulp, A.N., Qian, D., Lam, J.S., Ailles, L.E., Wong, M., Joshua, B., Kaplan, M.J., Wapnir, I., Dirbas, F.M., Somlo, G., Garberoglio, C., Paz, B., Shen, J., Lau, S.K., Quake, S.R., Brown, J.M., Weissman, I.L., Clarke, M.F., 2009. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. Nature 458, 780–783. https://doi.org/10.1038/nature07733

Dierge, E., Debock, E., Guilbaud, C., Corbet, C., Mignolet, E., Mignard, L., Bastien, E., Dessy, C., Larondelle, Y., Feron, O., 2021. Peroxidation of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in the acidic tumor environment leads to ferroptosis-mediated anticancer effects. Cell Metabolism 33, 1701-1715.e5. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.05.016

Du, J., Jiang, L., Chen, F., Hu, H., Zhou, M., 2021. Cardiac Glycoside Ouabain Exerts Anticancer Activity via Downregulation of STAT3. Front. Oncol. 11, 684316. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.684316

Duchatel, R.J., Jackson, E.R., Alvaro, F., Nixon, B., Hondermarck, H., Dun, M.D., 2019. Signal Transduction in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. Proteomics 19, 1800479. https://doi.org/10.1002/pmic.201800479

Duchatel, R.J., Mannan, A., Woldu, A.S., Hawtrey, T., Hindley, P.A., Douglas, A.M., Jackson, E.R., Findlay, I.J., Germon, Z.P., Staudt, D., Kearney, P.S., Smith, N.D., Hindley, K.E., Cain, J.E., André, N., La Madrid, A.M., Nixon, B., De Iuliis, G.N., Nazarian, J., Irish, K., Alvaro, F., Eisenstat, D.D., Beck, A., Vitanza, N.A., Mueller, S., Morris, J.C., Dun, M.D., 2021. Preclinical and clinical evaluation of German-sourced ONC201 for the treatment of H3K27M-mutant diffuse intrinsic pontine glioma. Neuro-Oncology Advances 3, vdab169. https://doi.org/10.1093/noajnl/vdab169

Dufour, C., Perbet, R., Leblond, P., Vasseur, R., Stechly, L., Pierache, A., Reyns, N., Touzet, G., Le Rhun, E., Vinchon, M., Maurage, C., Escande, F., Renaud, F., 2020. Identification of prognostic markers in diffuse midline gliomas H3K27M-mutant. Brain Pathology 30, 179–190. https://doi.org/10.1111/bpa.12768

Duman, C., Yaqubi, K., Hoffmann, A., Acikgöz, A.A., Korshunov, A., Bendszus, M., Herold-Mende, C., Liu, H.-K., Alfonso, J., 2019. Acyl-CoA-Binding Protein Drives Glioblastoma Tumorigenesis by Sustaining Fatty Acid Oxidation. Cell Metabolism 30, 274-289.e5. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.04.004

Ehteda, A., Simon, S., Franshaw, L., Giorgi, F.M., Liu, J., Joshi, S., Rouaen, J.R.C., Pang, C.N.I., Pandher, R., Mayoh, C., Tang, Y., Khan, A., Ung, C., Tolhurst, O., Kankean, A., Hayden, E., Lehmann, R., Shen, S., Gopalakrishnan, A., Trebilcock, P., Gurova, K., Gudkov, A.V., Norris, M.D., Haber, M., Vittorio, O., Tsoli, M., Ziegler, D.S., 2021. Dual targeting of the epigenome via FACT complex and histone deacetylase is a potent treatment strategy for DIPG. Cell Reports 35, 108994. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108994

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., Thorarinsdottir, H.K., Rutkauskiene, G., Calvagna, V., Drogosiewicz, M., Dragomir, M., Deak, L., Kitanovski, L., von Bueren, A.O., Kebudi, R., Slavc, I., Jacobs, S., Jadrijevic-Cvrlje, F., Entz-Werle, N., Grill, J., Kattamis, A., Hauser, P., Pears, J., Biassoni, V.,

Massimino, M., Lopez Aguilar, E., Torsvik, I.K., Joao Gil-da-Costa, M., Kumirova, E., Cruz-Martinez, O., Holm, S., Bailey, S., Hayden, T., Thomale, U.W., Janssens, G.O.R., Kramm, C.M., van Vuurden, D.G., 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

Fecher, C., Trovò, L., Müller, S.A., Snaidero, N., Wettmarshausen, J., Heink, S., Ortiz, O., Wagner, I., Kühn, R., Hartmann, J., Karl, R.M., Konnerth, A., Korn, T., Wurst, W., Merkler, D., Lichtenthaler, S.F., Perocchi, F., Misgeld, T., 2019. Cell-type-specific profiling of brain mitochondria reveals functional and molecular diversity. Nat Neurosci 22, 1731–1742. https://doi.org/10.1038/s41593-019-0479-z

Ferrari, K.J., Scelfo, A., Jammula, S., Cuomo, A., Barozzi, I., Stützer, A., Fischle, W., Bonaldi, T., Pasini, D., 2014. Polycomb-Dependent H3K27me1 and H3K27me2 Regulate Active Transcription and Enhancer Fidelity. Molecular Cell 53, 49–62. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.030

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., Haberler, C., Yizhak, K., Gojo, J., Egervari, K., Mount, C., van Galen, P., Bonal, D.M., Nguyen, Q.-D., Beck, A., Sinai, C., Czech, T., Dorfer, C., Goumnerova, L., Lavarino, C., Carcaboso, A.M., Mora, J., Mylvaganam, R., Luo, C.C., Peyrl, A., Popović, M., Azizi, A., Batchelor, T.T., Frosch, M.P., Martinez-Lage, M., Kieran, M.W., Bandopadhayay, P., Beroukhim, R., Fritsch, G., Getz, G., Rozenblatt-Rosen, O., Wucherpfennig, K.W., Louis, D.N., Monje, M., Slavc, I., Ligon, K.L., Golub, T.R., Regev, A., Bernstein, B.E., Suvà, M.L., 2018. Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq. Science 360, 331–335. https://doi.org/10.1126/science.aao4750

Findlay, I.J., De Iuliis, G.N., Duchatel, R.J., Jackson, E.R., Vitanza, N.A., Cain, J.E., Waszak, S.M., Dun, M.D., 2022. Pharmaco-proteogenomic profiling of pediatric diffuse midline glioma to inform future treatment strategies. Oncogene 41, 461–475. https://doi.org/10.1038/s41388-021-02102-y

Fnu, S., Williamson, E.A., De Haro, L.P., Brenneman, M., Wray, J., Shaheen, M., Radhakrishnan, K., Lee, S.-H., Nickoloff, J.A., Hromas, R., 2011. Methylation of histone H3 lysine 36 enhances DNA repair by nonhomologous end-joining. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 540–545. https://doi.org/10.1073/pnas.1013571108

Fontebasso, A.M., Liu, X., Sturm, D., Jabado, N., 2013. Chromatin Remodeling Defects in Pediatric and Young Adult Glioblastoma: A Tale of a Variant H istone 3 Tail. Brain Pathology 23, 210–216. https://doi.org/10.1111/bpa.12023

Fontebasso, A.M., Papillon-Cavanagh, S., Schwartzentruber, J., Nikbakht, H., Gerges, N., Fiset, P.-O., Bechet, D., Faury, D., De Jay, N., Ramkissoon, L.A., Corcoran, A., Jones, D.T.W., Sturm, D., Johann, P., Tomita, T., Goldman, S., Nagib, M., Bendel, A., Goumnerova, L., Bowers, D.C., Leonard, J.R., Rubin, J.B., Alden, T., Browd, S., Geyer, J.R., Leary, S., Jallo, G., Cohen, K., Gupta, N., Prados, M.D., Carret, A.-S., Ellezam, B., Crevier, L., Klekner, A., Bognar, L., Hauser, P., Garami, M., Myseros, J., Dong, Z., Siegel, P.M., Malkin, H., Ligon, A.H., Albrecht, S., Pfister, S.M., Ligon, K.L., Majewski, J., Jabado, N., Kieran, M.W., 2014. Recurrent somatic mutations in ACVR1 in pediatric midline high-grade astrocytoma. Nat Genet 46, 462–466. https://doi.org/10.1038/ng.2950

Franken, N.A.P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., Van Bree, C., 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. Nat Protoc 1, 2315–2319. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339

Frankenberg-Schwager, M., 1989. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. Radiotherapy and Oncology 14, 307–320. https://doi.org/10.1016/0167-8140(89)90143-6

Fu, S., Li, Z., Xiao, L., Hu, W., Zhang, L., Xie, B., Zhou, Q., He, J., Qiu, Y., Wen, M., Peng, Y., Gao, J., Tan, R., Deng, Y., Weng, L., Sun, L.-Q., 2019. Glutamine Synthetase Promotes Radiation Resistance via Facilitating Nucleotide Metabolism and Subsequent DNA Damage Repair. Cell Reports 28, 1136-1143.e4. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.002

Funato, K., Major, T., Lewis, P.W., Allis, C.D., 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

Funato, K., Smith, R.C., Saito, Y., Tabar, V., 2021. Dissecting the impact of regional identity and the oncogenic role of human-specific NOTCH2NL in an hESC model of H3.3G34R-mutant glioma. Cell Stem Cell 28, 894-905.e7. https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.02.003

Funk, O.H., Qalieh, Y., Doyle, D.Z., Lam, M.M., Kwan, K.Y., 2022. Postmitotic accumulation of histone variant H3.3 in new cortical neurons establishes neuronal chromatin, transcriptome, and identity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 119, e2116956119. https://doi.org/10.1073/pnas.2116956119

Furth, N., Algranati, D., Dassa, B., Beresh, O., Fedyuk, V., Morris, N., Kasper, L.H., Jones, D., Monje, M., Baker, S.J., Shema, E., 2022. H3-K27M-mutant nucleosomes interact with MLL1 to shape the glioma epigenetic landscape. Cell Reports 39, 110836. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110836

Gallitto, M., Lazarev, S., Wasserman, I., Stafford, J.M., Wolden, S.L., Terezakis, S.A., Bindra, R.S., Bakst, R.L., 2019. Role of Radiation Therapy in the Management of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: A Systematic Review. Adv Radiat Oncol 4, 520–531. https://doi.org/10.1016/j.adro.2019.03.009

Gates, L.A., Foulds, C.E., O'Malley, B.W., 2017. Histone Marks in the 'Driver's Seat': Functional Roles in Steering the Transcription Cycle. Trends in Biochemical Sciences 42, 977–989. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.10.004

Georgescu, M.-M., Islam, M.Z., Li, Y., Circu, M.L., Traylor, J., Notarianni, C.M., Kline, C.N., Burns, D.K., 2020. Global activation of oncogenic pathways underlies therapy resistance in diffuse midline glioma. acta neuropathol commun 8, 111. https://doi.org/10.1186/s40478-020-00992-9

Giacomini, G., Piquet, S., Chevallier, O., Dabin, J., Bai, S.-K., Kim, B., Siddaway, R., Raught, B., Coyaud, E., Shan, C.-M., Reid, R.J.D., Toda, T., Rothstein, R., Barra, V., Wilhelm, T., Hamadat, S., Bertin, C., Crane, A., Dubois, F., Forne, I., Imhof, A., Bandopadhayay, P., Beroukhim, R., Naim, V., Jia, S., Hawkins, C., Rondinelli, B., Polo, S.E., 2024. Aberrant DNA repair reveals a vulnerability in histone H3.3-mutant brain tumors. Nucleic Acids Research gkad1257. https://doi.org/10.1093/nar/gkad1257

Golbourn, B.J., Halbert, M.E., Halligan, K., Varadharajan, S., Krug, B., Mbah, N.E., Kabir, N., Stanton, A.-C.J., Locke, A.L., Casillo, S.M., Zhao, Y., Sanders, L.M., Cheney, A., Mullett, S.J., Chen, A., Wassell, M., Andren, A., Perez, J., Jane, E.P., Premkumar, D.R.D., Koncar, R.F., Mirhadi, S., McCarl, L.H., Chang, Y.-F., Wu, Y.L., Gatesman, T.A., Cruz, A.F., Zapotocky, M., Hu, B., Kohanbash, G., Wang, X., Vartanian, A., Moran, M.F., Lieberman, F., Amankulor, N.M., Wendell, S.G., Vaske, O.M., Panigrahy, A., Felker, J., Bertrand, K.C., Kleinman, C.L., Rich, J.N., Friedlander, R.M., Broniscer, A., Lyssiotis, C., Jabado, N., Pollack, I.F., Mack, S.C., Agnihotri, S., 2022. Loss of MAT2A compromises methionine metabolism and represents a vulnerability in H3K27M mutant glioma by modulating the epigenome. Nat Cancer 3, 629–648. https://doi.org/10.1038/s43018-022-00348-3

Goto, H., Kasahara, K., Inagaki, M., 2015. Novel Insights into Chk1 Regulation by Phosphorylation. Cell Struct. Funct. 40, 43–50. https://doi.org/10.1247/csf.14017

Goudelock, D.M., Jiang, K., Pereira, E., Russell, B., Sanchez, Y., 2003. Regulatory Interactions between the Checkpoint Kinase Chk1 and the Proteins of the DNA-dependent Protein Kinase Complex. Journal of Biological Chemistry 278, 29940–29947. https://doi.org/10.1074/jbc.M301765200

Granzotto, A., Benadjaoud, M.A., Vogin, G., Devic, C., Ferlazzo, M.L., Bodgi, L., Pereira, S., Sonzogni, L., Forcheron, F., Viau, M., Etaix, A., Malek, K., Mengue-Bindjeme, L., Escoffier, C., Rouvet, I., Zabot, M.-T., Joubert, A., Vincent, A., Venezia, N.D., Bourguignon, M., Canat, E.-P., d'Hombres, A., Thébaud, E., Orbach, D., Stoppa-Lyonnet, D., Radji, A., Doré, E., Pointreau, Y., Bourgier, C., Leblond, P., Defachelles, A.-S., Lervat, C., Guey, S., Feuvret, L., Gilsoul, F., Berger, C., Moncharmont, C., De Laroche, G., Moreau-Claeys, M.-V., Chavaudra, N., Combemale, P., Biston, M.-C., Malet, C., Martel-Lafay, I., Laude, C., Hau-Desbat, N.-H., Zioueche, A., Tanguy, R., Sunyach, M.-P., Racadot, S., Pommier, P., Claude, L., Baleydier, F., Fleury, B., De Crevoisier, R., Simon, J.-M., Verrelle, P., Peiffert, D., Belkacemi, Y., Bourhis, J., Lartigau, E., Carrie, C., De Vathaire, F., Eschwege, F., Puisieux, A., Lagrange, J.-L., Balosso, J., Foray, N., 2016. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics 94, 450–460. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.11.013

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., Ponnuswami, A., Chen, S., Johung, T.B., Sun, W., Kogiso, M., Du, Y., Qi, L., Huang, Y., Hütt-Cabezas,

M., Warren, K.E., Le Dret, L., Meltzer, P.S., Mao, H., Quezado, M., Van Vuurden, D.G., Abraham, J., Fouladi, M., Svalina, M.N., Wang, N., Hawkins, C., Nazarian, J., Alonso, M.M., Raabe, E.H., Hulleman, E., Spellman, P.T., Li, X.-N., Keller, C., Pal, R., Grill, J., Monje, M., 2015. Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. Nat Med 21, 555–559. https://doi.org/10.1038/nm.3855

Greer, E.L., Shi, Y., 2012. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. Nat Rev Genet 13, 343–357. https://doi.org/10.1038/nrg3173

Grill, J., Le Teuff, G., Varlet, P., Hargrave, D.R., Nysom, K., Blomgrenn, K., McCowage, G.B., Bautista, F., Van Vuurden, D., Debily, M.-A., Kergrohen, T., Puget, S., Bolle, S., Abbou, S., Leblond, P., Boddaert, N., Vassal, G., Le Deley, M.-C., 2023. Biological medicines for diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG) eradication (BIOMEDE): Final results of an international randomized phase II platform trial comparing 3 targeted therapies in combination with radiotherapy from ITCC, SIOPE-Brain and ANZCHOG. JCO 41, 10003–10003. https://doi.org/10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.10003

Gunawan, M., Venkatesan, N., Loh, J.T., Wong, J.F., Berger, H., Neo, W.H., Li, L.Y.J., La Win, M.K., Yau, Y.H., Guo, T., See, P.C.E., Yamazaki, S., Chin, K.C., Gingras, A.R., Shochat, S.G., Ng, L.G., Sze, S.K., Ginhoux, F., Su, I., 2015. The methyltransferase Ezh2 controls cell adhesion and migration through direct methylation of the extranuclear regulatory protein talin. Nat Immunol 16, 505–516. https://doi.org/10.1038/ni.3125

Haag, D., Mack, N., Benites Goncalves Da Silva, P., Statz, B., Clark, J., Tanabe, K., Sharma, T., Jäger, N., Jones, D.T.W., Kawauchi, D., Wernig, M., Pfister, S.M., 2021. H3.3-K27M drives neural stem cell-specific gliomagenesis in a human iPSC-derived model. Cancer Cell 39, 407-422.e13. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.01.005

Han, H.J., Jain, P., Resnick, A.C., 2018. Shared ACVR1 mutations in FOP and DIPG: Opportunities and challenges in extending biological and clinical implications across rare diseases. Bone 109, 91–100. https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.08.001

Hanahan, D., 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discovery 12, 31–46. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059

Hargrave, D., Bartels, U., Bouffet, E., 2006. Diffuse brainstem glioma in children: critical review of clinical trials. The Lancet Oncology 7, 241–248. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70615-5

Harpaz, N., Mittelman, T., Beresh, O., Griess, O., Furth, N., Salame, T.-M., Oren, R., Fellus-Alyagor, L., Harmelin, A., Alexandrescu, S., Marques, J.G., Filbin, M.G., Ron, G., Shema, E., 2022. Single-cell epigenetic analysis reveals principles of chromatin states in H3.3-K27M gliomas. Molecular Cell 82, 2696-2713.e9. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.023

Harutyunyan, A.S., Chen, H., Lu, T., Horth, C., Nikbakht, H., Krug, B., Russo, C., Bareke, E., Marchione, D.M., Coradin, M., Garcia, B.A., Jabado, N., Majewski, J., 2020. H3K27M in Gliomas Causes a One-Step Decrease in H3K27 Methylation and Reduced Spreading within the Constraints of H3K36 Methylation. Cell Reports 33, 108390. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108390

Harutyunyan, A.S., Krug, B., Chen, H., Papillon-Cavanagh, S., Zeinieh, M., De Jay, N., Deshmukh, S., Chen, C.C.L., Belle, J., Mikael, L.G., Marchione, D.M., Li, R., Nikbakht, H., Hu, B., Cagnone, G., Cheung, W.A., Mohammadnia, A., Bechet, D., Faury, D., McConechy, M.K., Pathania, M., Jain, S.U., Ellezam, B., Weil, A.G., Montpetit, A., Salomoni, P., Pastinen, T., Lu, C., Lewis, P.W., Garcia, B.A., Kleinman, C.L., Jabado, N., Majewski, J., 2019. H3K27M induces defective chromatin spread of PRC2-mediated repressive H3K27me2/me3 and is essential for glioma tumorigenesis. Nat Commun 10, 1262. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09140-x

Hashizume, R., Andor, N., Ihara, Y., Lerner, R., Gan, H., Chen, X., Fang, D., Huang, X., Tom, M.W., Ngo, V., Solomon, D., Mueller, S., Paris, P.L., Zhang, Z., Petritsch, C., Gupta, N., Waldman, T.A., James, C.D., 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

Healy, E., Mucha, M., Glancy, E., Fitzpatrick, D.J., Conway, E., Neikes, H.K., Monger, C., Van Mierlo, G., Baltissen, M.P., Koseki, Y., Vermeulen, M., Koseki, H., Bracken, A.P., 2019. PRC2.1 and PRC2.2 Synergize to Coordinate H3K27 Trimethylation. Molecular Cell 76, 437-452.e6. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.012

Hegi, M.E., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Kros, J.M., Mariani, L., Mirimanoff, R.O., Stupp, R., 2005. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. The New England Journal of Medicine.

Henikoff, S., Furuyama, T., Ahmad, K., 2004. Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. Trends in Genetics 20, 320–326. https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.05.004

Henikoff, S., Shilatifard, A., 2011. Histone modification: cause or cog? Trends in Genetics 27, 389–396. https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.06.006

Hoeman, C.M., Cordero, F.J., Hu, G., Misuraca, K., Romero, M.M., Cardona, H.J., Nazarian, J., Hashizume, R., McLendon, R., Yu, P., Procissi, D., Gadd, S., Becher, O.J., 2019. ACVR1 R206H cooperates with H3.1K27M in promoting diffuse intrinsic pontine glioma pathogenesis. Nat Commun 10, 1023. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08823-9

Hübner, J.-M., Müller, T., Papageorgiou, D.N., Mauermann, M., Krijgsveld, J., Russell, R.B., Ellison, D.W., Pfister, S.M., Pajtler, K.W., Kool, M., 2019. EZHIP/CXorf67 mimics K27M mutated oncohistones and functions as an intrinsic inhibitor of PRC2 function in aggressive posterior fossa ependymoma. Neuro-Oncology 21, 878–889. https://doi.org/10.1093/neuonc/noz058

Huchedé, P., Meyer, S., Berthelot, C., Hamadou, M., Bertrand-Chapel, A., Rakotomalala, A., Manceau, L., Tomine, J., Lespinasse, N., Lewandowski, P., Cordier-Bussat, M., Broutier, L., Dutour, A., Rochet, I., Blay, J.-Y., Degletagne, C., Attignon, V., Montero-Carcaboso, A., Grand, M.L., Pasquier, E., Vasiljevic, A., Gilardi-Hebenstreit, P., Meignan, S., Leblond, P., Ribes, V., Cosset, E., Castets, M., 2023. BMP2 and BMP7 cooperate with H3.3K27M to promote quiescence and invasiveness in pediatric diffuse midline gliomas (preprint). Cancer Biology. https://doi.org/10.1101/2023.08.09.552628

Ioannou, M.S., Jackson, J., Sheu, S.-H., Chang, C.-L., Weigel, A.V., Liu, H., Pasolli, H.A., Xu, C.S., Pang, S., Matthies, D., Hess, H.F., Lippincott-Schwartz, J., Liu, Z., 2019. Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling Protects against Activity-Induced Fatty Acid Toxicity. Cell 177, 1522-1535.e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.001

Ishizawa, J., Zarabi, S.F., Davis, R.E., Halgas, O., Nii, T., Jitkova, Y., Zhao, R., St-Germain, J., Heese, L.E., Egan, G., Ruvolo, V.R., Barghout, S.H., Nishida, Y., Hurren, R., Ma, W., Gronda, M., Link, T., Wong, K., Mabanglo, M., Kojima, K., Borthakur, G., MacLean, N., Ma, M.C.J., Leber, A.B., Minden, M.D., Houry, W., Kantarjian, H., Stogniew, M., Raught, B., Pai, E.F., Schimmer, A.D., Andreeff, M., 2019. Mitochondrial ClpP-Mediated Proteolysis Induces Selective Cancer Cell Lethality. Cancer Cell 35, 721-737.e9. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.03.014

Izquierdo, E., Carvalho, D.M., Mackay, A., Temelso, S., Boult, J.K.R., Pericoli, G., Fernandez, E., Das, M., Molinari, V., Grabovska, Y., Rogers, R.F., Ajmone-Cat, M.A., Proszek, P.Z., Stubbs, M., Depani, S., O'Hare, P., Yu, L., Roumelioti, G., Choudhary, J.S., Clarke, M., Fairchild, A.R., Jacques, T.S., Grundy, R.G., Howell, L., Picton, S., Adamski, J., Wilson, S., Gray, J.C., Zebian, B., Marshall, L.V., Carceller, F., Grill, J., Vinci, M., Robinson, S.P., Hubank, M., Hargrave, D., Jones, C., 2022. DIPG Harbors Alterations Targetable by MEK Inhibitors, with Acquired Resistance Mechanisms Overcome by Combinatorial Inhibition. Cancer Discovery 12, 712–729. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0930

Jackson, E.R., Duchatel, R.J., Staudt, D.E., Persson, M.L., Mannan, A., Yadavilli, S., Parackal, S., Game, S., Chong, W.C., Jayasekara, W.S.N., Grand, M.L., Kearney, P.S., Douglas, A.M., Findlay, I.J., Germon, Z.P., McEwen, H.P., Beitaki, T.S., Patabendige, A., Skerrett-Byrne, D.A., Nixon, B., Smith, N.D., Day, B., Manoharan, N., Nagabushan, S., Hansford, J.R., Govender, D., McCowage, G.B., Firestein, R., Howlett, M., Endersby, R., Gottardo, N.G., Alvaro, F., Waszak, S.M., Larsen, M.R., Colino-Sanguino, Y., Valdes-Mora, F., Rakotomalala, A., Meignan, S., Pasquier, E., André, N., Hulleman, E., Eisenstat, D.D., Vitanza, N.A., Nazarian, J., Koschmann, C., Mueller, S., Cain, J.E., Dun, M.D., 2023. ONC201 in Combination with Paxalisib for the Treatment of H3K27-Altered Diffuse Midline Glioma. Cancer Research 83, 2421–2437. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-23-0186

Jain, S.U., Do, T.J., Lund, P.J., Rashoff, A.Q., Diehl, K.L., Cieslik, M., Bajic, A., Juretic, N., Deshmukh, S., Venneti, S., Muir, T.W., Garcia, B.A., Jabado, N., Lewis, P.W., 2019. PFA ependymoma-associated protein EZHIP inhibits PRC2 activity through a H3 K27M-like mechanism. Nat Commun 10, 2146. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09981-6

Jain, S.U., Khazaei, S., Marchione, D.M., Lundgren, S.M., Wang, X., Weinberg, D.N., Deshmukh, S., Juretic, N., Lu, C., Allis, C.D., Garcia, B.A., Jabado, N., Lewis, P.W., 2020a. Histone H3.3 G34 mutations promote aberrant PRC2 activity and drive tumor progression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 117, 27354–27364. https://doi.org/10.1073/pnas.2006076117

Jain, S.U., Rashoff, A.Q., Krabbenhoft, S.D., Hoelper, D., Do, T.J., Gibson, T.J., Lundgren, S.M., Bondra, E.R., Deshmukh, S., Harutyunyan, A.S., Juretic, N., Jabado, N., Harrison, M.M., Lewis, P.W., 2020b. H3 K27M and EZHIP Impede H3K27-Methylation Spreading by Inhibiting Allosterically Stimulated PRC2. Molecular Cell 80, 726-735.e7. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.09.028

Jalali, R., Raut, N., Arora, B., Gupta, T., Dutta, D., Munshi, A., Sarin, R., Kurkure, P., 2010. Prospective Evaluation of Radiotherapy With Concurrent and Adjuvant Temozolomide in Children With Newly Diagnosed Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics 77, 113–118. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.04.031

Jane, E.P., Premkumar, D.R., Thambireddy, S., Golbourn, B., Agnihotri, S., Bertrand, K.C., Mack, S.C., Myers, M.I., Chattopadhyay, A., Taylor, D.L., Schurdak, M.E., Stern, A.M., Pollack, I.F., 2020. Targeting NAD+ Biosynthesis Overcomes Panobinostat and Bortezomib-Induced Malignant Glioma Resistance. Molecular Cancer Research 18, 1004–1017. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0669

Jane, E.P., Reslink, M.C., Gatesman, T.A., Halbert, M.E., Miller, T.A., Golbourn, B.J., Casillo, S.M., Mullett, S.J., Wendell, S.G., Obodo, U., Mohanakrishnan, D., Dange, R., Michealraj, A., Brenner, C., Agnihotri, S., Premkumar, D.R., Pollack, I.F., 2023. Targeting mitochondrial energetics reverses panobinostat- and marizomib-induced resistance in pediatric and adult high-grade gliomas. Molecular Oncology 1878–0261.13427. https://doi.org/10.1002/1878-0261.13427

Jessa, S., Mohammadnia, A., Harutyunyan, A.S., Hulswit, M., Varadharajan, S., Lakkis, H., Kabir, N., Bashardanesh, Z., Hébert, S., Faury, D., Vladoiu, M.C., Worme, S., Coutelier, M., Krug, B., Faria Andrade, A., Pathania, M., Bajic, A., Weil, A.G., Ellezam, B., Atkinson, J., Dudley, R.W.R., Farmer, J.-P., Perreault, S., Garcia, B.A., Larouche, V., Blanchette, M., Garzia, L., Bhaduri, A., Ligon, K.L., Bandopadhayay, P., Taylor, M.D., Mack, S.C., Jabado, N., Kleinman, C.L., 2022. K27M in canonical and noncanonical H3 variants occurs in distinct oligodendroglial cell lineages in brain midline gliomas. Nat Genet 54, 1865–1880. https://doi.org/10.1038/s41588-022-01205-w

Jones, C., 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., Hargrave, D., Haas-Kogan, D.A., Jabado, N., Li, X.-N., Mueller, S., Nicolaides, T., Packer, R.J., Persson, A.I., Phillips, J.J., Simonds, E.F., Stafford, J.M., Tang, Y., Pfister, S.M., Weiss, W.A., 2016. Pediatric high-grade glioma: biologically and clinically in need of new thinking. Neuro Oncol now101. https://doi.org/10.1093/neuonc/now101

Jones, C., Perryman, L., Hargrave, D., 2012. Paediatric and adult malignant glioma: close relatives or distant cousins? Nat Rev Clin Oncol 9, 400–413. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.87

Jovanovich, N., Habib, A., Head, J., Hameed, F., Agnihotri, S., Zinn, P.O., 2023. Pediatric diffuse midline glioma: Understanding the mechanisms and assessing the next generation of personalized therapeutics. Neuro-Oncology Advances 5, vdad040. https://doi.org/10.1093/noajnl/vdad040

Justin, N., Zhang, Y., Tarricone, C., Martin, S.R., Chen, S., Underwood, E., De Marco, V., Haire, L.F., Walker, P.A., Reinberg, D., Wilson, J.R., Gamblin, S.J., 2016. Structural basis of oncogenic histone H3K27M inhibition of human polycomb repressive complex 2. Nat Commun 7, 11316. https://doi.org/10.1038/ncomms11316

Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., Leiserson, M.D.M., Miller, C.A., Welch, J.S., Walter, M.J., Wendl, M.C., Ley, T.J., Wilson, R.K., Raphael, B.J., Ding, L., 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. Nature 502, 333–339. https://doi.org/10.1038/nature12634

Kant, S., Kesarwani, P., Prabhu, A., Graham, S.F., Buelow, K.L., Nakano, I., Chinnaiyan, P., 2020. Enhanced fatty acid oxidation provides glioblastoma cells metabolic plasticity to accommodate to its dynamic nutrient microenvironment. Cell Death Dis 11, 253. https://doi.org/10.1038/s41419-020-2449-5

Karakaidos, P., Karagiannis, D., Rampias, T., 2020. Resolving DNA Damage: Epigenetic Regulation of DNA Repair. Molecules 25, 2496. https://doi.org/10.3390/molecules25112496

Karremann, M., Gielen, G.H., Hoffmann, M., Wiese, M., Colditz, N., Warmuth-Metz, M., Bison, B., Claviez, A., Van Vuurden, D.G., Von Bueren, A.O., Gessi, M., Kühnle, I., Hans, V.H., Benesch, M., Sturm, D., Kortmann, R.-D., Waha, A., Pietsch, T., Kramm, C.M., 2018. Diffuse high-grade gliomas with H3 K27M mutations carry a dismal prognosis independent of tumor location. Neuro-Oncology 20, 123–131. https://doi.org/10.1093/neuonc/nox149

Kasper, L.H., Baker, S.J., 2020. Invited Review: Emerging functions of histone H3 mutations in paediatric diffuse high-grade gliomas. Neuropathology Appl Neurobio 46, 73–85. https://doi.org/10.1111/nan.12591

Katagi, H., Louis, N., Unruh, D., Sasaki, T., He, X., Zhang, A., Ma, Q., Piunti, A., Shimazu, Y., Lamano, J.B., Carcaboso, A.M., Tian, X., Seluanov, A., Gorbunova, V., Laurie, K.L., Kondo, A., Wadhwani, N.R., Lulla, R., Goldman, S., Venneti, S., Becher, O.J., Zou, L., Shilatifard, A., Hashizume, R., 2019. Radiosensitization by Histone H3 Demethylase Inhibition in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. Clinical Cancer Research 25, 5572–5583. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3890

Kaur, E., Nair, J., Ghorai, A., Mishra, S.V., Achareker, A., Ketkar, M., Sarkar, D., Salunkhe, S., Rajendra, J., Gardi, N., Desai, S., Iyer, P., Thorat, R., Dutt, A., Moiyadi, A., Dutt, S., 2020. Inhibition of SETMAR–H3K36me2–NHEJ repair axis in residual disease cells prevents glioblastoma recurrence. Neuro-Oncology 22, 1785–1796. https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa128

Keane, L., Cheray, M., Saidi, D., Kirby, C., Friess, L., Gonzalez-Rodriguez, P., Gerdes, M.E., Grabert, K., McColl, B.W., Joseph, B., 2021. Inhibition of microglial EZH2 leads to anti-tumoral effects in pediatric diffuse midline gliomas. Neuro-Oncology Advances 3, vdab096. https://doi.org/10.1093/noajnl/vdab096

Khadka, P., Reitman, Z.J., Lu, S., Buchan, G., Gionet, G., Dubois, F., Carvalho, D.M., Shih, J., Zhang, S., Greenwald, N.F., Zack, T., Shapira, O., Pelton, K., Hartley, R., Bear, H., Georgis, Y., Jarmale, S., Melanson, R., Bonanno, K., Schoolcraft, K., Miller, P.G., Condurat, A.L., Gonzalez, E.M., Qian, K., Morin, E., Langhnoja, J., Lupien, L.E., Rendo, V., Digiacomo, J., Wang, D., Zhou, K., Kumbhani, R., Guerra Garcia, M.E., Sinai, C.E., Becker, S., Schneider, R., Vogelzang, J., Krug, K., Goodale, A., Abid, T., Kalani, Z., Piccioni, F., Beroukhim, R., Persky, N.S., Root, D.E., Carcaboso, A.M., Ebert, B.L., Fuller, C., Babur, O., Kieran, M.W., Jones, C., Keshishian, H., Ligon, K.L., Carr, S.A., Phoenix, T.N., Bandopadhayay, P., 2022. PPM1D mutations are oncogenic drivers of de novo diffuse midline glioma formation. Nat Commun 13, 604. https://doi.org/10.1038/s41467-022-28198-8

Khan, D.H., Mullokandov, M., Wu, Y., Voisin, V., Gronda, M., Hurren, R., Wang, X., MacLean, N., Jeyaraju, D.V., Jitkova, Y., Xu, G.W., Laister, R., Seneviratne, A., Blatman, Z.M., Ketela, T., Bader, G.D., Marhon, S.A., De Carvalho, D.D., Minden, M.D., Gross, A., Schimmer, A.D., 2020. Mitochondrial carrier homolog 2 is necessary for AML survival. Blood 136, 81–92. https://doi.org/10.1182/blood.2019000106

Khuong-Quang, D.-A., Buczkowicz, P., Rakopoulos, P., Liu, X.-Y., Fontebasso, A.M., Bouffet, E., Bartels, U., Albrecht, S., Schwartzentruber, J., Letourneau, L., Bourgey, M., Bourque, G., Montpetit, A., Bourret, G., Lepage, P., Fleming, A., Lichter, P., Kool, M., Von Deimling, A., Sturm, D., Korshunov, A., Faury, D., Jones, D.T., Majewski, J., Pfister, S.M., Jabado, N., Hawkins, C., 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, H.J., Suh, C.-O., 2023. Radiotherapy for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: Insufficient but Indispensable. Brain Tumor Res Treat 11, 79. https://doi.org/10.14791/btrt.2022.0041

Kim, J.W., Lee, J.-Y., Oh, M., Lee, E.-W., 2023. An integrated view of lipid metabolism in ferroptosis revisited via lipidomic analysis. Exp Mol Med 55, 1620–1631. https://doi.org/10.1038/s12276-023-01077-y

Kinnaird, A., Zhao, S., Wellen, K.E., Michelakis, E.D., 2016. Metabolic control of epigenetics in cancer. Nat Rev Cancer 16, 694–707. https://doi.org/10.1038/nrc.2016.82

Klasson, T.D., LaGory, E.L., Zhao, H., Huynh, S.K., Papandreou, I., Moon, E.J., Giaccia, A.J., 2022. ACSL3 regulates lipid droplet biogenesis and ferroptosis sensitivity in clear cell renal cell carcinoma. Cancer Metab 10, 14. https://doi.org/10.1186/s40170-022-00290-z

Klein, R.H., Knoepfler, P.S., 2023. Knockout tales: the versatile roles of histone H3.3 in development and disease. Epigenetics & Chromatin 16, 38. https://doi.org/10.1186/s13072-023-00512-8

Knobloch, M., Pilz, G.-A., Ghesquière, B., Kovacs, W.J., Wegleiter, T., Moore, D.L., Hruzova, M., Zamboni, N., Carmeliet, P., Jessberger, S., 2017. A Fatty Acid Oxidation-Dependent Metabolic Shift Regulates Adult Neural Stem Cell Activity. Cell Reports 20, 2144–2155. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.029

Koncar, R.F., Dey, B.R., Stanton, A.-C.J., Agrawal, N., Wassell, M.L., McCarl, L.H., Locke, Abigail.L., Sanders, L., Morozova-Vaske, O., Myers, M.I., Hamilton, R.L., Carcaboso, A.M., Kohanbash, G., Hu, B., Amankulor, N.M., Felker, J., Kambhampati, M., Nazarian, J., Becher, O.J., James, C.D., Hashizume, R., Broniscer, A., Pollack, I.F., Agnihotri, S., 2019. Identification of Novel RAS Signaling Therapeutic Vulnerabilities in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas. Cancer Research 79, 4026–4041. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3521

Kopan, R., Ilagan, Ma.X.G., 2009. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. Cell 137, 216–233. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.045

Koschmann, C., Calinescu, A.-A., Nunez, F.J., Mackay, A., Fazal-Salom, J., Thomas, D., Mendez, F., Kamran, N., Dzaman, M., Mulpuri, L., Krasinkiewicz, J., Doherty, R., Lemons, R., Brosnan-Cashman, J.A., Li, Y., Roh, S., Zhao, L., Appelman, H., Ferguson, D., Gorbunova, V., Meeker, A., Jones, C., Lowenstein, P.R., Castro, M.G., 2016. ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma. Sci. Transl. Med. 8. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac8228

Krug, B., De Jay, N., Harutyunyan, A.S., Deshmukh, S., Marchione, D.M., Guilhamon, P., Bertrand, K.C., Mikael, L.G., McConechy, M.K., Chen, C.C.L., Khazaei, S., Koncar, R.F., Agnihotri, S., Faury, D., Ellezam, B., Weil, A.G., Ursini-Siegel, J., De Carvalho, D.D., Dirks, P.B., Lewis, P.W., Salomoni, P., Lupien, M., Arrowsmith, C., Lasko, P.F., Garcia, B.A., Kleinman, C.L., Jabado, N., Mack, S.C., 2019. Pervasive H3K27 Acetylation Leads to ERV Expression and a Therapeutic Vulnerability in H3K27M Gliomas. Cancer Cell 35, 782-797.e8. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.04.004

Lapin, D.H., Tsoli, M., Ziegler, D.S., 2017. Genomic Insights into Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. Front. Oncol. 7. https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00057

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., Xu, R., Zhu, X., Zhang, Junyuan, Russell, H.R., Peters, J.L., Finkelstein, D., Xu, B., Lin, T., Tinkle, C.L., Patay, Z., Onar-Thomas, A., Pounds, S.B., McKinnon, P.J., Ellison, D.W., Zhang, Jinghui, Baker, S.J., 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

Laugesen, A., Højfeldt, J.W., Helin, K., 2016. Role of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) in Transcriptional Regulation and Cancer. Cold Spring Harb Perspect Med 6, a026575. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026575

Lee, C.-H., Yu, J.-R., Granat, J., Saldaña-Meyer, R., Andrade, J., LeRoy, G., Jin, Y., Lund, P., Stafford, J.M., Garcia, B.A., Ueberheide, B., Reinberg, D., 2019. Automethylation of PRC2 promotes H3K27 methylation and is impaired in H3K27M pediatric glioma. Genes Dev. 33, 1428–1440. https://doi.org/10.1101/gad.328773.119

Lei, G., Zhang, Y., Koppula, P., Liu, X., Zhang, J., Lin, S.H., Ajani, J.A., Xiao, Q., Liao, Z., Wang, H., Gan, B., 2020. The role of ferroptosis in ionizing radiation-induced cell death and tumor suppression. Cell Res 30, 146–162. https://doi.org/10.1038/s41422-019-0263-3

Leszczynska, K.B., Jayaprakash, C., Kaminska, B., Mieczkowski, J., 2021. Emerging Advances in Combinatorial Treatments of Epigenetically Altered Pediatric High-Grade H3K27M Gliomas. Front. Genet. 12, 742561. https://doi.org/10.3389/fgene.2021.742561

Lewis, N.A., Klein, R.H., Kelly, C., Yee, J., Knoepfler, P.S., 2022. Histone H3.3 K27M chromatin functions implicate a network of neurodevelopmental factors including ASCL1 and NEUROD1 in DIPG. Epigenetics & Chromatin 15, 18. https://doi.org/10.1186/s13072-022-00447-6

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., 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, W., Long, Q., Wu, H., Zhou, Y., Duan, L., Yuan, H., Ding, Y., Huang, Y., Wu, Y., Huang, J., Liu, D., Chen, B., Zhang, J., Qi, J., Du, S., Li, L., Liu, Y., Ruan, Z., Liu, Zihuang, Liu, Zichao, Zhao, Y., Lu, J., Wang, J., Chan, W.-Y., Liu, X., 2022. Nuclear localization of mitochondrial TCA cycle enzymes modulates pluripotency via histone acetylation. Nat Commun 13, 7414. https://doi.org/10.1038/s41467-022-35199-0

Li, Y.-J., Zhang, C., Martincuks, A., Herrmann, A., Yu, H., 2023. STAT proteins in cancer: orchestration of metabolism. Nat Rev Cancer 23, 115–134. https://doi.org/10.1038/s41568-022-00537-3

Lieberman, N.A.P., DeGolier, K., Kovar, H.M., Davis, A., Hoglund, V., Stevens, J., Winter, C., Deutsch, G., Furlan, S.N., Vitanza, N.A., Leary, S.E.S., Crane, C.A., 2019. Characterization of the immune microenvironment of diffuse intrinsic pontine glioma: implications for development of immunotherapy. Neuro-Oncology 21, 83–94. https://doi.org/10.1093/neuonc/noy145

Lin, G.L., Nagaraja, S., Filbin, M.G., Suvà, M.L., Vogel, H., Monje, M., 2018. Non-inflammatory tumor microenvironment of diffuse intrinsic pontine glioma. acta neuropathol commun 6, 51. https://doi.org/10.1186/s40478-018-0553-x

Lin, G.L., Wilson, K.M., Ceribelli, M., Stanton, B.Z., Woo, P.J., Kreimer, S., Qin, E.Y., Zhang, X., Lennon, J., Nagaraja, S., Morris, P.J., Quezada, M., Gillespie, S.M., Duveau, D.Y., Michalowski, A.M., Shinn, P., Guha, R., Ferrer, M., Klumpp-Thomas, C., Michael, S., McKnight, C., Minhas, P., Itkin, Z., Raabe, E.H., Chen, L., Ghanem, R., Geraghty, A.C., Ni, L., Andreasson, K.I., Vitanza, N.A., Warren, K.E., Thomas, C.J., Monje, M., 2019. Therapeutic strategies for diffuse midline glioma from high-throughput combination drug screening. Sci. Transl. Med. 11, eaaw0064. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw0064

Lin, H., Patel, S., Affleck, V.S., Wilson, I., Turnbull, D.M., Joshi, A.R., Maxwell, R., Stoll, E.A., 2017. Fatty acid oxidation is required for the respiration and proliferation of malignant glioma cells. Neuro-Oncology 19, 43–54. https://doi.org/10.1093/neuonc/now128

Lobon-Iglesias, M.J., Giraud, G., Castel, D., Philippe, C., Debily, M.A., Briandet, C., Fouyssac, F., De Carli, E., Dufour, C., Valteau-Couanet, D., Sainte-Rose, C., Blauwblomme, T., Beccaria, K., Zerah, M., Puget, S., Calmon, R., Boddaert, N., Bolle, S., Varlet, P., Grill, J., 2018. Diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) at recurrence: is there a window to test new therapies in some patients? J Neurooncol 137, 111–118. https://doi.org/10.1007/s11060-017-2702-7

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P., 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Acta Neuropathol 114, 97–109. https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4

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., 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., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D.J., Cree, I.A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H.K., Pfister, S.M., Reifenberger, G., Soffietti, R., Von Deimling, A., Ellison, D.W., 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., Partridge, J.F., 2019. Histone H3 Mutations: An Updated View of Their Role in Chromatin Deregulation and Cancer. Cancers 11, 660. https://doi.org/10.3390/cancers11050660

Lu, C., Jain, S.U., Hoelper, D., Bechet, D., Molden, R.C., Ran, L., Murphy, D., Venneti, S., Hameed, M., Pawel, B.R., Wunder, J.S., Dickson, B.C., Lundgren, S.M., Jani, K.S., De Jay, N., Papillon-Cavanagh, S., Andrulis, I.L., Sawyer, S.L., Grynspan, D., Turcotte, R.E., Nadaf, J., Fahiminiyah, S., Muir, T.W., Majewski, J., Thompson, C.B., Chi, P., Garcia, B.A., Allis, C.D., Jabado, N., Lewis, P.W., 2016. Histone H3K36 mutations promote sarcomagenesis through altered histone methylation landscape. Science 352, 844–849. https://doi.org/10.1126/science.aac7272

Lu, V.M., Welby, J.P., Mahajan, A., Laack, N.N., Daniels, D.J., 2019. Reirradiation for diffuse intrinsic pontine glioma: a systematic review and meta-analysis. Childs Nerv Syst 35, 739–746. https://doi.org/10.1007/s00381-019-04118-y

Luijsterburg, M.S., de Krijger, I., Wiegant, W.W., Shah, R.G., Smeenk, G., de Groot, A.J.L., Pines, A., Vertegaal, A.C.O., Jacobs, J.J.L., Shah, G.M., van Attikum, H., 2016. PARP1 Links CHD2-Mediated Chromatin Expansion and H3.3 Deposition to DNA Repair by Non-homologous End-Joining. Molecular Cell 61, 547–562. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.019

Lytle, N.K., Barber, A.G., Reya, T., 2018. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. Nat Rev Cancer 18, 669–680. https://doi.org/10.1038/s41568-018-0056-x

Ma, Y., Zha, J., Yang, X., Li, Q., Zhang, Q., Yin, A., Beharry, Z., Huang, H., Huang, J., Bartlett, M., Ye, K., Yin, H., Cai, H., 2021. Long-chain fatty acyl-CoA synthetase 1 promotes prostate cancer progression by elevation of lipogenesis and fatty acid beta-oxidation. Oncogene 40, 1806–1820. https://doi.org/10.1038/s41388-021-01667-y

Macedo-Silva, C., Miranda-Gonçalves, V., Lameirinhas, A., Lencart, J., Pereira, A., Lobo, J., Guimarães, R., Martins, A.T., Henrique, R., Bravo, I., Jerónimo, C., 2020. JmjC-KDMs KDM3A and KDM6B modulate radioresistance under hypoxic conditions in esophageal squamous cell carcinoma. Cell Death Dis 11, 1068. https://doi.org/10.1038/s41419-020-03279-y

Mackay, A., Burford, A., Carvalho, D., Izquierdo, E., Fazal-Salom, J., Taylor, K.R., Bjerke, L., Clarke, M., Vinci, M., Nandhabalan, M., Temelso, S., Popov, S., Molinari, V., Raman, P., Waanders, A.J., Han, H.J., Gupta, S., Marshall, L., Zacharoulis, S., Vaidya, S., Mandeville, H.C., Bridges, L.R., Martin, A.J., Al-Sarraj, S., Chandler, C., Ng, H.-K., Li, X., Mu, K., Trabelsi, S., Brahim, D.H.-B., Kisljakov, A.N., Konovalov, D.M., Moore, A.S., Carcaboso, A.M., Sunol, M., De Torres, C., Cruz, O., Mora, J., Shats, L.I., Stavale, J.N., Bidinotto, L.T., Reis, R.M., Entz-Werle, N., Farrell, M., Cryan, J., Crimmins, D., Caird, J., Pears, J., Monje, M., Debily, M.-A., Castel, D., Grill, J., Hawkins, C., Nikbakht, H., Jabado, N., Baker, S.J., Pfister, S.M., Jones, D.T.W., Fouladi, M., Von Bueren, A.O., Baudis, M., Resnick, A., Jones, C., 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

Marchetti, P., Fovez, Q., Germain, N., Khamari, R., Kluza, J., 2020. Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. FASEB j. 34, 13106–13124. https://doi.org/10.1096/fj.202000767R

Martínez-Reyes, I., Chandel, N.S., 2020. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. Nat Commun 11, 102. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3

Martz, C.A., Ottina, K.A., Singleton, K.R., Jasper, J.S., Wardell, S.E., Peraza-Penton, A., Anderson, G.R., Winter, P.S., Wang, T., Alley, H.M., Kwong, L.N., Cooper, Z.A., Tetzlaff, M., Chen, P.-L., Rathmell, J.C., Flaherty, K.T., Wargo, J.A., McDonnell, D.P., Sabatini, D.M., Wood, K.C., 2014. Systematic identification of signaling pathways with potential to confer anticancer drug resistance. Sci. Signal. 7. https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa1877

Maze, I., Wenderski, W., Noh, K.-M., Bagot, R.C., Tzavaras, N., Purushothaman, I., Elsässer, S.J., Guo, Y., Ionete, C., Hurd, Y.L., Tamminga, C.A., Halene, T., Farrelly, L., Soshnev, A.A., Wen, D., Rafii, S., Birtwistle, M.R., Akbarian, S., Buchholz, B.A., Blitzer, R.D., Nestler, E.J., Yuan, Z.-F., Garcia, B.A., Shen, L., Molina, H., Allis, C.D., 2015. Critical Role of Histone Turnover in Neuronal Transcription and Plasticity. Neuron 87, 77–94. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.014

Mbah, N.E., Myers, A.L., Chung, C., Thompson, J.K., Hong, H.S., Sajjakulnukit, P., Nwosu, Z.C., Shan, M., Sweha, S.R., Maydan, D.D., Chen, B., Zhang, L., Magnuson, B., Zui, Z., Wahl, D.R., Franchi, L., Agnihotri, S., Koschmann, C.J., Venneti, S., Lyssiotis, C.A., 2022. Therapeutic targeting of differentiation state-dependent metabolic vulnerabilities in DIPG (preprint). Cancer Biology. https://doi.org/10.1101/2022.03.01.482555

McCann, E., O'Sullivan, J., Marcone, S., 2021. Targeting cancer-cell mitochondria and metabolism to improve radiotherapy response. Translational Oncology 14, 100905. https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100905

McGinty, R.K., Tan, S., 2015. Nucleosome Structure and Function. Chem. Rev. 115, 2255–2273. https://doi.org/10.1021/cr500373h

McMullen, E.R., Skala, S.L., Gonzalez, M.E., Djomehri, S., Chandrashekar, D.S., Varambally, S., Kleer, C.G., 2021. Subcellular localization of EZH2 phosphorylated at T367 stratifies metaplastic breast carcinoma subtypes. Breast Cancer 28, 496–505. https://doi.org/10.1007/s12282-020-01189-7

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., 2017. Culture methods of diffuse intrinsic pontine glioma cells determine response to targeted therapies. Experimental Cell Research 360, 397–403. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.09.032

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., Vellanki, R.N., Vladoiu, M.C., Guilhamon, P., Ong, W., Lee, J.J.Y., Jiang, Y., Holgado, B.L., Rasnitsyn, A., Malik, A.A., Tsai, R., Richman, C.M., Juraschka, K., Haapasalo, J., Wang, E.Y., De Antonellis, P., Suzuki, H., Farooq, H., Balin, P., Kharas, K., Van Ommeren, R., Sirbu, O., Rastan, A., Krumholtz, S.L., Ly, M., Ahmadi, M., Deblois, G., Srikanthan, D., Luu, B., Loukides, J., Wu, X., Garzia, L., Ramaswamy, V., Kanshin, E., Sánchez-Osuna, M., El-Hamamy, I., Coutinho, F.J., Prinos, P., Singh, S., Donovan, L.K., Daniels, C., Schramek, D., Tyers, M., Weiss, S., Stein, L.D., Lupien, M., Wouters, B.G., Garcia, B.A., Arrowsmith, C.H., Sorensen, P.H., Angers, S., Jabado, N., Dirks, P.B., Mack, S.C., Agnihotri, S., Rich, J.N., Taylor, M.D., 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

Millán-Zambrano, G., Burton, A., Bannister, A.J., Schneider, R., 2022. Histone post-translational modifications — cause and consequence of genome function. Nat Rev Genet 23, 563–580. https://doi.org/10.1038/s41576-022-00468-7

Miller, D.M., Thomas, S.D., Islam, A., Muench, D., Sedoris, K., 2012. c-Myc and Cancer Metabolism. Clinical Cancer Research 18, 5546–5553. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0977

Minami, J.K., Morrow, D., Bayley, N.A., Fernandez, E.G., Salinas, J.J., Tse, C., Zhu, H., Su, B., Plawat, R., Jones, A., Sammarco, A., Liau, L.M., Graeber, T.G., Williams, K.J., Cloughesy, T.F., Dixon, S.J., Bensinger, S.J., Nathanson, D.A., 2023. CDKN2A deletion remodels lipid metabolism to prime glioblastoma for ferroptosis. Cancer Cell 41, 1048-1060.e9. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.05.001

Minasi, S., Baldi, C., Gianno, F., Antonelli, M., Buccoliero, A.M., Pietsch, T., Massimino, M., Buttarelli, F.R., 2021. Alternative lengthening of telomeres in molecular subgroups of paediatric high-grade glioma. Childs Nerv Syst 37, 809–818. https://doi.org/10.1007/s00381-020-04933-8

Miska, J., Chandel, N.S., 2023. Targeting fatty acid metabolism in glioblastoma. Journal of Clinical Investigation 133, e163448. https://doi.org/10.1172/JCI163448

Mo, Y., Duan, S., Zhang, X., Hua, X., Zhou, H., Wei, H.-J., Watanabe, J., McQuillan, N., Su, Z., Gu, W., Wu, C.-C., Vakoc, C.R., Hashizume, R., Chang, K., Zhang, Z., 2022. Epigenome Programming by H3.3K27M Mutation Creates a Dependence of Pediatric Glioma on SMARCA4. Cancer Discovery 12, 2906–2929. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1492

Mohammad, F., Weissmann, S., Leblanc, B., Pandey, D.P., Højfeldt, J.W., Comet, I., Zheng, C., Johansen, J.V., Rapin, N., Porse, B.T., Tvardovskiy, A., Jensen, O.N., Olaciregui, N.G., Lavarino, C., Suñol, M., de Torres, C., Mora, J., Carcaboso, A.M., Helin, K., 2017. EZH2 is a potential therapeutic target for H3K27M-mutant pediatric gliomas. Nat Med 23, 483–492. https://doi.org/10.1038/nm.4293

Moldovan GL, D'Andrea AD. How the fanconi anemia pathway guards the genome. Annu Rev Genet. 2009;43:223-49. doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134222. PMID: 19686080; PMCID: PMC2830711.

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., Fisher, P.G., Weissman, I.L., Rowitch, D.H., Vogel, H., Wong, A.J., Beachy, P.A., 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

Mota, M., Sweha, S.R., Pun, M., Natarajan, S.K., Ding, Y., Chung, C., Hawes, D., Yang, F., Judkins, A.R., Samajdar, S., Cao, X., Xiao, L., Parolia, A., Chinnaiyan, A.M., Venneti, S., 2023. Targeting SWI/SNF ATPases in H3.3K27M diffuse intrinsic pontine gliomas. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 120, e2221175120. https://doi.org/10.1073/pnas.2221175120

Mozzetta, C., Boyarchuk, E., Pontis, J., Ait-Si-Ali, S., 2015. Sound of silence: the properties and functions of repressive Lys methyltransferases. Nat Rev Mol Cell Biol 16, 499–513. https://doi.org/10.1038/nrm4029

Muroi, A., Mizumoto, M., Ishikawa, E., Ihara, S., Fukushima, H., Tsurubuchi, T., Sakurai, H., Matsumura, A., 2020. Proton therapy for newly diagnosed pediatric diffuse intrinsic pontine glioma. Childs Nerv Syst 36, 507–512. https://doi.org/10.1007/s00381-019-04420-9

Nagaraja, S., Quezada, M.A., Gillespie, S.M., Arzt, M., Lennon, J.J., Woo, P.J., Hovestadt, V., Kambhampati, M., Filbin, M.G., Suva, M.L., Nazarian, J., Monje, M., 2019. Histone Variant and Cell Context Determine H3K27M Reprogramming of the Enhancer Landscape and Oncogenic State. Molecular Cell 76, 965-980.e12. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.030

Nagaraja, S., Vitanza, N.A., Woo, P.J., Taylor, K.R., Liu, F., Zhang, L., Li, M., Meng, W., Ponnuswami, A., Sun, W., Ma, J., Hulleman, E., Swigut, T., Wysocka, J., Tang, Y., Monje, M., 2017. Transcriptional Dependencies in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. Cancer Cell 31, 635-652.e6. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.03.011

Nikbakht, H., Panditharatna, E., Mikael, L.G., Li, R., Gayden, T., Osmond, M., Ho, C.-Y., Kambhampati, M., Hwang, E.I., Faury, D., Siu, A., Papillon-Cavanagh, S., Bechet, D., Ligon, K.L., Ellezam, B., Ingram, W.J., Stinson, C., Moore, A.S., Warren, K.E., Karamchandani, J., Packer, R.J., Jabado, N., Majewski, J., Nazarian, J., 2016. Spatial and temporal homogeneity of driver mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. Nat Commun 7, 11185. https://doi.org/10.1038/ncomms11185

Ocasio, J.K., Budd, K.M., Roach, J.T., Andrews, J.M., Baker, S.J., 2023. Oncohistones and disrupted development in pediatric-type diffuse high-grade glioma. Cancer Metastasis Rev 42, 367–388. https://doi.org/10.1007/s10555-023-10105-2

Olzmann, J.A., Carvalho, P., 2019. Dynamics and functions of lipid droplets. Nat Rev Mol Cell Biol 20, 137–155. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z

Ostrom, Q.T., Cioffi, G., Gittleman, H., Patil, N., Waite, K., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J.S., 2019. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. Neuro-Oncology 21, v1–v100. https://doi.org/10.1093/neuonc/noz150

Pajovic, S., Siddaway, R., Bridge, T., Sheth, J., Rakopoulos, P., Kim, B., Ryall, S., Agnihotri, S., Phillips, L., Yu, M., Li, C., Milos, S., Patel, P., Srikanthan, D., Huang, A., Hawkins, C., 2020. Epigenetic activation of a RAS/MYC axis in H3.3K27M-driven cancer. Nat Commun 11, 6216. https://doi.org/10.1038/s41467-020-19972-7

Pajtler, K.W., Wen, J., Sill, M., Lin, T., Orisme, W., Tang, B., Hübner, J.-M., Ramaswamy, V., Jia, S., Dalton, J.D., Haupfear, K., Rogers, H.A., Punchihewa, C., Lee, R., Easton, J., Wu, G., Ritzmann, T.A., Chapman, R., Chavez, L., Boop, F.A., Klimo, P., Sabin, N.D., Ogg, R., Mack, S.C., Freibaum, B.D., Kim, H.J., Witt, H., Jones, D.T.W., Vo, B., Gajjar, A., Pounds, S., Onar-Thomas, A., Roussel, M.F., Zhang, J., Taylor, J.P., Merchant, T.E., Grundy, R., Tatevossian, R.G., Taylor, M.D., Pfister, S.M., Korshunov, A., Kool, M., Ellison, D.W., 2018. Molecular heterogeneity and CXorf67 alterations in posterior fossa group A (PFA) ependymomas. Acta Neuropathol 136, 211–226. https://doi.org/10.1007/s00401-018-1877-0

Pal, S., Kaplan, J.P., Nguyen, H., Stopka, S.A., Savani, M.R., Regan, M.S., Nguyen, Q.-D., Jones, K.L., Moreau, L.A., Peng, J., Dipiazza, M.G., Perciaccante, A.J., Zhu, X., Hunsel, B.R., Liu, K.X., Alexandrescu, S., Drissi, R., Filbin, M.G., McBrayer, S.K., Agar, N.Y.R., Chowdhury, D., Haas-Kogan, D.A., 2022. A druggable addiction to de novo pyrimidine biosynthesis in diffuse midline glioma. Cancer Cell 40, 957-972.e10. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.07.012

Panditharatna, E., Marques, J.G., Wang, T., Trissal, M.C., Liu, I., Jiang, L., Beck, A., Groves, A., Dharia, N.V., Li, D., Hoffman, S.E., Kugener, G., Shaw, M.L., Mire, H.M., Hack, O.A., Dempster, J.M., Lareau, C., Dai, L., Sigua, L.H., Quezada, M.A., Stanton, A.-C.J., Wyatt, M., Kalani, Z., Goodale, A., Vazquez, F., Piccioni, F., Doench, J.G., Root, D.E., Anastas, J.N., Jones, K.L., Conway, A.S., Stopka, S., Regan, M.S., Liang, Y., Seo, H.-S., Song, K., Bashyal, P., Jerome, W.P., Mathewson, N.D., Dhe-Paganon, S., Suvà, M.L., Carcaboso, A.M., Lavarino, C., Mora, J., Nguyen, Q.-D., Ligon, K.L., Shi, Y., Agnihotri, S., Agar, N.Y.R., Stegmaier, K., Stiles, C.D., Monje, M., Golub, T.R., Qi, J., Filbin, M.G., 2022. BAF Complex Maintains Glioma Stem Cells in Pediatric H3K27M Glioma. Cancer Discovery OF1–OF26. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1491

Panditharatna, E., Yaeger, K., Kilburn, L.B., Packer, R.J., Nazarian, J., 2015. Clinicopathology of diffuse intrinsic pontine glioma and its redefined genomic and epigenomic landscape. Cancer Genetics 208, 367–373. https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2015.04.008

Panwalkar, P., Tamrazi, B., Dang, D., Chung, C., Sweha, S., Natarajan, S.K., Pun, M., Bayliss, J., Ogrodzinski, M.P., Pratt, D., Mullan, B., Hawes, D., Yang, F., Lu, C., Sabari, B.R., Achreja, A., Heon, J., Animasahun, O., Cieslik, M., Dunham, C., Yip, S., Hukin, J., Phillips, J.J., Bornhorst, M., Griesinger, A.M., Donson, A.M., Foreman, N.K., Garton, H.J.L., Heth, J., Muraszko, K., Nazarian, J., Koschmann, C., Jiang, L., Filbin, M.G., Nagrath, D., Kool, M., Korshunov, A., Pfister, S.M., Gilbertson, R.J., Allis, C.D., Chinnaiyan, A.M., Lunt, S.Y., Blüml, S., Judkins, A.R., Venneti, S., 2021. Targeting integrated epigenetic and metabolic pathways in lethal childhood PFA ependymomas. Sci. Transl. Med. 13, eabc0497. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc0497

Park, J., Lee, W., Yun, S., Kim, S.P., Kim, K.H., Kim, J., Kim, S., Wang, K., Lee, J.Y., 2020. STAT3 is a key molecule in the oncogenic behavior of diffuse intrinsic pontine glioma. Oncol Lett 20, 1989–1998. https://doi.org/10.3892/ol.2020.11699

Patel, S.K., Hartley, R.M., Wei, X., Furnish, R., Escobar-Riquelme, F., Bear, H., Choi, K., Fuller, C., Phoenix, T.N., 2019. Generation of diffuse intrinsic pontine glioma mouse models by brainstem targeted in utero electroporation. Neuro-Oncology noz197. https://doi.org/10.1093/neuonc/noz197

Pathania, M., De Jay, N., Maestro, N., Harutyunyan, A.S., Nitarska, J., Pahlavan, P., Henderson, S., Mikael, L.G., Richard-Londt, A., Zhang, Y., Costa, J.R., Hébert, S., Khazaei, S., Ibrahim, N.S., Herrero, J., Riccio, A., Albrecht, S., Ketteler, R., Brandner, S., Kleinman, C.L., Jabado, N., Salomoni, P., 2017. H3.3K27M Cooperates with Trp53 Loss and PDGFRA Gain in Mouse Embryonic Neural Progenitor Cells to Induce Invasive High-Grade Gliomas. Cancer Cell 32, 684-700.e9. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.09.014

Pfister, S.M., Reyes-Múgica, M., Chan, J.K.C., Hasle, H., Lazar, A.J., Rossi, S., Ferrari, A., Jarzembowski, J.A., Pritchard-Jones, K., Hill, D.A., Jacques, T.S., Wesseling, P., López Terrada, D.H., von Deimling, A., Kratz, C.P., Cree, I.A., Alaggio, R., 2022. A Summary of the Inaugural WHO Classification of Pediatric Tumors: Transitioning from the Optical into the Molecular Era. Cancer Discovery 12, 331–355. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1094

Phillips, R.E., Yang, Y., Smith, R.C., Thompson, B.M., Yamasaki, T., Soto-Feliciano, Y.M., Funato, K., Liang, Y., Garcia-Bermudez, J., Wang, X., Garcia, B.A., Yamasaki, K., McDonald, J.G., Birsoy, K., Tabar, V., Allis, C.D., 2019. Target identification reveals lanosterol synthase as a vulnerability in glioma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 116, 7957–7962. https://doi.org/10.1073/pnas.1820989116

Piunti, A., Hashizume, R., Morgan, M.A., Bartom, E.T., Horbinski, C.M., Marshall, S.A., Rendleman, E.J., Ma, Q., Takahashi, Y., Woodfin, A.R., Misharin, A.V., Abshiru, N.A., Lulla, R.R., Saratsis, A.M., Kelleher, N.L., James, C.D., Shilatifard, A., 2017. Therapeutic targeting of polycomb and BET bromodomain proteins in diffuse intrinsic pontine gliomas. Nat Med 23, 493–500. https://doi.org/10.1038/nm.4296

Pollack, I.F., Agnihotri, S., Broniscer, A., 2019. Childhood brain tumors: current management, biological insights, and future directions: JNSPG 75th Anniversary Invited Review Article. Journal of Neurosurgery: Pediatrics 23, 261–273. https://doi.org/10.3171/2018.10.PEDS18377

Prassas, I., Diamandis, E.P., 2008. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. Nat Rev Drug Discov 7, 926–935. https://doi.org/10.1038/nrd2682

Przystal, J.M., Cianciolo Cosentino, C., Yadavilli, S., Zhang, J., Laternser, S., Bonner, E.R., Prasad, R., Dawood, A.A., Lobeto, N., Chin Chong, W., Biery, M.C., Myers, C., Olson, J.M., Panditharatna, E., Kritzer, B., Mourabit, S., Vitanza, N.A., Filbin, M.G., De Iuliis, G.N., Dun, M.D., Koschmann, C., Cain, J.E., Grotzer, M.A., Waszak, S.M., Mueller, S., Nazarian, J., 2022. Imipridones affect tumor bioenergetics and promote cell lineage differentiation in diffuse midline gliomas. Neuro-Oncology 24, 1438–1451. https://doi.org/10.1093/neuonc/noac041

Puget, S., Beccaria, K., Blauwblomme, T., Roujeau, T., James, S., Grill, J., Zerah, M., Varlet, P., 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

Qin, T., Mullan, B., Ravindran, R., Messinger, D., Siada, R., Cummings, J.R., Harris, M., Muruganand, A., Pyaram, K., Miklja, Z., Reiber, M., Garcia, T., Tran, D., Danussi, C., Brosnan-Cashman, J., Pratt, D., Zhao, X.,

Rehemtulla, A., Sartor, M.A., Venneti, S., Meeker, A.K., Huse, J.T., Morgan, M.A., Lowenstein, P.R., Castro, M.G., Yadav, V.N., Koschmann, C., 2022. ATRX loss in glioma results in dysregulation of cell-cycle phase transition and ATM inhibitor radio-sensitization. Cell Reports 38, 110216. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110216

Rakotomalala, A., Bailleul, Q., Savary, C., Arcicasa, M., Hamadou, M., Huchedé, P., Hochart, A., Restouin, A., Castellano, R., Collette, Y., Dieny, E., Vincent, A., Angrand, P.-O., Le Bourhis, X., Leblond, P., Furlan, A., Castets, M., Pasquier, E., Meignan, S., 2021a. H3.3K27M Mutation Controls Cell Growth and Resistance to Therapies in Pediatric Glioma Cell Lines. Cancers 13, 5551. https://doi.org/10.3390/cancers13215551

Rakotomalala, A., Escande, A., Furlan, A., Meignan, S., Lartigau, E., 2021b. Hypoxia in Solid Tumors: How Low Oxygenation Impacts the "Six Rs" of Radiotherapy. Front. Endocrinol. 12, 742215. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.742215

Ralhan, I., Chang, C.-L., Lippincott-Schwartz, J., Ioannou, M.S., 2021. Lipid droplets in the nervous system. Journal of Cell Biology 220, e202102136. https://doi.org/10.1083/jcb.202102136

Rambold, A.S., Cohen, S., Lippincott-Schwartz, J., 2015. Fatty Acid Trafficking in Starved Cells: Regulation by Lipid Droplet Lipolysis, Autophagy, and Mitochondrial Fusion Dynamics. Developmental Cell 32, 678–692. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.029

Roadmap Epigenomics Consortium, Kundaje, A., Meuleman, W., Ernst, J., Bilenky, M., Yen, A., Heravi-Moussavi, A., Kheradpour, P., Zhang, Z., Wang, J., Ziller, M.J., Amin, V., Whitaker, J.W., Schultz, M.D., Ward, L.D., Sarkar, A., Quon, G., Sandstrom, R.S., Eaton, M.L., Wu, Y.-C., Pfenning, A.R., Wang, X., Claussnitzer, M., Liu, Y., Coarfa, C., Harris, R.A., Shoresh, N., Epstein, C.B., Gjoneska, E., Leung, D., Xie, W., Hawkins, R.D., Lister, R., Hong, C., Gascard, P., Mungall, A.J., Moore, R., Chuah, E., Tam, A., Canfield, T.K., Hansen, R.S., Kaul, R., Sabo, P.J., Bansal, M.S., Carles, A., Dixon, J.R., Farh, K.-H., Feizi, S., Karlic, R., Kim, A.-R., Kulkarni, A., Li, D., Lowdon, R., Elliott, G., Mercer, T.R., Neph, S.J., Onuchic, V., Polak, P., Rajagopal, N., Ray, P., Sallari, R.C., Siebenthall, K.T., Sinnott-Armstrong, N.A., Stevens, M., Thurman, R.E., Wu, J., Zhang, B., Zhou, X., Beaudet, A.E., Boyer, L.A., De Jager, P.L., Farnham, P.J., Fisher, S.J., Haussler, D., Jones, S.J.M., Li, W., Marra, M.A., McManus, M.T., Sunyaev, S., Thomson, J.A., Tlsty, T.D., Tsai, L.-H., Wang, W., Waterland, R.A., Zhang, M.Q., Chadwick, L.H., Bernstein, B.E., Costello, J.F., Ecker, J.R., Hirst, M., Meissner, A., Milosavljevic, A., Ren, B., Stamatoyannopoulos, J.A., Wang, T., Kellis, M., 2015. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. Nature 518, 317–330. https://doi.org/10.1038/nature14248

Rowley, M.J., Corces, V.G., 2018. Organizational principles of 3D genome architecture. Nat Rev Genet 19, 789–800. https://doi.org/10.1038/s41576-018-0060-8

Ryall, J.G., Cliff, T., Dalton, S., Sartorelli, V., 2015. Metabolic Reprogramming of Stem Cell Epigenetics. Cell Stem Cell 17, 651–662. https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.11.012

Sarthy, J.F., Meers, M.P., Janssens, D.H., Henikoff, J.G., Feldman, H., Paddison, P.J., Lockwood, C.M., Vitanza, N.A., Olson, J.M., Ahmad, K., Henikoff, S., 2020. Histone deposition pathways determine the chromatin landscapes of H3.1 and H3.3 K27M oncohistones. eLife 9, e61090. https://doi.org/10.7554/eLife.61090

Schaue, D., McBride, W.H., 2015. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. Nat Rev Clin Oncol 12, 527–540. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.120

Schönfeld, P., Reiser, G., 2013. Why does Brain Metabolism not Favor Burning of Fatty Acids to Provide Energy? - Reflections on Disadvantages of the Use of Free Fatty Acids as Fuel for Brain. J Cereb Blood Flow Metab 33, 1493–1499. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.128

Schulze, A., Harris, A.L., 2012. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. Nature 491, 364–373. https://doi.org/10.1038/nature11706

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., Hovestadt, V., Albrecht, S., Kool, M., Nantel, A., Konermann, C., Lindroth, A., Jäger, N., Rausch, T., Ryzhova, M., Korbel, J.O., Hielscher, T., Hauser, P., Garami, M., Klekner, A., Bognar, L., Ebinger, M., Schuhmann, M.U., Scheurlen, W., Pekrun, A., Frühwald, M.C., Roggendorf, W., Kramm, C., Dürken, M., Atkinson, J., Lepage, P., Montpetit, A., Zakrzewska, M., Zakrzewski, K., Liberski, P.P., Dong, Z., Siegel, P., Kulozik, A.E., Zapatka, M., Guha, A., Malkin, D., Felsberg, J., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Ichimura, K., Collins, V.P., Witt, H., Milde, T., Witt, O., Zhang, C., Castelo-Branco, P., Lichter,

P., Faury, D., Tabori, U., Plass, C., Majewski, J., Pfister, S.M., Jabado, N., 2012. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. Nature 482, 226–231. https://doi.org/10.1038/nature10833

Shakya, S., Gromovsky, A.D., Hale, J.S., Knudsen, A.M., Prager, B., Wallace, L.C., Penalva, L.O.F., Brown, H.A., Kristensen, B.W., Rich, J.N., Lathia, J.D., Brown, J.M., Hubert, C.G., 2021. Altered lipid metabolism marks glioblastoma stem and non-stem cells in separate tumor niches. acta neuropathol commun 9, 101. https://doi.org/10.1186/s40478-021-01205-7

Shen, H., Yu, M., Tsoli, M., Chang, C., Joshi, S., Liu, J., Ryall, S., Chornenkyy, Y., Siddaway, R., Hawkins, C., Ziegler, D.S., 2020. Targeting reduced mitochondrial DNA quantity as a therapeutic approach in pediatric high-grade gliomas. Neuro-Oncology 22, 139–151. https://doi.org/10.1093/neuonc/noz140

Shorstova, T., Foulkes, W.D., Witcher, M., 2021. Achieving clinical success with BET inhibitors as anti-cancer agents. Br J Cancer 124, 1478–1490. https://doi.org/10.1038/s41416-021-01321-0

Shvedunova, M., Akhtar, A., 2022. Modulation of cellular processes by histone and non-histone protein acetylation. Nat Rev Mol Cell Biol 23, 329–349. https://doi.org/10.1038/s41580-021-00441-y

Siddaway, R., Canty, L., Pajovic, S., Milos, S., Coyaud, E., Sbergio, S.-G., Vadivel Anguraj, A.K., Lubanszky, E., Yun, H.Y., Portante, A., Carette, S., Zhang, C., Moran, M.F., Raught, B., Campos, E.I., Hawkins, C., 2022. Oncohistone interactome profiling uncovers contrasting oncogenic mechanisms and identifies potential therapeutic targets in high grade glioma. Acta Neuropathol 144, 1027–1048. https://doi.org/10.1007/s00401-022-02489-2

Silveira, A.B., Kasper, L.H., Fan, Y., Jin, H., Wu, G., Shaw, T.I., Zhu, X., Larson, J.D., Easton, J., Shao, Y., Yergeau, D.A., Rosencrance, C., Boggs, K., Rusch, M.C., Ding, L., Zhang, Junyuan, Finkelstein, D., Noyes, R.M., Russell, B.L., Xu, B., Broniscer, A., Wetmore, C., Pounds, S.B., Ellison, D.W., Zhang, Jinghui, Baker, S.J., 2019. H3.3 K27M depletion increases differentiation and extends latency of diffuse intrinsic pontine glioma growth in vivo. Acta Neuropathol 137, 637–655. https://doi.org/10.1007/s00401-019-01975-4

Sørensen, C.S., Hansen, L.T., Dziegielewski, J., Syljuåsen, R.G., Lundin, C., Bartek, J., Helleday, T., 2005. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. Nat Cell Biol 7, 195–201. https://doi.org/10.1038/ncb1212

St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project, 2012. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. Nat Genet 44, 251–253. https://doi.org/10.1038/ng.1102

Stafford, J.M., Lee, C.-H., Voigt, P., Descostes, N., Saldaña-Meyer, R., Yu, J.-R., Leroy, G., Oksuz, O., Chapman, J.R., Suarez, F., Modrek, A.S., Bayin, N.S., Placantonakis, D.G., Karajannis, M.A., Snuderl, M., Ueberheide, B., Reinberg, D., 2018. Multiple modes of PRC2 inhibition elicit global chromatin alterations in H3K27M pediatric glioma. SCIENCE ADVANCES.

Stupp, R., Weller, M., Belanger, K., Bogdahn, U., Ludwin, S.K., Lacombe, D., Mirimanoff, R.O., 2005. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. The New England Journal of Medicine.

Sturm, D., Witt, H., Hovestadt, V., Khuong-Quang, D.-A., Jones, D.T.W., Konermann, C., Pfaff, E., Tönjes, M., Sill, M., Bender, S., Kool, M., Zapatka, M., Becker, N., Zucknick, M., Hielscher, T., Liu, X.-Y., Fontebasso, A.M., Ryzhova, M., Albrecht, S., Jacob, K., Wolter, M., Ebinger, M., Schuhmann, M.U., van Meter, T., Frühwald, M.C., Hauch, H., Pekrun, A., Radlwimmer, B., Niehues, T., von Komorowski, G., Dürken, M., Kulozik, A.E., Madden, J., Donson, A., Foreman, N.K., Drissi, R., Fouladi, M., Scheurlen, W., von Deimling, A., Monoranu, C., Roggendorf, W., Herold-Mende, C., Unterberg, A., Kramm, C.M., Felsberg, J., Hartmann, C., Wiestler, B., Wick, W., Milde, T., Witt, O., Lindroth, A.M., Schwartzentruber, J., Faury, D., Fleming, A., Zakrzewska, M., Liberski, P.P., Zakrzewski, K., Hauser, P., Garami, M., Klekner, A., Bognar, L., Morrissy, S., Cavalli, F., Taylor, M.D., van Sluis, P., Koster, J., Versteeg, R., Volckmann, R., Mikkelsen, T., Aldape, K., Reifenberger, G., Collins, V.P., Majewski, J., Korshunov, A., Lichter, P., Plass, C., Jabado, N., Pfister, S.M., 2012. Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma. Cancer Cell 22, 425–437. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.08.024

Sulkowski, P.L., Corso, C.D., Robinson, N.D., Scanlon, S.E., Purshouse, K.R., Bai, H., Liu, Y., Sundaram, R.K., Hegan, D.C., Fons, N.R., Breuer, G.A., Song, Y., Mishra-Gorur, K., De Feyter, H.M., de Graaf, R.A., Surovtseva, Y.V., Kachman, M., Halene, S., Günel, M., Glazer, P.M., Bindra, R.S., 2017. 2-Hydroxyglutarate produced

by neomorphic IDH mutations suppresses homologous recombination and induces PARP inhibitor sensitivity. Sci. Transl. Med. 9, eaal2463. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal2463

Sulkowski, P.L., Oeck, S., Dow, J., Economos, N.G., Mirfakhraie, L., Liu, Y., Noronha, K., Bao, X., Li, J., Shuch, B.M., King, M.C., Bindra, R.S., Glazer, P.M., 2020. Oncometabolites suppress DNA repair by disrupting local chromatin signalling. Nature 582, 586–591. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2363-0

Sun, C.X., Daniel, P., Bradshaw, G., Shi, H., Loi, M., Chew, N., Parackal, S., Tsui, V., Liang, Y., Koptyra, M., Adjumain, S., Sun, C., Chong, W.C., Fernando, D., Drinkwater, C., Tourchi, M., Habarakada, D., Sooraj, D., Carvalho, D., Storm, P.B., Baubet, V., Sayles, L.C., Fernandez, E., Nguyen, T., Pörksen, M., Doan, A., Crombie, D.E., Panday, M., Zhukova, N., Dun, M.D., Ludlow, L.E., Day, B., Stringer, B.W., Neeman, N., Rubens, J.A., Raabe, E.H., Vinci, M., Tyrrell, V., Fletcher, J.I., Ekert, P.G., Dumevska, B., Ziegler, D.S., Tsoli, M., Syed Sulaiman, N.F., Loh, A.H.P., Low, S.Y.Y., Sweet-Cordero, E.A., Monje, M., Resnick, A., Jones, C., Downie, P., Williams, B., Rosenbluh, J., Gough, D., Cain, J.E., Firestein, R., 2023. Generation and multi-dimensional profiling of a childhood cancer cell line atlas defines new therapeutic opportunities. Cancer Cell 41, 660-677.e7. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.03.007

Sun, Y., Yan, K., Wang, Y., Xu, C., Wang, D., Zhou, W., Guo, S., Han, Y., Tang, L., Shao, Y., Shan, S., Zhang, Q.C., Tang, Y., Zhang, L., Xi, Q., 2022. Context-dependent tumor-suppressive BMP signaling in diffuse intrinsic pontine glioma regulates stemness through epigenetic regulation of CXXC5. Nat Cancer 3, 1105–1122. https://doi.org/10.1038/s43018-022-00408-8

Szenker, E., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., 2011. The double face of the histone variant H3.3. Cell Res 21, 421–434. https://doi.org/10.1038/cr.2011.14

Talbert, P.B., Henikoff, S., 2021. The Yin and Yang of Histone Marks in Transcription. Annu. Rev. Genom. Hum. Genet. 22, 147–170. https://doi.org/10.1146/annurev-genom-120220-085159

Tang, L., Wei, F., Wu, Y., He, Y., Shi, L., Xiong, F., Gong, Z., Guo, C., Li, Xiayu, Deng, H., Cao, K., Zhou, M., Xiang, B., Li, Xiaoling, Li, Y., Li, G., Xiong, W., Zeng, Z., 2018. Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. J Exp Clin Cancer Res 37, 87. https://doi.org/10.1186/s13046-018-0758-7

Tatavosian, R., Duc, H.N., Huynh, T.N., Fang, D., Schmitt, B., Shi, X., Deng, Y., Phiel, C., Yao, T., Zhang, Z., Wang, H., Ren, X., 2018. Live-cell single-molecule dynamics of PcG proteins imposed by the DIPG H3.3K27M mutation. Nat Commun 9, 2080. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04455-7

Taylor, E., Zhou, J., Lindsay, P., Foltz, W., Cheung, M., Siddiqui, I., Hosni, A., Amir, A.E., Kim, J., Hill, R.P., Jaffray, D.A., Hedley, D.W., 2020. Quantifying Reoxygenation in Pancreatic Cancer During Stereotactic Body Radiotherapy. Sci Rep 10, 1638. https://doi.org/10.1038/s41598-019-57364-0

Taylor, I.C., Hütt-Cabezas, M., Brandt, W.D., Kambhampati, M., Nazarian, J., Chang, H.T., Warren, K.E., Eberhart, C.G., Raabe, E.H., 2015. Disrupting NOTCH Slows Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Growth, Enhances Radiation Sensitivity, and Shows Combinatorial Efficacy With Bromodomain Inhibition. J Neuropathol Exp Neurol 74, 778–790. https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000216

Taylor, K.R., Barron, T., Hui, A., Spitzer, A., Yalçin, B., Ivec, A.E., Geraghty, A.C., Hartmann, G.G., Arzt, M., Gillespie, S.M., Kim, Y.S., Maleki Jahan, S., Zhang, H., Shamardani, K., Su, M., Ni, L., Du, P.P., Woo, P.J., Silva-Torres, A., Venkatesh, H.S., Mancusi, R., Ponnuswami, A., Mulinyawe, S., Keough, M.B., Chau, I., Aziz-Bose, R., Tirosh, I., Suvà, M.L., Monje, M., 2023. Glioma synapses recruit mechanisms of adaptive plasticity. Nature 623, 366–374. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06678-1

Taylor, Kathryn R, Mackay, A., Truffaux, N., Butterfield, Y.S., Morozova, O., Philippe, C., Castel, D., Grasso, C.S., Vinci, M., Carvalho, D., Carcaboso, A.M., De Torres, C., Cruz, O., Mora, J., Entz-Werle, N., Ingram, W.J., Monje, M., Hargrave, D., Bullock, A.N., Puget, S., Yip, S., Jones, C., Grill, J., 2014. Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. Nat Genet 46, 457–461. https://doi.org/10.1038/ng.2925

Taylor, Kathryn R., Vinci, M., Bullock, A.N., Jones, C., 2014. *ACVR1* Mutations in DIPG: Lessons Learned from FOP. Cancer Research 74, 4565–4570. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1298

the St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project, 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

Tvardovskiy, A., Schwämmle, V., Kempf, S.J., Rogowska-Wrzesinska, A., Jensen, O.N., 2017. Accumulation of histone variant H3.3 with age is associated with profound changes in the histone methylation landscape. Nucleic Acids Research 45, 9272–9289. https://doi.org/10.1093/nar/gkx696

Vanan, M.I., Eisenstat, D.D., 2015. DIPG in Children – What Can We Learn from the Past? Front. Oncol. 5. https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00237

VandeKopple, M.J., Wu, J., Auer, E.N., Giaccia, A.J., Denko, N.C., Papandreou, I., 2019. HILPDA Regulates Lipid Metabolism, Lipid Droplet Abundance, and Response to Microenvironmental Stress in Solid Tumors. Molecular Cancer Research 17, 2089–2101. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-1343

Venkatesh, H.S., Morishita, W., Geraghty, A.C., Silverbush, D., Gillespie, S.M., Arzt, M., Tam, L.T., Espenel, C., Ponnuswami, A., Ni, L., Woo, P.J., Taylor, K.R., Agarwal, A., Regev, A., Brang, D., Vogel, H., Hervey-Jumper, S., Bergles, D.E., Suvà, M.L., Malenka, R.C., Monje, M., 2019. Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. Nature 573, 539–545. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1563-y

Venneti, S., Kawakibi, A.R., Ji, S., Waszak, S.M., Sweha, S.R., Mota, M., Pun, M., Deogharkar, A., Chung, C., Tarapore, R.S., Ramage, S., Chi, A., Wen, P.Y., Arrillaga-Romany, I., Batchelor, T.T., Butowski, N.A., Sumrall, A., Shonka, N., Harrison, R.A., De Groot, J., Mehta, M., Hall, M.D., Daghistani, D., Cloughesy, T.F., Ellingson, B.M., Beccaria, K., Varlet, P., Kim, M.M., Umemura, Y., Garton, H., Franson, A., Schwartz, J., Jain, R., Kachman, M., Baum, H., Burant, C.F., Mottl, S.L., Cartaxo, R.T., John, V., Messinger, D., Qin, T., Peterson, E., Sajjakulnukit, P., Ravi, K., Waugh, A., Walling, D., Ding, Y., Xia, Z., Schwendeman, A., Hawes, D., Yang, F., Judkins, A.R., Wahl, D., Lyssiotis, C.A., De La Nava, D., Alonso, M.M., Eze, A., Spitzer, J., Schmidt, S.V., Duchatel, R.J., Dun, M.D., Cain, J.E., Jiang, L., Stopka, S.A., Baquer, G., Regan, M.S., Filbin, M.G., Agar, N.Y.R., Zhao, L., Kumar-Sinha, C., Mody, R., Chinnaiyan, A., Kurokawa, R., Pratt, D., Yadav, V.N., Grill, J., Kline, C., Mueller, S., Resnick, A., Nazarian, J., Allen, J.E., Odia, Y., Gardner, S.L., Koschmann, C., 2023. Clinical Efficacy of ONC201 in H3K27M-Mutant Diffuse Midline Gliomas Is Driven by Disruption of Integrated Metabolic and Epigenetic Pathways. Cancer Discovery OF1–OF24. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-23-0131

Veringa, S.J.E., Biesmans, D., Van Vuurden, D.G., Jansen, M.H.A., Wedekind, L.E., Horsman, I., Wesseling, P., Vandertop, W.P., Noske, D.P., Kaspers, G.J.L., Hulleman, E., 2013. In Vitro Drug Response and Efflux Transporters Associated with Drug Resistance in Pediatric High Grade Glioma and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. PLoS ONE 8, e61512. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061512

Vinci, M., Burford, A., Molinari, V., Kessler, K., Popov, S., Clarke, M., Taylor, K.R., Pemberton, H.N., Lord, C.J., Gutteridge, A., Forshew, T., Carvalho, D., Marshall, L.V., Qin, E.Y., Ingram, W.J., Moore, A.S., Ng, H.-K., Trabelsi, S., H'mida-Ben Brahim, D., Entz-Werle, N., Zacharoulis, S., Vaidya, S., Mandeville, H.C., Bridges, L.R., Martin, A.J., Al-Sarraj, S., Chandler, C., Sunol, M., Mora, J., De Torres, C., Cruz, O., Carcaboso, A.M., Monje, M., Mackay, A., Jones, C., 2018. Functional diversity and cooperativity between subclonal populations of pediatric glioblastoma and diffuse intrinsic pontine glioma cells. Nat Med 24, 1204–1215. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0086-7

Von Bueren, A.O., Karremann, M., Gielen, G.H., Benesch, M., Fouladi, M., Van Vuurden, D.G., Van Zanten, S.E.M.V., Hoffman, L.M., Kramm, C.M., 2018. A suggestion to introduce the diagnosis of "diffuse midline glioma of the pons, H3 K27 wildtype (WHO grade IV)." Acta Neuropathol 136, 171–173. https://doi.org/10.1007/s00401-018-1863-6

Wang, H., Mu, X., He, H., Zhang, X.-D., 2018. Cancer Radiosensitizers. Trends in Pharmacological Sciences 39, 24–48. https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.11.003

Wang, J., Huang, T.Y.-T., Hou, Y., Bartom, E., Lu, X., Shilatifard, A., Yue, F., Saratsis, A., 2021. Epigenomic landscape and 3D genome structure in pediatric high-grade glioma. Sci. Adv. 7, eabg4126. https://doi.org/10.1126/sciadv.abg4126

Weinberg, D.N., Papillon-Cavanagh, S., Chen, H., Yue, Y., Chen, X., Rajagopalan, K.N., Horth, C., McGuire, J.T., Xu, X., Nikbakht, H., Lemiesz, A.E., Marchione, D.M., Marunde, M.R., Meiners, M.J., Cheek, M.A., Keogh, M.-C., Bareke, E., Djedid, A., Harutyunyan, A.S., Jabado, N., Garcia, B.A., Li, H., Allis, C.D., Majewski, J., Lu, C., 2019. The histone mark H3K36me2 recruits DNMT3A and shapes the intergenic DNA methylation landscape. Nature 573, 281–286. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1534-3

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., Varlet, P., Beccaria, K., Boddaert, N., Puget, S., Grill, J., Debily, M.-A., Castel, D., 2019. TP53 Pathway Alterations Drive Radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG). Clinical Cancer Research 25, 6788–6800. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0126

Wiese, M., Hamdan, F.H., Kubiak, K., Diederichs, C., Gielen, G.H., Nussbaumer, G., Carcaboso, A.M., Hulleman, E., Johnsen, S.A., Kramm, C.M., 2020. Combined treatment with CBP and BET inhibitors reverses inadvertent activation of detrimental super enhancer programs in DIPG cells. Cell Death Dis 11, 673. https://doi.org/10.1038/s41419-020-02800-7

Yard, B., Adams, D., Chie, E. *et al.* A genetic basis for the variation in the vulnerability of cancer to DNA damage. *Nat Commun* **7**, 11428 (2016). https://doi.org/10.1038/ncomms11428

Yu JR, LeRoy G, Bready D, Frenster JD, Saldaña-Meyer R, Jin Y, Descostes N, Stafford JM, Placantonakis DG, Reinberg D. 2021. The H3K36me2 writer-reader dependency in H3K27M-DIPG. Sci Adv.;7(29):eabg7444. doi: 10.1126/sciadv.abg7444. PMID: 34261657; PMCID: PMC8279504.

Yu, X., Ma, R., Wu, Y., Zhai, Y., Li, S., 2018. Reciprocal Regulation of Metabolic Reprogramming and Epigenetic Modifications in Cancer. Front. Genet. 9, 394. https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00394

Zadoorian, A., Du, X., Yang, H., 2023. Lipid droplet biogenesis and functions in health and disease. Nat Rev Endocrinol 19, 443–459. https://doi.org/10.1038/s41574-023-00845-0

Zarghooni, M., Bartels, U., Lee, E., Buczkowicz, P., Morrison, A., Huang, A., Bouffet, E., Hawkins, C., 2010. Whole-Genome Profiling of Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas Highlights Platelet-Derived Growth Factor Receptor α and Poly (ADP-ribose) Polymerase As Potential Therapeutic Targets. JCO 28, 1337–1344. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.5463

Zhang, L., Nesvick, C.L., Day, C.A., Choi, J., Lu, V.M., Peterson, T., Power, E.A., Anderson, J.B., Hamdan, F.H., Decker, P.A., Simons, R., Welby, J.P., Siada, R., Ge, J., Kaptzan, T., Johnsen, S.A., Hinchcliffe, E.H., Daniels, D.J., 2022. STAT3 is a biologically relevant therapeutic target in H3K27M-mutant diffuse midline glioma. Neuro-Oncology 24, 1700–1711. https://doi.org/10.1093/neuonc/noac093

Zhang, Q., Zhou, W., Yu, S., Ju, Y., To, S.K.Y., Wong, A.S.T., Jiao, Y., Poon, T.C.W., Tam, K.Y., Lee, L.T.O., 2021. Metabolic reprogramming of ovarian cancer involves ACSL1-mediated metastasis stimulation through upregulated protein myristoylation. Oncogene 40, 97–111. https://doi.org/10.1038/s41388-020-01516-4

Zhang, T., Cooper, S., Brockdorff, N., 2015. The interplay of histone modifications – writers that read. EMBO Reports 16, 1467–1481. https://doi.org/10.15252/embr.201540945

Zhang, Y., Dong, W., Zhu, J., Wang, L., Wu, X., Shan, H., 2017. Combination of EZH2 inhibitor and BET inhibitor for treatment of diffuse intrinsic pontine glioma. Cell Biosci 7, 56. https://doi.org/10.1186/s13578-017-0184-0

Zhang, Y., Hunter, T., 2014. Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. Intl Journal of Cancer 134, 1013–1023. https://doi.org/10.1002/ijc.28226

Zhang, Ye, Chang, J.-F., Sun, J., Chen, L., Yang, X.-M., Tang, H.-Y., Jing, Y.-Y., Kang, X., He, Z.-M., Wu, J.-Y., Wei, H.-M., Wang, D.-L., Xu, R.-G., Zhu, R.-B., Shen, Y., Zeng, S.-Y., Wang, C., Liu, K.-N., Zhang, Yong, Mao, Z.-Y., Jiang, C.-Z., Sun, F.-L., 2018. Histone H3K27 methylation is required for NHEJ and genome stability by modulating the dynamics of FANCD2 on chromatin. Journal of Cell Science jcs.215525. https://doi.org/10.1242/jcs.215525

Zhu, X., Lazow, M.A., Schafer, A., Bartlett, A., Senthil Kumar, S., Mishra, D.K., Dexheimer, P., DeWire, M., Fuller, C., Leach, J.L., Fouladi, M., Drissi, R., 2021. A pilot radiogenomic study of DIPG reveals distinct subgroups with unique clinical trajectories and therapeutic targets. acta neuropathol commun 9, 14. https://doi.org/10.1186/s40478-020-01107-0

ANNEXES

Tableau 1. Liste des composés utilisés pour le criblage pharmacologique.

Nom du composé	Mécanisme d'action
PFI-1	pan-BET inhibitor
Molibresib (I-BET-762)	pan-BET inhibitor
Birabresib (OTX015)	pan-BET inhibitor
CRCM-5483	BD1-selective BET inhibitor
ABBV-744	BD2-selective BET inhibitor
GSK-046	BD2-selective BET inhibitor
RVX-208	BD2-selective BET inhibitor
AGI-5198	IDH1 inhibitor
Enasidenib (AG-221)	IDH2 inhibitor
Entinostat (MS-275)	HDACi
Vorinostat (SAHA)	HDACi
Panobinostat	HDACi
GSK-126	EZH2 inhibitor
Pinometostat (EPZ5676)	DOT1L inhibitor
SGC 0946	DOT1L inhibitor
GSK-J4	JMJD3 inhibitor
cisplatin	DNA synthesis inhibitor
vincristine	Anti-microtubule
etoposide	DNA topoisomerase II inhibitor
topotecan	DNA topoisomerase I inhibitor
SN38	DNA topoisomerase I inhibitor
Vinorelbine	Anti-microtubule
Afatinib	EGFR family inhibitor
Erlotinib	EGFR inhibitor
Osimertinib	EGFR inhibitor avec bonne penetration CNS
Alisertib	Aurora A inhibitor
VX680	Aurora inhibitor
Volasertib	Polo like kinase inhibitor
Palbociclib	CDK4/6 inhibitor
Dinaciclib	CDK1, 2, 5 et 9 inhibitor
Ralimetinib	MAPK14 inhibitor
Doramapimod	pan-p38 MAPK inhibitor
Tanespimycin (17-AAG)	HSP90 inhibitor
Luminespib	HSP90 inhibitor
Birinapant	XIAP cIAP inhibitor
GDC-0152	XIAP cIAP inhibitor
Bortezomib	proteasome inhibitor
Savolitinib	selective MET inhibitor
AMG337	selective MET inhibitor
RU-301	pan-TAM receptor
Ningetinib	c-Met, VEGFR2 and Axl inhibitor
BFH772	VEGFR2 inhibitor
Axitinib	Inhibitor of VEGFR1, 2/3, PDGFRβ and c-Kit
LCL-161	SMAC mimetic
Everolimus	mTOR inhibitor
Temsirolimus	mTOR inhibitor
Navitoclax (ABT-263)	anti BCL2
Venetoclax	anti BCL2
Nutlin 3	MDM2 inhibitor
Olaparib	PARP inhibitor
Prima1	re activator of mutant p53
ONC201	AKT/ERK inhibitor
Paxalisib	PI3K inhibitor
Larotrectinib	TRK kinase inhibitor
Entrectinib	pan-TrkA/B/C, ROS1 and ALK inhibitor
Selitrectinib	TRK kinase inhibitor
lenvatinib	VEGFR2/3 inhibitor
ribociclib	CDK4/6 inhibitor
Fimepinostat	PI3Kα and HDAC1/2/3/10 inhibitor
GMX-1178	NAMPT inhibitor
FK866	NAMPT inhibitor
Omipalisib	inhibitor of p110α/β/δ/γ, mTORC1/2
Dabrafenib	mutant BRAFV600 specific inhibitor
KU-60019	ATM inhibitor
Berzosertib	ATR inhibitor
IRAK-1-4 Inhibitor I	IRAK1/4 inhibitor

Nom du composé	Mécanisme d'action
Selumetinib	MEK inhibitor
Mirdametinib	MEK inhibitor
Trametinib	MEK inhibitor
Vismodegib	Hedgehog inhibitor
Sonidegib	Smoothened antagonist
albendazole	benzimidazole anti-helminthique
fenbendazole	benzimidazole anti-helminthique
mebendazole	benzimidazole anti-helminthique
mefloquine	anti-parasitaire
niclosamide	anti-helminthique
pyrvinium	anti-parasitaire
quinacrine	anti-parasitaire
primaquine	anti-palludeen
astemizole	anti-histaminique
carvedilol	anti-hypertenseur
nebivolol	anti-hypertenseur
digoxin	anti-arrythmique
mifepristone	progesterone receptor antagonist
disulfiram	anti-alcoolisme
itraconazole	anti-fongique
metergoline	anti-migraineux
mometasone	anti-inflammatoire
lovastatine	statine
cerivastatine	statine
fluvastatine	statine
mevastatine	statine
simvastatine	statine
proscillaridin A	glycoside cardiaque
pilocarpine	agoniste muscarinique
sertraline	inhibiteur recepteur serotonine
Trimethobenzamide	anti-emetique
aripiprazole	anti-psychotique atypique
pimozide	anti-psychotique typique
Prochlorperazine	anti-psychotique typique
Metformin	Anti-diabetic
Piroxicam	COX inhibitor
Celecoxib	COX-2 inhibitor
Omeprazole	proton pump inhibitor
Paroxetine	antidepressant
Fluphenazine	D1DR and D2DR inhibitor
Metronidazole	antibacterial and antiprotozoal
carazolol	anti-hypertenseur
lapatinib	Inhibiteur HER2/Neu
Vinorelbine	Anti-microtubule

Range of drug concentrations (µM)		
High Tox	Medium Tox	Low Tox
0,001	0,010	0,1
0,010	0,100	1
0,025	0,250	2,5
0,100	1,000	10
0,250	2,500	25
1,000	10,000	100

LEGEND
Epidrugs
Chemotherapy agents
Targeted agents
Repurposed drugs

frontiers in Endocrinology

REVIEW
published: 02 September 2021
doi: 10.3389/fendo.2021.742215

Hypoxia in Solid Tumors: How Low Oxygenation Impacts the "Six Rs" of Radiotherapy

Andria Rakotomalala[1,2], *Alexandre Escande*[3,4,5], *Alessandro Furlan*[1,2], *Samuel Meignan*[1,2*] *and Eric Lartigau*[3,4,5]

[1] Oscar Lambret center, Tumorigenesis and Resistance to Treatment Unit, Lille, France, [2] Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER – Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, Lille, France, [3] Oscar Lambret Center, Academic Radiation Oncology Department, Lille, France, [4] University of Lille, H. Warembourg School of Medicine, Lille, France, [5] CRIStAL UMR CNRS 9189, University of Lille, Villeneuve-d'Ascq, France

Radiotherapy is an important component of cancer treatment, with approximately 50% of all cancer patients receiving radiation therapy during their course of illness. Nevertheless, solid tumors frequently exhibit hypoxic areas, which can hinder therapies efficacy, especially radiotherapy one. Indeed, hypoxia impacts the six parameters governing the radiotherapy response, called the « six Rs of radiation biology » (for Radiosensitivity, Repair, Repopulation, Redistribution, Reoxygenation, and Reactivation of anti-tumor immune response), by inducing pleiotropic cellular adaptions, such as cell metabolism rewiring, epigenetic landscape remodeling, and cell death weakening, with significant clinical repercussions. In this review, according to the six Rs, we detail how hypoxia, and associated mechanisms and pathways, impact the radiotherapy response of solid tumors and the resulting clinical implications. We finally illustrate it in hypoxic endocrine cancers through a focus on anaplastic thyroid carcinomas.

Keywords: radiotherapy, hypoxia, radioresistance, HIF, thyroid cancer

OPEN ACCESS

Edited by:
Ralf Jockers,
Université de Paris, France

Reviewed by:
Rosalba Senese,
University of Campania Luigi Vanvitelli, Italy
Ines Lohse,
University of Miami, United States

****Correspondence:***
Samuel Meignan
s-meignan@o-lambret.fr

Specialty section:
This article was submitted to Cellular Endocrinology, a section of the journal Frontiers in Endocrinology

Received: *15 July 2021*
Accepted: *13 August 2021*
Published: *02 September 2021*

Citation:
Rakotomalala A, Escande A, Furlan A, Meignan S and Lartigau E (2021) Hypoxia in Solid Tumors: How Low Oxygenation Impacts the "Six Rs" of Radiotherapy. Front. Endocrinol. 12:742215. doi: 10.3389/fendo.2021.742215

INTRODUCTION

Because of its high cytotoxic potential in solid tumors, radiation therapy is a standard of care in many solid tumors (1, 2). The mechanism of action relies on ROS production, notably through water radiolysis, and DNA damages induction, especially double strand breaks (DSBs), leading to cell death. Aiming at killing cancer cells while preserving healthy cells, radiotherapy is mainly delivered through fractionated schemes. The success of fractionated radiotherapy depends on multiple sub-cellular, cellular, and microenvironmental parameters, together referred to as the "5Rs of radiation therapy": *Repair* (of irradiation-induced DNA damages), *Redistribution* (of cells within the cell cycle), *Repopulation* (of tumor cells after radiation), *Reoxygenation* (of the surviving cells) and, more recently, intrinsic *Radiosensitivity* (3). Moreover, it is now accepted that immune response could play a critical role in radiotherapy response, leading to the emergence of a 6th R: *Reactivation* (of the anti-tumor immune response) (4) (**Figure 1**).

However, numerous tumors fail to be controlled with radiotherapy, representing a significant cause of disease progression and mortality in cancer. There is a growing consensus that tumor heterogeneity is one of the principal explanations for treatment failure (5). In particular,

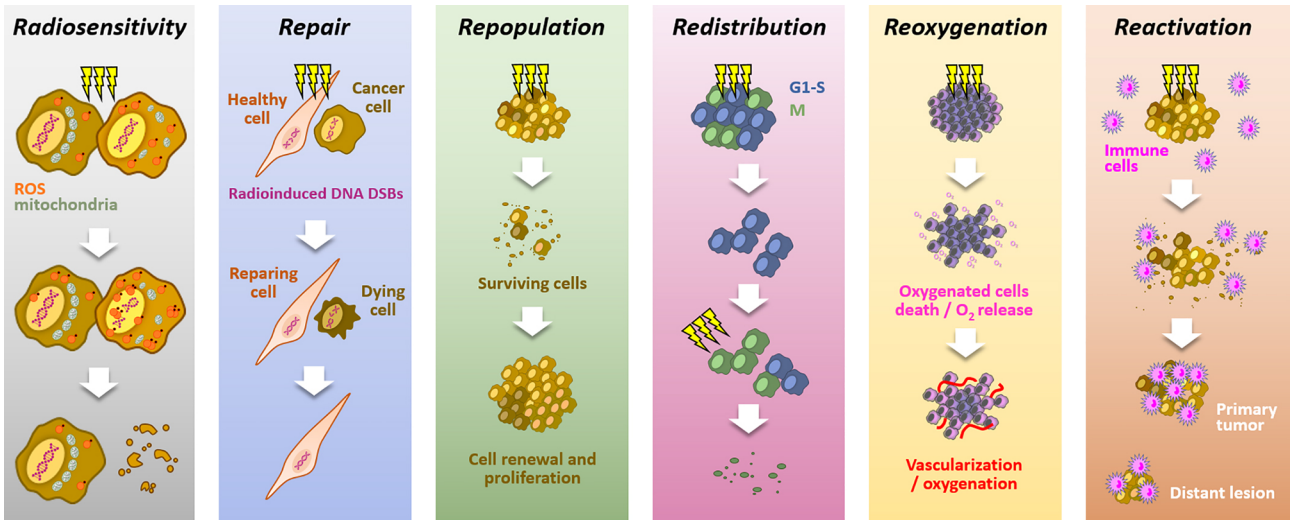


FIGURE 1 | The six "Rs" dictating the response to radiotherapy. Radiotherapy response depends on six parameters: *Radiosensitivity*, refers to the cell-intrinsic mechanisms (*e.g.*, metabolic adaption, ROS detoxification), explaining differences in cell responses to irradiations; *Repair*, refers to the cell capacity to survive by repairing radio-induced damages (particularly DSBs), in theory, more characteristic of healthy cells; *Repopulation*, refers to the tumor cells capacity to grow following a radiotherapy fraction; *Redistribution*, refers to the progression of cancer cells from radioresistant cell cycle phases (*i.e.*, G1/S) toward more radiosensitive phases (*i.e.*, G2/M), between radiotherapy fractions; *Reoxygenation*, refers to the oxygen level recovery following irradiation, due to well-oxygenated cells death and tumor vascularization; *Reactivation*, refers to the triggering of a systemic anti-tumor immune response following irradiation-induced immunogenic cell deaths.

oxygenation level is generally reduced and heterogenous within solid tumors, compared to the oxygenation found in associated healthy tissues (6, 7). In this sense, hypoxic regions are considered to be present in about 50% of solid tumors, and hypoxia is one of the most studied causes of radioresistance (8, 9). Indeed, hypoxia correlates with a poor prognosis after radiotherapy in various cancer types (10–12). Experimental evidence confirms the crucial impact of the low oxygen level (hypoxia) on the efficiency of cell irradiation.

Hypoxia is a consequence of the high tumor cell proliferation rate and the abnormal structure of the tumor vasculature (13). Depending on the distance of the blood vessels and their transient collapses, hypoxia can be chronic, meaning diffusion-limited, or acute, meaning transient and perfusion-limited. Basically, within most solid tumors, oxygen level fluctuates between physioxia (about 8% O_2, i.e., 60 mmHg), hypoxia (about 1% O_2, i.e., 7.5 mmHg), and anoxia (0% oxygen) (14). The unquestionable master regulators of the transcriptional response to hypoxia are the HIF transcription factors (Hypoxia Inducible Factor), especially HIF-1. The regulation of HIF-1 is very dynamic to adapt quickly to the oxygen concentration. HIF-1 is composed of two subunits, HIF-1α and HIF-1β. Under physioxia, HIF-1α is hydroxylated on 402 and/or 564 proline residues by oxygen-dependent prolyl hydroxylase domain proteins (PHD1-3). This hydroxylated form will interact with the tumor suppressor protein Von Hippel-Lindau (pVHL), which recruits an E3-ubiquitine-ligase complex tagging HIF-1α by polyubiquitination for proteasomal degradation. Thus, in the presence of oxygen, the HIF-1α subunit is continuously produced and degraded, which regulates HIF-1 activity. Under hypoxia, oxygen-dependent PHDs activity is attenuated, HIF-1α is thus stabilized and accumulates to finally translocate to the nucleus where it dimerizes with the constitutively expressed HIF-1β subunit. Thus formed, the HIF-1 heterodimer will then recruit transcriptional coactivators (p300/CBP) and bind to hypoxia response elements (HREs) present in various gene promoters to initiate a transcriptional program leading to cell adaptation to hypoxia, notably through induction of metabolic switch, oxygen transport increase, and angiogenesis. In the same family, HIF-2 presents a similar structure. As HIF-1, HIF-2 is a heterodimer of the HIF-2α subunit combined with the HIF-1β one. The oxygen-dependent alpha-subunit HIF-2α is similarly regulated to HIF-1α (**Figure 2**). HIF-1 and HIF-2 modulate their own set of target genes and appear differentially regulated according to the hypoxia level and duration (15). By their role in hypoxia adaption, both HIF factors have a pleiotropic impact on the cell response to irradiation. Supporting this, in head and neck squamous cell carcinomas, HIF-1α and HIF-2α expressions positively correlate with a higher rate of local failure after chemoradiotherapy treatment (16, 17). Of course, hypoxia can also impact cellular behaviors through HIF-independent mechanisms and pathways. For example, severe hypoxia can induce endoplasmic reticulum stress and thus activate UPR (Unfolded Protein Response) pathways.

This review proposes to outline how low oxygen levels and hypoxia-associated tumor cell adaptions affect the six Rs of radiation therapy (here photon radiation therapy, the most widely used) and thereby its efficiency in solid tumors treatment.

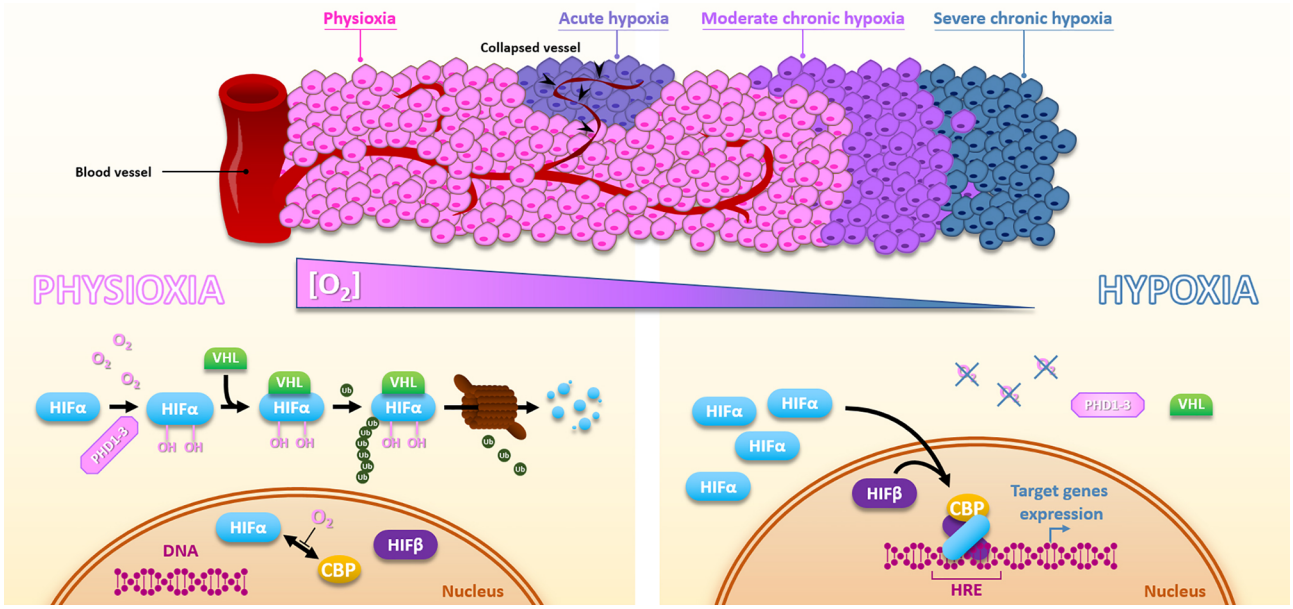


FIGURE 2 | Hypoxia and HIFs regulation. Due to the distance to the blood vessels, cancer cells are well oxygenated or under moderate to severe chronic hypoxia. In addition, vessels collapse can cause sporadic acute hypoxic areas. Under physioxia, HIFα is hydroxylated by PHDs, poly-ubiquitinylated *via* VHL, and then degraded by the proteasomal way. Oxygen also inhibits HIFα-CBP interaction. Inversely, hypoxia inactivates PHDs, HIFα is subsequently stabilized, translocates into the nucleus, and forms a complex with HIFβ and CBP, which activates HREs-containing genes expression.

RADIOSENSITIVITY: HOW THE LOW OXYGEN LEVEL INTRINSICALLY PRIMES CANCER CELLS FOR IRRADIATION RESISTANCE

"Radiosensitivity" defines the intrinsic sensitivity of tumor cells to radiation therapy. This property appears very heterogeneous within solid tumors and is impacted at two levels by hypoxia.

First, the molecular oxygen level directly impacts cell radiosensitivity *via* the "oxygen effect." Actually, radiation-induced DNA damages are less likely to lead to cell killing under hypoxia (7). To explain that, the "oxygen fixation hypothesis" is based on the fact that oxygen reacts with radiation-induced DNA radicals to stabilize them. In a hypoxia or anoxia context, compounds containing sulfhydryl groups spontaneously reverse radiation-induced DNA radicals by reduction (18). *In vitro*, the "oxygen fixation hypothesis" is supported by the radioresistance induced by an oxygen depletion only during irradiation (19, 20). Another hypothesis formulated by Richardson and Harper suggests a central role for radiation impacts on mitochondria to explain the "oxygen effect." In fact, radiations increase cell mitochondrial ROS content and disturb mitochondrial metabolism, which is more prejudicial for aerobic cells than hypoxic cells (21). The oxygen tension thus appears to be a determinant for the intrinsic tumor cell "Radiosensitivity," and the "oxygen effect" may partly explain the radioresistant phenotype of hypoxic tumor areas.

Besides, hypoxia promotes additional pleiotropic cellular adaptions through hypoxia-associated signaling pathways, which can prime cancer cells for radiotherapy resistance. These include cell metabolism rewiring, ROS detoxification, autophagy, and resistance to cell death (**Figure 3**).

Cell Metabolism

Hypoxia modifies cancer cell metabolism (22). Yet, cell metabolism changes strongly correlate with radioresistance in various cancer models (23). The consensus is that hypoxia drives a metabolic switch from an OXPHOS metabolism toward a glycolytic metabolism (24). This glycolytic flux leads to an increased lactate production which correlates with a particularly poor prognosis in HNSCC and uterine cervix cancers treated by radiotherapy (25, 26). Moreover, the lactate concentration positively correlates with tumor hypoxia and relative resistance to a fractionated radiation therapy regimen (30 fractions within six weeks) in HNSCC xenograft models (27, 28). Following that, under hypoxic conditions, HIF-1α knock-down diminishes the tumor lactate level, increases basal and maximal oxygen consumption rate (OCR), and sensitizes HNSCC xenografts to high-dose single-fraction radiotherapy (29).

At the molecular level, various factors involved in hypoxia-induced metabolic modulations confer radioresistant properties to cancer cells. Among them, pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), a HIF-1 target gene, inactivates the pyruvate dehydrogenase (PDH) responsible for pyruvate to acetyl-CoA conversion to supply tricarboxylic acid cycle (TCA) (30). So, PDK1 inhibits OXPHOS metabolism and forces cells to rely on glycolytic metabolism. In HNSCC, PDK1 expression appears to have a critical role in maintaining glycolytic metabolism under hypoxia through a HIF-1α dependent way and correlates with a

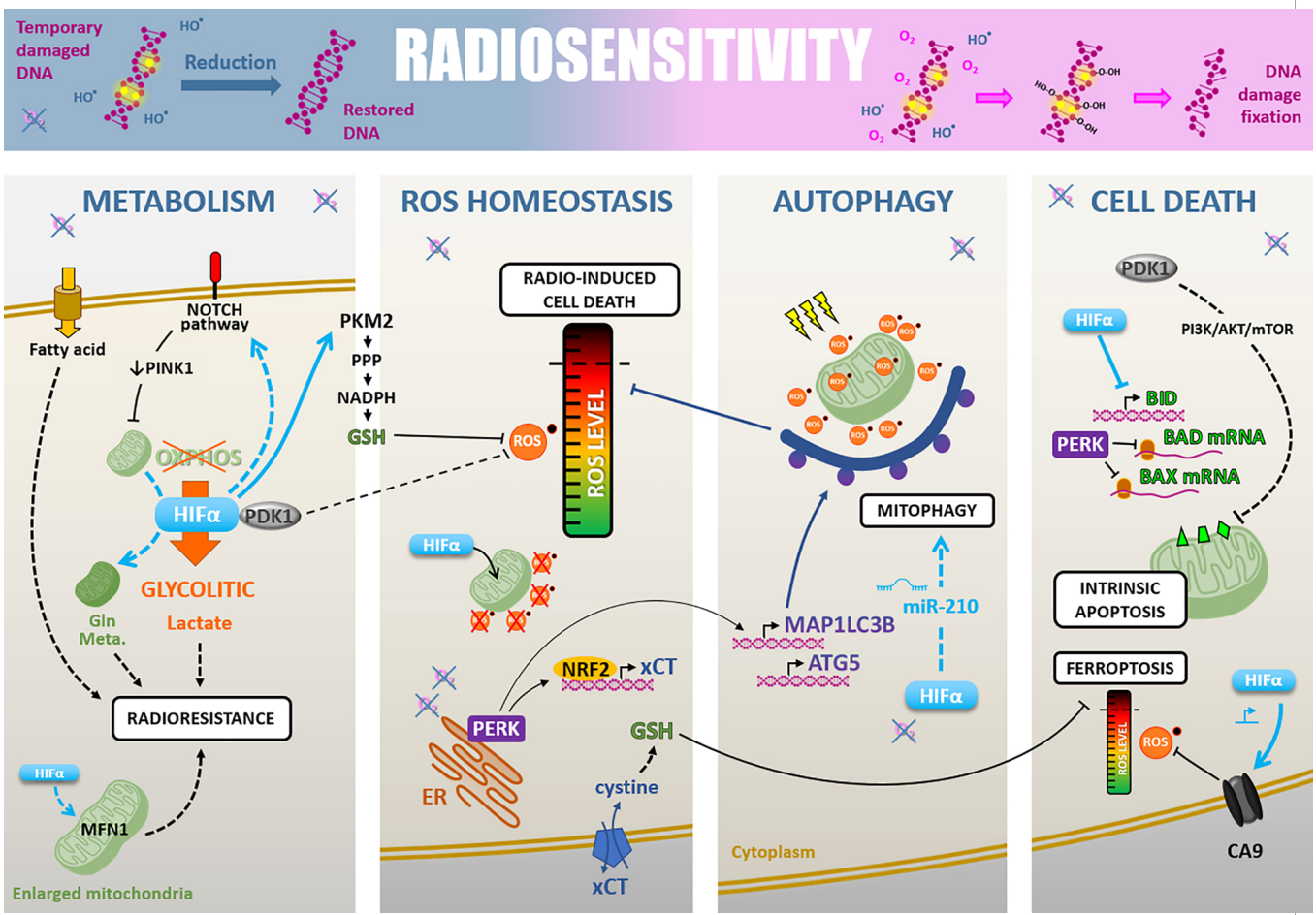


FIGURE 3 | Radiosensitivity. Cell-intrinsic radiosensitivity can be linked to the fixation of radiation-induced DNA damages in the presence of oxygen, whereas a hypoxic environment favors the reduction of DNA radicals and return to a restored DNA (upper part). Hypoxia also impacts radiosensitivity through different cellular adaptions. i) The cell metabolism modifications, mainly PDK1-mediated glycolytic switch leading to lactate production, but also fatty acid uptake, NOTCH-dependent mitochondrial glutamine metabolism increase, and mitochondria fusion. ii) The ROS homeostasis is maintained under the critical level by PDK1 increase, HIFα-mediated GSH regeneration, HIFα translocation to mitochondria leading to their ROS production decrease, and PERK-mediated xCT expression promoting GSH synthesis. iii) Induction of HIFα- and PERK-mediated autophagy of ROS-productive damaged mitochondria. iiii) The cell death regulation through a HIFα-, PDK1- and PERK-mediated inhibition of antiapoptosis modulators BID, BAD, and BAX, and a HIFα-induced CA9 expression decreasing ROS level and inhibiting ferroptosis.

dismal prognosis (31). Following the example of PDK1, another mechanism involved in the OXPHOS down-regulation and tumor aggressiveness under hypoxia (1% O_2) is the modification of mitochondrial mass and morphology by PINK1 down-regulation through HIF-1-mediated NOTCH signaling activation in hepatocellular carcinoma cells, a cancer type highly resistant to radiotherapy (32).

Although hypoxia favors glycolytic metabolism over mitochondrial OXPHOS, mitochondria still keep a role in cell death and radiation therapy resistance under hypoxia (33). Chronic hypoxia (72h, 1% O_2) actually modifies mitochondria morphology through a mitochondria fusion excess mediated by a HIF-1α, Mitofusin I, BNIP3, and BNIP3L dependent way in several cancer cell types (*i.e.*, colon, lung, cervix, renal cancer cells). These functional enlarged mitochondria confer a cell death resistance and could, by the way, prime hypoxic cancer cells to radioresistance (34, 35). Moreover, hypoxia can enhance mitochondrial glutamine metabolism of NSCLCC through a HIF-1α dependent manner and glutamine metabolism targeting can induce radiosensitization (36, 37).

Also, monounsaturated fatty acids are essential cellular compounds whose generation depends on oxygen. In lung adenocarcinoma cells, chronic severe hypoxia induces an adaptive up-regulation of SKG1 (human serum and glucocorticoid-inducible kinase) to promote unsaturated fatty acid uptake and thus shunt their oxygen-dependent generation. Matschke and colleagues showed that this hypoxia-linked adaption confers radioresistance *in vitro* in this model (38).

ROS Homeostasis

Metabolism and ROS homeostasis are closely associated, and hypoxia significantly impacts ROS detoxification through

metabolism rewiring and other ways. For example, PDK1, which expression increases under hypoxia, affects cell metabolism and thus maintains a low basal ROS level in hypoxic cells (30). As radiotherapy efficacy relies on ROS production, hypoxia can favor tumor cell-intrinsic radioresistance by promoting ROS detoxification processes.

In addition, to sustain a glycolytic metabolism, hypoxia can support glycolysis branched pathways such as pentose phosphate pathway (PPP), which participate in cellular redox homeostasis (39, 40). Mechanistically, hypoxia (1% O_2) induces PKM2 (Pyruvate Kinase M2) isoform expression in breast cancer cells through HIF-1α recruitment on *PKM2* gene by KDM8 (41). The particularly weak activity of the PKM2 isoform slows the glycolytic flux down and favors glucose-6-phosphate accumulation to fuel PPP. During PPP, the 6-phosphogluconate dehydrogenase reduces $NADP^+$ to NADPH which participates in reduced glutathione (GSH) regeneration, a cellular antioxidant highly involved in cellular ROS detoxification. So, by promoting PPP, hypoxia increases the cellular antioxidant potential and could counteract radiation therapy efficacy. Furthermore, severe cyclic hypoxia can increase GSH level through an up-regulation of two mitochondrial metabolite carriers, SLC25A1 and SLC25A10, in various cancer cell types (*i.e.*, glioblastoma, lung, and prostate cancer). These factors participate in NADPH cellular pool maintenance and sustain mitochondrial metabolism under hypoxia, notably fatty acids uptake, which has been linked to the radioresistance phenomenon (38). Consequently, severe cyclic hypoxia is associated with reducing basal mitochondrial ROS content and a high ROS detoxification potential, conferring resistance to radiotherapy (42, 43).

Beyond their canonical role of transcription factors, HIFs also protect cells from oxidative stress more directly. Indeed, under hypoxia or during oxidative stress, mitochondrial translocation of HIF-1α reduces mitochondrial ROS production and protects cancer cells from cell death (44), and possibly from irradiation-induced mitochondrial ROS production. Following the example of HIF-1α, HIF-2α can also prevent ROS overload and protect renal carcinoma cells from irradiation-induced cell killing (45).

In addition to the HIF-dependent response, severe hypoxia leads to endoplasmic reticulum (ER) stress and induces unfolded protein response (UPR). The PERK (PRKR-like ER kinase) axis of the UPR is particularly involved in cell survival during severe hypoxia or anoxia. In a subcutaneous murine glioma model, the tumor hypoxic fraction resists a high single dose of radiation therapy by activating the PERK/eIF2α/GADD34c axis, when HIF-1α is rather involved in post-irradiation re-progression. This PERK axis drives glutamate-cystine antiporter xCT expression, promoting GSH synthesis and cell radioresistance (46). In this sense, it has been shown that PERK phosphorylates the oxidative homeostasis master regulator NRF2 and promotes its nuclear translocation driving the expression of antioxidant factors, notably xCT antiporter (47–49). Küper and colleagues have recently shown that NRF2 stabilizes HIF-1α by direct interaction and plays a critical role in pancreatic and lung cancer cell radioresistance under hypoxia (1% O_2) *in vitro* (50).

Autophagy

In several cancer models, hypoxia exposure, as well as radiation treatment, lead to autophagy initiation (51). Autophagy preferentially occurs in hypoxic tumor regions and is observed along the entire gradient of hypoxia (52). Although autophagy can participate in radiation sensitivity in certain contexts, it is largely described as a cytoprotective mechanism, protecting the cell from extensive damages, notably after irradiation, by recycling damaged cellular components (*e.g.*, mitochondria). Thus, hypoxia-induced autophagy can constitute a radioresistance mechanism in several cancer models, as demonstrated in osteosarcoma cells, a highly hypoxic and radioresistant cancer type (53, 54). Moreover, targeting specific autophagy-related genes (*e.g., ATG3*) can sensitize pharyngeal, breast, and rectum resistant cancer cell lines to single-dose and fractionated irradiations *in vitro* (55).

At the molecular level, during severe hypoxia (<0.02% O_2), the PERK axis of UPR sustains autophagy by inducing *MAP1LC3B* (microtubule-associated protein 1 light chain 3β) and *ATG5* (autophagy-related gene 5) expression *in vitro* and *in vivo*. This PERK-induced autophagy is a hypoxia-mediated adaption that diminishes cancer cell radiosensitivity, *in vitro* and *in vivo* (52). To a smaller extent, it has also been reported that the "hypoxamir" miR-210 can participate in the initiation of hypoxia-induced autophagy and promotes colon cancer cells radioresistance (56).

Finally, hypoxia-induced autophagy can highly reduce irradiation-linked oxidative stress and counteracts radiation therapy efficacy in various cancer cell models (*e.g.*, osteosarcoma and NSCLC cells) (53, 57).

Cell Death Resistance

Radiation therapy relies on DNA damages and ROS overload induction to trigger cell death by various modalities (58). Among them, the cell death by mitotic catastrophe and the apoptosis processes are notably controlled by the BCL-2 family proteins, containing the pro-apoptotic members BID, BAD, and BAX (59). Yet, hypoxia (1-2% O_2) and anoxia (<0.1% O_2) correlate with the down-regulation of these proteins in colorectal cancer cells *in vitro*. In addition, these pro-apoptotic factors are widely absent from tumors hypoxic areas *in vivo*. Mechanistically, hypoxia-mediated *BID* down-regulation depends on its transcriptional repression by HIF-1α (60). Also, PDK1 (a HIF-1α target gene) drives PI3K/AKT/mTOR pathway activation, decreases BAX expression, and renders hepatocellular carcinoma cells resistant to irradiations (61). Likewise, the decrease of BAD and BAX protein levels can also be due to reducing their translation rate, possibly linked to the PERK activation observed under severe hypoxia (60). So, hypoxia can confer a radioresistant phenotype by down-regulate certain pro-apoptotic factors, which have been recently shown as essential for irradiation-induced apoptosis (58).

Besides apoptosis, recent studies suggest that other kinds of cell death are highly involved in radiation therapy efficacy. It's notably the case for ferroptosis, an iron and ROS-dependent cell death (62), from which cancer cells are protected under

hypoxia (63). Indeed, it has been shown that carbonic anhydrase 9 (CA9), a well-known target of HIFs factors, can participate in mesothelioma cells ferroptosis resistance by regulating ROS, lipid peroxidation, and mitochondrial Fe^{2+} levels under hypoxia (64). Also, by promoting ROS detoxification, notably through NRF2-mediated xCT expression (an anti-ferroptosis factor) and decreasing mitochondrial ROS production, hypoxia can counteract radiation-induced ferroptosis (65).

Since low oxygen level leads to selecting cells that can overcome and adapt to this stress, cyclic hypoxia promotes apoptosis-resistant cell expansion and further diminishes global radiation-induced cell death within the tumor. For example, cyclic hypoxia selects lung cancer cells resistant to the intrinsic apoptosis pathway. These selected cells harbor a radioresistant phenotype linked to a defective conformational change of BAX after irradiation (66). Also, a recent study defines hypoxia molecular hallmarks across 19 tumor types. It shows that hypoxic stress highly impacts the clonal evolution of tumors and drives an enrichment for specific molecular alterations (67). Among these hypoxic-enriched molecular alterations, TP53 loss of function is frequently observed and directly associated with an apoptotic potential loss. Of note, TP53 mutations drive the radioresistance phenomenon, notably in some pediatric high-grade gliomas characterized by their radioresistance (68).

To sum up, the low oxygenation both reduces radiotherapy efficacy *via* the physico-chemical "oxygen effect" and *via* hypoxia-induced biological adaptions. While hypoxia downplays the OXPHOS metabolism, the mitochondria are not inert and conserve a crucial role in hypoxia-mediated radioresistance phenomenon. The metabolic remodeling towards pathways known to enhance antioxidant protections, accompanied by increased autophagy, result in an exacerbate ability to maintain ROS homeostasis even after ionizing radiation. Last but not least, hypoxia drives and selects resistance to various radiation-induced cell death. Altogether, hypoxia undeniably enhances cancer cell's intrinsic radioresistance and participates in radiotherapy treatment failure. In this frame, a phase I clinical trial (NCT01163487) evaluates tumor hypoxia by PET-scan in recurrent head and neck cancers and the possibility to use dichloroacetate (DCA), a drug targeting PDK1, in these tumors. Furthermore, a phase II clinical trial (NCT02432417) in glioblastoma assesses the efficiency of combining the standard chemoradiotherapy regimen with an autophagy inhibition by chloroquine. In this study, the hypoxia within the tumor is monitored by PET-scan imaging before and after the chloroquine treatment. A challenge for the effectiveness of autophagy-inhibition combined with radiotherapy remains to dichotomize contexts in which autophagy is cytoprotective rather than nonprotective, cytostatic, or cytotoxic.

REPAIR: THE VERSATILE IMPACT OF HYPOXIA ON DNA DAMAGE REPAIR

Radiation therapy causes direct and indirect (*via* ROS) DNA damages. The "*Repair*" defines the deferential capability of normal *versus* tumor cells to rely on DNA damage response (DDR) pathways after a radiotherapy fraction. Among radiation-induced DNA damages, double-strand breaks (DSB) are those responsible for the higher part of radiotherapy-induced cell death (69).

In eukaryotic cells, two major pathways drive DSBs repair; the non-homologous end joining (NHEJ) in most of the cases and the high-fidelity homologous recombination repair (HRR) (70). An increase in those DSBs repair mechanisms' efficiency correlates with cancer cell resistance to radiation therapy (71, 72). Several studies have shown that hypoxia impacts those DSBs repair mechanisms (7, 73, 74). Nevertheless, hypoxia globally has a versatile role on cells' DSBs repair capacity *in vitro*, either promoting or reducing it, depending on cellular model, hypoxia level, duration, and alternation with reoxygenation. For example, Kumareswaran and colleagues showed that continuous and very severe hypoxia (0.2% O_2), as well as anoxia, cause a defective irradiation-induced DSBs repair in non-cancerous human fibroblasts (19). On the contrary, Wozny *et al.* recently showed that continuous but less pronounced hypoxia (1% O_2) leads to an increased NHEJ initiation and correlates with radioresistance in HNSCC cells (75).

Such discrepancies may find some explanations with various molecular mechanisms differentially impacted by hypoxia in different cellular contexts (**Figure 4**). On the one hand, it is frequently reported that hypoxia favors the initiation of DSBs repair mechanisms by increasing ATM (ataxia-telangiectasia mutated protein) and DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) expression and phosphorylation on ser1981 and ser2056, respectively. This notably occurs through MAPK, Scr, and AMPK signaling pathways (20, 76–78). Once activated, ATM and DNA-PKcs catalyze the phosphorylation of several substrates, notably histone H2AX at serine 139 (ɣH2AX), which signaled DSBs before effectors processing. Thus, hypoxia can prime cancer cells for DSBs repair initiation (79). In this sense, it has been recently demonstrated that hypoxia (1% O_2) is associated with a higher ɣH2AX foci decay rate and enhanced RAD51 recruitment in irradiated HNSCC cells, suggesting a higher efficacy of HRR under hypoxia in this model (75, 80).

Contrarily, on the other hand, hypoxia reduces the expression of several key HRR effectors such as *NBN*, *MRE11*, *RAD51*, and *BRCA1* in different cancer cell models (20, 81, 82). Mechanistically, hypoxia-induced down-regulation of *RAD51* and *BRCA1* can be mediated by E2Fs factors (83, 84). Also, the reduced *BRCA1* and *RAD51* expressions in VHL-mutated cancers highlight the involvement of HIFs in HRR factors down-regulation and radiation-induced DSBs persistence (85). A mechanism of HRR genes down-regulation is driven by the HIFs-dependent miR-210, which targets *RAD52* mRNA (86). Altogether, the hypothesis that hypoxia down-regulates HRR to favor fast but error-prone NHEJ mechanism to repair radiation-induced DSBs emerged in some models (84, 87).

Concerning NHEJ pathway effectors, oxygen level impacts remain elusive and appear highly dependent on hypoxia conditions (7, 73). For example, in prostate and breast cancer cells maintained under severe (0.2% O_2) and moderate (3% O_2) hypoxia, respectively, both HRR-related genes (*e.g.*, *RAD51* and *BRCA1*) and NHEJ-related genes (*e.g.*, *Ku70*, *LIG4*, and *XRCC4*)

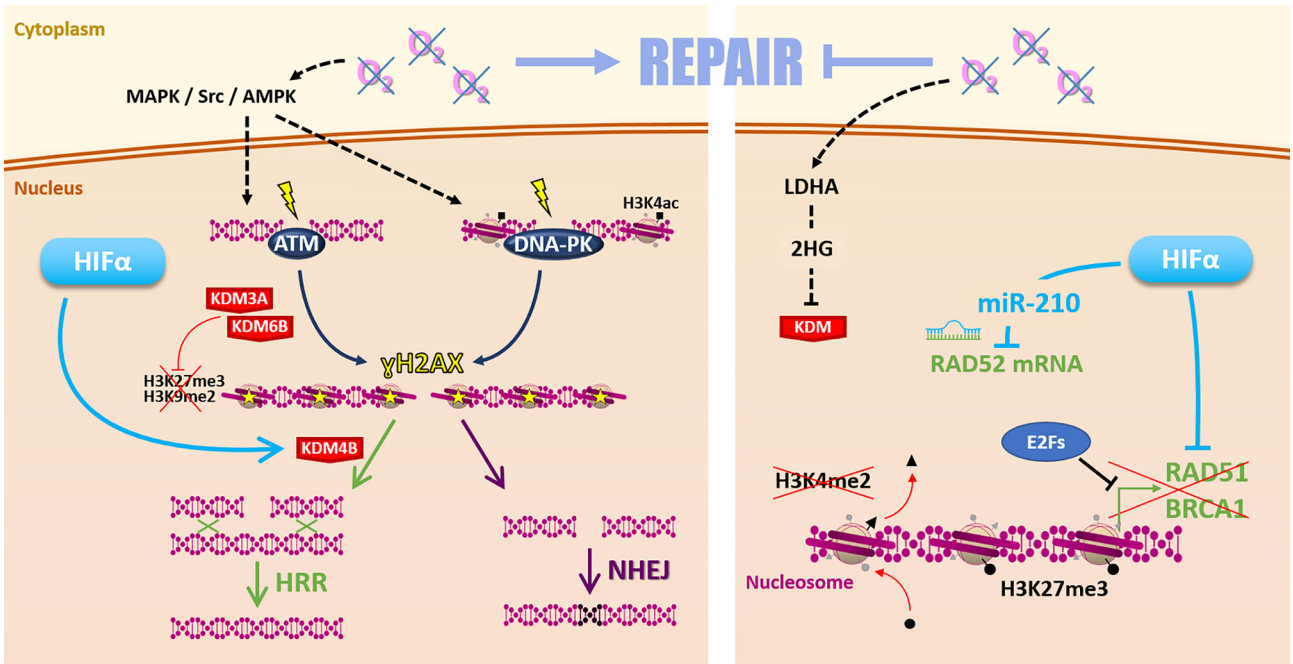


FIGURE 4 | Repair. Hypoxia can favor radiation-induced DNA damages repair (left side) by MAPK/Src/AMPK-dependent ATM and DNA-PK activation. Hypoxia-induced modulation of KDM3A, KDM6B, and KDM4B expression changes the epigenetic landscape favoring DSBs repair by HRR or NHEJ. However, low oxygen levels can also affect the Repair (right side) notably *via* 2-hydroxyglutarate-dependent KDM inhibition. Moreover, HIFα and E2Fs inhibit HRR-related genes *RAD51*, *BRCA1* expression. Hypoxia-induced epigenetic changes (as loss of H3K4me2 and gain of H3K27me3 marks) inhibit these genes' expression. HIFα can also inhibit *RAD52* mRNA through the miR-210.

are down-regulated (88, 89). On the contrary, in breast cancer, NSCLCC, and colon cancer cells, very severe hypoxia (0.01%O_2) has no impact on NHEJ activity (82).

In addition, the deep relationship between hypoxia and epigenetic also impacts the "Repair" (90). Indeed, hypoxia-induced epigenetic modulations can directly impact the DDR orchestration, which relies on chromatin remodeling (91, 92). For example, hypoxia-enhanced acetylation at lysine 14 of histone 3 (H3K14ac) favors DNA-PK complex formation on DNA (79). This potentially primes hypoxic cells for post-irradiation DSBs repair initiation. It has also been shown that hypoxia can modify the epigenetic landscape (global loss of H3K27me3 and H3K9me2) by modulating epigenetic enzyme expressions, such as KDM3A and KDM6B and finally promotes DDR activity and radioresistance in HNSCC (80). Moreover, *via* HIFs, hypoxia can also increase KDM4B expression participating in HRR orchestration (93–95). Nevertheless, these KDM enzymes are α-ketoglutarate-dependent enzymes and are inhibited by L-2-hydroxyglutarate (2HG), a metabolite notably produced under hypoxia by lactate dehydrogenase A (LDHA) (96, 97). Thus, in that case, hypoxia-associated metabolism can also disturb HRR activity but by radiosensitizing cells (93). In this sense, hypoxia can also promote transcriptional silencing of the HRR-related genes *BRCA1* and *RAD51* through the induction of LSD1-mediated demethylation of the histone 3 lysine 4 (H3K4) and EZH2-mediated trimethylation of the histone 3 lysine 27 (H3K27) (98, 99).

Finally, hypoxia impacts "Repair" through various multimodal mechanisms leading to apparently antagonist cellular consequences. Globally, hypoxia appears to favor DSBs repair initiation and epigenetic orchestration but down-regulate HRR effectors. The consequent impact is highly dependent on the cancer model and hypoxia type. In this context, it seems complicated to develop a generalizable "Repair"-based therapeutic strategies to overcome hypoxic cells radioresistance. Still, a recent study demonstrated that, contrary to photon radiation therapy, hypoxia (1% O_2) doesn't enhance the repair of carbon ion irradiation-induced DSBs, suggesting that the choice of irradiation particles can overcome hypoxia-mediated repair enhancement in HNSCC (75). In this frame, a phase II clinical trial evaluates the benefit of an increased radiation dose and the use of carbon ion radiotherapy for hypoxic HNSCCs based on F-MISO-PET hypoxia-imaging (NCT03865277). Further studies in other cancer models and with different hypoxia parameters are needed to corroborate these promising findings.

REPOPULATION: HYPOXIA AND CANCER CELLS RENEWAL AFTER RADIATION THERAPY

The "*Repopulation*" defines the renewal and proliferation of surviving cancer cells following irradiation. This phenomenon

represents one of the main reasons for the failure of conventionally fractionated radiation therapy.

It is now widely accepted that cancer stem cells (CSCs) are involved in cancer progression and post-radiotherapy tumor recurrence through their self-renewal properties (100). Also, CSCs are frequently associated with hypoxic niches which favor stemness maintenance (101, 102). Hypoxia, particularly chronic hypoxia, promotes the self-renewal capacity of persistent CSCs (103). For example, hypoxia maintains CD133-positive glioblastoma cells in an undifferentiated state and enhances their self-renewal activity through a HIF-1α dependent way (104). In addition, in these cells, HIF-2α overexpression under hypoxia also plays an essential role in maintaining self-renewal capacities *in vitro* and *in vivo* (105).

Mechanistically, hypoxia favors CSC self-renewal by stemness-associated signaling activation. In breast cancer cells, HIF-2α stabilization under chronic hypoxia actives the WNT/β-catenin signaling pathway (106). Hypoxia can also induce AKT phosphorylation and thus participate in CSCs self-renewal by the AKT/WNT/β-catenin axis (107–109). Furthermore, the WNT/β-catenin signaling pathway drives post-radiotherapy progression in xenograft models of prostate cancer cells overexpressing HIF-1α (110). Another stemness-associated pathway potentially responsible for hypoxia-enhanced repopulation is the NOTCH pathway. NOTCH signaling pathway appears highly responsible for HIF-mediated maintenance of self-renewal properties in glioblastoma and breast cancer cells (106, 111). As WNT/β-catenin, the NOTCH signaling pathway is preferentially activated under chronic hypoxia in a HIF-2α dependent way (106), even if HIF-1α can also activate the NOTCH pathway by stabilizing NICD through direct interaction (111). STAT3 activation is a third pathway by which hypoxia promotes CSCs expansion. Through a HIF-1α-dependent way, hypoxia modulates glioma cells secretome, which induces STAT3 phosphorylation and subsequently promotes CSC self-renewal capacity *in vitro* and *in vivo* (112). Following these studies, HIFs factors appear highly involved in glioblastoma stem cells' self-renewal properties that could explain the post-radiotherapy progression characteristic of this tumor type.

Hypoxia also plays a role in repopulation by regulating cyclin expressions, notably *via* HIFs factors, thus promoting radiation-surviving cancer cell proliferation. HIF-2α can drive cyclin D1 and cyclin D2 expression, notably through c-MYC activation for the latter, and promote cancer cell proliferation (113, 114). Following the example of HIF-2α, HIF-1α drives NOCTH1-mediated cell proliferation through cyclin D1 expression in melanoma cells under severe hypoxia (0.5%) (115). Also, hypoxia can impact cyclin expressions *via* the control of epigenetic enzymes. Indeed, Kim and collaborators have shown that, under hypoxia (1% O_2), KDM4B induces cyclin A1 expression and favors gastric cancer cell proliferation following irradiation (95).

To conclude, hypoxia widely impacts the "Repopulation" through HIFs master regulators (**Figure 5**). In several cancer models, chronic hypoxia and HIF-2α appear critical, either by favoring CSCs self-renewal *via* WNT and NOTCH signaling pathways or by modulating cyclin expressions through c-MYC activation for example. In this frame, the ɣ-secretase/NOTCH signaling pathway inhibitor RO4929097 has been tested in

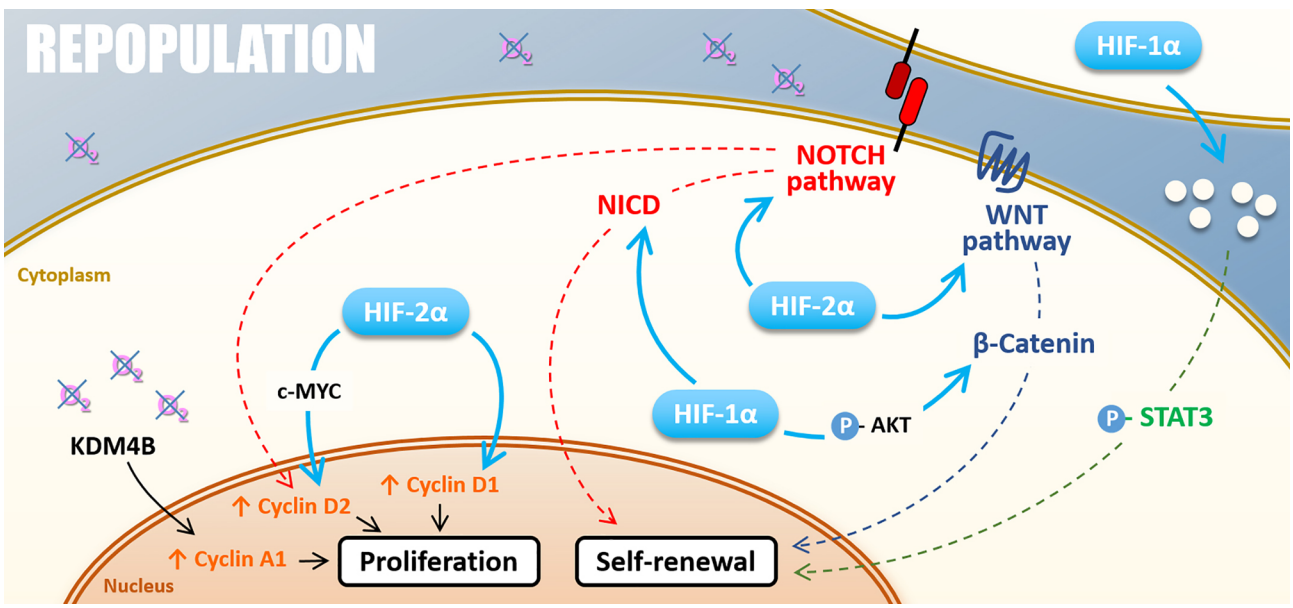


FIGURE 5 | Repopulation. Under hypoxia, cell proliferation can be stimulated by KDM4B-dependant Cyclin A1 up-regulation and Cyclin D2 up-regulation driven by HIF-2α through c-MYC or thought NOTCH pathway under hypoxia. HIF-2α also directly induces Cyclin D1 expression. The self-renewal is positively regulated by NOTCH and WNT/β-catenin pathways activated by both HIF-1α and HIF-2α**.** HIF-1α also activates the STAT3 pathway and cell renewal through the modification of cell secretome.

association with radiotherapy through several phase I/II clinical trials, notably for gliomas or breast cancers brain metastases (NCT01119599, NCT01217411). Nevertheless, these studies were prematurely terminated, and the clinical interest in inhibiting the NOTCH pathway in hypoxic tumors remains to be assessed.

REDISTRIBUTION: HOW HYPOXIA ALTERS CELL CYCLE DISTRIBUTION FOLLOWING RADIATION THERAPY

Cancer cells exhibit differential radiosensitivity depending on the cell cycle phase. Because cells in mitosis already pass through the last G2/M cell cycle checkpoint, they are the most sensitive to a mitotic catastrophe following radiations. Those in the G1 and S-phases are, on the contrary, more radioresistant (116). *"Redistribution"* defines the fact that these cells that survive the first fraction of radiation will progress into a more sensitive phase of the cell cycle and will be more sensitive to the following fraction. In this context, hypoxia, in particular acute hypoxia, *via* HIF-1α stabilization, counteracts radiation therapy efficiency by favoring cell-cycle arrest in less sensible phases (*i.e.*, G0/G1 and S-phases) (117).

Indeed, HIF-1α modulates many cell cycle regulation processes such as CHK1 (checkpoint kinase 1) activation and cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) expression like $p21^{CIP1}$ (110). CHK1 and $p21^{CIP1}$ are involved in cell cycle arrest in G1 or S-phase, by inhibiting CDC25A (cell division cycle 25A) activating-phosphatase or direct inhibition of the cyclin E/CDK2 complex, respectively. In this sense, in prostate cancer cells overexpressing HIF-1α, irradiation leads to a re-assortment in favor of G0/G1 and S-phase, in accordance with CHK1 phosphorylation and p21 up-regulation. This correlates with a radioresistant phenotype *in vitro* and *in vivo* (110). Mechanistically, under hypoxia (1% O_2), HIF-1α displaces MYC from *CDKN1A* (*$p21^{CIP1}$*) promoter and induces $p21^{CIP1}$ up-regulation (118). Hypoxia also induces $p27^{KIP1}$ and $p57^{KIP2}$ up-regulation, two other CKIs targeting G1/S transition (119–121). In several cancer cell types (*i.e.*, colon, cervical and hepatocellular cancer cells), another hypoxia-induced mechanism that leads to G0/G1 and S-phase accumulation is the HIF-1α dependent down-regulation of CDC25A protein level (122). In addition to these mechanisms, it can also be assumed that hypoxia-induced ATM activation (described in the "Repair" section), which activates CHK2 and thus inhibits CDC25A, participates to cell cycle re-assortment in less radiosensitive phases during hypoxia (123).

In addition to their implication in "Repopulation" through their renewal properties, CSCs present in hypoxic niches can as well impact "Redistribution." Indeed, CSCs can harbor a quiescent behavior under hypoxia. In glioblastoma, CSCs of the peri-necrotic zone, expressing HIF-1α, harbor a quiescent phenotype highlighted by the suppression of the RNA polymerase II phosphorylation at serine 2 (RNApII-S2P), a marker of transcriptionally less active quiescent cells (124). Moreover, in breast cancer cells, cyclic hypoxia selects slow-cycling CSCs, which accumulate in G0/G1 phase and are rarer in G2/M phases (125). At the molecular level, Ju and colleagues have recently shown that hypoxia (1% O_2) induces *CSN8* (COP9 signalosome 8) expression, which correlates with several quiescence markers expression (*i.e.*, NR2F1, DEC2, and $p27^{KIP1}$), a decrease of MYC expression, and a lower level of ki67 in colorectal cancer cells (126). Thus, CSN8 appears to be involved in a hypoxia-induced quiescent state and could, in this context, impact cell response to irradiation.

To sum up, hypoxia can counteract the "Redistribution" after radiation therapy by favoring cell cycle arrest within most

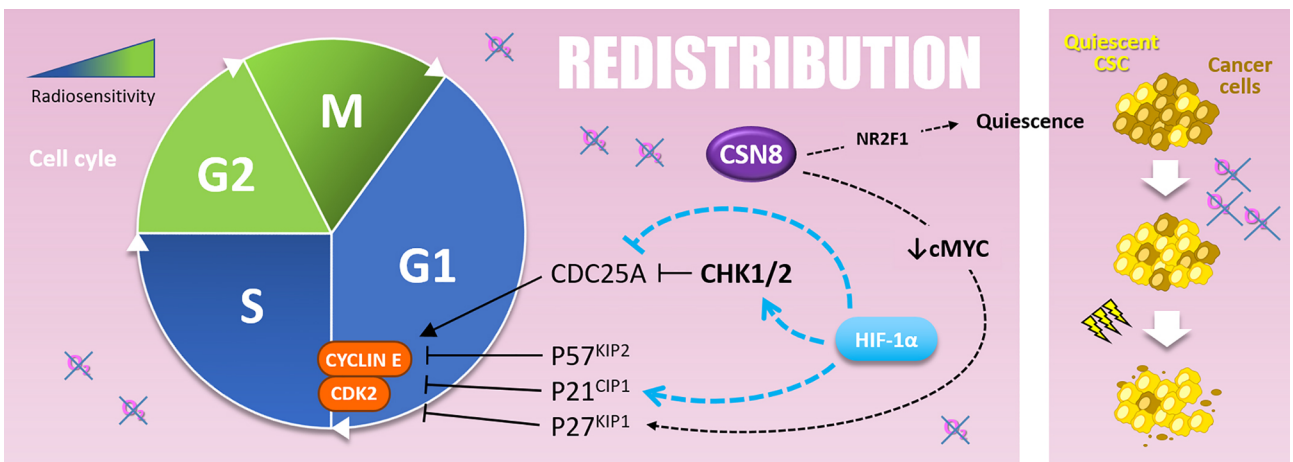


FIGURE 6 | Redistribution. Cells are more resistant to radiotherapy in the G1 and, above all, in the S phase of the cell cycle. The G1-S transition is notably driven by the Cyclin E and CDK2, inhibited by $P57^{KIP2}$, $P21^{CIP1}$, and $P27^{KIP1}$. Hypoxia upregulates $P57^{KIP2}$ and $P27^{KIP1}$ as well as $P21^{CIP1}$ in a HIF-1α dependent manner. The overexpression of CSN8 correlates with cMYC decrease and $P27^{KIP1}$ expression. It also correlates with NR2F1 quiescence marker expression. Quiescent CSC, selected by hypoxic stress, are more resistant to irradiation and participate in radioresistance (right side).

radioresistant cell cycle phases (*i.e.*, G0/G1 and S-phase). Actually, HIF-1α promotes CKI expressions (such as $p21^{CIP1}$) and CDC25A repression leading to cell cycle arrest in G0/G1 and S phases (**Figure 6**). In this sense, hypoxia can also maintain CSCs in a quiescent state. Nevertheless, determine in which context hypoxia counteracts the "Redistribution" (*via* cell cycle arrest) rather than favors the "Repopulation" (*via* cell expansion) after radiotherapy remains an open question.

REOXYGENATION: RADIATION-INDUCED HYPOXIA-LIKE SIGNALING RESTRICTS REOXYGENATION EFFECT

Hypoxic cells are up to three times more radioresistant than well-oxygenated ones. In this context, "*Reoxygenation*" defines the fact that, between radiotherapy fractions, well-oxygenated cells death leads to oxygen release, reduction of oxygen demand, and tumor bulk shrinkage allowing better oxygen diffusion and angiogenesis. Thus, the "*Reoxygenation*" turns back initially refractory hypoxic areas to a more radiosensitive state. Nevertheless, it is essential to note that irradiation and the subsequent reoxygenation induce oxidative stress that paradoxically stabilizes HIF-1 (127) (**Figure 7**).

At first, hypoxia appears to favor the tumor reoxygenation as *VEGF* is a target gene of HIF factors, and HIF-1 protects tumor endothelial cells from cell death following irradiation. According to these observations, hypoxia supports the oxygen level recovery inside the tumor and thus could enhance radiotherapy response subsequently.

Harada and colleagues have shown that hypoxic tumor areas are drastically reoxygenated 24 hours following irradiation. Surprisingly, this reoxygenation leads to an increase of HIF-1 activity through a glucose-dependent AKT/mTOR signaling activation (128). Moreover, Moeller and colleagues described that *in vivo*, HIF-1 pharmacological inhibition at the time of the reoxygenation post-irradiation sensitizes tumor cells (127). So, even after oxygen level recovering, HIF-1α-driven radioresistance mechanisms can be maintained. In addition, the high oxygen demand of some cancer cells can reduce the global oxygen availability inside the tumor and maintain a hypoxic environment. In this frame, in pancreatic ductal adenocarcinomas (PDAC) cells, an adaption mechanism to survive nearly anoxic conditions is the formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. In this context, PDAC cells conserve oxidative metabolism and maintain their oxygen consumption despite a very low oxygen level (129). It can be assumed that this kind of cell, containing respiratory supercomplexes, disturbs radiotherapy-induced reoxygenation by maintaining oxygen depletion. Interestingly, in a recent study by Taylor and colleagues, the extent of tumor reoxygenation appears heterogeneous after five fractions of radiotherapy in murine orthotopic pancreatic PDX (patient-derived xenograft) containing hypoxic areas. This study showed that the level of reoxygenation dictates tumor growth inhibition following radiation therapy (130).

Finally, the precise role of "Reoxygenation" on radiotherapy response appears ambiguous. On the one hand, the consensus is that the oxygen level increase radiosensitizes tumor cells *via* the "oxygen effect". Nevertheless, on the other hand, reoxygenation induces radioresistance through hypoxia-related signaling (*i.e.*, HIF-1 stabilization mediated by oxidative stress). Further studies are needed to determine whether initial tumor hypoxia affects the reoxygenation extent following radiotherapy, particularly fractionated protocols. Since the 60's, the "Reoxygenation" concept gives rise to strategies aiming to increase tumor oxygenation during irradiation, such as using hyperbaric oxygen or administration of O_2 at atmospheric pressure. Some of them were able to improve the local control of the tumor but

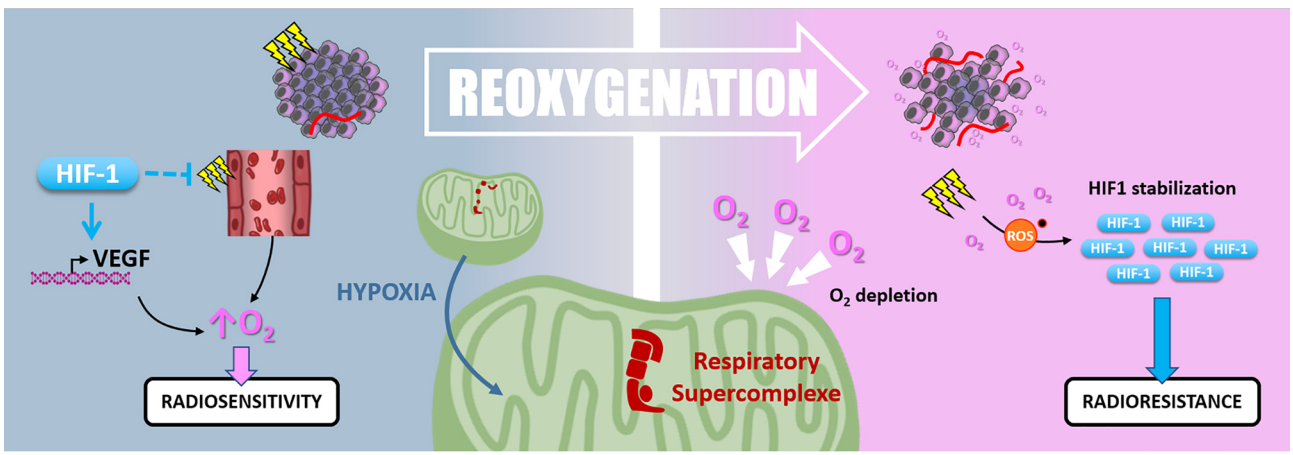


FIGURE 7 | Reoxygenation. Radiotherapy induces tissue reoxygenation through O_2 release and angiogenesis. Hypoxia also favors reoxygenation since HIF1 protects endothelial cells from irradiation and promotes VEGF expression. Nevertheless, hypoxia induces mitochondrial respiratory supercomplexes formation, which could persist after reoxygenation and cause high O_2 consumption and depletion. Oxidative stress due to irradiation and reoxygenation stabilizes HIF-1, which can maintain radioresistance.

appeared too difficult to set up in a clinical routine (131). More recently, several pre-clinical studies established a rationale for combining radiotherapy with HIF-1 inhibitor (132, 133), leading, for example, to a phase I clinical trial using PX-478 in advanced solid tumors (NCT00522652).

THE 6TH R: HOW HYPOXIA IMPACTS "REACTIVATION" OF ANTI-TUMOR IMMUNE RESPONSE

Radiotherapy has long been considered immunosuppressive through lymphocytes killing. Conversely, there is growing evidence assuming that irradiation efficacy may also rely on the induction of an anti-tumor immune response, depending on radiotherapy protocol, leading to a 6th R rising: the "Reactivation" of anti-tumor immune response (4). Supporting this idea, ablative (high dose) radiation therapy efficacy on melanoma xenograft is significantly reduced in immunodeficient nude mice than in immunocompetent models. Indeed, ablative radiotherapy increases tumor antigens presentation by dendritic cells (DCs), stimulating effector T-cells priming and expansion (134). Furthermore, high single-dose irradiation triggers DCs, macrophages, and primed T-cells infiltration in the irradiated tumor (135). As mentioned above, ionizing radiations lead to various types of cell death, including immunogenic cell deaths (*e.g.*, necrosis, necroptosis), depending on the fraction dose. For example, a high dose, notably during ablative radiotherapy, can induce necrosis (136). Also, ionizing radiations can cause necroptosis, notably in endocrine cancers (*e.g.*, anaplastic thyroid and adrenocortical cancers) (137). Moreover, radiation-induced DNA damages leading to the mitotic catastrophe can end in necrosis or senescence. Then senescent cells could, in some cases, undergo necrosis (58). Altogether, these radiation-induced immunogenic cell deaths can trigger an anti-tumor immune response following radiation therapy (138). Mechanistically, immunogenic cancer cell deaths release tumor-associated antigens. These tumor-associated antigens are processed by antigen-presenting cells, which stimulates effector T-cells and triggers a systemic anti-tumor immune response. This is in line with a clinical observation called the "abscopal effect," which consists of an immune-dependent regression of distant lesions after irradiation of the primary tumor (139, 140). So, innate and adaptive immune response players are involved in this radiotherapy-driven anti-tumor response. Yet, hypoxia modulates several immune player functions (141, 142) and participates in establishing an immunosuppressive microenvironment (**Figure 8**).

Besides, some nutrients (notably glucose and glutamine) essential for the anti-tumor function of immune cells (*e.g.*, T-cells, macrophages) are depleted in the tumor microenvironment because of consumption by cancer cells (143). This phenomenon by which cancer cells starve immune ones is called "metabolic competition" and appears amplified by hypoxia-related cancer cell metabolic remodeling.

In addition, glycolytic metabolism of hypoxic tumors results in lactate accumulation in the tumor microenvironment, leading to tumor-associated macrophages (TAMs) polarization toward an M2 immuno-suppressive phenotype (144) and can attenuate the radiotherapy-driven immune response. Moreover, the HIF-1α dependent lactate production by pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells induces the activation of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) that reduces effector T-cells expansion and anti-tumor activity. This lactate-driven MDSCs activation is thus a major contributor to PDAC radioresistance (145). Supporting this work, the combination of hypoxia-inducible pro-drug with immune checkpoint inhibitors in prostate adenocarcinoma murine models highly reduces MDSCs density and functions inside the tumor. It thus restores T-cell infiltration and their anti-tumor activity (146).

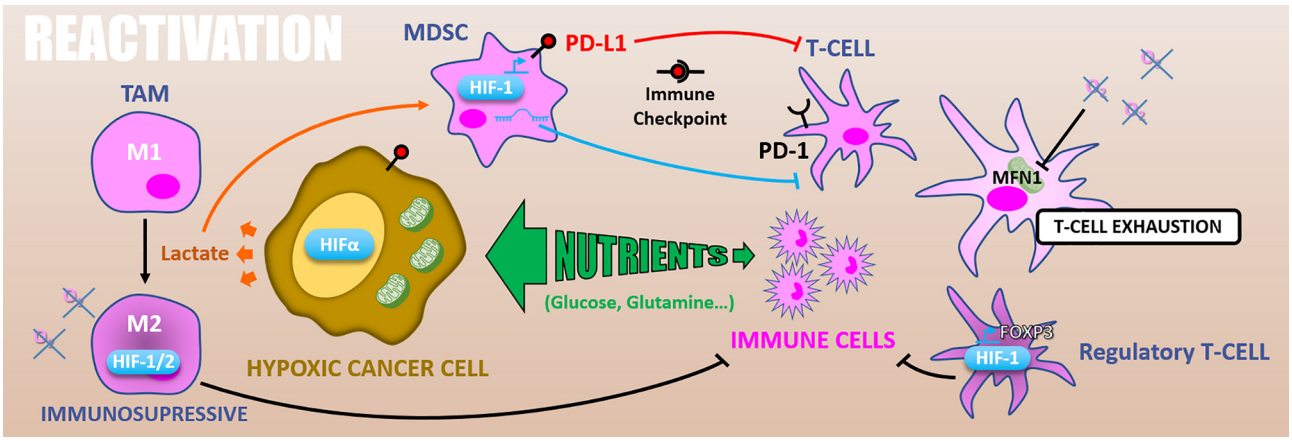


FIGURE 8 | Reactivation. Because of exacerbated metabolism, hypoxic cancer cells consume nutrients from the microenvironment and starve immune cells. In addition, glycolytic metabolism produces lactate which polarizes TAMs in M2 immuno-suppressive and activates MDSCs inhibiting T-cells. HIFs expression in TAMs increases their immunosuppressive activity. Also, in MDSCs HIF-1 promotes PD-L1 expression that inhibits T-cell through PD-1/PD-L1 immune checkpoint. HIF-1α differentiates T-cells into immunosuppressive regulatory T-cells *via* FOXP3 expression. Finally, hypoxia can cause T-cells exhaustion by reducing their energetic metabolism through MFN1 down-regulation.

Hypoxia also has a direct impact on the immune effector's metabolism. As mentioned above, effector T-cells, notably T $CD8^+$ lymphocytes, are required for optimal radiation therapy response. However, in nasopharyngeal carcinoma tissues, hypoxia causes T-cells exhaustion by reducing their energetic metabolism through an MFN1 (Mitofusin 1) down-regulation *via* a miR-24 dependent repression of the MYC transcription factor (147). HIF factors have as well an impact on immune effector cells. For example, HIF-1α stabilization and miR-210 expression are involved in hypoxia-enhanced MDSCs immunosuppressive functions (145, 148, 149). Also, in murine transgenic breast cancer models, it has been shown that TAMs exert an HIF-1α dependent immunosuppressive effect triggering a hypoxia-induced suppression of T-cell functions. Indeed, a specific knock-out of HIF-1α in macrophages decreases tumor aggressiveness (150). Similarly, HIF-2α suppression in TAMs reduces the tumor aggressiveness in a murine colon carcinoma model, indicating a HIF-2α role in hypoxia-induced immunosuppression (151). HIF-1α also favors $CD4^+$ T-cells differentiation into immunosuppressive regulatory T-cells by promoting FOXP3 transcription factor expression (152).

Another way by which hypoxia can counteract immune reactivation following ionizing radiations is by increasing immune checkpoints proteins expression. In this sense, *PD-L1* (Programmed death 1 – ligand 1) is an HIF-1α target gene and is upregulated under hypoxia (0.1% O_2) in MDSCs, in dendritic cells, as well as in cancer cells (153). Complementarily, hypoxia drives PD-1 (Programmed death 1) expression at the surface of T-cells and thus favors the PD-1/PD-L1 axis (147). Through CD86 upregulation in dendritic cells, hypoxia also promotes another well-known immune checkpoint, the CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)/CD86 axis (154).

To sum up, radiation therapy induces immunogenic cancer cell deaths and can trigger a systemic anti-tumor immune response. However, hypoxia inside solid tumors counteracts this mechanism of action by promoting an immuno-suppression due to its impacts on cell metabolism and through HIFs factors, both in cancer and immune cells. As described in this section, hypoxia drives immune checkpoints proteins expression, encouraging the combination of radiotherapy with immune checkpoint inhibitors for patients with hypoxic tumors (155). Adding a hypoxia-inducible pro-drug to this treatment combination could durably restore anti-tumor immune response, and maximize radiotherapy response (146, 156).

THE IMPLICATION IN ENDOCRINE CANCERS: THYROID CARCINOMA AS AN EXAMPLE

As most solid tumors, endocrine cancers frequently exhibit hypoxic areas. Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy. Anaplastic thyroid carcinomas (ATCs) account for 2-3% of thyroid gland neoplasms and are particularly aggressive tumors harboring a 3 to 4 months median survival (157). In this context, even though ATCs are often described as a radioresistant disease, adjuvant radiotherapy appears to increase the overall survival of patients with non-metastatic ATCs (158). Also, radiotherapy could offer a local control in advanced ATCs or for inoperable patients (159). Indeed, multimodal therapy with radiotherapy and chemotherapy (doxorubicin or cisplatin) is associated with the most extended survival and is considered a standard of care for these patients.

In ATCs, cancer cell metabolism relies on the reverse Warburg effect (*i.e.*, lactate uptake to fuel OXPHOS metabolism), frequently related to a hypoxic state (160, 161). In their study, Nakajo and collaborators concluded that glucose metabolism but also hypoxic conditions might be associated with progression in patients with metastatic thyroid cancer following radioactive iodine treatment (iodine-131) (162). Based on their metabolic profile, particularly their exacerbated glycolytic flux, a clinical trial assesses the benefit of using 18F-FDG-PET-guided radiotherapy in refractory thyroid cancers (NCT03191643). Most significantly, ATCs are necrotic tumors, supporting their hypoxic property (163). This hypoxic environment has been described to increase thyroid CSC-enriched side population, which are deeply involved in the "*Repopulation*" and also in the "*Redistribution*" parameters (164). Regarding "repopulation", some authors have described a better overall survival depending on the schedule fractionation used, particularly in the case of twice-daily treatment (165). Furthermore, another modality, neutron radiation therapy, could also be explored as its effectiveness may be less sensitive to hypoxia (166). In the clinic, neutrons provides better survival for thyroid cancer in small patient series (167). However, these studies need to be confirmed, given the large discrepancies about this topic in the literature.While HIF-1α is not detectable in healthy thyroids, ATCs exhibit high levels of nuclear HIF-1α and consistently overexpress the HIF target gene CA9 (168). Of note, as previously mentioned in the "*Radiosensitivity*" section, the CA9 is involved in cellular ROS homeostasis and can participate in irradiation-induced ferroptosis resistance. Additionally, HIF-1α silencing has been described to promote thyroid cancer cells apoptosis (169). Thereafter, Kim and colleagues showed that pharmacological targeting of HIF-1α can be a promising approach for thyroid cancers treatment (170). Based on this *in vitro* rationale, further studies are still needed to assess if HIFs inhibition could improve radiotherapy efficacy and thus represent a promising approach in the clinic.

Altogether, there is currently a huge amount of evidence on the critical role of hypoxia in radioresistance, *via* a strong modulation of the 6Rs of radiotherapy. Preclinical and clinical studies are ongoing, which should now further help us in defining the potential of hypoxia-related strategies aiming to improve the efficacy of radiation therapy against cancers.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AR, AE, AF, SM, and EL wrote sections of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

REFERENCES

1. Buckley AM, Lynam-Lennon N, O'Neill H, O'Sullivan J. Targeting Hallmarks of Cancer to Enhance Radiosensitivity in Gastrointestinal Cancers. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2020) 17:298–313. doi: 10.1038/s41575-019-0247-2
2. Schaue D, McBride WH. Opportunities and Challenges of Radiotherapy for Treating Cancer. *Nat Rev Clin Oncol* (2015) 12:527–40. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.120
3. Steel GG, McMillan TJ, Peacock JH. The 5Rs of Radiobiology. *Int J Radiat Biol* (1989) 56:1045–8. doi: 10.1080/09553008914552491
4. Boustani G, Laurent A, Mirjolet. The 6th R of Radiobiology: Reactivation of Anti-Tumor Immune Response. *Cancers* (2019) 11:860. doi: 10.3390/cancers11060860
5. Alfonso JCL, Berk L. Modeling the Effect of Intratumoral Heterogeneity of Radiosensitivity on Tumor Response Over the Course of Fractionated Radiation Therapy. *Radiat Oncol* (2019) 14:88. doi: 10.1186/s13014-019-1288-y
6. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The Role of Hypoxia in Cancer Progression, Angiogenesis, Metastasis, and Resistance to Therapy. *HP* (2015) 3:83–92. doi: 10.2147/HP.S93413
7. Begg K, Tavassoli M. Inside the Hypoxic Tumour: Reprogramming of the DDR and Radioresistance. *Cell Death Discovery* (2020) 6:77. doi: 10.1038/s41420-020-00311-0
8. Horsman MR, Mortensen LS, Petersen JB, Busk M, Overgaard J. Imaging Hypoxia to Improve Radiotherapy Outcome. *Nat Rev Clin Oncol* (2012) 9:674–87. doi: 10.1038/nrclinonc.2012.171
9. Horsman MR, Overgaard J. The Impact of Hypoxia and Its Modification of the Outcome of Radiotherapy. *J Radiat Res* (2016) 57:i90–8. doi: 10.1093/jrr/rrw007
10. Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, Scher RL, Dewhirst MW. Tumor Hypoxia Adversely Affects the Prognosis of Carcinoma of the Head and Neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1997) 38:285–9. doi: 10.1016/S0360-3016(97)00101-6
11. Fyles AW, Milosevic M, Wong R, Kavanagh M-C, Pintilie M, Sun A, et al. Oxygenation Predicts Radiation Response and Survival in Patients With Cervix Cancer. *Radiotherapy Oncol* (1998) 48:149–56. doi: 10.1016/S0167-8140(98)00044-9
12. Milosevic M, Warde P, Ménard C, Chung P, Toi A, Ishkanian A, et al. Tumor Hypoxia Predicts Biochemical Failure Following Radiotherapy for Clinically Localized Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* (2012) 18:2108–14. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2711
13. Rey S, Schito L, Koritzinsky M, Wouters BG. Molecular Targeting of Hypoxia in Radiotherapy. *Adv Drug Deliv* (2017) 109:45–62. doi: 10.1016/j.addr.2016.10.002
14. Barker HE, Paget JTE, Khan AA, Harrington KJ. The Tumour Microenvironment After Radiotherapy: Mechanisms of Resistance and Recurrence. *Nat Rev Cancer* (2015) 15:409–25. doi: 10.1038/nrc3958
15. Koh MY, Powis G. Passing the Baton: The HIF Switch. *Trends Biochem Sci* (2012) 37:364–72. doi: 10.1016/j.tibs.2012.06.004
16. Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, et al. Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1: A Novel Predictive and Prognostic Parameter in the Radiotherapy of Oropharyngeal Cancer. *Cancer Res* (2001) 61(7):2911–6.
17. Koukourakis MI, Simopoulos C, Gatter KC, Phil D, Harris AL, Phil D. Hypoxia-Inducible Factor (HIF1A and HIF2A), Angiogenesis, and Chemoradiotherapy Outcome of Squamous Cell Head-and-Neck Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2002) 53(5):1192–202. doi: 10.1016/s0360-3016(02)02848-1
18. Wang H, Jiang H, Van De Gucht M, De Ridder M. Hypoxic Radioresistance: Can ROS Be the Key to Overcome It? *Cancers* (2019) 11:112. doi: 10.3390/cancers11010112
19. Kumareswaran R, Ludkovski O, Meng A, Sykes J, Pintilie M, Bristow RG. Chronic Hypoxia Compromises Repair of DNA Double-Strand Breaks to Drive Genetic Instability. *J Cell Sci* (2012) 125:189–99. doi: 10.1242/jcs.092262
20. Hauth F, Toulany M, Zips D, Menegakis A. Cell-Line Dependent Effects of Hypoxia Prior to Irradiation in Squamous Cell Carcinoma Lines. *Clin Trans Radiat Oncol* (2017) 5:12–9. doi: 10.1016/j.ctro.2017.06.001
21. Richardson RB, Harper M-E. Mitochondrial Stress Controls the Radiosensitivity of the Oxygen Effect: Implications for Radiotherapy. *Oncotarget* (2016) 7:21469–83. doi: 10.18632/oncotarget.7412
22. Al Tameemi W, Dale TP, Al-Jumaily RMK, Forsyth NR. Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism. *Front Cell Dev Biol* (2019) 7:4. doi: 10.3389/fcell.2019.00004
23. Tang L, Wei F, Wu Y, He Y, Shi L, Xiong F, et al. Role of Metabolism in Cancer Cell Radioresistance and Radiosensitization Methods. *J Exp Clin Cancer Res* (2018) 37:87. doi: 10.1186/s13046-018-0758-7
24. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and Glucose Metabolism in the Solid Tumour. *Nat Rev Cancer* (2008) 8:705–13. doi: 10.1038/nrc2468
25. Brizel DM, Walenta S, Mueller-Klieser W. Elevated Tumor Lactate Concentrations Predict for an Increased Risk of Metastases in Head-and-Neck Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2001) 51:5. doi: 10.1016/S0360-3016(01)01630-3
26. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfør K, Rofstad EK, et al. High Lactate Levels Predict Likelihood of Metastases, Tumor Recurrence, and Restricted Patient Survival in Human Cervical Cancers. *Cancer Res* (2000) 60:916–21.
27. Sattler UGA, Meyer SS, Quennet V, Hoerner C, Knoerzer H, Fabian C, et al. Glycolytic Metabolism and Tumour Response to Fractionated Irradiation. *Radiotherapy Oncol* (2010) 94:102–9. doi: 10.1016/j.radonc.2009.11.007
28. Quennet V, Yaromina A, Zips D, Rosner A, Walenta S, Baumann M, et al. Tumor Lactate Content Predicts for Response to Fractionated Irradiation of Human Squamous Cell Carcinomas in Nude Mice. *Radiotherapy Oncol* (2006) 81:130–5. doi: 10.1016/j.radonc.2006.08.012
29. Leung E, Cairns RA, Chaudary N, Vellanki RN, Kalliomaki T, Moriyama EH, et al. Metabolic Targeting of HIF-Dependent Glycolysis Reduces Lactate, Increases Oxygen Consumption and Enhances Response to High-Dose Single-Fraction Radiotherapy in Hypoxic Solid Tumors. *BMC Cancer* (2017) 17:418. doi: 10.1186/s12885-017-3402-6
30. Kim J, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-Mediated Expression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase: A Metabolic Switch Required for Cellular Adaptation to Hypoxia. *Cell Metab* (2006) 3:177–85. doi: 10.1016/j.cmet.2006.02.002
31. Wigfield SM, Winter SC, Giatromanolaki A, Taylor J, Koukourakis ML, Harris AL. PDK-1 Regulates Lactate Production in Hypoxia and Is Associated With Poor Prognosis in Head and Neck Squamous Cancer. *Br J Cancer* (2008) 98:1975–84. doi: 10.1038/sj.bjc.6604356
32. Kung-Chun Chiu D, Pui-Wah Tse A, Law C-T, Ming-Jing Xu I, Lee D, Chen M, et al. Hypoxia Regulates the Mitochondrial Activity of Hepatocellular Carcinoma Cells Through HIF/HEY1/PINK1 Pathway. *Cell Death Dis* (2019) 10:934. doi: 10.1038/s41419-019-2155-3
33. McCann E, O'Sullivan J, Marcone S. Targeting Cancer-Cell Mitochondria and Metabolism to Improve Radiotherapy Response. *Trans Oncol* (2021) 14:100905. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100905
34. Chiche J, Rouleau M, Gounon P, Brahimi-Horn MC, Pouysségur J, Mazure NM. Hypoxic Enlarged Mitochondria Protect Cancer Cells From Apoptotic Stimuli. *J Cell Physiol* (2009) 222(3):648–57. doi: 10.1002/jcp.21984
35. Grosso S, Doyen J, Parks SK, Bertero T, Paye A, Cardinaud B, et al. MiR-210 Promotes a Hypoxic Phenotype and Increases Radioresistance in Human Lung Cancer Cell Lines. *Cell Death Dis* (2013) 4:e544–4. doi: 10.1038/cddis.2013.71
36. Jiang Z-F, Wang M, Xu J-L, Ning Y-J. Hypoxia Promotes Mitochondrial Glutamine Metabolism Through HIF1α-GDH Pathway in Human Lung Cancer Cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2017) 483:32–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.015
37. Meijer TWH, Peeters WJM, Dubois LJ, van Gisbergen MW, Biemans R, Venhuizen J-H, et al. Targeting Glucose and Glutamine Metabolism Combined With Radiation Therapy in non-Small Cell Lung Cancer. *Lung Cancer* (2018) 126:32–40. doi: 10.1016/j.lungcan.2018.10.016
38. Matschke J, Wiebeck E, Hurst S, Rudner J, Jendrossek V. Role of SGK1 for Fatty Acid Uptake, Cell Survival and Radioresistance of NCI-H460 Lung Cancer Cells Exposed to Acute or Chronic Cycling Severe Hypoxia. *Radiat Oncol* (2016) 11:75. doi: 10.1186/s13014-016-0647-1
39. Nagao A, Kobayashi M, Koyasu S, Chow CCT, Harada H. HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. *IJMS* (2019) 20:238. doi: 10.3390/ijms20020238

40. Sattler UGA, Mueller-Klieser W. The Anti-Oxidant Capacity of Tumour Glycolysis. *Int J Radiat Biol* (2009) 85:963–71. doi: 10.3109/09553000903258889
41. Wang H-J, Hsieh Y-J, Cheng W-C, Lin C-P, Lin Y-S, Yang S-F, et al. JMJD5 Regulates PKM2 Nuclear Translocation and Reprograms HIF-1 -Mediated Glucose Metabolism. *Proc Natl Acad Sci* (2014) 111:279–84. doi: 10.1073/pnas.1311249111
42. Hlouschek J, Hansel C, Jendrossek V, Matschke J. The Mitochondrial Citrate Carrier (SLC25A1) Sustains Redox Homeostasis and Mitochondrial Metabolism Supporting Radioresistance of Cancer Cells With Tolerance to Cycling Severe Hypoxia. *Front Oncol* (2018) 8:170. doi: 10.3389/fonc.2018.00170
43. Hlouschek J, Ritter V, Wirsdörfer F, Klein D, Jendrossek V, Matschke J. Targeting SLC25A10 Alleviates Improved Antioxidant Capacity and Associated Radioresistance of Cancer Cells Induced by Chronic-Cycling Hypoxia. *Cancer Lett* (2018) 439:24–38. doi: 10.1016/j.canlet.2018.09.002
44. Li H-S, Zhou Y-N, Li L, Li S-F, Long D, Chen X-L, et al. HIF-1α Protects Against Oxidative Stress by Directly Targeting Mitochondria. *Redox Biol* (2019) 25:101109. doi: 10.1016/j.redox.2019.101109
45. Bertout JA, Majmundar AJ, Gordan JD, Lam JC, Ditsworth D, Keith B, et al. HIF2 Inhibition Promotes P53 Pathway Activity, Tumor Cell Death, and Radiation Responses. *Proc Natl Acad Sci* (2009) 106:14391–6. doi: 10.1073/pnas.0907357106
46. Rouschop KM, Dubois LJ, Keulers TG, van den Beucken T, Lambin P, Bussink J, et al. PERK/eIF2 Signaling Protects Therapy Resistant Hypoxic Cells Through Induction of Glutathione Synthesis and Protection Against ROS. *Proc Natl Acad Sci* (2013) 110:4622–7. doi: 10.1073/pnas.1210633110
47. Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, Arvisais E, Kaufman RJ, Diehl JA. Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Mol Cell Biol* (2003) 23:7198–209. doi: 10.1128/MCB.23.20.7198-7209.2003
48. Habib E, Linher-Melville K, Lin H-X, Singh G. Expression of xCT and Activity of System Xc– Are Regulated by NRF2 in Human Breast Cancer Cells in Response to Oxidative Stress. *Redox Biol* (2015) 5:33–42. doi: 10.1016/j.redox.2015.03.003
49. Salaroglio IC, Panada E, Moiso E, Buondonno I, Provero P, Rubinstein M, et al. PERK Induces Resistance to Cell Death Elicited by Endoplasmic Reticulum Stress and Chemotherapy. *Mol Cancer* (2017) 16:91. doi: 10.1186/s12943-017-0657-0
50. Küper A, Baumann J, Göpelt K, Baumann M, Sänger C, Metzen E, et al. Overcoming Hypoxia-Induced Resistance of Pancreatic and Lung Tumor Cells by Disrupting the PERK-NRF2-HIF-Axis. *Cell Death Dis* (2021) 12:82. doi: 10.1038/s41419-020-03319-7
51. Patel NH, Sohal SS, Manjili MH, Harrell JC, Gewirtz DA. The Roles of Autophagy and Senescence in the Tumor Cell Response to Radiation. *Radiat Res* (2020) 194:103. doi: 10.1667/RADE-20-00009
52. Rouschop KMA, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkouls K, et al. The Unfolded Protein Response Protects Human Tumor Cells During Hypoxia Through Regulation of the Autophagy Genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* (2010) 120:127–41. doi: 10.1172/JCI40027
53. Feng H, Wang J, Chen W, Shan B, Guo Y, Xu J, et al. Hypoxia-Induced Autophagy as an Additional Mechanism in Human Osteosarcoma Radioresistance. *J Bone Oncol* (2016) 5:67–73. doi: 10.1016/j.jbo.2016.03.001
54. Zou Y, Hu G, Zhao X, Lu T, Zhu F, Yu S, et al. Hypoxia-Induced Autophagy Contributes to Radioresistance *via* C-Jun-Mediated Beclin1 Expression in Lung Cancer Cells. *J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci]* (2014) 34:761–7. doi: 10.1007/s11596-014-1349-2
55. Apel A, Herr I, Schwarz H, Rodemann HP, Mayer A. Blocked Autophagy Sensitizes Resistant Carcinoma Cells to Radiation Therapy. *Cancer Res* (2008) 68:1485–94. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0562
56. Sun Y, Xing X, Liu Q, Wang Z, Xin Y, Zhang P, et al. Hypoxia-Induced Autophagy Reduces Radiosensitivity by the HIF-1α/miR-210/Bcl-2 Pathway in Colon Cancer Cells. *Int J Oncol* (2015) 46:750–6. doi: 10.3892/ijo.2014.2745
57. Chen X, Wang P, Guo F, Wang X, Wang J, Xu J, et al. Autophagy Enhanced the Radioresistance of non-Small Cell Lung Cancer by Regulating ROS Level Under Hypoxia Condition. *Int J Radiat Biol* (2017) 93:764–70. doi: 10.1080/09553002.2017.1325025
58. Adjemian S, Oltean T, Martens S, Wiernicki B, Goossens V, Vanden Berghe T, et al. Ionizing Radiation Results in a Mixture of Cellular Outcomes Including Mitotic Catastrophe, Senescence, Methuosis, and Iron-Dependent Cell Death. *Cell Death Dis* (2020) 11:1003. doi: 10.1038/s41419-020-03209-y
59. Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell Death by Mitotic Catastrophe: A Molecular Definition. *Oncogene* (2004) 23:2825–37. doi: 10.1038/sj.onc.1207528
60. Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, et al. Hypoxia-Mediated Down-Regulation of Bid and Bax in Tumors Occurs *via* Hypoxia-Inducible Factor 1-Dependent and -Independent Mechanisms and Contributes to Drug Resistance. *Mol Cell Biol* (2004) 24:2875–89. doi: 10.1128/MCB.24.7.2875-2889.2004
61. Bamodu OA, Chang H-L, Ong J-R, Lee W-H, Yeh C-T, Tsai J-T. Elevated PDK1 Expression Drives PI3K/AKT/MTOR Signaling Promotes Radiation-Resistant and Dedifferentiated Phenotype of Hepatocellular Carcinoma. *Cells* (2020) 9:746. doi: 10.3390/cells9030746
62. Lei G, Zhang Y, Koppula P, Liu X, Zhang J, Lin SH, et al. The Role of Ferroptosis in Ionizing Radiation-Induced Cell Death and Tumor Suppression. *Cell Res* (2020) 30:146–62. doi: 10.1038/s41422-019-0263-3
63. Fuhrmann DC, Mondorf A, Beifuß J, Jung M, Brüne B. Hypoxia Inhibits Ferritinophagy, Increases Mitochondrial Ferritin, and Protects From Ferroptosis. *Redox Biol* (2020) 36:101670. doi: 10.1016/j.redox.2020.101670
64. Li Z, Jiang L, Chew SH, Hirayama T, Sekido Y, Toyokuni S. Carbonic Anhydrase 9 Confers Resistance to Ferroptosis/Apoptosis in Malignant Mesothelioma Under Hypoxia. *Redox Biol* (2019) 26:101297. doi: 10.1016/j.redox.2019.101297
65. Fan Z, Wirth A-K, Chen D, Wruck CJ, Rauh M, Buchfelder M, et al. Nrf2-Keap1 Pathway Promotes Cell Proliferation and Diminishes Ferroptosis. *Oncogenesis* (2017) 6:e371. doi: 10.1038/oncsis.2017.65
66. Weinmann M, Jendrossek V, Güner D, Goecke B, Belka C. Cyclic Exposure to Hypoxia and Reoxygenation Selects for Tumor Cells With Defects in Mitochondrial Apoptotic Pathways. *FASEB J* (2004) 18(15):1906–8. doi: 10.1096/fj.04-1918fje
67. Bhandari V, Hoey C, Liu LY, Lalonde E, Ray J, Livingstone J, et al. Molecular Landmarks of Tumor Hypoxia Across Cancer Types. *Nat Genet* (2019) 51:308–18. doi: 10.1038/s41588-018-0318-2
68. Werbrouck C, Barret E, Kergrohen T, Mondini M, Beccaria K, Boddaert N, et al. TP53 Pathway Alterations Drive Radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG). *Clin Cancer Res* (2019) 25(22):6788–800. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0126
69. Frankenberg-Schwager M. Review of Repair Kinetics for DNA Damage Induced in Eukaryotic Cells *In Vitro* by Ionizing Radiation. *Radiotherapy Oncol* (1989) 14:307–20. doi: 10.1016/0167-8140(89)90143-6
70. Mladenov E, Magin S, Soni A, Iliakis G. DNA Double-Strand Break Repair as Determinant of Cellular Radiosensitivity to Killing and Target in Radiation Therapy. *Front Oncol* (2013) 3:113. doi: 10.3389/fonc.2013.00113
71. Ho V, Chung L, Singh A, Lea V, Abubakar A, Lim SH, et al. Overexpression of the MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) Complex in Rectal Cancer Correlates With Poor Response to Neoadjuvant Radiotherapy and Prognosis. *BMC Cancer* (2018) 18:869. doi: 10.1186/s12885-018-4776-9
72. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma Stem Cells Promote Radioresistance by Preferential Activation of the DNA Damage Response. *Nature* (2006) 444:756–60. doi: 10.1038/nature05236
73. Kaplan AR, Glazer PM. Impact of Hypoxia on DNA Repair and Genome Integrity. *Mutagenesis* (2020) 35:61–8. doi: 10.1093/mutage/gez019
74. Chang WH, Lai AG. Transcriptional Landscape of DNA Repair Genes Underpins a Pan-Cancer Prognostic Signature Associated With Cell Cycle Dysregulation and Tumor Hypoxia. *DNA Repair* (2019) 78:142–53. doi: 10.1016/j.dnarep.2019.04.008
75. Wozny A-S, Alphonse G, Cassard A, Malésys C, Louati S, Beuve M, et al. Impact of Hypoxia on the Double-Strand Break Repair After Photon and Carbon Ion Irradiation of Radioresistant HNSCC Cells. *Sci Rep* (2020) 10:21357. doi: 10.1038/s41598-020-78354-7
76. Hashimoto T, Murata Y, Urushihara Y, Shiga S, Takeda K, Hosoi Y. Severe Hypoxia Increases Expression of ATM and DNA-PKcs and it Increases Their Activities Through Src and AMPK Signaling Pathways. *Biochem Biophys Res Commun* (2018) 505:13–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.09.068

77. Marampon F, Gravina GL, Zani BM, Popov VM, Fratticci A, Cerasani M, et al. Hypoxia Sustains Glioblastoma Radioresistance Through ERKs/DNA-PKcs/HIF-1α Functional Interplay. *Int J Oncol* (2014) 44:2121–31. doi: 10.3892/ijo.2014.2358
78. Zhou J, Wu K, Gao D, Zhu G, Wu D, Wang X, et al. Reciprocal Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 2α and GLI1 Expression Associated With the Radioresistance of Renal Cell Carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2014) 90:942–51. doi: 10.1016/j.ijrobp.2014.06.065
79. Bouquet F, Ousset M, Biard D, Fallone F, Dauvillier S, Frit P, et al. A DNA-Dependent Stress Response Involving DNA-PK Occurs in Hypoxic Cells and Contributes to Cellular Adaptation to Hypoxia. *J Cell Sci* (2011) 124:1943–51. doi: 10.1242/jcs.078030
80. Macedo-Silva C, Miranda-Gonçalves V, Lameirinhas A, Lencart J, Pereira A, Lobo J, et al. JmjC-KDMs KDM3A and KDM6B Modulate Radioresistance Under Hypoxic Conditions in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cell Death Dis* (2020) 11:1068. doi: 10.1038/s41419-020-03279-y
81. Cowman S, Fan YN, Pizer B, Sée V. Decrease of Nibrin Expression in Chronic Hypoxia Is Associated With Hypoxia-Induced Chemoresistance in Some Brain Tumour Cells. *BMC Cancer* (2019) 19:300. doi: 10.1186/s12885-019-5476-9
82. Bindra RS, Schaffer PJ, Meng A, Woo J, Lizardi P, Hedley DW, et al. Down-Regulation of Rad51 and Decreased Homologous Recombination in Hypoxic Cancer Cells. *Mol Cell Biol* (2004) 24(19):8504–18. doi: 10.1128/MCB.24.19.8504-8518.2004
83. Bindra RS, Glazer PM. Repression of RAD51 Gene Expression by E2F4/p130 Complexes in Hypoxia. *Oncogene* (2007) 26:2048–57. doi: 10.1038/sj.onc.1210001
84. Bindra RS, Gibson SL, Meng A, Westermark U, Jasin M, Pierce AJ, et al. Hypoxia-Induced Down-Regulation of *BRCA1* Expression by E2Fs. *Cancer Res* (2005) 65:11597–604. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2119
85. Scanlon SE, Hegan DC, Sulkowski PL, Glazer PM. Suppression of Homology-Dependent DNA Double-Strand Break Repair Induces PARP Inhibitor Sensitivity in *VHL* -Deficient Human Renal Cell Carcinoma. *Oncotarget* (2018) 9:4647–60. doi: 10.18632/oncotarget.23470
86. Crosby ME, Kulshreshtha R, Ivan M, Glazer PM. MicroRNA Regulation of DNA Repair Gene Expression in Hypoxic Stress. *Cancer Res* (2009) 69:1221–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2516
87. Scanlon SE, Glazer PM. Multifaceted Control of DNA Repair Pathways by the Hypoxic Tumor Microenvironment. *DNA Repair* (2015) 32:180–9. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.04.030
88. Meng AX, Jalali F, Cuddihy A, Chan N, Bindra RS, Glazer PM, et al. Hypoxia Down-Regulates DNA Double Strand Break Repair Gene Expression in Prostate Cancer Cells. *Radiotherapy Oncol* (2005) 76:168–76. doi: 10.1016/j.radonc.2005.06.025
89. Fanale D, Bazan V, Caruso S, Castiglia M, Bronte G, Rolfo C, et al. Hypoxia and Human Genome Stability: Downregulation of BRCA2 Expression in Breast Cancer Cell Lines. *BioMed Res Int* (2013) 2013:1–8. doi: 10.1155/2013/746858
90. Cabrera-Licona A, Pérez-Añorve IX, Flores-Fortis M, Moral-Hernández O, del, González-de la Rosa CH, Suárez-Sánchez R, et al. Deciphering the Epigenetic Network in Cancer Radioresistance. *Radiotherapy Oncol* (2021) 159:48–59. doi: 10.1016/j.radonc.2021.03.012
91. Camuzi D, de Amorim Í, Ribeiro Pinto L, Oliveira Trivilin L, Mencalha A, Soares Lima S. Regulation Is in the Air: The Relationship Between Hypoxia and Epigenetics in Cancer. *Cells* (2019) 8:300. doi: 10.3390/cells8040300
92. Karakaidos P, Karagiannis D, Rampias T. Resolving DNA Damage: Epigenetic Regulation of DNA Repair. *Molecules* (2020) 25:2496. doi: 10.3390/molecules25112496
93. Sulkowski PL, Corso CD, Robinson ND, Scanlon SE, Purshouse KR, Bai H, et al. 2-Hydroxyglutarate Produced by Neomorphic IDH Mutations Suppresses Homologous Recombination and Induces PARP Inhibitor Sensitivity. *Sci Transl Med* (2017) 9:eaal2463. doi: 10.1126/scitranslmed.aal2463
94. Hwang SY, Heo K, Kim JS, Im JW, Lee SM, Cho M, et al. Emodin Attenuates Radioresistance Induced by Hypoxia in HepG2 Cells *via* the Enhancement of PARP1 Cleavage and Inhibition of JMJD2B. *Oncol Rep* (2015) 33:1691–8. doi: 10.3892/or.2015.3744
95. Kim J-G, Yi JM, Park S-J, Kim J-S, Son TG, Yang K, et al. Histone Demethylase JMJD2B-Mediated Cell Proliferation Regulated by Hypoxia and Radiation in Gastric Cancer Cell. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Gene Regul Mech* (2012) 1819:1200–7. doi: 10.1016/j.bbagrm.2012.10.001
96. Intlekofer AM, Dematteo RG, Venneti S, Finley LWS, Lu C, Judkins AR, et al. Hypoxia Induces Production of L-2-Hydroxyglutarate. *Cell Metab* (2015) 22:304–11. doi: 10.1016/j.cmet.2015.06.023
97. Oldham WM, Clish CB, Yang Y, Loscalzo J. Hypoxia-Mediated Increases in L -2-Hydroxyglutarate Coordinate the Metabolic Response to Reductive Stress. *Cell Metab* (2015) 22:291–303. doi: 10.1016/j.cmet.2015.06.021
98. Chang C-J, Yang J-Y, Xia W, Chen C-T, Xie X, Chao C-H, et al. EZH2 Promotes Expansion of Breast Tumor Initiating Cells Through Activation of RAF1-β-Catenin Signaling. *Cancer Cell* (2011) 19:86–100. doi: 10.1016/j.ccr.2010.10.035
99. Lu Y, Chu A, Turker MS, Glazer PM. Hypoxia-Induced Epigenetic Regulation and Silencing of the BRCA1 Promoter. *Mol Cell Biol* (2011) 31:3339–50. doi: 10.1128/MCB.01121-10
100. Liu Y, Yang M, Luo J, Zhou H. Radiotherapy Targeting Cancer Stem Cells "Awakens" Them to Induce Tumour Relapse and Metastasis in Oral Cancer. *Int J Oral Sci* (2020) 12:19. doi: 10.1038/s41368-020-00087-0
101. Emami Nejad A, Najafgholian S, Rostami A, Sistani A, Shojaeifar S, Esparvarinha M, et al. The Role of Hypoxia in the Tumor Microenvironment and Development of Cancer Stem Cell: A Novel Approach to Developing Treatment. *Cancer Cell Int* (2021) 21:62. doi: 10.1186/s12935-020-01719-5
102. Najafi M, Farhood B, Mortezaee K, Kharazinejad E, Majidpoor J, Ahadi R. Hypoxia in Solid Tumors: A Key Promoter of Cancer Stem Cell (CSC) Resistance. *J Cancer Res Clin Oncol* (2020) 146:19–31. doi: 10.1007/s00432-019-03080-1
103. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The Response of CD24 –/Low/CD44 + Breast Cancer–Initiating Cells to Radiation. *JNCI: J Natl Cancer Institute* (2006) 98:1777–85. doi: 10.1093/jnci/djj495
104. Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD, et al. Hypoxia Promotes Expansion of the CD133-Positive Glioma Stem Cells Through Activation of HIF-1α. *Oncogene* (2009) 28:3949–59. doi: 10.1038/onc.2009.252
105. Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, et al. Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. *Cancer Cell* (2009) 15:501–13. doi: 10.1016/j.ccr.2009.03.018
106. Yan Y, Liu F, Han L, Zhao L, Chen J, Olopade OI, et al. HIF-2α Promotes Conversion to a Stem Cell Phenotype and Induces Chemoresistance in Breast Cancer Cells by Activating Wnt and Notch Pathways. *J Exp Clin Cancer Res* (2018) 37:256. doi: 10.1186/s13046-018-0925-x
107. Liu L, Zhu X-D, Wang W-Q, Shen Y, Qin Y, Ren Z-G, et al. Activation of β-Catenin by Hypoxia in Hepatocellular Carcinoma Contributes to Enhanced Metastatic Potential and Poor Prognosis. *Clin Cancer Res* (2010) 16:2740–50. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2610
108. Korkaya H, Paulson A, Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Brown M, Dutcher J, et al. Regulation of Mammary Stem/Progenitor Cells by PTEN/Akt/β-Catenin Signaling. *PloS Biol* (2009) 7:e1000121. doi: 10.1371/journal.pbio.1000121
109. Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, Newman B, Korkaya H, Heath AN, et al. Antiangiogenic Agents Increase Breast Cancer Stem Cells *via* the Generation of Tumor Hypoxia. *Proc Natl Acad Sci* (2012) 109:2784–9. doi: 10.1073/pnas.1018866109
110. Luo Y, Li M, Zuo X, Basourakos S, Zhang J, Zhao J, et al. β–Catenin Nuclear Translocation Induced by HIF–1α Overexpression Leads to the Radioresistance of Prostate Cancer. *Int J Oncol* (2018) 52(6):1827–40. doi: 10.3892/ijo.2018.4368
111. Qiang L, Wu T, Zhang H-W, Lu N, Hu R, Wang Y-J, et al. HIF-1α Is Critical for Hypoxia-Mediated Maintenance of Glioblastoma Stem Cells by Activating Notch Signaling Pathway. *Cell Death Differ* (2012) 19:284–94. doi: 10.1038/cdd.2011.95
112. Almiron Bonnin DA, Havrda MC, Lee MC, Liu H, Zhang Z, Nguyen LN, et al. Secretion-Mediated STAT3 Activation Promotes Self-Renewal of Glioma Stem-Like Cells During Hypoxia. *Oncogene* (2018) 37:1107–18. doi: 10.1038/onc.2017.404

113. Baba M, Hirai S, Yamada-Okabe H, Hamada K, Tabuchi H, Kobayashi K, et al. Loss of Von Hippel-Lindau Protein Causes Cell Density Dependent Deregulation of CyclinD1 Expression Through Hypoxia-Inducible Factor. *Oncogene* (2003) 22:2728–38. doi: 10.1038/sj.onc.1206373
114. Gordan JD, Bertout JA, Hu C-J, Diehl JA, Simon MC. HIF-2α Promotes Hypoxic Cell Proliferation by Enhancing C-Myc Transcriptional Activity. *Cancer Cell* (2007) 11:335–47. doi: 10.1016/j.ccr.2007.02.006
115. Bedogni B, Warneke JA, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, Powell MB. Notch1 Is an Effector of Akt and Hypoxia in Melanoma Development. *J Clin Invest* (2008) 118:3660–70. doi: 10.1172/JCI36157
116. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of Cell Cycle in Mediating Sensitivity to Radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2004) 59:928–42. doi: 10.1016/j.ijrobp.2004.03.005
117. Kato Y, Yashiro M, Fuyuhiro Y, Kashiwagi S, Matsuoka J, Hirakawa T, et al. Effects of Acute and Chronic Hypoxia on the Radiosensitivity of Gastric and Esophageal Cancer Cells. *Anticancer Res* (2011) 31(10):3369–75.
118. Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, Huang LE. HIF-1α Induces Cell Cycle Arrest by Functionally Counteracting Myc. *EMBO J* (2004) 23:1949–56. doi: 10.1038/sj.emboj.7600196
119. Gardner LB, Li Q, Park MS, Flanagan WM, Semenza GL, Dang CV. Hypoxia Inhibits G1/S Transition Through Regulation of P27 Expression. *J Biol Chem* (2001) 276:7919–26. doi: 10.1074/jbc.M010189200
120. Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS. Hypoxia in Cartilage: HIF-1α Is Essential for Chondrocyte Growth Arrest and Survival. *Genes Dev* (2001) 15(21):2865–76. doi: 10.1101/gad.934301
121. Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, Johnson RS. Hypoxia-Inducible Factor 1α Is Essential for Cell Cycle Arrest During Hypoxia. *Mol Cell Biol* (2003) 23(1):359–69. doi: 10.1128/MCB.23.1.359-369.2003
122. Hammer S, To KKW, Yoo Y-G, Koshiji M, Huang LE. Hypoxic Suppression of the Cell Cycle Gene CDC25A in Tumor Cells. *Cell Cycle* (2007) 6:1919–26. doi: 10.4161/cc.6.15.4515
123. Gibson SL, Bindra RS, Glazer PM. Hypoxia-Induced Phosphorylation of Chk2 in an Ataxia Telangiectasia Mutated–Dependent Manner. *Cancer Res* (2005) 65:10734–41. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1160
124. Ishii A, Kimura T, Sadahiro H, Kawano H, Takubo K, Suzuki M, et al. Histological Characterization of the Tumorigenic "Peri-Necrotic Niche" Harboring Quiescent Stem-Like Tumor Cells in Glioblastoma. *PloS One* (2016) 11:e0147366. doi: 10.1371/journal.pone.0147366
125. Carcereri de Prati A, Butturini E, Rigo A, Oppici E, Rossin M, Boriero D, et al. Metastatic Breast Cancer Cells Enter Into Dormant State and Express Cancer Stem Cells Phenotype Under Chronic Hypoxia: Tumor Breast Dormancy in Hypoxic Microenvironment. *J Cell Biochem* (2017) 118:3237–48. doi: 10.1002/jcb.25972
126. Ju S, Wang F, Wang Y, Ju S. CSN8 Is a Key Regulator in Hypoxia-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition and Dormancy of Colorectal Cancer Cells. *Mol Cancer* (2020) 19:168. doi: 10.1186/s12943-020-01285-4
127. Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Radiation Activates HIF-1 to Regulate Vascular Radiosensitivity in Tumors: Role of Reoxygenation, Free Radicals, and Stress Granules. *Cancer Cell* (2004) 5(5):429–41. doi: 10.1016/s1535-6108(04)00115-1
128. Harada H, Itasaka S, Kizaka-Kondoh S, Shibuya K, Morinibu A, Shinomiya K, et al. The Akt/mTOR Pathway Assures the Synthesis of HIF-1α Protein in a Glucose- and Reoxygenation-Dependent Manner in Irradiated Tumors. *J Biol Chem* (2009) 284:5332–42. doi: 10.1074/jbc.M806653200
129. Hollinshead KER, Parker SJ, Eapen VV, Encarnacion-Rosado J, Sohn A, Oncu T, et al. Respiratory Supercomplexes Promote Mitochondrial Efficiency and Growth in Severely Hypoxic Pancreatic Cancer. *Cell Rep* (2020) 33:108231. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108231
130. Taylor E, Zhou J, Lindsay P, Foltz W, Cheung M, Siddiqui I, et al. Quantifying Reoxygenation in Pancreatic Cancer During Stereotactic Body Radiotherapy. *Sci Rep* (2020) 10:1638. doi: 10.1038/s41598-019-57364-0
131. Rockwell S, Dobrucki I, Kim E, Marrison S, Vu V. Hypoxia and Radiation Therapy: Past History, Ongoing Research, and Future Promise. *CMM* (2009) 9:442–58. doi: 10.2174/156652409788167087
132. Harada H, Itasaka S, Zhu Y, Zeng L, Xie X, Morinibu A, et al. Treatment Regimen Determines Whether an HIF-1 Inhibitor Enhances or Inhibits the Effect of Radiation Therapy. *Br J Cancer* (2009) 100:747–57. doi: 10.1038/sj.bjc.6604939
133. Kabakov AE, Yakimova AO. Hypoxia-Induced Cancer Cell Responses Driving Radioresistance of Hypoxic Tumors: Approaches to Targeting and Radiosensitizing. *Cancers* (2021) 13:1102. doi: 10.3390/cancers13051102
134. Lee Y, Auh SL, Wang Y, Burnette B, Wang Y, Meng Y, et al. Therapeutic Effects of Ablative Radiation on Local Tumor Require CD8+ T Cells: Changing Strategies for Cancer Treatment. *Blood* (2009) 114:589–95. doi: 10.1182/blood-2009-02-206870
135. Lugade AA, Moran JP, Gerber SA, Rose C, Frelinger JG, Lord EM. Local Radiation Therapy of B16 Melanoma Tumors Increases the Generation of Tumor Antigen-Specific Effector Cells That Traffic to the Tumor. *J Immunol* (2005) 174(12):7516–23. doi: 10.4049/jimmunol.174.12.7516
136. Lauber K. Dying Cell Clearance and Its Impact on the Outcome of Tumor Radiotherapy. *Front Oncol* (2012) 2:116. doi: 10.3389/fonc.2012.00116
137. Nehs MA. Necroptosis Is a Novel Mechanism of Radiation-Induced Cell Death in Anaplastic Thyroid and Adrenocortical Cancers. *Surgery* (2011) 150(6):1032–9. doi: 10.1016/j.surg.2011.09.012
138. Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and Its Role in Inflammation. *Nature* (2015) 517(7534):311–20. doi: 10.1038/nature14191
139. Garelli E, Rittmeyer A, Putora PM, Glatzer M, Dressel R, Andreas S. Abscopal Effect in Lung Cancer: Three Case Reports and a Concise Review. *Immunotherapy* (2019) 11:1445–61. doi: 10.2217/imt-2019-0105
140. Dagoglu N, Karaman S, Caglar HB, Oral EN. Abscopal Effect of Radiotherapy in the Immunotherapy Era: Systematic Review of Reported Cases. *Cureus* (2019) 11(2):e4103. doi: 10.7759/cureus.4103
141. Petrova V, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G, Amelio I. The Hypoxic Tumour Microenvironment. *Oncogenesis* (2018) 7:10. doi: 10.1038/s41389-017-0011-9
142. Noman MZ, Hasmim M, Messai Y, Terry S, Kieda C, Janji B, et al. Hypoxia: A Key Player in Antitumor Immune Response. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am J Physiol-Cell Physiol* (2015) 309:C569–79. doi: 10.1152/ajpcell.00207.2015
143. Riera-Domingo C, Audigé A, Granja S, Cheng W-C, Ho P-C, Baltazar F, et al. Immunity, Hypoxia, and Metabolism–The Ménage À Trois of Cancer: Implications for Immunotherapy. *Physiol Rev* (2020) 100:1–102. doi: 10.1152/physrev.00018.2019
144. Colegio OR. Functional Polarization of Tumour-Associated Macrophages by Tumour-Derived Lactic Acid. *Nature* (2014) 513(7519):559–63. doi: 10.1038/nature13490
145. Yang X, Lu Y, Hang J, Zhang J, Zhang T, Huo Y, et al. Lactate-Modulated Immunosuppression of Myeloid-Derived Suppressor Cells Contributes to the Radioresistance of Pancreatic Cancer. *Cancer Immunol Res* (2020) 8:1440–51. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-20-0111
146. Jayaprakash P, Ai M, Liu A, Budhani P, Bartkowiak T, Sheng J, et al. Targeted Hypoxia Reduction Restores T Cell Infiltration and Sensitizes Prostate Cancer to Immunotherapy. *J Clin Invest* (2018) 128:5137–49. doi: 10.1172/JCI96268
147. Liu Y-N, Yang J-F, Huang D-J, Ni H-H, Zhang C-X, Zhang L, et al. Hypoxia Induces Mitochondrial Defect That Promotes T Cell Exhaustion in Tumor Microenvironment Through MYC-Regulated Pathways. *Front Immunol* (2020) 11:1906. doi: 10.3389/fimmu.2020.01906
148. Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn J-I, Cheng P, et al. HIF-1α Regulates Function and Differentiation of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *J Exp Med* (2010) 207:2439–53. doi: 10.1084/jem.20100587
149. Noman MZ, Janji B, Hu S, Wu JC, Martelli F, Bronte V, et al. Tumor-Promoting Effects of Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Potentiated by Hypoxia-Induced Expression of miR-210. *Cancer Res* (2015) 75:3771–87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0405
150. Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, Liao D, Zhang N, DeNardo DG, et al. Macrophage Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1α Suppresses T-Cell Function and Promotes Tumor Progression. *Cancer Res* (2010) 70:7465–75. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1439
151. Imtiyaz HZ, Williams EP, Hickey MM, Patel SA, Durham AC, Yuan L-J, et al. Hypoxia-Inducible Factor 2α Regulates Macrophage Function in Mouse Models of Acute and Tumor Inflammation. *J Clin Invest* (2010) 120:2699–714. doi: 10.1172/JCI39506

152. Ben-Shoshan J, Maysel-Auslender S, Mor A, Keren G, George J. Hypoxia Controls CD4+CD25+ Regulatory T-Cell Homeostasis *via* Hypoxia-Inducible Factor-1α. *Eur J Immunol* (2008) 38:2412–8. doi: 10.1002/eji.200838318
153. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, et al. PD-L1 Is a Novel Direct Target of HIF-1α, and Its Blockade Under Hypoxia Enhanced MDSC-Mediated T Cell Activation. *J Exp Med* (2014) 211:781–90. doi: 10.1084/jem.20131916
154. Köhler T, Reizis B, Johnson RS, Weighardt H, Förster I. Influence of Hypoxia-Inducible Factor 1α on Dendritic Cell Differentiation and Migration: Immunomodulation. *Eur J Immunol* (2012) 42:1226–36. doi: 10.1002/eji.201142053
155. Eckert F, Zwirner K, Boeke S, Thorwarth D, Zips D, Huber SM. Rationale for Combining Radiotherapy and Immune Checkpoint Inhibition for Patients With Hypoxic Tumors. *Front Immunol* (2019) 10:407. doi: 10.3389/fimmu.2019.00407
156. 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* (2021) 13:1804. doi: 10.3390/cancers13081804
157. Lin B, Ma H, Ma M, Zhang Z, Sun Z, Hsieh I, et al. The Incidence and Survival Analysis for Anaplastic Thyroid Cancer: A SEER Database Analysis. *Am J Transl Res* (2019) 11(9):5888–96.
158. Saeed NA, Kelly JR, Deshpande HA, Bhatia AK, Burtness BA, Judson BL, et al. Adjuvant External Beam Radiotherapy for Surgically Resected, Nonmetastatic Anaplastic Thyroid Cancer. *Head Neck* (2020) 42:1031–44. doi: 10.1002/hed.26086
159. Augustin T, Oliinyk D, Rauch J, Koehler VF, Spitzweg C, Belka C, et al. Radiation to the Primary Tumor in Metastatic Anaplastic Thyroid Cancer. *In Vivo* (2021) 35:461–5. doi: 10.21873/invivo.12279
160. Johnson JM, Lai SY, Cotzia P, Cognetti D, Luginbuhl A, Pribitkin EA, et al. Mitochondrial Metabolism as a Treatment Target in Anaplastic Thyroid Cancer. *Semin Oncol* (2015) 42:915–22. doi: 10.1053/j.seminoncol.2015.09.025
161. Gill K S, Tassone P. Thyroid Cancer Metabolism: A Review. *Thyroid Disord Ther* (2016) 05:200. doi: 10.4172/2167-7948.1000200
162. Nakajo M, Jinguji M, Tani A, Kajiya Y, Nandate T, Kitazano I, et al. [18f]-FDG-PET/CT and [18F]-FAZA-PET/CT Hypoxia Imaging of Metastatic Thyroid Cancer: Association With Short-Term Progression After Radioiodine Therapy. *Mol Imaging Biol* (2020) 22:1609–20. doi: 10.1007/s11307-020-01516-6
163. Lee JW, Yoon DY, Choi CS, Chang SK, Yun EJ, Seo YL, et al. Anaplastic Thyroid Carcinoma: Computed Tomographic Differentiation From Other Thyroid Masses. *Acta Radiol* (2008) 49:321–7. doi: 10.1080/02841850701813120
164. Mahkamova K, Latar N, Aspinall S, Meeson A. Hypoxia Increases Thyroid Cancer Stem Cell-Enriched Side Population. *World J Surg* (2018) 42:350–7. doi: 10.1007/s00268-017-4331-x
165. Jacobsen A-B, Grøholt KK, Lorntzsen B, Osnes TA, Falk RS, Sigstad E. Anaplastic Thyroid Cancer and Hyperfractionated Accelerated Radiotherapy (HART) With and Without Surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2017) 274:4203–9. doi: 10.1007/s00405-017-4764-8
166. Warenius HM, White R, Peacock JH, Hanson J, Britten RA, Murray D. The Influence of Hypoxia on the Relative Sensitivity of Human Tumor Cells to 62.5 MeV (P→Be) Fast Neutrons and 4 MeV Photons. *Radiat Res* (2000) 154:54–63. doi: 10.1667/00337587(2000)154[0054:TIOHOT]2.0.CO;2
167. Chapman TR, Laramore GE, Bowen SR, Orio PF. Neutron Radiation Therapy for Advanced Thyroid Cancers. *Adv Radiat Oncol* (2016) 1:148–56. doi: 10.1016/j.adro.2016.05.001
168. Burrows N, Resch J, Cowen RL, von Wasielewski R, Hoang-Vu C, West CM, et al. Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1α in Thyroid Carcinomas. *Endocrine-Related Cancer* (2010) 17:61–72. doi: 10.1677/ERC-08-0251
169. Ding Z-Y, Huang Y-J, Tang J-D, Li G, Jiang P-Q, Wu H-T. Silencing of Hypoxia-Inducible Factor-1α Promotes Thyroid Cancer Cell Apoptosis and Inhibits Invasion by Downregulating WWP2, WWP9, VEGF and VEGFR2. *Exp Ther Med* (2016) 12:3735–41. doi: 10.3892/etm.2016.3826
170. Kim M-H, Lee TH, Lee JS, Lim D-J, Lee PC-W. Hif-1α Inhibitors Could Successfully Inhibit the Progression of Differentiated Thyroid Cancer *in Vitro*. *Pharmaceuticals* (2020) 13:208. doi: 10.3390/ph13090208

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Rakotomalala, Escande, Furlan, Meignan and Lartigau. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Cancer Biology

BMP2 and BMP7 cooperate with H3.3K27M to promote quiescence and invasiveness in pediatric diffuse midline gliomas

Reviewed Preprint

Published from the original preprint after peer review and assessment by eLife.

About eLife's process

Reviewed preprint posted
November 23, 2023 (this version)

Sent for peer review
August 17, 2023

Posted to bioRxiv
August 11, 2023

Paul Huchedé, Swann Meyer, Clément Berthelot, Maud Hamadou, Adrien Bertrand-Chapel, Andria Rakotomalala, Line Manceau, Julia Tomine, Nicolas Lespinasse, Paul Lewandowski, Martine Cordier-Bussat, Laura Broutier, Aurélie Dutour, Isabelle Rochet, Jean-Yves Blay, Cyril Degletagne, Valéry Attignon, Angel Montero-Carcaboso, Marion Le Grand, Eddy Pasquier, Alexandre Vasiljevic, Pascale Gilardi-Hebenstreit, Samuel Meignan, Pierre Leblond, Vanessa Ribes, Erika Cosset, Marie Castets

Childhood Cancer & Cell Death (C3) team, LabEx DEVweCAN, Institut Convergence Plascan, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France • University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277-CANTHER Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, Centre Oscar Lambret, F-59000 Lille, France • Université Paris Cité, CNRS, Institut Jacques Monod, F-75013 Paris, France • Multisite Institute of Pathology, Groupement Hospitalier Est du CHU de Lyon, Hôpital Femme-Mère-Enfant, 69677 Bron, France • Platform of Cancer Genomics, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France • Preclinical Therapeutics and Drug Delivery Research Program, Department of Oncology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain • Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Université Aix-Marseille, Institut Paoli-Calmettes, Centre de Lutte Contre le Cancer de la région PACA, INSERM 1068, CNRS 7258, 13009 Marseille, France • Department of Pediatric Oncology, Institute of Pediatric Hematology and Oncology (IHOPe), Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France • GLIMMER Of lIght (GLIoblastoma MetabolisM, HetERogeneity, and OrganoIds) team, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France

https://en.wikipedia.org/wiki/Open_access
Copyright information

Abstract

Pediatric diffuse midline gliomas (pDMG) are an aggressive type of childhood cancer with a fatal outcome. Their major epigenetic determinism has become clear, notably with the identification of K27M mutations in histone H3. However, the synergistic oncogenic mechanisms that induce and maintain tumor cell phenotype have yet to be deciphered.

In 20 to 30% of cases, these tumors have an altered BMP signaling pathway with an oncogenic mutation on the BMP type I receptor ALK2, encoded by *ACVR1*. However, the potential impact of the BMP pathway in tumors non-mutated for *ACVR1* is less clear. By integrating bulk, single-cell and spatial transcriptomic data, we show here that the BMP signaling pathway is activated at similar levels between *ACVR1* wild type and mutant tumors and identify BMP2 and BMP7 as putative activators of the pathway in a specific subpopulation of cells. By using both pediatric isogenic glioma lines genetically modified to overexpress H3.3K27M and patients-derived DIPG cell lines, we demonstrate that BMP2/7 synergizes with H3.3K27M to induce a transcriptomic rewiring associated with a quiescent but invasive cell state. These data suggest a generic oncogenic role for the BMP pathway in gliomagenesis of pDMG and

pave the way for specific targeting of downstream effectors mediating the BMP/K27M crosstalk.

eLife assessment

This **important** study examined whether the BMP signaling pathway has a role in H3.3K27M DMG tumors, regardless of the presence of ACRVR1 activating mutations. The authors show **compelling** evidence that BMP2/7 synergizes with H3.3K27M to induce a transcriptomic rewiring associated with a quiescent but invasive cell state. Although this work could be further enhanced by the inclusion of additional models as well as further consideration of elements, such as the location of the tumor, in the datasets used, overall this work suggests that BMP2/7 could be considered as a target for future therapies in this deadly cancer.

Introduction

Pediatric Diffuse Midline Gliomas (pDMG), including Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG) are rare and aggressive brain tumors that arise in the pons, thalamus or spinal cord of children, most commonly between the ages of 5 and 10[1–3]. pDMG are almost uniformly fatal, with a median overall survival of 9 to 11 months[4,5], thereby representing the leading cause of mortality in pediatric neuro-oncology[1,3]. Clinical management of pDMG and especially of DIPG is a major challenge given their location in vital nervous centers and their leptomeningeal dissemination, which prevent any prospect of surgical intervention[6]. Radiotherapy, the current standard-of-care, is at best only transiently effective[3,7]. Moreover, pDMG are highly resistant to currently available chemotherapies although promising combinations of molecules, including ONC201, are currently in clinical trials[8].

High-throughput sequencing demonstrated that pDMG are associated with a major disruption of the epigenetic landscape, resulting in 80% of cases from a lysine-to-methionine substitution at position 27 (K27M) in genes encoding histone variants H3.3 (*H3F3A/H3-3A*) or H3.1 (*HIST1H3B/H3C2* or *HIST1H3C/H3C3*)[4,9–11]. H3K27M variants, also known as oncohistones, are affine for EZH2, the methyltransferase subunit of Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) and inhibit its activity. As a result, pDMG show abnormal methyl group deposition on H3K27 and a global loss of trimethylated H3K27 (H3K27me3)[12–17], a histone mark associated with transcriptional repression.

In addition to *TP53*, other genetic alterations have been described, notably in the *PDGFR*, *EGFR* or *PIK3CA* genes[1], suggesting an oncogenic synergy between H3K27-based epigenetic remodeling and the activation of several transcriptional programs[18,19]. Accordingly, 20 to 30% of pDMG cases are associated with mutations in the *ACVR1* gene, encoding for the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor ALK2[20–23], which leads to the overactivation of intracellular BMP signaling pathway[24–32]. Such increase in BMP signaling in pDMG epigenetic context has been suggested to promote tumorigenesis by maintaining cells in a proliferative, mesenchymal-like and undifferentiated state *in vitro* and *in vivo*[24,25,27,29]. In 69% of cases, these *ACVR1* mutations are associated with the H3.1K27M mutation, whereas less than 20% are observed in H3.3K27M tumors[1]. The question is then whether BMP signaling pathway could also be involved in the tumorigenesis of H3.3K27M-positive tumors. Recent data support the idea that H3.1K27M tumors mutated for *ACVR1* would emerge from a ventral pool of oligodendrocyte progenitor cells (OPC) characterised by the expression of the transcription factor NKX6-1 and dependent on the Sonic Hedgehog (SHH) signaling[29]. In contrast, H3.3K27M are thought to preferentially derive

from dorsal progenitors expressing the dorsal PAX3- and BMP-dependent transcription factor[29]. In other words, H3.1K27M tumors would depend on the concomitant acquisition of the *ACVR1* mutation for transformation, whereas the BMP pathway could be activated in a tumor-independent manner in H3.3K27M tumors, due to their BMP-rich microenvironment. However, while the pro-tumorigenic activity of BMP signaling is clear in *ACVR1* mutant pDMG, recent data have unexpectedly reported that BMP ligands may exert a tumor-suppressive activity in H3.3K27M-*ACVR1* wild-type (WT) pDMG cellular models[33].

Here, we have integrated bulk, single-cell and spatial transcriptomic data from patients with functional approaches in cellular models to characterize the impact of BMP activation in H3.3K27M-*ACVR1* WT pDMG. Bioinformatic analyses indicate that BMP signaling pathway activation ground state is independent of *ACVR1* status in pDMG, which likely results both from BMP2/7 tumor-autonomous and microenvironment-driven signals in *ACVR1* WT tumors. Functional modeling on pediatric glioma cell lines and spatial transcriptomics unveil that H3.3K27M and BMP2/7 synergize to induce a transcriptomic switch leading to a quiescent but invasive cell state. These results shed new light on the complex phenotype resulting from the synergy between activation of the BMP pathway and epigenetic remodeling induced by the H3.3K27M mutation in pDMG, and the interest of a therapeutic approach targeting the downstream oncogenic pathways responsible for the invasive potential of tumor cells.

Results

BMP pathway activation level is independent of *ACVR1* mutational status in pDMG, and likely supported by BMP2/BMP7 in H3.3K27M tumors

Oncogenic[24,25,27,29] and tumor-suppressive[33] functions of the BMP pathway have both been reported in pDMG. To clarify this point, we first compared tumor clustering according to their *ACVR1* status, based on the transcriptional profiling of 193 BMP pathway target genes as a reliable readout of the pathway activation state, including notably the downstream transducers ID1, ID2, RUNX2 and GATA3 (see list in Supp. Table 1). Principal component analysis (PCA) performed on this BMP target genes subset demonstrates no segregation of *ACVR1* mutant (in blue) from *ACVR1* WT samples (in red) in two independent publicly available transcriptomic cohorts of 31[34] and 40[1] patients (**Figure 1A** and **Figure 1**—figure supplement A, respectively). Consistently, the expression pattern of these genes does not segregate pDMG according to their *ACVR1* status in an unsupervised hierarchical clustering analysis in both cohorts (**Figure 1B** and **Figure 1**—figure supplement B). To have a more comprehensive overview of BMP pathway activation level, we used the PROGENy method to infer downstream TGF- β/BMP response footprint from perturbation-response genes indicative of the pathway activity[35]. Interestingly, we observed no significant difference in the TGF-β/BMP activation PROGENy score between *ACVR1* mutant and WT tumors (**Figure 1C** and **Figure 1**—figure supplement C). Of note, although variable, this score was even higher than the maximum observed in *ACVR1* mutant tumors in 12.5 (cohort 2) to 18.5% (cohort 1) of *ACVR1* WT pDMG.

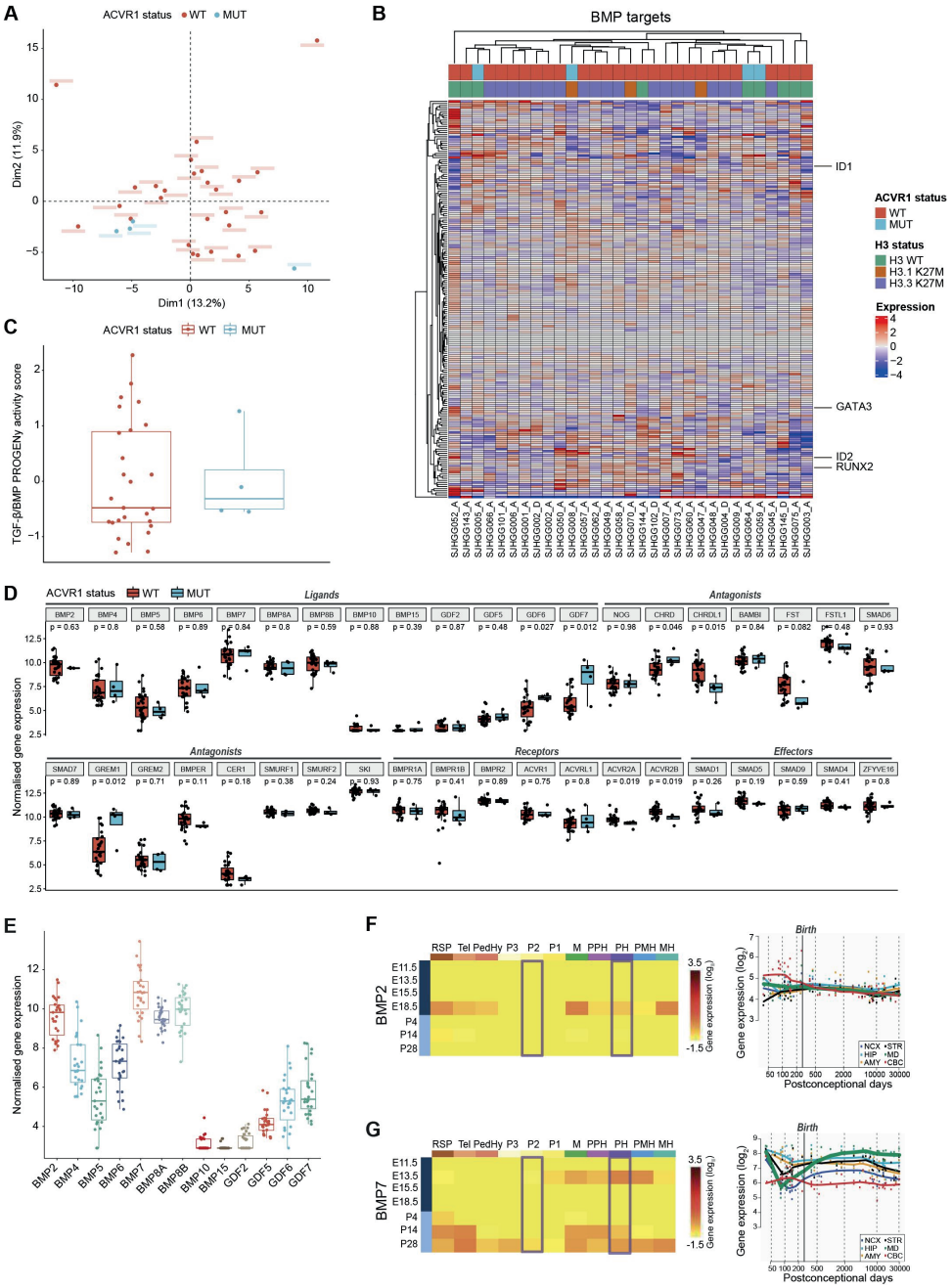


Figure 1.

BMP pathway activation coincides with high BMP2/7 levels in *ACVR1* WT-H3.3K27M pDMG

A. Principal Component Analysis (PCA) of *ACVR1* WT (red) and mutant pDMG (blue) samples based on transcriptomic data from cohort 1.

B. Heatmap representing the transcriptomic expression levels of BMP target genes between *ACVR1* WT (red) and mutant pDMG (blue) in cohort 1. H3 mutational status is specified as WT (green), mutated on variant H3.1 (brown) or H3.3 (purple). Normalized and centered gene expression levels are color-coded with a blue (low expression) to red (high

expression) gradient. Samples in columns are clustered using Euclidean distance. The BMP targets gene list is presented in Supplementary Table 1.

C. TGF-β/BMP pathway activity inferred from a specific genes-response signature using PROGENy algorithm in *ACVR1* WT (red) versus mutant pDMG (blue) (cohort 1). No significant difference was observed between both groups.

D. Comparison of the expression level of BMP ligands, antagonists, receptors, and effectors between *ACVR1* WT (red) versus mutant pDMG (blue) in cohort 1. p-values are indicated for each gene.

E. Boxplot of BMP ligands expression (vst-normalized) in cohort 1.

F-G. Pattern of expression of BMP2 and 7 in developing brain. **Left panel:** heatmaps showing relative BMP2 (**F**) and BMP7 (**G**) expression by *in situ* hybridization (ISH) in murine brain across development obtained from the ALLEN Developing Mouse Brain Atlas. Normalized and scaled gene expression levels are color-coded with a yellow (low expression) to red (high expression) gradient. Developmental stage is mentioned in rows with pre-and post-natal stage color-coded in dark and light blue, respectively. Different brain regions are indicated in columns as following: RSP: rostral secondary prosencephalon; Tel: telencephalic vesicle; PedHy: peduncular caudal hypothalamus; P3: prosomere 3; P2: prosomere 2; P1: prosomere 1; M: midbrain; PPH: prepontine hindbrain; PH: pontine hindbrain; PMH: pontomedullary hindbrain; MH: medullary hindbrain (medulla). **Right panel:** spatiotemporal gene expression data of BMP2 (**F**) and BMP7 (**G**) expression from human developing and adult brain samples obtained from the Human Brain Transcriptome[32]. The vertical line indicates birth at 266 days. Each curve represents a part of the brain as following: NCX: neocortex (dark blue); HIP: hippocampus (light blue); AMY: amygdala (orange); STR: striatum (black); MD: mediodorsal nucleus of the thalamus (green, in bold); CBC: cerebellar cortex (red).

To define what alternative mechanism could lead to the activation of the BMP pathway in *ACVR1* WT tumors, we profiled the expression of all the major BMP pathway components. Compatible with BMP signaling being active, several ligands, receptors, antagonists and intracellular transducers are expressed in *ACVR1* WT pDMG, albeit at expression levels very similar to those observed in *ACVR1* mutant tumors (**Figures 1B**, D and **Figure 1**-figure supplement B, D). By differential analysis, we found that only *CHRDL1* is significantly overexpressed in *ACVR1* WT tumors compared to mutant ones in two independent transcriptomic cohorts, as previously reported in pDMG cell lines[33] (**Figure 1D** and **Figure 1**-figure supplement D). Although its role in regulating the BMP pathway remains to be fully elucidated[36–40], the gain of *CHRDL1* expression is unlikely promoting the activation of the BMP pathway in *ACVR1* WT tumors. Since no difference is observed in receptor expression consistently between the two cohorts (**Figure 1D** and **Figure 1**-figure supplement D), we hypothesized that activation of this pathway likely results from tumor-autonomous and/or microenvironment-driven production of ligands. Out of all BMP ligands present in pDMG tumors, BMP2 and BMP7 are the two most highly expressed ligands in H3.3K27M pDMG in both cohorts (**Figure 1E** and **Figure 1**-figure supplement E). Once induced, BMP ligand production can be maintained by a positive transcriptional regulatory loop[41,42]. We then reasoned that in *ACVR1* WT pDMG, the priming signal may come from the microenvironment. Accordingly, it has been recently suggested that H3.3K27M DIPG likely occur in cells derived from dorsal PAX3+ BMP-reliant progenitors, and that the oncogenic transformation may result from a crosstalk with BMP ligands present in the microenvironment at that time[29]. Regulation of dorsal glial cell fate during development has been shown to rely mostly on BMP4 and BMP7[43–46]. By analysing data from the ALLEN Developing Mouse Brain Atlas[47], we observed that BMP7 is only expressed at E13.5 during embryogenesis. It is then progressively re-expressed post-natally from P14 notably in the pontine hindbrain, to reach a maximum in most territories including prosomere 2 at P28, which is compatible with the spatio-temporal window of occurrence of H3.3K27M pDMG tumors[29] (**Figure 1F**). BMP2 is only expressed at the E18.5 embryonic stage and BMP4 expression peaks at P14 corresponding to infancy[48], before decreasing during the post-natal period in these territories (**Figure 1**-figure supplement F). Similarly, by integrating transcriptomic data from the HBT program[49], we observed that BMP7

expression but not BMP2 and BMP4 gradually increases to reach its maximum in the midline structure in the mid-childhood period (green curve, **Figure 1G** and **Figure 1**-figure supplement G), then coinciding with the peak incidence of pDMG tumors[1].

Overall, the integration of transcriptomic data reveals that the induction of BMP signaling in *ACVR1* WT pDMG, at a level equivalent to that observed in mutant tumors, could notably result from the production of BMP2 and/or 7, initiated by the expression of BMP7 by the microenvironment.

BMP7 synergizes with K27M to induce a transcriptomic program leading to quiescence and invasiveness in a low-grade glioma model

To functionally dissect the impact of H3.3K27M/BMP crosstalk and define whether it may have a rather oncogenic or tumor suppressive value, we first used the two previously described pediatric glioma Res259 and SF188 cell lines, which have been genetically modified to stably express and reproduce the epigenetic context either of WT or mutated forms of the variant H3.3[50]. Interestingly, BMP7 expression significantly decreases after H3.3K27M induction in both SF188 and Res259 cells (**Figure 2A**), whereas BMP2 and BMP4 expressions are not significantly modified (**Figure 2A** and **Figure 2**-figure supplement A-B). To compensate for this decrease and mimic the high-level of BMP7 expression observed in pDMG tumors, we then assessed the impact of recombinant BMP7 depending on the H3.3 context.

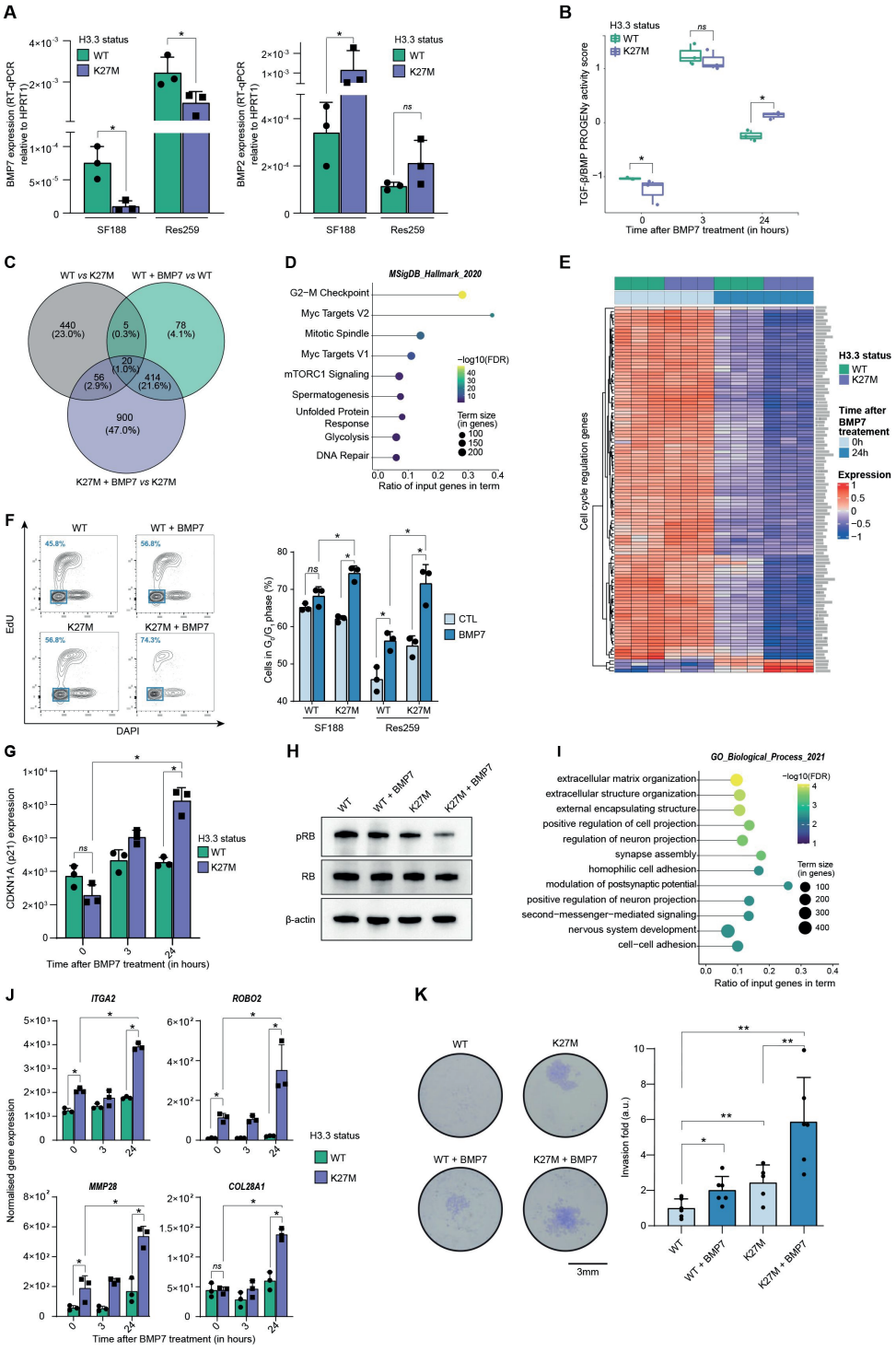

A
H3.3 status
WT
K27M
BMP7 expression (RT-qPCR relative to HPRT1)
BMP2 expression (RT-qPCR relative to HPRT1)
SF188
Res259
B
TGF-β/BMP PROGENy activity score
Time after BMP7 treatment (in hours)
C
WT vs K27M
WT + BMP7 vs WT
K27M + BMP7 vs K27M
440 (23.0%)
5 (0.3%)
78 (4.1%)
20 (1.0%)
56 (2.9%)
414 (21.6%)
900 (47.0%)
D
MSigDB_Hallmark_2020
G2−M Checkpoint
Myc Targets V2
Mitotic Spindle
Myc Targets V1
mTORC1 Signaling
Spermatogenesis
Unfolded Protein Response
Glycolysis
DNA Repair
−log10(FDR)
Term size (in genes)
Ratio of input genes in term
E
Cell cycle regulation genes
H3.3 status
Time after BMP7 treatement
0h
24h
Expression
F
WT
WT + BMP7
K27M
K27M + BMP7
EdU
DAPI
Cells in G1/G0 phase (%)
CTL
BMP7
G
CDKN1A (p21) expression
Time after BMP7 treatment (in hours)
H
pRB
RB
β-actin
I
GO_Biological_Process_2021
extracellular matrix organization
extracellular structure organization
external encapsulating structure
positive regulation of cell projection
regulation of neuron projection
synapse assembly
homophilic cell adhesion
modulation of postsynaptic potential
positive regulation of neuron projection
second−messenger−mediated signaling
nervous system development
cell−cell adhesion
Ratio of input genes in term
J
ITGA2
ROBO2
MMP28
COL28A1
Normalised gene expression
Time after BMP7 treatment (in hours)
K
3mm
Invasion fold (a.u.)

Figure 2.

BMP7 induces a specific transcriptomic and phenotypic switch in a H3.3K27M mutant glioma context

A. *BMP7* (left) and *BMP2* (right) expressions in H3.3WT (green) versus H3.3K27M (purple) SF188 and Res259 cells. Gene expressions were analyzed by QRT-PCR relative to *HPRT1* expression. Means +/- std are represented (n = 3). *: p<0.05, ns: non-significant.

B. TGF-β/BMP pathway activity inferred from a specific genes-response signature using the PROGENy algorithm in Res259-H3.3WT (green) and H3.3K27M (purple) after 0, 3 and 24 hr of BMP7 treatment (n=3). *: p<0.05, ns: non-significant.

C. Venn diagram showing the number of differentially expressed genes (DEG) and the corresponding percentages compared to all DEG in each condition: Res259-H3.3WT versus Res259-H3.3K27M without BMP7 treatment (grey), Res259-H3.3WT versus Res259-H3.3WT treated with BMP7 for 24h (green), Res259-H3.3K27M versus Res259-H3.3K27M treated with BMP7 for 24h (purple).

D. Functional enrichment of DEG specifically between Res259-H3.3K27M versus Res259-H3.3K27M treated with BMP7 for 24h. Dots are colored according to their false discovery rate with a blue (lower significance) to yellow (higher significance) gradient and sized by the count number of genes matching the biological process.

E. Heatmap representing the transcriptomic expression levels of genes associated with cell cycle regulation between Res259-H3.3WT (green) and Res259-H3.3K27M (purple) cells, with (dark blue) or without (light blue) BMP7 treatment. Normalized and centered gene expression levels are color-coded with a blue (low expression) to red (high expression) gradient.

F. Flow cytometry analyses of cell cycle in Res259/SF188-H3.3WT and H3.3K27M upon BMP7 treatment. **Left panel:** representative density plots with outliers (dots) with 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining on the y-axis and with DAPI staining on the x-axis for the indicated conditions on Res259 cell lines. Quantification of cells in G0/G1 phase (blue square, low EdU and low DAPI stainings) appear in the lower left corner for the presented graph. **Right panel:** quantification of cells in G0/G1 phase for SF188- and Res259-H3.3WT or H3.3K27M without BMP7 treatment (light blue) or after 24 hr treatment (dark blue). Means +/- std are represented (n = 3). *: p<0.05, ns: non-significant.

G. *CDKN1A* (encoding p21) normalized expression from transcriptomic data of Res259-H3.3WT (green) and Res259-H3.3K27M (purple) after 0, 3 or 24 hr of BMP7 treatment. Means +/- std are represented (n = 3). *: p<0.05, ns: non-significant.

H. Western-blot analysis of RB phosphorylation on S780 (pRB) in Res259-H3.3WT or H3.3K27M upon BMP7 treatment. Total RB and β-actin are used as controls. One representative experiment out of 3 is shown.

I. Functional enrichment of DEG specific for the K27M/BMP7 condition, according to the decision tree algorithm presented in **Figure 2** -figure supplement J. Dots are colored according to their false discovery rate with a blue (lower significance) to yellow (higher significance) gradient and sized by the count number of genes matching the biological process.

J. *ITGA2*, *ROBO2*, *MMP28* and *COL28A1* normalized expression from transcriptomic data of Res259- H3.3WT (green) and Res259-H3.3K27M (purple) after 0, 3 or 24 hr of BMP7 treatment. Means +/- std are represented (n = 3). *: p<0.05, ns: non-significant.

K. Impact of BMP7 treatment on invasion in Res259-H3.3WT versus H3.3K27M. **Left panel:** representative pictures of a transwell invasion assay of Res259-H3.3WT or H3.3K27M, with and without BMP7 treatment. Scale bar = 3 mm. **Right panel:** invasion was quantified as the mean value of five independent experiments and represented as a graph. Means +/- std are represented. *: p<0.05, **: p<0.01.

Using qRT-PCR as a first hint, we observed a significant increase in BMP targets expression following BMP7 treatment in both H3.3K27M-Res259 and -SF188 cells compared to H3.3 WT cell lines, with at least a 2-fold increase at 3 and 24 hours for both *ID1* and *ID2* (**Figure 2A** and **Figure 2**-figure supplement C). Interestingly, both levels and kinetics of SMAD1/5/8 phosphorylation in H3.3K27M versus WT overexpressing cells remain unchanged, indicating that BMP canonical pathway activation is not modified by histone mutational status (**Figure 2**-figure supplement D). To further investigate and characterize the specificity of the response of H3.3 WT and mutant cells to BMP7, we performed an RNA-sequencing (RNA-seq) analysis after 3h and 24h of treatment with recombinant BMP7. Using PROGENy analysis, we observed that the increase in TGF-β/BMP activation score induced by BMP7 is potentiated and remains significantly higher at 24 hours in H3.3K27M-Res259 compared to their wild-type counterparts (**Figure 2B**). While differentially expressed genes at 3 hours mostly correspond to the expression of the K27M mutation (**Figure 2**-figure supplement E-F), a subset of 900 genes appears differentially expressed (DE) specifically between treated and untreated H3.3K27M-Res259 cells, but not in H3.3 WT ones (**Figure 2C**). Enrichment analyses revealed that DE genes are notably associated with alteration in cell cycle regulation (**Figure 2D-E**), and that the downregulated ones in H3.3K27M BMP7-treated cells correspond to E2F targets (**Figure 2**-figure supplement G). Consistently, BMP7 treatment leads to a significant 12.2% and 16.7% increase of cells in the G0/G1 phase respectively in H3.3K27M-SF188 and -Res259 cells, while its effect is limited to a 3% and 10.3% increase in their WT counterparts (**Figure 2F**). Similarly, the number of H3.3K27M-Res259 cells is significantly reduced by 1.7-fold compared to non-treated cells upon BMP7 treatment, while the decrease is limited to 1.2- fold in WT ones (**Figure 2**-figure supplement H). Of note, this K27M-dependent BMP7 effect is associated with a significant 1.8-fold increase in cyclin dependent kinase inhibitor 1A (*CDKN1A*, encoding P21; **Figure 2G**) expression and a reciprocal decrease in RB1 phosphorylation (**Figure 2H**). This cell cycle blockade is unlikely to result from the entry of cells in senescence since there is no difference in beta-galactosidase activity (SA-β-gal) between wild-type and mutant cells upon BMP7 treatment (**Figure 2**-figure supplement I).

To further dissect the crosstalk between BMP7 and the H3.3K27M mutation, we established a decision tree algorithm to specifically isolate which of the 900 DE genes post-treatment BMP7 in H3.3K27M cells correspond to a potentiation of the effect of the K27M mutation by BMP7 (**Figure 2**-figure supplement J, left panel), or to a specific effect of BMP7 in the K27M context (**Figure 2**-figure supplement J, right panel). We then pinpointed DE genes that specifically correspond to cooperative effects of K27M epigenetic alterations and BMP7-mediated transcriptional regulation. Interestingly, enrichment analyses revealed that these genes are involved in processes related to invasion/migration, including extracellular matrix organization, regulation of cell/neuron projection and adhesion (**Figure 2I**). Some of these genes such as *ITGA2*, *ROBO2*, and *MMP28* are already induced following H3.3K27M expression, and their expression is further amplified by the BMP7 treatment (**Figure 2J**). Conversely, others, such as *COL28A1*, are specifically induced or repressed by the K27M+BMP7 context (**Figure 2J**), consistently with our decision tree algorithm. We then assessed the combined impact of H3.3K27M expression and exposure to BMP7 on the invasive properties of glioma cells using a Matrigel™-coated transwell assay (**Figure 2K**). Expression of the H3.3K27M mutation is sufficient to drive a moderate increase in invasion compared to the WT context. However, this phenomenon is largely amplified by BMP7, with a global 5.6-fold in the H3.3 mutant context, compared to 2-fold in the H3.3 WT one.

Altogether, these data support the fact that BMP7 is sufficient to induce a transcriptomic reprogramming specific to the H3.3K27M epigenetic context, which leads to the emergence of a quiescent but invasive cell state.

Combined BMP2/BMP7 expression drives a quiescent-invasive tumor cell state in pDMG

Considering the data obtained in the Res259/SF188 mechanistic models, we then sought to define whether this crosstalk between BMP and H3.3K27M was preserved with similar effects in H3.3K27M pDMG models. First, we observed that BMP7 is the most expressed ligand in two *ACVR1* WT/H3.3K27M DIPG cell lines, but that few if any other BMP ligands, including BMP4, are. Unlike in tumors, BMP2 expression is notably low in these cell lines (**Figure 3** -figure supplement A). BMP2 has been shown to be induced by hypoxia[51] or reactive oxygen species (ROS)[52]. Accordingly, exposure of *ACVR1* WT H3.3K27M DIPG cells to hypoxia or ONC201, which is known to significantly increase ROS production[53,54], are both sufficient to induce a significant increase in BMP2 expression (**Figure 3A**). Thus, BMP2 can be produced autonomously by tumor cells in response to specific stresses. To model the concomitant impact of BMP7 and stress-induced BMP2 in the H3.3K27M mutant background, we analysed the impact of addition of BMP2 on DIPG 3D-spheroids. As shown in **Figure 3B** and **Figure 3** - figures supplement B-C, treatment of DIPG spheroids with increasing doses of recombinant human BMP2 triggers SMAD1/5/8 phosphorylation and leads to a strong dose-dependent decrease in growth rate. Consistently, Ki67 staining, a marker of proliferation, is significantly decreased upon BMP2 treatment (**Figure 3C**). Reciprocally, treatment of DIPG-spheroids with the BMP inhibitor LDN-193189 (LDN) leads to a slight increase in KI67-positive cells (**Figure 3C**). In parallel, we explored the impact of BMP activation/inhibition on DIPG cells migration/invasion propensity. BMP2 significantly increases the migration of tumor cells from Matrigel™-embedded 3D-DIPG spheroids, while an antagonistic effect was observed upon LDN treatment (**Figure 3D** and **Figure 3** -figure supplement D).

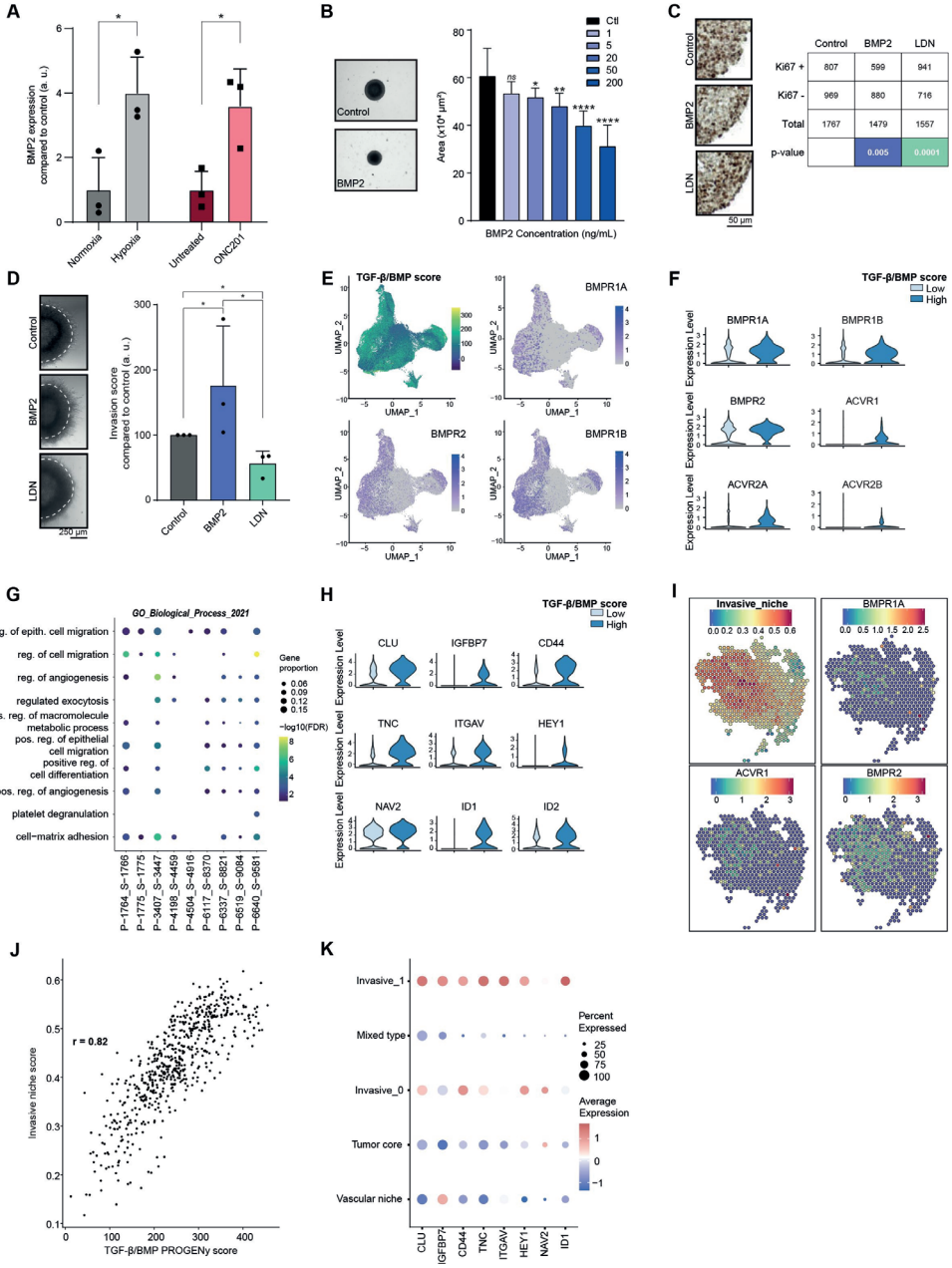


Figure 3.

Combined tumor-autonomous BMP2/BMP7 expression drives a quiescent-invasive tumor cell state in pDMG

A. *BMP2* expression after hypoxia or ONC201 treatment. Gene expression was analyzed by QRT-PCR relative to *HPRT1* expression. Means +/- std are represented (n = 3). *: p<0.05.

B. Growth monitoring of HSJD-DIPG-012 following recombinant BMP2 treatment. Means +/- std are represented (n = 3). *: p<0.05, **: p<0.01, ****: p<0.0001, ns: non-significant.

C. Impact of BMP2 or LDN treatment on KI67-positive staining in HSJD-DIPG-012. **Left panel:** representative images of Ki67 immunohistochemistry on HSJD-DIPG-012 spheroids treated or not with either BMP2 or LDN-193189. Scale bar = 50 µm. **Right panel:** quantification of Ki67-positive and negative cells. p-values were computed using Fisher's exact test. BMP2: 200 ng/mL, LDN-193189: 1 µM.

D. Impact of BMP2 or LDN treatment on tumor cells invasion. **Left panel:** representative images of HSJD-DIPG-012 spheroids embedded in Matrigel, after 48 hr of BMP2 or LDN-193189 treatment. Scale bar = 250 µm. **Right panel:** Invasion was quantified as the mean value of four independent experiments and represented as a graph. *: p<0.05. BMP2: 10 ng/mL, LDN-193189: 1 µM.

E. UMAP (uniform manifold approximation and projection) computed on harmony embeddings of the tumor cells of 10 *ACVR1* WT-H3.3K27M pDMGs from the scRNA-seq data published by [Jessa et al., 2022]. PROGENy TGF-β/BMP score is colored from blue (low activity score) to yellow (high activity score). Expression of the BMP receptors *BMPR1A*, *BMPR2* and *BMPR1B* is colored from grey (low expression values) to purple (high expression values).

F. Violin plots of BMP receptors in one (P-1775_S-1775) of the 10 samples based on the TGF-β/BMP PROGENy score. The TGF-β/BMP-low and high groups are colored respectively in light and dark blue. All p-value are lower than 7.357206e-13 (*ACVR2A*).

G. Dotplot of the first 10 significantly enriched pathways (FDR <= 0.05) in TGF-β/BMP-high cells for each of the 10 *ACVR1* WT-H3.3K27M pDMGs, ranked by number of samples with a significant enrichment, using the GO Biological Process database. Only dots of significant enrichments are shown for each sample. Dot color represents the -log10 (p-value) and ranges from blue (high p-value) to yellow (low p-values). Dot size is proportional to the overlap of DE genes and the genes of a geneset.

H. Violin plots of invasion-related genes in one (P-3407_S-3447) of the 10 samples based on the TGF- β/BMP-high/low score. The TGF-β/BMP-low group and high group are respectively colored in light and dark blue. All p-value are lower than 1.34e-8 (*HEY1*).

I. "Invasive niche" score from [Ren et al., 2023], and associated expression of the BMP receptors *BMPR1A*, *ACVR1* and *BMPR2*. Color ranges from blue (low score/expression value) to red (high score/expression value).

J. Scatter plot correlating the PROGENy TGF-β/BMP pathway activity score with the "Invasive niche" score for each Visium spot of pDMG Sample-1. The correlation coefficient was computed using Pearson's method. ****: p-value < 2.e-16.

K. Scaled expression of invasion-related genes in pDMG Sample-1 for each identified area. Dot size represents the proportion of cells expressing the gene. Color ranges from blue (low expression) to red (high expression).

To define whether such a BMP-induced quiescent-invasive cell state exists in *ACVR1* WT H3.3K27M pDMG tumors, we first used publicly available scRNA-seq data from 10 patients' biopsies published by Jessa and colleagues[29]. Integration of all these data unveiled that the BMP-responsive (*i.e.* High PROGENy TGF-β/BMP score) pool of tumor cells correlate significantly with BMP receptors expression, in particular to *BMPR2*, *BMPR1B*, *BMPR1A*, and *ACVR1* levels, respectively in 8, 5, 5 and 4 out of 10 samples (**Figure 3E-F** and **Figure 3**-figure supplement E). Interestingly, this BMP-responsive pool of cells is significantly enriched in genes involved in positive regulation of cell migration and in cell-matrix adhesion (**Figure 3G**), while showing a specific quiescent-compatible decrease in genes involved in transcription/translation processes (**Figure 3**-figure supplement F). To further define the extent and organization of this pool of cells, we performed spatial transcriptomic analysis of 3 H3.3K27M pDMG tumors. Data integration was performed using pDMG-derived Visium and scRNA-seq signatures recently published by Ren et al. and Filbin et al.[55,56] (**Figure 3**-figure supplement G). Consistently with observations in bulk and single-cell analyses of patients/models, the highest BMP ligands expressed are BMP2 and BMP7 along with BMP8B (Suppl. Table 2 and **Figure 3**-figure supplement G), whose expression

is not spatially delimited or associated with a specific gene signature. In line with single-cell analyses, we observed on the contrary that BMP receptors expression correlate significantly with the invasive niche score defined by Ren et al.[55] (**Figure 3I**), which can be spatially restricted to histologically delineated areas (samples 1-3, **Figure 3I** and **Figure 3**-figure supplement G) or more dispersed within the tumor (sample 2, **Figure 3**-figure supplement G). Moreover, the invasive niche score strongly correlates to the PROGENy TGF-β/BMP score (**Figure 3J** and **Figure 3**-figure supplement H). Coherently, this BMP-responsive invasive niche is characterised by a high expression of key markers of BMP activity (ID1), as well as markers of stemness (CD44, HEY1) and migration/invasion (TNC, IGFBP7, ITGAV) (**Figure 3K**).

Altogether, these data indicate that tumor-autonomous production of BMP2 and BMP7 synergize to maintain a quiescent-invasive niche in H3.3K27M DIPG.

Discussion

Major advances have been made in understanding the molecular bases of pDMG, among which DIPG, with the identification of the major epigenetic remodeling processes induced by histone H3 mutations. However, the oncogenic mechanisms cooperating with these mutations to induce transformation and tumor escape remain largely undefined.

Along this line, a key challenge is to define the precise role of the transcriptomic reprogramming induced by the BMP pathway, which remains controversial in these pediatric brain tumors[24,25,27,29,33]. Herein, we performed a comprehensive integration of transcriptomic data, which first supports the view of BMP signaling being also clearly activated in *ACVR1* WT/H3.3K27M pDMG. Effect of BMP activation is potentiated by the epigenetic context of these tumors, then leading to a global transcriptional reprogramming. Although it has been previously described that *ACVR1*-mutant tumors exhibit a higher expression of *ID1* and *ID2*[24], the extrapolation of BMP activity from a larger signature of BMP targets and on a score calculated from the inference of gene expression perturbations in response to the TGF-β/BMP pathway indicates the existence of a compensatory mechanism driving BMP activation in non-*ACVR1* mutant tumors. By analysing the expression of BMP effectors in pDMG tumors and patient-derived DIPG models, we propose that activation of this pathway in *ACVR1* WT H3.3K27M tumors could be at least partially mediated by two complementary tumor-autonomous and microenvironment-dependent mechanisms. Upon initiation, the expression of BMP, and notably BMP7, could synergize with or even trigger the autocrine production of BMP ligands by the tumors, among which BMP2 and 7. Indeed, such positive feedback loops maintaining the expression of BMP ligands have already been described notably during development[41,42]. Thus, BMP secretion by the microenvironment may prime the BMP activation in tumor cells and be required for oncogenic transformation. Once established, the dynamic modulation of BMP2 expression in response to stresses, such as hypoxia or treatments, could synergize with constitutive production of BMP7 to drive the emergence of an aggressive cell state.

Second, our data are in favor of a rather global oncogenic role of BMP pathway in pDMG gliomagenesis. The tumor suppressor activity of the BMP pathway had been largely extrapolated because of its positive impact on tumor cell quiescence[33]. Indeed, using a genetically engineered glioma model, we confirmed that BMP7 is sufficient to potentiate the entry of cells in a quiescent state in a H3.3K27M-dependent manner, via a transcriptomic switch largely relying on the downregulation of E2F-targets cell-cycle regulating genes. Nevertheless, this quiescent cellular phenotype could paradoxically constitute an aggressive treatment-resistant state, as previously observed in adult glioblastoma[57–59] and thus explaining its increase in response to treatment[33]. Along the same line, the impact of CHRDL1 increase in H3.3K27M tumors on BMP pathway inhibition may probably need to be qualified[33]. Indeed, if CHRDL1 was first classified as a member of the chordin family of secreted BMP antagonists due to sequence homology, it has

been shown that it exerts BMP-independent functions in synapses plasticity and maturation[39]. Moreover, this protein has also been described as an activator of the BMP pathway[40], suggesting that its high level of expression may not be a robust marker of BMP activation state.

However, it cannot be ruled out also that different ligands of the BMP pathway may have different impacts on the cellular phenotype induced by the H3.3K27M mutation. Accordingly, it was shown that BMP4 treatment promotes differentiation of DIPG tumor cells, in line with its putative tumor suppressor activity[33]. However, beyond quiescence, we observed that BMP activation by BMP2/7 in a H3.3K27M epigenetic context induces a transcriptomic switch rather conferring enhanced invasion potential to pDMG tumor cells. Because the level of BMP2/7 is particularly important i) in bulk, single-cell and spatial transcriptomic tumors, ii) in patient-derived cell models, and because the dynamics of BMP7 induction in the post-natal period coincide with the spatio-temporal window of pDMG onset, we believe that the role of the BMP2/7 couple is non-negligible in the pathogenesis of pDMG. Interestingly, this pair has already been shown to trigger BMP signaling as a heterodimer notably during embryogenesis, with a higher efficiency than the homodimers[60–62]. Keeping in mind that BMP2 appears to be dynamically regulated by tumor cells upon stress, these data suggest that activation of the BMP pathway may be finely regulated in pDMG to be maintained at a moderate, oncogenic level, without triggering the tumor-suppressive effects[33] or negative regulatory loops associated with its over-activation[42,63–65].

The next question is whether a therapeutic perspective can be defined by targeting the crosstalk between epigenetic modifications induced by the H3.3K27M mutation and transcriptomic reprogramming induced by BMP2/7. The BMP2/7-driven cell state that we described here fits with previous results obtained in other glioma models, in which a subpopulation of quiescent cells was identified as partially responsible of tumor invasiveness[57,66,67], a hallmark of pDMG aggressiveness[68]. Given the complexity of the phenotype induced by BMP/H3.3K27M crosstalk and the pleiotropic role of BMP proteins in central nervous system, the therapeutic strategy to be developed should be based on the targeting of the downstream effectors, such as ID1 as recently described[69], or TNC, which may be responsible for the invasive phenotype. Upcoming challenges will be to precisely define the identity of these pro-invasive BMP effectors, to set up a combinatorial therapeutic approach, simultaneously targeting the proliferative compartment and the BMP-responsive H3.3K27M invasive cell state.

Materials and methods

Gene expression analyses of publicly available transcriptomic datasets

Gene-Expression analyses of H3.3K27M-pDMG transcriptomic cohorts

For cohort 1[34], HTSeq gene counts and somatic vcf of St Jude's pDMG samples were downloaded from *https://platform.stjude.cloud/*. DESeq2 (v 1.36)[70] was used to normalise the data with the variant stabilisation transformation (vst)[71]. *ACVR1* mutation status was assessed using tabix[72] (v 1.15.1) to query the region of the *ACVR1* gene chr2:157,736,251-157,876,330 (hg38). Identified variants were manually curated. PROGENy (v 1.18.0)[35] was used to infer TGF-β/BMP pathway activity with the "top" parameter set to 100 (default value).

For cohort 2[1], gene expression (z-score) and tumor variants were downloaded on *https://pedcbioportal.kidsfirstdrc.org/* from the dataset "phgg_jones_meta_2017". Samples were filtered based on the following location: brainstem or midline, and the following histone mutation: WT, H3.1K27M and H3.3K27M. Only the 4 datasets with *ACVR1* mutant samples were kept for the analysis to avoid biases: "PMID:21931021|PMID:24705251", "PMID:21931021|PMID:22286216",

"PMID:22389665|PMID:24705252", "PMID:24705251". TGF-β/BMP pathway activity was also inferred using PROGENy, but the "top" parameter was set to 178 genes: as half of the top 100 genes of the PROGENy model for the TGF-β/BMP pathway are not covered in the cohort 2, we identified the top 100 genes with the highest absolute coefficient in PROGENy's model to compute pathway activity with the same number of genes in both cohorts.

For both cohorts, Principal Component Analysis (PCA) was performed using FactoMineR (v.2.4)[73] and plotted with factoextra (v1.0.7)[74].

Patterning of BMP expression in the developing brain

Spatio-temporal gene expression data of *BMP2*, *BMP4* and *BMP7* from human developing and adult brain samples were obtained from the Human Brain Transcriptome project (*hbatlas.org*)[49]. Heatmaps showing relative *BMP2*, *BMP4* and *BMP7* expression by *in situ* hybridisation (ISH) in murine brain across development were obtained from the ALLEN Developing Mouse Brain Atlas (*developingmouse.brain-map.org*)[47].

scRNA-seq analyses of H3.3K27M ACVR1 WT DMG

Using the scRNA-seq data published by [Jessa et al., 2022] (GSE210568)[29], we selected H3.3K27M-*ACVR1* WT pDMGs localized either in the pons or in the thalamus (10 samples). The same processing steps as the authors were performed except for the regression of mitochondrial proportion and the number of UMIs. Normalization was performed with the LogNormalize function of Seurat[75]. All samples were filtered to keep tumoral cells as identified by the authors. As a readout of BMP pathway activity, we used PROGENy to infer the TGF-β/BMP score. We then stratified cells into TGF-β-High and TGF-β-Low groups using the 95th quantile as cutoff. FindMarkers with default parameters was used to identify differentially expressed (DE) genes (FDR <= 0.05) in each group. Enrichment analyses were then conducted using the enrichR package[76] and the Gene Ontology Biological Process gene signatures[77], separately on DE genes upregulated in TGF-β-High and TGF-β-Low for each sample. Only the top 10 significant enrichments (FDR <= 0.05) are shown on the plots. Identification of DE BMP ligands and receptors was run with FindMarkers using a logfc.threshold of 0.15 (instead of the default 0.25). For the visualization of all samples on a shared UMAP, Harmony[78] (v 0.1.1) was used to integrate the 10 samples on the 50 principal components computed. The first 30 harmony-corrected principal components were then used to compute the SNN graph and UMAP.

RNA-sequencing of inhouse pDMG samples

As part as the Share4Kids program, a third cohort was constituted from leftovers DMG samples, obtained through biopsies performed at the Pediatric Hematology and Oncology Institute (iHOPE, Lyon) and the Hôpital Femme Mère Enfant (HFME, Lyon). Tissue banking and research were conducted according to national ethics guidelines, after obtaining the written informed consent of patients. This study was approved by the ethical review board of the BRC of the Centre Léon Bérard (n°BB-0033- 00050, N° 2020-02). This BRC quality is certified according to AFNOR NFS96900 (N° 2009/35884.2) and ISO 9001 (Certification N° 2013/56348.2). Biological material collection and retention activity are declared to the Ministry of Research (DC-2008-99 and AC-2019-3426). For RNA-seq library construction of cohort 3, total RNAs from tissues were isolated using the AllPrep® DNA/RNA FFPE kit (Qiagen, 80224) following manufacturer's instructions. Libraries were prepared with Illumina Stranded mRNA Prep (Illumina, 20040534) following recommendations. Quality was further assessed using the TapeStation 4200 automated electrophoresis system (Agilent) with High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent). All libraries were sequenced (2×100 bp) using Agilent SureSelect RNA XTHS2 All Exon V8 (Agilent, G9991A)according to the standard agilent protocol.

Quality control of reads was performed using FastQC (v.0.11.9)[79], followed by trimming of Illumina adapter sequences with Cutadapt[80] (v.3.4) using the -a CTGTCTCTTATACACATCT and -A CTGTCTCTTATACACATCT parameters. Reads were mapped to the GRCh38 human genome using "two-pass" mode STAR (v.2.7.9)[81], with Ensembl v104 annotations. Gene counts were then computed using HTseq-count (v.0.13.5)[82] with the following parameters: "--order pos" and "--stranded reverse". HTseq count files were then loaded in R (v 4.2.0) and two filtration steps were applied using the annotations of org.Hs.eg.db (v 3.15.0)[83]: genes with low counts (less than 10 reads across samples) were removed; non-protein-coding genes were removed. Filtered gene counts were converted into a DESeq2 object with the design parameter set to account for the tumor histone mutation (HGG/DIPG) and normalized with vst using "blind = FALSE". The R package ggplot2 (v 3.3.5)[84] was used to plot the expression of BMP ligands.

Spatial transcriptomics analyses

FFPE tissue sections were placed on Visium slides and prepared according to 10X Genomics protocols. After H&E staining, imaging and decrosslinking steps, tissue sections were incubated with human-specific probes targeting 17,943 genes (10X genomics, Visium Human Transcriptome Probe Set v.1.0). Probes hybridised on mRNA were captured on Visium slides and a gene expression library prepared following 10X genomics dedicated protocol and sequenced on Illumina NovaSeq 6000 targeting 50,000 reads per spot.

Raw reads were pre-processed using the spaceranger count pipeline (v 2.0.0) and the human GRCh38 reference provided by 10X Genomics. Filtered H5 matrices were loaded using the Load10X_Spatial function from Seurat. The following pipeline was applied to process raw counts: counts were normalized with the LogNormalise method and a scale factor of 10000; the top 4000 variable features ("nfeatures" parameter) were identified using the vst method; data were then scaled for all genes, the first 50 components of the PCA were computed using the 4000 variable features identified; SNN graph was constructed using the first 30 dimensions of the PCA (dims parameter); clusters were identified with the Louvain algorithm along several resolutions ranging from 0.1 to 1; UMAP was also computed using the first 30 dimensions of the PCA (dims parameter). Signatures identified by [Ren et al., 2023][55] and [Filbin et al., 2018][56] were used in conjunction with sc-type[85] to annotate the clusters at a resolution of 0.5. Annotated clusters were validated with an anatomopathologist, leading to the subclusterisation of the "Invasive niche" of HFME-1 into 2 new clusters ("Invasive_niche_1" and "Invasive_niche_2"). Scoring of Ren's signatures were made with the AddModuleScore function of Seurat. PROGENy was used to score TGF-β/BMP pathway activity. Markers of the "Invasive niche" were identified with the FindMarkers function using a logfc.threshold = 0.15.

Cell culture and treatments

Human pediatric low-grade glioma cell line Res259 (grade II, diffuse astrocytoma) and high-grade glioma cell line SF188 (grade IV, glioblastoma) were kindly provided by Dr Samuel Meignan. Both isogenic cell lines overexpressing H3.3 wild-type and H3.3K27M were generated as previously described by [Rakotomalala et al, 2021][50]. All cell lines were grown as a monolayer in DMEM medium with GlutaMAX-I, 4,5 g/L D-Glucose and 110 mg/L pyruvate (Gibco, 31966) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 1X MEM non-essential amino acid solution (Gibco, 11140050) and 1X Penicillin-Streptomycin (Gibco, 15140122). Cells were incubated in a humid atmosphere at 37 °C with 5% CO2.

To assess the impact of BMP7 treatment on wild-type or H3.3K27M-mutated Res259 or SF188 cell lines, 1.5×10^5 cells were plated into 6-well plates in complete medium. After 24 hr, cells were rinsed with PBS and fresh medium and serum-deprived in 1% FBS medium for 3 hours. 50 ng/mL of human recombinant BMP7 (Peprotech, 120-03P) was then directly added to the medium, and cells were harvested at indicated time points for further experiments.

For pDMG cell lines grown as spheroids, HSJD-DIPG-007, HSJD-DIPG-012, HSJD-DIPG-013 and HSJD-DIPG-014 were kindly provided by Dr Angel Montero-Carcaboso. pDMG cell lines were grown in complete culture medium as described by [Monje et al., 2011][86], in 96-well ULA plates (Corning, 7007) or 25cm² low attachment culture flasks (Corning, 431463). Medium was changed twice a week and spheroids were splitted every 1 to 2 weeks when reaching 800 to 1000 µm of diameter using TrypLE Express Enzyme (Thermo Fisher Scientific, 12605010) preheated to 37 °C. Hypoxia and ONC201 treatments were induced on HSJD-DIPG-012 spheroids once a diameter of 600 µm was reached. To induce hypoxia, HSJD-DIPG-012 spheres were incubated for 3 hr in a dedicated incubator at 37 °C, 1% O_2, while the controls were incubated at 37 °C in normoxia conditions. Spheroids were similarly treated or not with 20 µM of ONC201 (Selleckchem, S7963) for 96 hr. Exploration of BMP2 effect on HSJD-DIPG-012 and HSJD-DIPG-014 spheroids was done using 10 ng/mL of human recombinant BMP2 (Peprotech, 120-02C) before protein quantification by western blot.

All cultures were tested every month for mycoplasma using the MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza, LT07-318), in accordance with the manufacturer's instructions.

RNA-seq data processing and analyses of Res259 cells

For RNA-seq library construction, 1000 ng of total RNAs were isolated using the Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel, 740955) following manufacturer's instructions. Libraries were prepared with Illumina Stranded mRNA Prep (Illumina, 20040534) following recommendations. Quality was further assessed using the TapeStation 4200 automated electrophoresis system (Agilent) with High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent). All libraries were sequenced (2×75 bp) using NovaSeq 6000 (Illumina) according to the standard Illumina protocol.

Raw sequence quality was assessed using FastQC (0.11.9)[79]. The trimming step was omitted, as 5' and 3' read bases had a quality greater than Q30, and no adapter fragments were detected. Reads were then pseudo-aligned using Kallisto (0.46.2)[87] with Ensembl v96, human genome build GRCh38. The rest of the analyses were performed using R version (4.2.0). Differential expression (DE) analyses were conducted using the DESeq2 package (1.36.0)[70] using default parameters. Genes with corrected *p*- value (Benjamini–Hochberg) < 0.05 and |log2FoldChange (LFC)| > log2(1.5) were considered DE. EnrichR package (3.0)[76] was used for overrepresentation analysis using the following databases: Gene Ontology (GO) Biological Process 2021, GO Molecular Function 2021, GO Cellular Compartment 2021, KEGG 2021 Human, MSigDB Hallmarks 2020 and ChEA 2016. Enrichment significance was assessed by Fisher's exact test, and *p*-values were corrected with the Bonjamini-Hochberg method. Overrepresentation analyses were run separately on upregulated and downregulated DE genes. Principal Component Analysis (PCA) was performed using FactoMineR and plotted with factoextra. Boxplots and heatmaps were respectively made with ggplot2 and ComplexHeatmap (v 2.12.1)[88] using the vst normalized expression. TGF-β pathway activity was inferred with PROGENy using the first 100 genes of the model (top=100).

qRT-PCR profiling

Total RNA was extracted using Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel, 740955) or RNeasy Plus Micro (Qiagen, 74034) following manufacturer's instructions. 500 to 1000 ng was reverse transcribed using the iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, 1708891) according to the manufacturer's instructions. Expression of *BMP2* [forward primer (5'-TGCGGTCTCCTAAAGGTCG-3') and reverse primer (5'- GAATTCAGAAGCCTGCAAGG-3')], *BMP7* [forward primer (5'-GGGTGGGTCTCTGTTTCAG-3') and reverse primer (5'-CCTGGAGCACCTGATAAACG-3')], *ID1* [forward primer (5'-GGTGCGCTGTCTGTCTGAG-3') and reverse primer (5'-TGTCGTAGAGCAGCACGTTT-3')] and *ID2* [forward primer (5'- CCCAGAACAAGAAGGTGAGC-3') and reverse primer (5'-GAATTCAGAAGCCTGCAAGG-3')], were assessed by real-time quantitative QRT-PCR on a LightCycler® 480 instrument (Roche) using the LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche,

04707516001), according to the manufacturer's instructions. *HPRT1* [forward primer (5'-AAGAGCTATTGTAATGACCAGT-3') and reverse primer (5'- CAAAGTCTGCATTGTTTTGC-3')] expression was used as a housekeeping gene.

The expression of a panel of 84 genes of the TGF-β/BMP signaling pathway was assessed in HSJD-DIPG- 007, HSJD-DIPG-012 and HSJD-DIPG-014 cell lines by real-time quantitative QRT-PCR on a LightCycler® 480 instrument (Roche) using a RT² Profiler PCR Array (Qiagen, 330231), according to the manufacturer's instructions. RNA were extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen, 74104) and 500 ng of RNA were reverse transcribed using the RT2 First Strand Kit (Qiagen, 330401) according to the manufacturer's instructions.

Western Blot

Cells were lysed in RIPA Buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, IGEPAL 1%, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, 78440). Protein contents were estimated using the Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Fischer Scientific, 23225). Samples were diluted with distilled water to achieve equal concentrations and a loading buffer (4x Laemmli Sample Buffer, Biorad, 1610747) containing 100 mM DTT (Sigma-Aldrich, 11583786001) was added. Protein extracts were then analysed by immunoblot. Briefly, proteins were loaded into SDS-polyacrylamide gels for electrophoresis (Mini Protean TGX gels, Biorad, 4561034) and blotted onto polyvinylidene fluoride sheets (Trans-Blot Turbo Transfer PVDF pack, Biorad, 1704156) using the TransBlot technology (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% BSA in TBS for 1 hr and then incubated overnight at 4° C with anti-pSMAD1/5/8 (1:1000, Cell Signaling Technology, 13820), anti-SMAD1 (1:1000, Cell Signaling Technology, 6944), anti-SMAD1/5/8 (1:1000, Abcam, ab80255), anti-pRb (1:500, Abcam, ab47763), and anti-Rb (1:1000, Cell Signaling Technology, 9309). After three washes with TBS-Tween 0.1%, membranes were incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody (1:20.000, Jackson ImmunoResearch). HRP-conjugated β-Actin antibody (1:25.000, Sigma-Aldrich A3854) and HRP-conjugated GAPDH antibody (1:2000 Cell Signaling Technology, 8884), used as loading controls, were incubated for 1 h at room temperature. After three washes with TBS-Tween 0.1%, detection was performed using the Amersham ECL Prime Detection Reagent (Cytiva, RPN2232). Membranes were imaged on the ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad).

Proliferation and cell cycle characterisation assays

For proliferation assay, 5×10^4 Res259 or 7.5×10^4 SF188 cells were plated into 6-well plates in complete medium. After 72 hr of BMP7 treatment, total cell number and viability were quantified by image cytometry on a NucleoCounter NC-3000 (Chemometec) according to the procedure provided by the manufacturer, using a co-staining of Acridine Orange and DAPI (Chemometec, 910-3013).

For cell cycle analyses, 3×10^5 Res259 or SF188 cells were plated into 10 cm-petri dishes in complete medium. After 24 hr of BMP7 treatment, 10 µM EdU was added for 1.5 hr. Cells were then harvested using Trypsin (Gibco, 25300054) and washed twice with PBS. Click-it reactions were performed using the Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 647 Flow Cytometry Kit (Invitrogen, C10634), according to the manufacturer's instructions. Cells were counterstained with DAPI and analysed on a BD FACSAria Fusion flow cytometer (BD Biosciences). Data analysis was performed with FlowJo v10.7.1 Software (BD Biosciences). Cells were identified on a Side Scatter (SSC) vs Forward Scatter (FSC) dot plot and cell debris and aggregates were excluded from analysis based on FSC signals.

For β-galactosidase activity determination, 5×10^3 Res259 cells were plated into 12-well plates in complete medium. After 72 h of BMP7 treatment, cells were fixed for 5 min in 0.5% glutaraldehyde, rinsed twice with PBS, and incubated for 48 hr at 37 °C in senescence-associated

beta-galactosidase (SA-β-Gal) staining solution as previously described[89]. SA-β-Gal+ cells were counted manually, and total number of cells were counted using a DAPI-counterstaining and using the Fiji software[90].

Invasion assays

For 2D pediatric glioma cell lines (Res259 and SF188), 8.0 µm-Boyden chambers (Falcon, 353097) were coated with 100µL of 10% Geltrex™ LDEV-Free, hESC-Qualified, Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (Gibco, A1413301) completed or not with 50 ng/mL human recombinant BMP7. During the 3 days preceding the experiment, Res259 WT or K27M cells were pre-conditioned or not with 50 ng/mL human recombinant BMP7. 2.5×10^4 cells were plated over Geltrex™ in 400 µL 1% FBS-DMEM completed or not with 50 ng/mL human recombinant BMP7. Boyden chambers were deposited in 24-well plates filled with 700 µL of 10% FBS-DMEM. After 48 hr, Boyden chambers were washed with PBS, incubated for 20 minutes with methanol to fix the cells and Crystal violet 0,1% (Sigma-Aldrich, V5265) was used to color cells allowing counting. Pictures of the chambers were taken using an EVOS-7000 (Invitrogen) and analyzed using the Fiji software.

For pDMG cell lines grown as spheroids, HSJD-DIPG-012 were plated in 10% Matrigel (Corning, 354277) in Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide (Thermo Fisher Scientific, 177402). Media and matrigel were supplemented with either 10 ng/mL human recombinant BMP2 or 1 µM LDN-193189 (Selleckchem, S2618). Invasiveness was measured at 48 hr after seeding. Images were captured using an EVOS-7000 (Invitrogen) and analyzed using the 'ROI' feature in the Fiji software.

Spheroids growth monitoring

To assess the effects of BMP2 on pDMG spheroids, 1×10^4 cells of HSJD-DIPG-012 or HSJD-DIPG-014 were seeded in 96-well plates (Corning, 7007). Cells were treated at seeding with concentrations of 1, 5, 20, 50 or 200 ng/mL of human recombinant BMP2 (Peprotech, 120-02C). Media were renewed twice a week, with or without recombinant BMP2. Cell growth was monitored using an EVOS-7000 (Invitrogen) and pictures of control and treated 6-days or 9-days spheres were used to calculate sphere area of HSJD-DIPG-014 and HSJD-DIPG-012, respectively.

Immunohistochemistry

HSJD-DIPG-012 spheroids were treated when reaching a diameter of 600 µm either with 200 ng/mL of human recombinant BMP2 or with 1 µM of LDN-193189. Spheroids were then fixed in 4% PFA for 1 h at room temperature, dehydrated and embedded in paraffin. 8 µm-sections were then deparaffinized, rehydrated, and heated in a citrate buffer (0.01 M; pH 6.0) for 15 min. Sections were then incubated overnight at 4 °C with appropriate dilution of anti-Ki67 (1:100, Dako, M7240) in TBS containing Horse Serum (2%). After several washes in TBS-Tween 0.05 %, sections were incubated with the secondary antibody for 1 hr, and then washed again in TBS-Tween 0.05 %. Color was developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories, SK-4100) incubation for 1 to 3 min and with Hematoxylin (Vector Laboratories, H-3401) incubation for 3 min. Images were captured using an EVOS-7000 (Invitrogen) and quantification of Ki67-positive cells was assessed using the "Cell Positive Detection" QuPath function[91], with parameters: "Optical density sum", "thresholdCompartment": "Cell: DAB OD mean", "thresholdPositive2": 0.25.

Statistical analyses

Data are represented as means ± std. Sample size and replicates are stated in the corresponding figure legends. Using GraphPad Prism 9 software and R (4.2.0), the statistical significance between two groups were determined by one-tailed Wilcoxon signed-rank tests, apart from the proportion of Ki67 stained cells, which was assessed using Fisher's exact Test. The following symbols used to denote (<0.05: *; <0.01: **; <0.001: ***; <0.0001: ****).

Data availability

Raw bulk RNA-seq and Visium data generated in this study will be available *via* GEO. RNA-seq data of pDMG samples from cohort 1 were obtained from St. Jude Cloud[46]. (*https://www.stjude.cloud*). Cohort 2 of glioma samples[1] can be accessed on *https://pedcbioportal.kidsfirstdrc.org/* with the following dataset id: "phgg_jones_meta_2017". The scRNA-seq cohort of H3.3K27M ACVR1 WT pDMGs is available on GEO (GSE210568) and *https://zenodo.org/record/6929428*.

Code availability

All data analyses' codes will be made available without restriction upon request.

Author contributions

Study concept and design were performed by P.H., S.Meyer., C.B., M.H., V.R., E.C., and M.C.. Acquisition of data was performed by P.H., S.Meyer., C.B., M.H., A.B.C., A.R., L.M., J.T., N.L., P.Lewandowski., M.C.B, L.B., A.D., I.R., J.Y.B., C.D., V.A., A.M.C., M.L.G., E.P., A.V., P.G.H., S.Meignan, P.Leblond., V.R., E.C., M.C.. Analysis and interpretation of data were performed by P.H., S.Meyer., C.B., M.H., A.B.C., V.R., E.C., M.C.. Drafting of the manuscript was performed by P.H. and M.C.. Writing of the manuscript was performed by P.H., S.Meyer., C.B., M.H and M.C.. Critical revisions of the manuscript for important intellectual content was performed by P.H., S.Meyer., C.B., M.H, A.B.C., V.R., E.C., and M.C.. M.C. obtained funding. V.R., E.C. and M.C. co-supervised the study.

Ethics declarations

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Acknowledgements

We thank the patients and their families who consent to participate in this study, as well as charities that support this work, including the Ligue Nationale contre le Cancer, and the Ligue Départementale contre le Cancer de Haute-Savoie et de l'Ain. Our warmest thanks go to Augustine and its Wonder team ("Wonder Augustine" charity) that support this work since the initiation, to Léonie ("Au Pays de Léonie") and to "Les Etoiles Filantes", which has funded all the omics analyses. We also thank clinical teams from IHOPe and HFME for their support and contributions, as well as all the facilities from the CLB and CRCL. We are grateful to Séverine Tabone-Eglinger, Loïc Sebileau and Anne-Sophie Bonne for their help with the management of regulatory procedures. P.H. and M.H. received financial support from the Dev2Can LabEx and ITMO Cancer of Aviesan, respectively. C.B. received financial support from the University Claude Bernard Lyon 1 in the framework of the "Etoiles 2022" call for projects. S.Meyer. is supported by a private donation from T. family. The Share4Kids project is supported by INCa and "Enfants Cancers Santé" foundation.

References

1. Mackay A., et al. (2017) **Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma** *Cancer Cell* **32**:520–537

2. Di Ruscio V., et al. (2022) **Pediatric Diffuse Midline Gliomas: An Unfinished Puzzle** *Diagn. Basel Switz* **12**

3. Sulman E. P., Eisenstat D. D. (2021) **World Cancer Day 2021 - Perspectives in Pediatric and Adult Neuro-Oncology** *Front. Oncol* **11**

4. Khuong-Quang D.-A., et al. (2012) **K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas** *Acta Neuropathol. (Berl* **124**:439–447

5. Hoffman L. M., et al. (2018) **Clinical, Radiologic, Pathologic, and Molecular Characteristics of Long-Term Survivors of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG): A Collaborative Report From the International and European Society for Pediatric Oncology DIPG Registries** *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol* **36**:1963–1972

6. Sethi R., et al. (2011) **Prospective neuraxis MRI surveillance reveals a high risk of leptomeningeal dissemination in diffuse intrinsic pontine glioma** *J. Neurooncol* **102**:121–127

7. Vitanza N. A., Monje M (2019) **Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: From Diagnosis to Next-Generation Clinical Trials** *Curr. Treat. Options Neurol* **21**

8. Jackson E. R., et al. (2023) **ONC201 in combination with paxalisib for the treatment of H3K27-altered diffuse midline glioma** *Cancer Res. CAN* :23–186 https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-23-0186

9. Schwartzentruber J., et al. (2012) **Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma** *Nature* **482**:226–231

10. Sturm D., et al. (2012) **Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma** *Cancer Cell* **22**:425–437

11. Wu G., et al. (2012) **Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas** *Nat. Genet* **44**:251–253

12. Bender S., et al. (2013) **Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas** *Cancer Cell* **24**:660–672

13. Chan K.-M., et al. (2013) **The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression** *Genes Dev* **27**:985–990

14. Lewis P. W., et al. (2013) **Inhibition of PRC2 Activity by a Gain-of-Function H3 Mutation Found in Pediatric Glioblastoma** *Science* **340**:857–861

15. Piunti A., et al. (2017) **Therapeutic targeting of polycomb and BET bromodomain proteins in diffuse intrinsic pontine gliomas** *Nat. Med* **23**:493–500

16. Stafford J. M., et al. (2018) **Multiple modes of PRC2 inhibition elicit global chromatin alterations in H3K27M pediatric glioma** *Sci. Adv* **4**

17. Harutyunyan A. S., et al. (2019) **H3K27M induces defective chromatin spread of PRC2-mediated repressive H3K27me2/me3 and is essential for glioma tumorigenesis** *Nat. Commun* **10**

18. Nagaraja S., et al. (2019) **Histone Variant and Cell Context Determine H3K27M Reprogramming of the Enhancer Landscape and Oncogenic State** *Mol. Cell* **76**:965–980

19. Huchedé P., Leblond P., Castets M (2022) **The Intricate Epigenetic and Transcriptional Alterations in Pediatric High-Grade Gliomas: Targeting the Crosstalk as the Oncogenic Achilles' Heel** *Biomedicines* **10**

20. Buczkowicz P., et al. (2014) **Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations** *Nat. Genet* **46**:451–456

21. Fontebasso A. M., et al. (2014) **Recurrent somatic mutations in ACVR1 in pediatric midline high-grade astrocytoma** *Nat. Genet* **46**:462–466

22. Taylor K. R., et al. (2014) **Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma** *Nat. Genet* **46**:457–461

23. Wu G., et al. (2014) **The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma** *Nat. Genet* **46**:444–450

24. Carvalho D., et al. (2019) **ALK2 inhibitors display beneficial effects in preclinical models of ACVR1 mutant diffuse intrinsic pontine glioma. Commun** *Biol* **2**

25. Fortin J., et al. (2020) **Mutant ACVR1 Arrests Glial Cell Differentiation to Drive Tumorigenesis in Pediatric Gliomas** *Cancer Cell* **37**:308–323

26. Haupt J., Xu M., Shore E. M (2018) **Variable signaling activity by FOP ACVR1 mutations** *Bone* **109**:232–240

27. Hoeman C. M., et al. (2019) **ACVR1 R206H cooperates with H3.1K27M in promoting diffuse intrinsic pontine glioma pathogenesis** *Nat. Commun* **10**

28. Ramachandran A., et al. (2021) **Pathogenic ACVR1R206H activation by Activin A-induced receptor clustering and autophosphorylation** *EMBO J* **40**

29. Jessa S., et al. (2022) **K27M in canonical and noncanonical H3 variants occurs in distinct oligodendroglial cell lineages in brain midline gliomas** *Nat. Genet* **54**:1865–1880

30. Mucha B. E., Hashiguchi M., Zinski J., Shore E. M., Mullins M. C (2018) **Variant BMP receptor mutations causing fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) in humans show BMP ligand-independent receptor activation in zebrafish** *Bone* **109**:225–231

31. Hatsell S. J., et al. (2015) **ACVR1R206H receptor mutation causes fibrodysplasia ossificans progressiva by imparting responsiveness to activin A** *Sci. Transl. Med* **7**

32. Hino K., et al. (2015) **Neofunction of ACVR1 in fibrodysplasia ossificans progressiva** *Proc. Natl. Acad. Sci* **112**:15438–15443

33. Sun Y., et al. (2022) **Context-dependent tumor-suppressive BMP signaling in diffuse intrinsic pontine glioma regulates stemness through epigenetic regulation of CXXC5. Nat** *Cancer* **3**:1105–1122

34. McLeod C., et al. (2021) **Jude Cloud: A Pediatric Cancer Genomic Data-Sharing Ecosystem** *Cancer Discov* **11**:1082–1099

35. Schubert M., et al. (2018) **Perturbation-response genes reveal signaling footprints in cancer gene expression** *Nat. Commun* **9**

36. Nakayama N., et al. (2001) **A Novel Chordin-like Protein Inhibitor for Bone Morphogenetic Proteins Expressed Preferentially in Mesenchymal Cell Lineages** *Dev. Biol* **232**:372–387

37. Sakuta H., et al. (2001) **Ventroptin: a BMP-4 antagonist expressed in a double-gradient pattern in the retina** *Science* **293**:111–115

38. Larman B. W., Karolak M. J., Adams D. C., Oxburgh L (2009) **Chordin-like 1 and twisted gastrulation 1 regulate BMP signaling following kidney injury** *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **20**:1020–1031

39. Blanco-Suarez E., Liu T.-F., Kopelevich A., Allen N. J (2018) **Astrocyte-Secreted Chordin-like 1 Drives Synapse Maturation and Limits Plasticity by Increasing Synaptic GluA2 AMPA Receptors** *Neuron* **100**:1116–1132

40. Lin J., et al. (2005) **Kielin/chordin-like protein, a novel enhancer of BMP signaling, attenuates renal fibrotic disease** *Nat. Med* **11**:387–393

41. Kozmikova I., Candiani S., Fabian P., Gurska D., Kozmik Z (2013) **Essential role of Bmp signaling and its positive feedback loop in the early cell fate evolution of chordates** *Dev. Biol* **382**:538–554

42. Christiaen L., Stolfi A., Levine M (2010) **BMP signaling coordinates gene expression and cell migration during precardiac mesoderm development** *Dev. Biol* **340**:179–187

43. Liem K. F., Tremml G., Roelink H., Jessell T. M (1995) **Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm** *Cell* **82**:969–979

44. Wilson S. I., Graziano E., Harland R., Jessell T. M., Edlund T (2000) **An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo** *Curr. Biol* **10**:421–429

45. Hawley S. H., et al. (1995) **Disruption of BMP signals in embryonic Xenopus ectoderm leads to direct neural induction** *Genes Dev* **9**:2923–2935

46. Wilson P. A., Hemmati-Brivanlou A (1995) **Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4** *Nature* **376**:331–333

47. Lein E. S., et al. (2007) **Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain** *Nature* **445**:168–176

48. Burford A. (2021) **Of Mice And Men: Translating Mouse Age To Human Age**

49. Kang H. J., et al. (2011) **Spatio-temporal transcriptome of the human brain** *Nature* **478**:483–489

50. Rakotomalala A., et al. (2021) **H3.3K27M Mutation Controls Cell Growth and Resistance to Therapies in Pediatric Glioma Cell Lines** *Cancers* **13**

51. Tseng W.-P., Yang S.-N., Lai C.-H., Tang C.-H (2010) **Hypoxia induces BMP-2 expression via ILK, Akt, mTOR, and HIF-1 pathways in osteoblasts** *J. Cell. Physiol* **223**:810–818

52. Sánchez-de-Diego C., Valer J. A., Pimenta-Lopes C., Rosa J. L., Ventura F (2019) **Interplay between BMPs and Reactive Oxygen Species in Cell Signaling and Pathology** *Biomolecules* **9**

53. Przystal J. M., et al. (2022) **Imipridones affect tumor bioenergetics and promote cell lineage differentiation in diffuse midline gliomas** *Neuro-Oncol* **24**:1438–1451

54. Wu J.-C., et al. (2023) **ONC201 Suppresses Neuroblastoma Growth by Interrupting Mitochondrial Function and Reactivating Nuclear ATRX Expression While Decreasing MYCN** *Int. J. Mol. Sci* **24**

55. Ren Y., et al. (2023) **Spatial transcriptomics reveals niche-specific enrichment and vulnerabilities of radial glial stem-like cells in malignant gliomas** *Nat. Commun* **14**

56. Filbin M. G., et al. (2018) **Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq** *Science* **360**:331–335

57. Atkins R. J., et al. (2019) **Cell quiescence correlates with enhanced glioblastoma cell invasion and cytotoxic resistance** *Exp. Cell Res* **374**:353–364

58. Chen J., et al. (2012) **A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy** *Nature* **488**:522–526

59. Xie X. P., et al. (2022) **Quiescent human glioblastoma cancer stem cells drive tumor initiation, expansion, and recurrence following chemotherapy** *Dev. Cell* **57**:32–46

60. Kim H.-S., Neugebauer J., McKnite A., Tilak A., Christian J. L (2019) **BMP7 functions predominantly as a heterodimer with BMP2 or BMP4 during mammalian embryogenesis** *eLife* **8**

61. Schmid B., et al. (2000) **Equivalent genetic roles for bmp7/snailhouse and bmp2b/swirl in dorsoventral pattern formation** *Dev. Camb. Engl* **127**:957–967

62. Tajer B., Dutko J. A., Little S. C., Mullins M. C (2021) **BMP heterodimers signal via distinct type I receptor class functions** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **118**

63. Afrakhte M., et al. (1998) **Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members** *Biochem. Biophys. Res. Commun* **249**:505–511

64. Akizu N., Estarás C., Guerrero L., Martí E., Martínez-Balbás M. A (2010) **H3K27me3 regulates BMP activity in developing spinal cord** *Development* **137**:2915–2925

65. Bénazet J.-D., et al. (2009) **A self-regulatory system of interlinked signaling feedback loops controls mouse limb patterning** *Science* **323**:1050–1053

66. Antonica F., et al. (2022) **A slow-cycling/quiescent cells subpopulation is involved in glioma invasiveness** *Nat. Commun* **13**

67. Furst L., et al. (2022) **Identification and isolation of slow-cycling glioma stem cells** *Methods Cell Biol* **170**:21–30

68. Kluiver T. A., Alieva M., van Vuurden D. G., Wehrens E. J., Rios A. C (2020) **Invaders Exposed: Understanding and Targeting Tumor Cell Invasion in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma** *Front. Oncol* **10**

69. Messinger D., et al. (2023) **Therapeutic targeting of prenatal pontine ID1 signaling in diffuse midline glioma** *Neuro-Oncol* **25**:54–67

70. Love M. I., Huber W., Anders S (2014) **Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2** *Genome Biol* **15**

71. Anders S., Huber W (2010) **Differential expression analysis for sequence count data** *Genome Biol* **11**

72. Li H (2011) **Tabix: fast retrieval of sequence features from generic TAB-delimited files** *Bioinformatics* **27**:718–719

73. Lê S., Josse J., Husson F (2008) **FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis** *J. Stat. Softw* **25**:1–18

74. Kassambara A., Mundt F (2017) **Package 'factoextra'** *Extr. Vis. Results Multivar. Data Anal* **76**

75. Hao Y., et al. (2021) **Integrated analysis of multimodal single-cell data** *Cell* **184**:3573–3587

76. Kuleshov M. V., et al. (2016) **Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update** *Nucleic Acids Res* **44**:W90–W97

77. Ashburner M., et al. (2000) **Gene Ontology: tool for the unification of biology** *Nat. Genet* **25**:25–29

78. Korsunsky I., et al. (2019) **Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony** *Nat. Methods* **16**:1289–1296

79. Andrews S. (2010) **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**

80. Martin M (2011) **Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads** *EMBnet.journal* **17**:10–12

81. Dobin A., et al. (2013) **STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner** *Bioinformatics* **29**:15–21

82. Anders S., Pyl P. T., Huber W (2014) **Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq – A Python framework to work with high-throughput sequencing data. 002824 Preprint at 10.1101/002824 (2014).** *HTSeq – A Python framework to work with high-throughput sequencing data* **2824** https://doi.org/10.1101/002824

83. Carlson M., Falcon S., Pages H., Li N. (2019) **org. Hs. eg. db: Genome wide annotation for Human** *R Package Version* **3**

84. Villanueva R. A. M., Chen Z. J (2019) **ggplot2: elegant graphics for data analysis** *Taylor & Francis*

85. Ianevski A., Giri A. K., Aittokallio T (2022) **Fully-automated and ultra-fast cell-type identification using specific marker combinations from single-cell transcriptomic data** *Nat. Commun* **13**

86. Monje M., et al. (2011) **Hedgehog-responsive candidate cell of origin for diffuse intrinsic pontine glioma** *Proc. Natl. Acad. Sci* **108**:4453–4458

87. Bray N. L., Pimentel H., Melsted P., Pachter L (2016) **Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification** *Nat. Biotechnol* **34**:525–527

88. Gu Z., Eils R., Schlesner M (2016) **Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data** *Bioinformatics* **32**:2847–2849

89. Debacq-Chainiaux F., Erusalimsky J. D., Campisi J., Toussaint O (2009) **Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo** *Nat. Protoc* **4**:1798–1806

90. Schindelin J., et al. (2012) **Fiji: an open-source platform for biological-image analysis** *Nat. Methods* **9**:676–682

91. Bankhead P., et al. (2017) **QuPath: Open source software for digital pathology image analysis** *Sci. Rep* **7**

Article and author information

Paul Huchedé
Childhood Cancer & Cell Death (C3) team, LabEx DEVweCAN, Institut Convergence Plascan, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France

Swann Meyer
Childhood Cancer & Cell Death (C3) team, LabEx DEVweCAN, Institut Convergence Plascan, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France

Clément Berthelot
Childhood Cancer & Cell Death (C3) team, LabEx DEVweCAN, Institut Convergence Plascan, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France

Maud Hamadou
Childhood Cancer & Cell Death (C3) team, LabEx DEVweCAN, Institut Convergence Plascan, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France

Adrien Bertrand-Chapel
Childhood Cancer & Cell Death (C3) team, LabEx DEVweCAN, Institut Convergence Plascan, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France

Andria Rakotomalala
University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277-CANTHER Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, Centre Oscar Lambret, F-59000 Lille, France

Line Manceau
Université Paris Cité, CNRS, Institut Jacques Monod, F-75013 Paris, France

Julia Tomine
Childhood Cancer & Cell Death (C3) team, LabEx DEVweCAN, Institut Convergence Plascan, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France

Nicolas Lespinasse
Childhood Cancer & Cell Death (C3) team, LabEx DEVweCAN, Institut Convergence Plascan, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France

Paul Lewandowski
University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277-CANTHER Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, Centre Oscar Lambret, F-59000 Lille, France

Martine Cordier-Bussat
Childhood Cancer & Cell Death (C3) team, LabEx DEVweCAN, Institut Convergence Plascan, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France

Laura Broutier
Childhood Cancer & Cell Death (C3) team, LabEx DEVweCAN, Institut Convergence Plascan, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France

Aurélie Dutour
Childhood Cancer & Cell Death (C3) team, LabEx DEVweCAN, Institut Convergence Plascan, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France

Isabelle Rochet
Multisite Institute of Pathology, Groupement Hospitalier Est du CHU de Lyon, Hôpital Femme-Mère-Enfant, 69677 Bron, France

Jean-Yves Blay
Childhood Cancer & Cell Death (C3) team, LabEx DEVweCAN, Institut Convergence Plascan, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France
ORCID iD: 0000-0001-7190-120X

Cyril Degletagne
Platform of Cancer Genomics, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France

Valéry Attignon
Platform of Cancer Genomics, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France

Angel Montero-Carcaboso
Preclinical Therapeutics and Drug Delivery Research Program, Department of Oncology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

Marion Le Grand
Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Université Aix-Marseille, Institut Paoli-Calmettes, Centre de Lutte Contre le Cancer de la région PACA, INSERM 1068, CNRS 7258, 13009 Marseille, France

Eddy Pasquier
Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Université Aix-Marseille, Institut Paoli-Calmettes, Centre de Lutte Contre le Cancer de la région PACA, INSERM 1068, CNRS 7258, 13009 Marseille, France

Alexandre Vasiljevic
Multisite Institute of Pathology, Groupement Hospitalier Est du CHU de Lyon, Hôpital Femme-Mère-Enfant, 69677 Bron, France

Pascale Gilardi-Hebenstreit
Université Paris Cité, CNRS, Institut Jacques Monod, F-75013 Paris, France

Samuel Meignan
University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277-CANTHER Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, Centre Oscar Lambret, F-59000 Lille, France

Pierre Leblond
Childhood Cancer & Cell Death (C3) team, LabEx DEVweCAN, Institut Convergence Plascan, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France, Department of Pediatric Oncology, Institute of Pediatric Hematology and Oncology (IHOPe), Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France

Vanessa Ribes
Université Paris Cité, CNRS, Institut Jacques Monod, F-75013 Paris, France
For correspondence: marie.castets@lyon.unicancer.fr
ORCID iD: 0000-0001-7016-9192

Erika Cosset
GLIMMER Of lIght (GLIoblastoma MetabolisM, HetERogeneity, and OrganoIds) team, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France
For correspondence: marie.castets@lyon.unicancer.fr

Marie Castets
Childhood Cancer & Cell Death (C3) team, LabEx DEVweCAN, Institut Convergence Plascan, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, F-69008 Lyon, France
For correspondence: marie.castets@lyon.unicancer.fr

Copyright

© 2023, Huchedé et al.

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Editors

Reviewing Editor
Lynne-Marie Postovit
Queens University, Canada

Senior Editor
Erica Golemis
Fox Chase Cancer Center, United States of America

Reviewer #1 (Public Review):

Summary:
Mutational analysis of diffuse midline glioma (DMG) found that ACVR1 mutations, which up-regulate the BMP signaling pathway are found in most H3.1K27M, but not H3.3K27M DMG cases. In this manuscript, Huchede et al attempted to determine whether the BMP signaling pathway has any role in H3.3K27M DMG tumors. They found that the BMP signaling is activated to a similar level in H3.3K27M DMG cells with wild-type ACVR1 compared to ACVR1 DMG cells, likely due to the expression of BMP7 or BMP2. They went on to test whether cells treated with BMP7 or BMP2 treatments affected the gene expression and cell fitness of tumor cells with H3.3K27M mutation. They concluded that BMP2/7 synergizes with H3.3K27M to induce a transcriptomic rewiring associated with a quiescent but invasive cell state. The major issue for this conclusion is that the authors did not use the right models/controls to obtain results to support this conclusion as detailed below. Therefore, in order to strengthen the conclusion, the authors need to address the major concerns below.

Strength:
This paper addresses an important question in the DMG field.

Major concerns/weakness:

1. All the results in Fig. 2 utilized two glioma lines SF188 and Res259. The authors should repeat all these experiments in a couple of H3.3K27M DMG lines by deleting the H3.3K27M mutation first.
2. Fig. 3. The experiments of BMP2 treatment should be repeated in other H3.3K27M DMG lines using H3.1K27M ACVR1 mutant tumor lines as controls.

Minor concerns
Fig.2A. BMP2 expression increased in H3.3K27M SF188 cells. Therefore, the statement "whereas BMP2 and BMP4 expressions are not significantly modified (Figure 2A and Figure 2-figure supplement A-B)" is not accurate.

Reviewer #2 (Public Review):

The manuscript by Huchede et al investigates the BMP pathway in H3K27M-mutant gliomas carrying or not activating mutations in ALK2 (ACVR1). Their results in cell lines and in datasets acquired from the literature on patient tumors indicate that the BMP signaling

pathway is activated at similar levels between ACVR1 wild-type and mutant tumors. The group further identifies BMP2 and BMP7 as possibly the main activators of the pathway in cells. They then show that BMP2 and 7 crosstalk with the H3 mutation and synergize to induce transcriptomic rewiring leading to an invasive cell state.

The paper is well-written and easy to follow with a robust experimental plan and datasets supporting the claims. While previous work (acknowledged by the authors) indicated activation of BMP in H3K27M tumors, wild type for the ACVR1 mutation this paper is a nice addition and provides further mechanistic cues as to the importance of the BMP pathway and specific members in these deadly brain cancers. The effect of these BMPs in quiescence and invasion is of particular interest.

A few suggestions to clarify the message are provided below
1- In thalamic diffuse midline gliomas, the BMP pathway should not be activated as it is in the pons. The authors should identify thalamic tumors in the datasets they explored and patients-derived cell lines from thalamic tumors available to investigate whether this pathway is active across all H3.3K27M mutants in the brain midline or specifically in tumors from the pons.

2- There are ~20% H3.3K27M tumors that carry an ACVR1 mutation and similar numbers of H3.1K27M that are wild type for this gene. Can the authors identify these outliers in their datasets and assess the activation of BMP2 and 7 or other BMP pathway members in this context?

In all this is an interesting paper that provides meaningful data to pursue clinical targeting of the BMP pathway, which would be a nice addition to the field.

Author Response:

> ***Reviewer #1 (Public Review):***
>
> *[...] Major concerns/weakness:*
>
> 1. *All the results in Fig. 2 utilized two glioma lines SF188 and Res259. The authors should repeat all these experiments in a couple of H3.3K27M DMG lines by deleting the H3.3K27M mutation first.*

We thank the referee for his/her comments that will help us to strengthen our conclusions.

The reviewer's proposal is interesting, but this approach to deletion of the K27M mutation rather answers the question of the role of the BMP pathway in maintaining the phenotype of DMG cells. Our aim in the first part of this article (with Res and SF188) is rather to study how the BMP pathway can participate in installing a particular cellular state at the time of expression of the K27M mutation. In other words, the underlying idea is to define the phenotypic changes specifically associated with activation of the BMP pathway when epigenetic modifications are induced by expression of the K27M mutation. We have chosen the SF188 and Res259 models to remain in a glial context, but it would indeed be interesting to test the effect of this synergy in other models, closer to the cells of origin of DMG. In any case, these models should make it possible to answer the question of the cellular state transition at the moment of K27M expression, even if the reciprocal question of the reversibility of this state proposed by the reviewer is also of interest for understanding the oncogenic synergy between BMP/K27M.

> 1. *Fig. 3. The experiments of BMP2 treatment should be repeated in other H3.3K27M DMG lines using H3.1K27M ACVR1 mutant tumor lines as controls.*

We will provide the results of these experiments in a revised version. The use of mutant ACVR1 lines is interesting, but their control status seems questionable, as the addition of BMPs could have a cumulative effect on the effect of the mutation, notably by activating other receptors in the pathway.

> *Minor concerns:*
>
> *Fig.2A. BMP2 expression increased in H3.3K27M SF188 cells. Therefore, the statement "whereas BMP2 and BMP4 expressions are not significantly modified (Figure 2A and Figure 2-figure supplement A-B)" is not accurate.*

The referee is absolutely right and we will correct this statement in the revised version.

> ***Reviewer #2 (Public Review):***
>
> *[...] The paper is well-written and easy to follow with a robust experimental plan and datasets supporting the claims. While previous work (acknowledged by the authors) indicated activation of BMP in H3K27M tumors, wild type for the ACVR1 mutation this paper is a nice addition and provides further mechanistic cues as to the importance of the BMP pathway and specific members in these deadly brain cancers. The effect of these BMPs in quiescence and invasion is of particular interest.*

We thank the referee for his/her supportive comments.

> *A few suggestions to clarify the message are provided below:*
>
> *1- In thalamic diffuse midline gliomas, the BMP pathway should not be activated as it is in the pons. The authors should identify thalamic tumors in the datasets they explored and patients-derived cell lines from thalamic tumors available to investigate whether this pathway is active across all H3.3K27M mutants in the brain midline or specifically in tumors from the pons.*

The referee's question is an interesting one, and we will try to see if we can determine tumor's location from the public data we've used. We will nevertheless try to determine whether the inter-patient variability observed in the level of activation of the BMP pathway may be due, in particular, to different tumor locations.

> *2 - There are ~20% H3.3K27M tumors that carry an ACVR1 mutation and similar numbers of H3.1K27M that are wild type for this gene. Can the authors identify these outliers in their datasets and assess the activation of BMP2 and 7 or other BMP pathway members in this context?*

Indeed, defining the level of activation of the pathway in this type of H3.3K27M ACVR1 mutant or H3.1K27M ACVR1 wt tumors would be extremely interesting, but no samples of this type are a priori included in the datasets analyzed. Instead, we will try to define the phenotype of cell lines of this type in response to BMP.

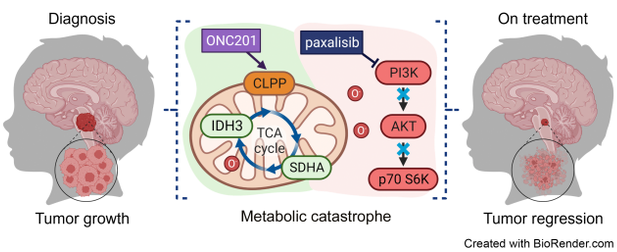
ONC201 in Combination with Paxalisib for the Treatment of H3K27-Altered Diffuse Midline Glioma

Evangeline R. Jackson[1,2], Ryan J. Duchatel[1,2], Dilana E. Staudt[1,2], Mika L. Persson[1,2], Abdul Mannan[1,2], Sridevi Yadavilli[3,4], Sarah Parackal[5,6], Shaye Game[5,6], Wai Chin Chong[5,6], W. Samantha N. Jayasekara[5,6], Marion Le Grand[7], Padraic S. Kearney[1,2], Alicia M. Douglas[1,2], Izac J. Findlay[1,2], Zacary P. Germon[1,2], Holly P. McEwen[1,2], Tyrone S. Beitaki[1,2], Adjanie Patabendige[8,9], David A. Skerrett-Byrne[10,11], Brett Nixon[10,11], Nathan D. Smith[12], Bryan Day[13], Neevika Manoharan[14], Sumanth Nagabushan[14], Jordan R. Hansford[15], Dinisha Govender[16], Geoff B. McCowage[16], Ron Firestein[5,6], Meegan Howlett[17], Raelene Endersby[17], Nicholas G. Gottardo[17,18], Frank Alvaro[2,19], Sebastian M. Waszak[20,21], Martin R. Larsen[22], Yolanda Colino-Sanguino[23,24], Fatima Valdes-Mora[23,24], Andria Rakotomalala[25,26], Samuel Meignan[25,26], Eddy Pasquier[7,27], Nicolas André[7,27,28], Esther Hulleman[29], David D. Eisenstat[30,31], Nicholas A. Vitanza[32,33], Javad Nazarian[3,34,35], Carl Koschmann[36], Sabine Mueller[34,37], Jason E. Cain[5,6], and Matthew D. Dun[1,2,38]

ABSTRACT

Diffuse midline gliomas (DMG), including diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG), are the most lethal of childhood cancers. Palliative radiotherapy is the only established treatment, with median patient survival of 9 to 11 months. ONC201 is a DRD2 antagonist and ClpP agonist that has shown preclinical and emerging clinical efficacy in DMG. However, further work is needed to identify the mechanisms of response of DIPGs to ONC201 treatment and to determine whether recurring genomic features influence response. Using a systems-biological approach, we showed that ONC201 elicits potent agonism of the mitochondrial protease ClpP to drive proteolysis of electron transport chain and tricarboxylic acid cycle proteins. DIPGs harboring *PIK3CA* mutations showed increased sensitivity to ONC201, whereas those harboring *TP53* mutations were more resistant. Metabolic adaptation and reduced sensitivity to ONC201 was promoted by redox-activated PI3K/Akt signaling, which could be counteracted using the brain penetrant PI3K/Akt inhibitor, paxalisib. Together, these discoveries coupled with the powerful anti-DIPG/DMG pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of ONC201 and paxalisib have provided the rationale for the ongoing DIPG/DMG phase II combination clinical trial NCT05009992.

Significance: PI3K/Akt signaling promotes metabolic adaptation to ONC201-mediated disruption of mitochondrial energy homeostasis in diffuse intrinsic pontine glioma, highlighting the utility of a combination treatment strategy using ONC201 and the PI3K/Akt inhibitor paxalisib.



[1]Cancer Signalling Research Group, School of Biomedical Sciences and Pharmacy, College of Health, Medicine and Wellbeing, University of Newcastle, Callaghan, New South Wales, Australia. [2]Precision Medicine Research Program, Hunter Medical Research Institute, New Lambton Heights, New South Wales, Australia. [3]Center for Genetic Medicine Research, Children's National Hospital, Washington, DC. [4]Brain Tumor Institute, Children's National Hospital, Washington, DC. [5]Centre for Cancer Research, Hudson Institute of Medical Research, Clayton, Victoria, Australia. [6]Department of Molecular and Translational Science, Monash University, Clayton, Victoria, Australia. [7]Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Aix-Marseille Université, Inserm, CNRS, Institut Paoli Calmettes, Marseille, France. [8]Brain Barriers Group, School of Biomedical Sciences and Pharmacy, College of Health, Medicine and Wellbeing, University of Newcastle, Callaghan, New South Wales, Australia. [9]Department of Biology, Edge Hill University, Ormskirk, United Kingdom. [10]School of Environmental and Life Sciences, College of Engineering, Science and Environment, University of Newcastle, Callaghan, New South Wales, Australia. [11]Infertility and Reproduction Research Program, Hunter Medical Research Institute, New Lambton Heights, New South Wales, Australia. [12]Analytical and Biomolecular Research Facility Advanced Mass Spectrometry Unit, University of Newcastle, Callaghan, New South Wales, Australia. [13]QIMR Berghofer Medical Research Institute, Herston, Queensland, Australia. [14]Department of Paediatric Oncology, Sydney Children's Hospital, Randwick, New South Wales, Australia. [15]Michael Rice Cancer Centre, Women's and Children's Hospital, South Australia Health and Medical Research Institute, South Australia ImmunoGenomics Cancer Institute, University of Adelaide, Adelaide, Australia. [16]Department of Oncology, The Children's Hospital at Westmead, Westmead, New South Wales, Australia. [17]Brain Tumor Research Program, Telethon Kids Cancer Centre, Telethon Kids Institute, University of Western Australia, Perth, Australia. [18]Department of Pediatric and Adolescent Oncology and Hematology, Perth Children's Hospital, Perth, Australia. [19]John Hunter Children's Hospital, New Lambton Heights, New South Wales, Australia. [20]Centre for Molecular Medicine Norway (NCMM), Nordic EMBL Partnership, University of Oslo and Oslo University Hospital, Oslo, Norway. [21]Department of Neurology, University of California, San Francisco, San Francisco, California. [22]Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense M, Denmark. [23]Cancer Epigenetics Biology and Therapeutics, Precision Medicine Theme, Children's Cancer Institute, Sydney, New South Wales, Australia. [24]School of Women's and Children's Health, University of NSW, Sydney, New South Wales, Australia. [25]Tumorigenesis and Resistance to Treatment Unit, Centre Oscar Lambret, Lille, France. [26]University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277, CANTHER, Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, Lille, France. [27]Metronomics Global Health Initiative, Marseille, France. [28]Department

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024

Introduction

High-grade gliomas (HGG) are responsible for 10%–15% of all pediatric central nervous system (CNS) cancers, but account for over 40% of deaths (1). Diffuse midline gliomas (DMG), including those of the brainstem (diffuse intrinsic pontine glioma, DIPG) are universally fatal childhood malignancies and responsible for half of all pediatric HGG diagnoses (2). Despite half a century of clinical trials, radiotherapy (RT) remains the only life prolonging treatment for DIPG, with the median overall survival (OS) remaining stagnant at 9–11 months after diagnosis, and <10% of patients with pontine tumors surviving more than 2 years after diagnosis (3, 4). The diffuse and infiltrative growth characteristics of DIPG that enmesh the critical structures of the brainstem make surgical resection extremely challenging. However, over the last 10 years image-guided stereotactic biopsy at diagnosis has been shown to be safe and feasible (5), helping to isolate tumor tissue to identify the recurring molecular (6) and immunological (7) features of the disease.

Global loss of trimethylation at lysine 27 (K27) of histone H3 drives epigenetic dysregulation in primitive neuronal stem cells/oligodendrocyte precursor cells, caused by a methionine to lysine substitution (H3K27M) in either *HIST1H3B* (H3.1) or *H3F3A* (H3.3) genes (8–10) or through the overexpression of *EZHIP* (EZH inhibitory protein) in patients harboring wild-type H3 (11). These H3-alterations inhibit the catalysis of H3K27 trimethylation by the polycomb-repressive complex 2 (12) and co-occur with mutations in tumor suppressor and signaling genes (13). Together, these changes promote the activity of oncogenic signaling cascades that sustain mitogenesis, immune system avoidance, and drive cellular immortality (14).

Preliminary clinical efficacy for the oral, small-molecule imipridone anticancer therapy, ONC201, has been reported in patients diagnosed with DIPG (15) and recurrent H3K27M DMG (16). Previous studies in hematological (17), colorectal (18), breast (19), uterine (20), and non-midline brain cancers (such as glioblastoma; ref. 21), showed ONC201-triggered p53-independent cancer cell apoptosis driven in part by an atypical integrated stress response, initiating expression of the antitumor protein TRAIL (22, 23). The identification of a durable objective response observed in a patient with a secondary glioblastoma harboring an H3.3K27M mutation encouraged continued testing in patients with these mutations, such as DIPG (21).

Described as a dopamine receptor D2 (DRD2) selective antagonist, corroborated by Bayesian machine-learning approaches (24), more recent studies show that ONC201 is also a potent agonist of the ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (ClpP), a mitochondrial protein that degrades mitochondrial respiratory chain proteins to disrupt energy homeostasis (23, 25). Recently, mRNA expression analysis correlated *CLPP* expression with tumor grade and OS in DMG (25). These studies also demonstrated that DMG cell lines with sensitivity to ONC201 and ONC206 (a fluorinated analog of ONC201 in a phase I pediatric clinical trial for DMG PNOC023, NCT04732065), impaired tumor cell metabolism and caused mitochondrial damage, inducing reactive oxygen species (ROS) production to activate an integrative stress response and apoptosis *in vitro* and *in vivo*.

Metabolic effects highlight the potential of ONC201 for the treatment of DIPG, potentially circumventing the inter- and intra-tumoral heterogeneity that has previously plagued the use of precision therapy–based approaches (6). Indeed, ONC201 induces a state of energy depletion as outlined by a significant decrease in ATP levels and a hypophosphorylated state in glioblastoma (26). Potentially, ONC201 represents an important first step in the establishment of a recognized targeted treatment strategy for some patients with H3K27-altered DMG; however, monotherapeutic benefits are transient, whereas for other patients, ONC201 offers no survival improvements and these individuals succumb quickly (27).

Here, we use a systems-wide approach to identify combination strategies to increase the therapeutic response to ONC201, thereby providing the preclinical and preliminary clinical evidence for the commencement of the phase II clinical trial to test ONC201 in combination with the potent brain-penetrant PI3K/Akt inhibitor, paxalisib (28, 29), for the treatment of patients with H3K27M DIPG and DMG at diagnosis and disease progression (NCT05009992).

Materials and Methods

Reagents

Unless otherwise stated, all reagents were obtained from Thermo Fisher Scientific.

Drugs

ONC201 (Chimerix) and paxalisib (Kazia Therapeutics Limited) were obtained under a materials transfer agreement.

Cell lines

The use of patient-derived DIPG neurosphere cell cultures in this study was approved by the Human Ethics Research Committee, University of Newcastle (H-2018–0241). Cell lines (summarized in Supplementary Table S1) were cultured as previously described (30).

Sensitivity

Drug effect on cellular growth and proliferation was determined using the resazurin cell proliferation assay as previously established (15). Briefly, DIPG cells were seeded at 2.5×10^4 cells/well in

of Pediatric Oncology, La Timone Children's Hospital, AP-HM, Marseille, France. [29]Princess Máxima Center for Pediatric Oncology, Utrecht, the Netherlands. [30]Children's Cancer Centre, The Royal Children's Hospital Melbourne, Parkville, Victoria, Australia. [31]Neuro-Oncology Laboratory, Murdoch Children's Research Institute, Department of Paediatrics, University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia. [32]Ben Towne Center for Childhood Cancer Research, Seattle Children's Research Institute, Seattle, Washington. [33]Division of Pediatric Hematology/Oncology, Department of Pediatrics, Seattle Children's Hospital, Seattle, Washington. [34]Department of Pediatrics, University Children's Hospital Zurich, Zurich, Switzerland. [35]The George Washington University, School of Medicine and Health Sciences, Washington, DC. [36]Division of Pediatric Hematology/Oncology, Department of Pediatrics, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan. [37]Department of Neurology, Neurosurgery and Pediatric, University of California, San Francisco, California. [38]Paediatric Program, Mark Hughes Foundation Centre for Brain Cancer Research, College of Health, Medicine, and Wellbeing, Callaghan, New South Wales, Australia.

E.R. Jackson, R.J. Duchatel, and D.E. Staudt contributed equally as co-first authors of this article.

Corresponding Authors: Matthew D. Dun, The University of Newcastle, Level 3, Life Sciences Building, Callaghan, NSW 2308, Australia. Phone: 612-4921-5693; E-mail: matt.dun@newcastle.edu.au; Sabine Mueller, sabine.mueller@ucsf.edu; Jason E. Cain, jason.cain@hudson.org.au; Carl Koschmann, ckoschma@med.umich.edu; and Javad Nazarian, Javad.Nazarian@kispi.uzh.ch

Cancer Res 2023;83:2421–37

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-23-0186

This open access article is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license.

©2023 The Authors; Published by the American Association for Cancer Research

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024

a 96-well plate, incubated overnight at 37°C and treated with a 1:2 serial dilution of ONC201 from 150 μmol/L for 96 hours. Cells were treated as neurospheres without growth matrix. For low-oxygen testing, DIPG cells were grown in 5% O_2 conditions for at least 1 week before commencement of assays. Plates were read using a Fluostar system at 544/590 nm and values graphed compared with the untreated control.

Annexin-V FITC assay

Cell death was measured using an Annexin-V FITC apoptosis detection kit (BD Biosciences) as previously established (15). Cells were seeded at a density of 5×10^4 per well in a 96-well plate and were incubated with ONC201, for 96 hours before propidium iodide and Annexin V staining as per the manufacturer's recommendations. Stained cells were analyzed using a FACS Canto II flow cytometer and data were processed using FlowJo software.

Colony formation assay

SU-DIPG-VI colony forming ability was assessed via soft agar growth matrix colony formation assay as previously described (31). A total of 3,000 SU-DIPG-VI cells/well were plated into the top agar layer of 24-well plates with indicated doses. MTT was used to count proliferative cells after 2 weeks of growth (5% CO_2 conditions). These data were analyzed with ImageJ and are presented as colony number compared with untreated wells, performed in biological triplicate.

Western blotting

Protein was extracted from DIPG cells using RIPA buffer as per the manufacturer's recommendations and previously described (32). BCA quantification was performed using a Pierce BCA Protein Assay Kit (catalog no. 23227) according to the manufacturer's instructions. Primary antibodies were incubated overnight at dilutions described in Supplementary Table S2. Secondary horseradish peroxidase (HRP)–conjugated antibody (1662408; Bio-Rad) was used at a dilution of 1:5,000. Labeled protein bands were imaged using enhanced chemiluminescence (ECL—Classico, Crescendo; Merck KGaA) in combination with a Chemidoc MP Imaging System (Bio-Rad) and data were analyzed using ImageLab software.

Res259 H3 mutation transfection

The human pediatric glioma cell line Res259 (grade II, diffuse astrocytoma) was transfected to express the wild-type or mutated histone H3 forms, using a Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza) with 1 μg of the plasmid containing K27M-mutated *H3F3A* or *HIST1H3B* gene fused with the *mCherry* gene, and bearing a resistance gene for Hygromycin B. As a control, cells were transfected with a similar plasmid containing the wild-type *H3F3A* or *HIST1H3B* gene. Cells were selected using Hygromycin B and sorted for mCherry expression. Histones PTMs were collected using a histone extraction kit (Abcam ab113476) and analyzed using immunoblotting.

CRISPR/Cas9

A total of 2×10^5 cells were seeded in a 6-well plate and incubated overnight. Cells were then replenished with fresh complete media containing 5 μg/mL polybrene (Thermo Fisher Scientific). A 250 μL aliquot of lentiviral cocktail containing either Lenti-Cas9-Blast plasmid (SU-DIPG 13; Addgene), Lenti-Cas9–2A-Blast (SU-DIPG 36; Addgene) or FUCas9Cherry (DIPG-HSJD-007; Addgene) was supplemented into the cell media and incubated for 72 hours. Transduced cells were selectively maintained in complete media containing 10 μg/mL blasticidin (Jomar Life Research) for at least 7 days, or sorted for mCherry expression, before experiment. *CLPP, DRD2, TP53*, and nontargeting control (NTC) single guide RNAs (sgRNA), cloned into the U6-gRNA/hPGK-puro-2A-BFP vector, were obtained from the Human Sanger Whole-Genome Lentiviral CRISPR Library (Thermo Fisher Scientific). The details of gRNA sequence for the *CLPP, DRD2*, and *TP53* were as follows: *CLPP*: 5′-GGTGTGGTGACCGCGGGCCTGG-3′, *DRD2*: 5′-GGCAATGATGCACTCGTTCTGG-3′, *TP53*: 5′-CTCGAAGCGCTCACGCCCACGG-3′.

A total of 5×10^5 Lenti-X HEK29T were seeded in 6-well plates and the following day were transfected with sgRNA plasmids along with the viral packaging plasmids, psPAX-D64V (Addgene) and pMD2.G (Addgene) using Lipofectamine LTX Reagent with PLUS reagent as per the manufacturer's recommendations. Transfection media were replaced with fresh media after 6 hours and incubated for a further 72 hours before collection of virus-containing media. Viral media were added to 2×10^5 Cas9-expressing DMG cells in a 6-well plate in the presence of 1 μg/mL polybrene, centrifuged at $800 \times g$ for 30 minutes and then incubated for 72 hours. Selection of transduced cells using 2 μg/mL of puromycin in fresh media was performed until non-transduced control cells were dead. Heterogenous cell lines were maintained in 2 μg/mL puromycin. For the establishment of single-cell clones from the heterogenous population, single BFP–positive cells were sorted in 96-well plates containing a 1:1 mixture of conditioned media and fresh media. Single-cell clones were expanded and screened using immunoblotting to identify clones with reduced or absent target protein.

Mass spectrometry

Proteomic analysis was conducted as previously reported (33). Briefly, protein was extracted from DIPG cells using a Na_2CO_3 solubilization method capable of differentiating between soluble and membrane bound proteins. Oasis solid-phase extraction columns (Waters) were blocked using a trypsin digest of BSA before being used to desalt protein extracts. A total of 100 μg of each sample (as determined by Qubit 2.0 Fluorometer quantification) was labeled with TMT 16 plex pro labeling tags (as per Supplementary Table S3) according to the manufacturer's instructions. Samples were fractionated by offline high-pH reverse phase fractionation using a Dionex Ultra 3000 uHPLC system (Thermo Fisher Scientific) using nano Ease M/Z Peptide CSH C18 column (130 A, 1.7 μm, 300 μm × 100 mm; Waters). LC/MS-MS was performed using EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific) coupled online to an Orbitrap Exploris 480 mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Raw files were processed via Proteome Discoverer 2.5.

Hierarchical clustering was performed using Perseus. For our parameters, we used a Euclidean distance, with average linkage and no constraint. A pre-process with *k*-means was performed, with a maximum of 300 clusters, no more than 10 iterations and 1 restart. Because of the small size of some clusters, we grouped like clusters where the same treatment had similar expression profiles. Cluster 1 was the combination of two clusters, whereas cluster 3 was the combination of 7 clusters, 4 of which with clusters less than 5 genes. Clusters 2 and 4 are standalone. Hierarchical clustering trees have been highlighted. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (Qiagen) was used for bioinformatic analysis of proteomic dataset. Canonical pathways, and upstream regulator analyses were generated and assessed on the basis of *P* value and z-scores.

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024

DIPG xenograft modeling

All *in vivo* experiments were conducted in compliance with the approved CNH Institutional Animal Care and Use Committee protocol (#30425), the University of Newcastle Animal Care and Ethics Committee (#A-2019–900) and the University of California San Francisco Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Five-week-old, male, NOD SCID gamma (NSG) mice were implanted with 100,000 SU-DIPG-VI/Luc and 300,000 HSJD-DIPG-007 tumor cells into the pontine region of the brainstem using coordinates with Lambda as the reference point (Y: 1.5 mm, X: 0.8 mm, Z: 5 mm) at a rate of 1 μL/minute. Mice were allowed to recover for 4 and 3 weeks, respectively, before commencement of treatment.

For SU-DIPG-VI/Luc model, ONC201 and paxalisib were administered by oral gavage at 125 mg/kg (PBS) and 10 mg/kg (0.5% methyl cellulose/0.2% Tween 80), respectively, at a frequency of 1 time/wk and 3 times/wk. Animals were monitored for weight loss (compared with base weight) and clinical signs. Dose holidays were given at 10% weight loss and resumed at 5% weight recovery. Mice were humanely sacrificed when neurological symptoms were observed, or with more than 20% weight loss.

For the HSJD-DIPG-007 xenograft model, ONC201 and paxalisib were administered as above, except paxalisib was given twice daily at 5 mg/kg. Mice were treated for 5 weeks. Mice were sacrificed at endpoints as described above.

For the SF8628 study, five to six week-old, female athymic (homozygous, nu/nu) mice were obtained from Harlan-Envigo Laboratory. For tumor inoculation 500,000 human SF8628 DIPG cells with the luciferase reporter gene were intracranially implanted into the right pons as previously described (34). Briefly, anesthetized animals received 2 μL of cell suspensions into the right pontine area, with injection coordinates 1 mm to the right from the lambda, top of lamboid suture, and 4-mm depth. Treatment initiated at day 14, when bioluminescence indicated log phase growth. Mice were euthanized when tumor burden reached levels determined by IACUC guidelines.

Tumor size was monitored bi-weekly, using an IVIS-Lumina III imaging system (PerkinElmer) for SU-DIPG-VI/Luc. For SF8628, bioluminescence was measuring using an IVIS Lumina imaging station (Caliper Life Sciences; ref. 35). Mice were intraperitonially injected with 150 mg/kg of D-luciferin (Gold Biotechnology) and imaged 10 minutes following D-luciferin injection. BLI signal intensities were quantified using the region of interest feature of Living Image software. BLI signal at each time point was plotted as an average of total flux (photons/s) for all animals in each group.

In SU-DIPG-VI/Luc, following 2 *in vivo* treatments with ONC201, paxalisib or combination, brainstems were resected lysed with RIPA buffer, immunoblotting was then performed as described above. Samples for IHC were collected in the middle of the fourth week of treatment in HSJD-DIPG-007 xenograft model and staining was conducted as previously described for H3K27M, Ki67 and SDHA (15). Images were visualized using ImageScope and pixel intensity was quantified using ImageJ in technical triplicates across three biological replicates.

Patient experience

Written informed consent was obtained from each of the families whose child's data are included in this study. Two children with biopsy/autopsy-confirmed H3K27M, *PIK3CA* or *PIK3R1* mutant DIPG were treated with ONC201 and paxalisib.

DIPG patient at 5-year-old was diagnosed in March, 2021 with H3.1K27M, *PIK3R1*, and *ACVR1* mutations. A biopsy was performed in the two weeks following this diagnosis, with RT started soon after. The combination of ONC201 (15 mg/kg) and paxalisib (27 mg/m^2) was started 3 months following diagnosis and is ongoing.

DIPG patient at 16-year-old was diagnosed with H3.3K27M, *TP53*, and *PIK3CA* mutations on the December 19, 2018, without a biopsy. They began radiotherapy and ONC201 (15 mg/kg) treatment on the January 9, 2019. ONC201 alone began in February, 2019. February, 2020 saw further progression, with ONC201 and panobinostat (45 mg daily three times per week), stopped May 20, 2020, at further progression. Re-irradiation and ONC201 began on May 29. ONC201 and paxalisib (27 mg/m^2) dual compassionate use began on June 22, 2020.

Statistical analysis

GraphPad Prism 9 software was used for statistical analyses. Unless otherwise stated, two sample unpaired Student *t* tests or one-way ANOVA was used to determine significant differences between groups. Where samples sizes were smaller, comparing different biological samples, nonparametric tests, one-way ANOVA, and *t* tests were used. Survival analysis was performed using the log-rank test. Values shown are the mean ±SEM. Significance values, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$, are used throughout.

Data availability

Data generated in this study have been included in the article and Supplementary Material. The proteomics data are deposited to ProteomeXchange via the PRIDE with the dataset identifier PXD036245 (36). All other raw data are available upon request from the corresponding author.

Results

Comprehensive drug profiling predicts reduced sensitivity to ONC201 in *TP53*-mutant DIPG

Using 13 patient-derived neurosphere-cell culture models harboring DMG molecular subtypes (H3-wt $n = 2$, H3.1K27M $n = 4$, and H3.3K27M $n = 7$) and immortalized neural cell controls (HCMEC/D3 blood–brain barrier endothelial cells, HMC3 microglial cells and ReN neural progenitor cells), we assessed sensitivity to ONC201 via inhibition of proliferation, induction of apoptosis and cell death. Overall, 43% of DIPG models showed >50% reduction in proliferation following ONC201 exposure (**Fig. 1A**; Supplementary Table S4). However, we identified a subpopulation of DIPG models, including controls, which demonstrated <50% reduction in proliferation, even at very high concentrations of ONC201 (>150 μmol/L) for up to 96 hours (**Fig. 1A**; Supplementary Table S4).

Analysis of cell death markers via annexin V/PI cytotoxicity analysis corroborated proliferation data, showing ONC201 is cytotoxic to SU-DIPG-XXXIII ($P = 0.0043$) and HSJD-DIPG-007 ($P = 0.0018$), with UON-JUMP4 and SU-DIPG-XIII demonstrating decreased sensitivity (**Fig. 1B**), akin to previous studies testing ONC201 in DIPG models (15, 25) and at physiologically relevant doses (5 μmol/L; ref. 37). Neurosphere morphology was assessed following a 6-day ONC201 treatment to account for variations in doubling times (Supplementary Fig. S1) across 11 DIPG cell line models. ONC201-sensitive cells showed reduced cell number and less viability, whereas neurosphere models similarly featured less robust sphere formation accompanied by more nonviable, singular cells (**Fig. 1C**, top; Supplementary Fig. S2). By contrast, models with decreased sensitivity retained cell number and neurosphere morphology and presented with fewer differences in nonviable cells compared with untreated controls (**Fig. 1C**, bottom; Supplementary Fig. S2B).

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024

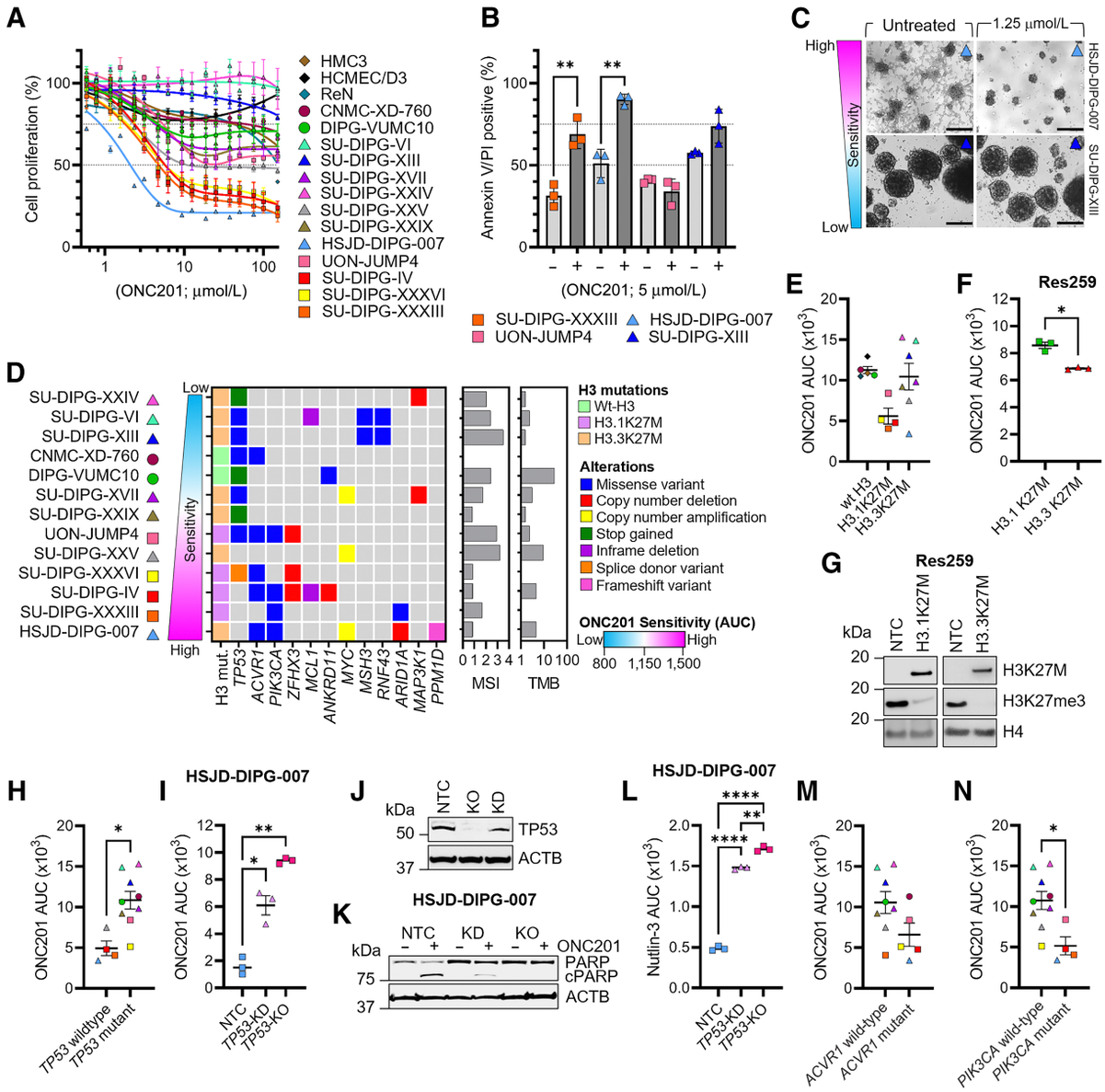


Figure 1.

DIPG patient–derived cell lines show variable response to ONC201 treatment. **A,** Resazurin proliferation (percentage compared with untreated) after 96 hours ONC201 exposure in DIPG patient-derived cell lines; EZHIP+ (circles) = CNMC-XD-760, DIPG-VUMC10; H3.1K27M (squares) = UON-JUMP4, SU-DIPG-IV, SU-DIPG-XXXIII, SU-DIPG-XXXVI, and H3.3K27M (triangles) = HSJD-DIPG-007, SU-DIPG-VI, SU-DIPG-XIII, SU-DIPG-XVII, SU-DIPG-XXIV, SU-DIPG-XXV, SU-DIPG-XXIX. The endothelial cell line, HCMEC/D3, SV-40–dependent human microglial line, HMC3 and neural progenitor cell line, ReN cells, were used as controls (diamonds). Values shown as mean ± SEM ($n = 3$). **B,** Annexin V apoptosis assay after 96 hours exposure with 5 μmol/L ONC201 (dark gray) compared with untreated (light gray) in SU-DIPG-XXXVI, HSJD-DIPG-007, UON-JUMP4, and SU-DIPG-XIII. Unpaired *t* test, values shown as mean ± SEM ($n = 3$). **C,** Representative phase contrast images of biological triplicates ($n = 3$) of HSJD-DIPG-007 and SU-DIPG-XIII following 6 days exposure to 1.25 μmol/L ONC201. Scale bar, 0.2 mm. **D,** Oncoplot of somatic mutations determined using TSO500. Cell lines ordered from the least to most sensitive to ONC201 exposure (top to bottom). Larger values of MSI and TMB are associated with increased pathogenicity. **E,** Proliferation data were grouped by H3 status; wt-H3 ($n = 5$), H3.1K27M ($n = 4$), and H3.3K27M ($n = 7$), and sensitivity to ONC201 was determined by the AUC, ± SEM. Statistical analysis was performed via nonparametric unpaired one-way ANOVA. **F,** Resazurin proliferation, AUC, following ONC201 exposure for 96 hours in Res259 cells harboring knockin of either H3.1K27M or H3.3K27M mutations. Statistical analysis performed via parametric unpaired *t* test, with Welch correction. **G,** Western blot validation of H3K27M knockin in Res259 cells. **H,** *TP53* status, wt- and mutant-*TP53* ($n = 4$ vs. $n = 9$), and sensitivity to ONC201 were determined by the AUC, with values shown as mean ± SEM. Statistical analysis performed via nonparametric unpaired *t* test. **I,** Resazurin proliferation, AUC, following ONC201 exposure in wt-*TP53* HSJD-DIPG-007 DIPG cell lines transduced with a nontargeting control (NTC) gRNA, *TP53*-KD (knockdown), and *TP53*-KO (knockout). Statistical analysis was performed via parametric unpaired one-way ANOVA with Welch correction. **J,** Western Blot confirmation of TP53 KO and KD in HSJD-DIPG-007 cells. **K,** Validation of decreased response to ONC201 in *TP53*-KD or *TP53*-KO HSJD-DIPG-007 cell lines was performed by Western blot analysis of PARP cleavage (cPARP). **L,** Resazurin proliferation, AUC, following Nutlin-3 exposure for 96 hours in HSJD-DIPG-007 NTC, *TP53*-KD, and *TP53*-KO. Statistical analysis was performed via parametric unpaired one-way ANOVA with Welch correction. **M** and **N,** Proliferation data were grouped by ACVR1 status; *ACVR1* wild-type ($n = 8$) versus *ACVR1* mutant ($n = 5$; **M**) and *PIK3CA* status; *PIK3CA* wild-type ($n = 9$) versus *PIK3CA* mutant ($n = 4$; **N**) and compared with AUC following ONC201 exposure. Statistical analysis performed via nonparametric unpaired *t* test. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$.

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024

To determine whether recurring mutations influenced the sensitivity of DIPG cell lines to ONC201, we performed pharmacogenomic analysis using next generation sequencing (summarized in **Fig. 1D**). As a means of determining the comparative sensitivity across models, we calculated the AUC of cell lines treated with ONC201 (**Fig. 1A**), and grouped DIPG models by H3K27 status and assessed whether there were differences in sensitivity (**Fig. 1E**). No difference in ONC201 sensitivity was seen in H3K27-altered subtypes (**Fig. 1E**, wt-H3 vs. H3.1K27M, $P = 0.0696$; wt-H3 vs. H3.3K27M, $P = 0.09999$; H3.1K27M vs. H3.3K27M, $P = 0.1711$). In line with previous studies of ONC201 efficacy in glioblastoma models (21), and to confirm the role histone mutations may play in response to ONC201, we knocked in H3.1K27M or H3.3K27M mutations into wt-H3 astrocytoma models (Res259; ref. 38). Res259 cells harbor overexpression of *PDGFRA* and *KIT* (39), which represents a similar genetic architecture to DMGs without the H3/EZHIP alterations. In line with previous studies Res259-H3.3K27M$^+$ cells showed significantly increased sensitivity compared with H3.1K27M$^+$ cells (H3.3K27M vs. H3.1K27M $P = 0.0139$; **Fig. 1F** and **G**; Supplementary Fig. S3A and S3B).

Besides H3K27M alterations, *TP53* loss-of-function mutations (LoF) were the next most frequently identified in our DIPG models ($n = 9$), and included missense variants ($n = 5$), stop gains ($n = 3$) and a splice donor variant ($n = 1$), predominantly affecting H3.3K27M DIPG models (**Fig. 1D**). *TP53*-mutant DIPG models were significantly less sensitive to ONC201 than wt-*TP53* DIPG models ($P = 0.014$; **Fig. 1H**). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis supported the pharmacogenomic observation that *TP53*-mutant DIPGs possessed decreased sensitivity to ONC201 (AUROC = 0.9722, $P = 0.0087$; Supplementary Fig. S3C). To further explore the influence of *TP53* mutations, we performed CRISPR/Cas9-mediated *TP53* knockdown (KD) and single-cell knockout (KO) using the ONC201-sensitive HSJD-DIPG-007 DIPG model, which harbors wt-*TP53*, H3.3K27M and mutant *PPM1D* (**Fig. 1A**, **B**, and **D**). Modulating expression of *TP53* did not influence proliferation rate (Supplementary Fig. S3D); however, in agreement with our pharmacogenomics studies, *TP53* KD/KO decreased sensitivity of HSJD-DIPG-007 to ONC201 treatment compared with nontargeting gRNA controls (ONC201 IC_{50} wt-*TP53* = 2.202 μmol/L, *TP53*-KD = 7.344 μmol/L $P = 0.0117$, *TP53*-KO = NR $P = 0.004$; **Fig. 1I** and **J**; Supplementary Fig. S3E). The role LoF *TP53* mutations in response to ONC201 was further investigated using immunoblotting, which demonstrated that 5 μmol/L ONC201 induced robust cleavage of PARP, indicative of apoptosis in wt-*TP53* cells, moderate cleavage in *TP53*-KD cells, but no cleavage of PARP in *TP53*-KO HSJD-DIPG-007 cells (**Fig. 1K**), corroborating the pharmacogenomic analysis showing that DIPG cells harboring *TP53* mutations show decreased sensitivity to ONC201. Using the small-molecule MDM2 inhibitor of Nutlin-3, we show that KD/KO of *TP53* mimics LoF mutations, driving senescence only in nontransfected control (*TP53*-NTC $IC_{50} = 3.507$; *TP53*-KD and *TP53*-KO IC_{50} = NR) than *TP53*-KD and *TP53*-KO, which did not reach IC_{50} (**Fig. 1L**). Furthermore, even though HSJD-DIPG-007 cells harbor a *PPM1D* mutation, these cells are as sensitive to MDM2 antagonism in line with other *PPM1D* mutant cells lines (40), and conversely to HSJD-DIPG-007 cells harboring *TP53* LoF, show reduced sensitivity to ONC201 (**Fig. 1L**; Supplementary Fig. S3E–S3G). As *TP53* and H3.3K27M mutations are known to associate with aneuploidy, and a chromosomal instability signature, we examined whether *TP53* mutations and ONC201 sensitivity correlated with chromosomal instability (41), through the measurement of tumor mutational burden (TMB), microsatellite instability (MSI; **Fig. 1D**; Supplementary Fig. S3H and S3I) and chromosomal gains and losses (Supplementary Fig. S3J and S3K). No difference between *TP53* status and MSI, TMB or chromosomal gains/losses was observed, suggesting that this may not be a feature of *TP53*-mutant DMGs in our cohort. Furthermore, TSO500 revealed high number of *ACVR1*-mutant DIPGs (38%, $n = 5$), often co-occurring with H3.1K27M (23%, $n = 3$; **Fig. 1D**). We next examined whether *ACVR1* promoted sensitivity to ONC201; however showed no difference in ONC201 sensitivity between wt-*ACRV1* and mutant DIPGs ($P = 0.1274$; **Fig. 1M**). In addition, as *ACVR1* and *PIK3CA* regularly co-occur (23%, $n = 3$), with recurrent *PIK3CA* mutations seen in our DMG models (31%, $n = 4$), we examined whether *PIK3CA* mutations could predict sensitivity and show here that they are more sensitive to ONC201 compared with wt-*PIK3CA* DIPGs ($P = 0.012$; **Fig. 1N**).

Somatic pharmacogenomic analysis identified DRD2 and CLPP to be targets of ONC201 in DIPG

In vitro profiling of the G-protein coupled receptor (GPCR) superfamily has previously shown ONC201 to be a dopamine receptor (DRD2/3/4) antagonist (24), as well as an agonist of the mitochondrial protease ClpP (19, 23). Recently, we performed molecular modeling of both ClpP and DRD2 to show that ONC201 binds to both targets with high affinity (15). Therefore, to identify targets of, and hence pathways influenced by ONC201, we correlated ONC201 sensitivity (z-AUC) with basal gene (Supplementary Fig. S4A) and protein (**Fig. 2A**) expression profiles of known putative targets. High DRD2 protein expression was significantly correlated with increased sensitivity to ONC201 ($R^2 = 0.2348$; $P = 0.0027$; **Fig. 2B**), and at the transcript level ($R^2 = 0.1382$; $P = 0.0431$; Supplementary Fig. S4B). A significant correlation was also identified for ClpP at the protein level ($R^2 = 0.1240$; $P = 0.0352$; **Fig. 2B**); however, not at the transcript level ($R^2 = 0.06571$; $P = 0.1715$; Supplementary Fig. S4B). Pediatric patients with HGG, including patients with DIPG, harbor ubiquitously high-*CLPP* expression, more so than any other pediatric CNS tumor (**Fig. 2C**; ref. 42). Agonism of ClpP by ONC201, increases its proteolytic activity to drive degradation of respiratory chain complex subunits, including Succinate dehydrogenase A and B (SDHA and SDHB), among others (Supplementary Fig. S4C; ref. 23). Succinate dehydrogenase enzymes form integral components of both the TCA cycle and mitochondrial respiratory ETC, and not only oxidize succinate to fumarate to support energy production, but their loss promotes oxidative stress through the production of ROS and release intermediates that control chromatin modifications and gene expression (43). Our recent study of ONC201 used by patients with DIPG, showed that ONC201 elicited potent degradation of SDHA in DIPG patient-derived xenograft (PDX) tumor tissue *in vivo* (15). Analysis shows that SDHA protein expression did nonsignificantly correlate with ONC201 sensitivity ($R^2 = 0.05555$; $P = 0.1664$; **Fig. 2B**), and this was also not at the transcript level ($R^2 = 0.118$; $P = 0.071$; Supplementary Fig. S4B). However, the ratio of SDHA (proteolytic target) to ClpP (protease) protein expression profiles may influence DMG cell sensitivity to ONC201 ($R^2 = 0.1823$; $P = 0.0094$; **Fig. 2B**), providing further evidence that ClpP is a target of ONC201 in DIPG. We further examined the role of ClpP and DRD2 in mediating ONC201 sensitivity using CRISPR/Cas9–mediated KD (**Fig. 2D**). Indeed, loss of *CLPP* expression had no effect on the ONC201-cell line harboring reduced sensitivity (SU-DIPG-XIII) yet abrogated the effects of ONC201 in the sensitive line (SU-DIPG-XXXVI; **Fig. 2D** and **E**). Interestingly, DRD2 was shown to be indispensable for DIPG cell line proliferation *in vitro*, regardless of sensitivity (**Fig. 2D** and **E**), analogous to *in vitro* and *in vivo* studies performed in patient-derived glioblastoma models (44).

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024

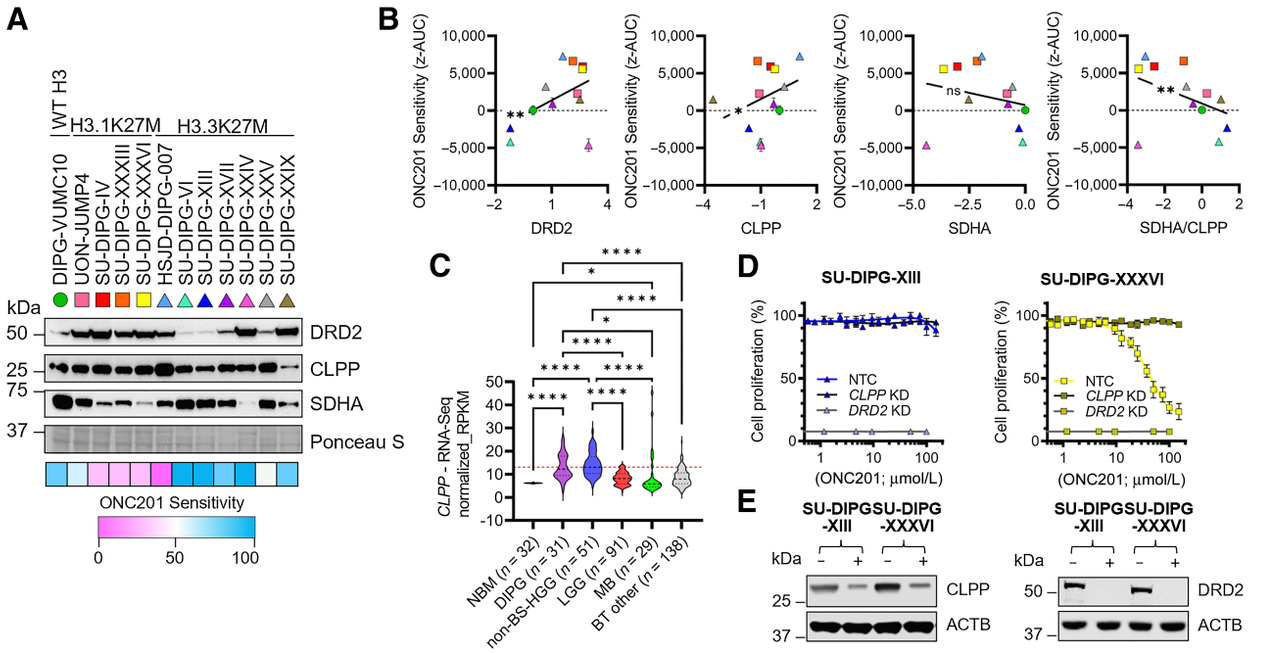


Figure 2.

Pharmacoproteogenomic analysis identifies DRD2 and ClpP as targets of ONC201 in DIPG. **A,** Western blot analysis of basal DRD2, SDHA, and CLPP expression across DIPG models. **B,** Densitometry of protein expressions was normalized to DIPG-VUMC10 and compared with the z-AUC (median AUC) for the control cell lines (HMC3, HCMEC/D3, ReN)—AUC of DIPG cells after exposure to ONC201. Pearson linear regression, accounting for replicates, was used to determine ONC201 sensitivity correlation for DRD2, CLPP, SDHA, and the ratio of SDHA to CLPP (SDHA/CLPP). ns, not significant; $n = 12$. **C,** *CLPP* RNA expression from RNA-seq data publicly available through St Jude's PeCan database, normalized to FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads). NBM (normal bone marrow CD34-positive hemopoietic stem cells/mononuclear cells), DIPG (diffuse intrinsic pontine glioma), non-BS-HGG (non-brainstem-high grade glioma, including not otherwise specified), LGG (low-grade glioma), MB (medulloblastoma), and BT other (brain tumor other—ependymoma, atypical teratoid rhabdoid tumor, choroid plexus carcinoma, cranio and CNS tumor not specified). Statistical significance determined via one-way ANOVA. **D,** Resazurin proliferation following ONC201 exposure (compared with untreated, 96 hours) of CRIPSR-Cas9–mediated knockdown of *CLPP* and *DRD2* was performed in SU-DIPG-XIII (blue) and SU-DIPG-XXXVI (yellow). Values shown as mean ± SEM ($n = 3$). **E,** Western blot validation of successful knockdown of CLPP and DRD2 in SU-DIPG-XIII and SU-DIPG-XXXVI. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$.

Quantitative proteomic profiling confirms that ONC201 drives mitochondrial degradation, rescued by redox-regulated PI3K/Akt signaling

Pharmacogenomics coupled with gene editing predicted *TP53* mutations/LoF to influence sensitivity to ONC201 (**Fig. 1**), which is at odds with previous studies in non-DIPG cancers (17, 22). However, biochemical correlation of putative targets, including DRD2 and ClpP, supports previously identified mechanisms of the anticancer effects of ONC201 in non-DIPG cells.

Given the critical role SDHA plays in mitochondrial respiration, we performed high-resolution quantitative proteomic profiling following ONC201 exposure (5 μmol/L, 24 hours) in both normoxic and low-oxygen conditions to mimic the spatial heterogeneity of DIPG using SU-DIPG-VI cells (H3.3K27M, *TP53*-mutant, DRD2-low, SDHA-high, ONC201 resistant; Supplementary Table S5). Hierarchical clustering revealed subtle but significant changes in protein expression induced by ONC201 treatment in cells grown under different oxygen tensions (Supplementary Fig. S5A). By interrogating differentially and commonly expressed clusters, assigned using the differences influenced by ONC201 or oxygen concentration (Supplementary Fig. S5B and S5C) using IPA, we identified mitochondrial dysfunction as the most significantly altered canonical process across these clusters and across both oxygen tensions following ONC201 treatment ($P =$ 1E−27; **Fig. 3A**; Supplementary Fig. S5B–S5D; Supplementary Tables S6–S8), with oxidative phosphorylation the most significantly downregulated cellular process ($P = 1.58e{-}24$, z-score = −4.49; **Fig. 3A**; Supplementary Fig. S5B and S5C). Activated upstream regulator analysis further revealed the role that ONC201 plays in promoting ClpP ($P = 6.65E{-}09$, z-score = 3.051) and KDM5A ($P =$ 2.22E−15, z-score = 4.2) activity, disrupting mitochondrial homeostasis ($P = 6.65E{-}09$, z-score = 3.051; **Fig. 3B**) and degrading mitochondrial and tricarboxylic acid cycle (TCA) proteins (SDHA, $P = 2.58E{-}04$ and IDH3B, $P = 5.29E{-}03$, respectively), as well as additional enzymes of the mitochondrial energy production pathways (**Fig. 3C**). Immunoblotting confirmed the changes in protein expression revealed by mass spectrometry, here ONC201 elicited degradation of mitochondrial proteins SDHA and IDH3A/B and increased phosphorylation of H2AX (**Fig. 3D**).

Protein expression profiles significantly regulated by ONC201 treatment across oxygen tensions predicted the Akt serine/threonine kinase, the key effector of the PI3K pathway, to be upregulated following ONC201 treatment (AKT1, z-score = 2.399; Akt, z-score = 2.349; **Fig. 3B**; Supplementary Table S9). In addition, IL15 activity (z-score = 2.416), which is known to stimulate the JAK–STAT pathway and PI3K/Akt signaling was predicted to be increased (45). Taken together, the predicted increase of PI3K/Akt signaling is potentially responsible for the significantly altered protein expression profiles seen following ONC201 treatment (**Fig. 3E**). These include decreased expression of the proapoptotic protein BAD, increased expression of the antiapoptotic protein BCL2 as well as increased

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024

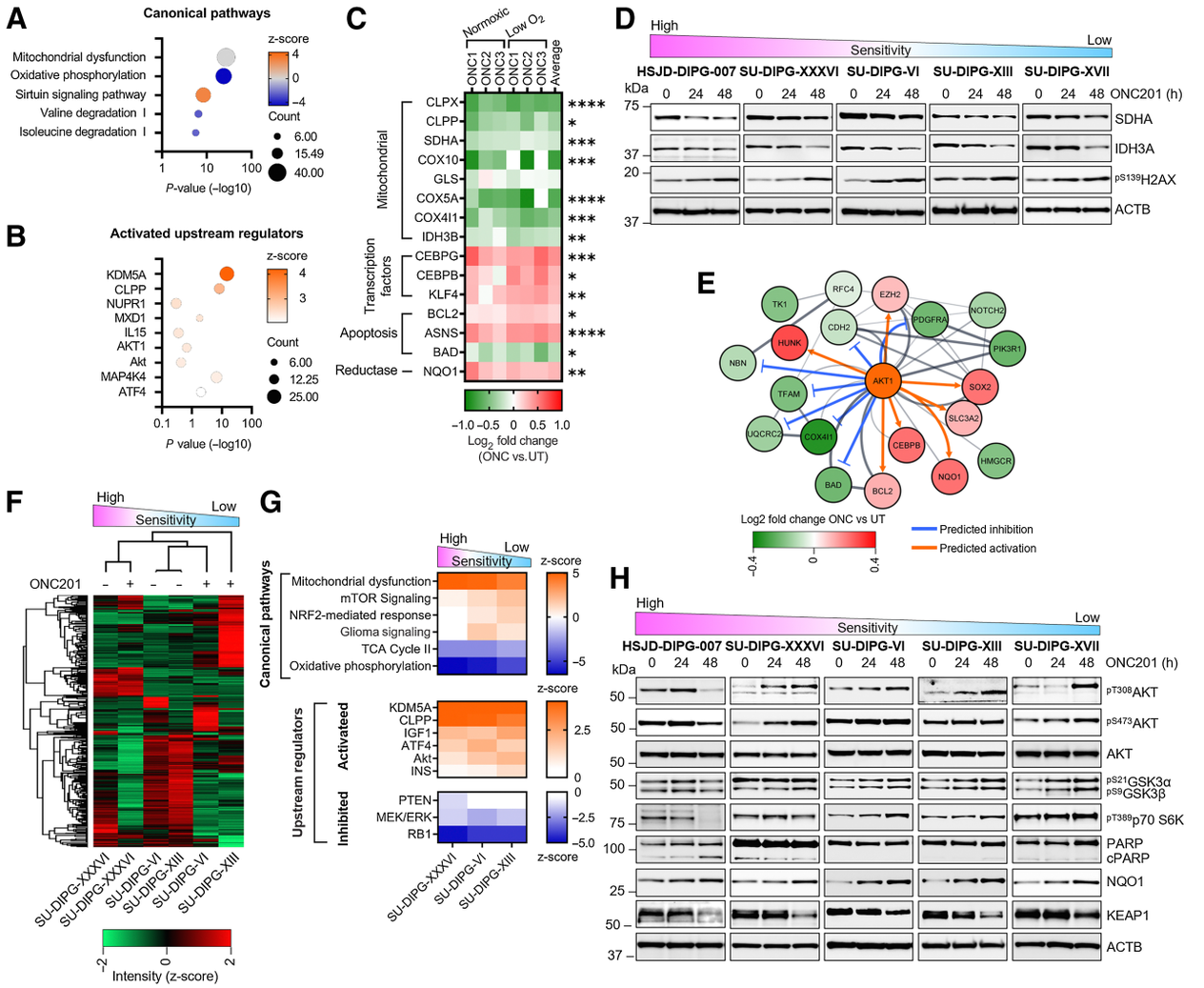


Figure 3.

Quantitative proteomic profiling identifies increased PI3K/Akt signaling in resistant models. High-resolution quantitative proteomic profiling was conducted on SU-DIPG-VI, exposed to 5 μmol/L ONC201 for 24 hours. Cells were treated in low oxygen (5% O_2, 5% CO_2) and normoxic conditions (20% O_2, 5% CO_2) in biological triplicate. **A** and **B,** Major canonical pathways (**A**) and activated upstream regulators (determined by IPA; **B**) of proteins significantly altered following 5 μmol/L ONC201, regardless of oxygen tension (Student *t* test, $P < 0.05$, $n = 6$). **C,** Expression changes of proteins were calculated as $\log_2$-fold change and grouped by mitochondrial proteins, transcription factors, and protein markers of apoptosis. Student *t* test of average change; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$. **D,** Orthogonal validation of mitochondrial changes, such as decreased SDHA, was analyzed in DIPG cell lines (HSJD-DIPG-007, SU-DIPG-XXXVI, SU-DIPG-VI, SU-DIPG-XIII, and SU-DIPG-XVII) via Western blot, exposed to 5 μmol/L ONC201 for up to 48 hours. **E,** Network of proteins from upregulated PI3K/Akt signaling predicted by IPA were integrated in Cytoscape StringApp. Predicted increase (orange) and predicted decrease (blue) functional networks indicated with sharp and dark lines linking proteins to indicate a higher confidence interval. Protein expression changes mapped as $\log_2$-fold change of ONC201/untreated calculated using the right-tailed Fisher exact test with the smaller the *P* value, the more likely the association between proteins not to be a random event ($P < 0.05$). **F** and **G,** High-resolution quantitative proteomic profiling was conducted on SU-DIPG-XXXVI, SU-DIPG-VI and SU-DIPG-XXXVI, exposed to 5 μmol/L ONC201 for 24 hours. **F,** Heatmap and unbiased hierarchical clustering of protein expression values normalized using z-score of abundances in Perseus. **G,** Canonical pathways and predicted upstream regulators determined by IPA analysis of proteins altered following ONC201 exposure. Positive z-score value is predictive of pathway activation, whereas a negative z-score is predictive of inhibition. **H,** Orthogonal validation of protein-associated PI3K/Akt/mTOR signaling and the antioxidant-response element (ARE) axis were assessed in DIPG cell lines following ONC201 exposure.

expression of markers of quiescence and progenitor cell types such as SOX2 and EZH2. Predicted increased activity of activating transcription factor 4 (ATF4; z-score = 2.051, $P = 0.0104$; **Fig. 3B**), leading to antiapoptosis through unfolded protein response ($P = 5.89E{-}04$; Supplementary Fig. S5B; ref. 46) is also driven by increased PI3K/Akt signaling, inferring a mechanism of avoiding cell death processes following ONC201 treatment.

To further elucidate the role PI3K/Akt activation may be playing in resistance to ONC201, we performed high-resolution comparative and quantitative proteomic profiling following ONC201 exposure (5 μmol/L, 24 hours) across additional DIPG cell lines with varying sensitivity to ONC201; SU-DIPG-XXXVI, SU-DIPG-XIII and compared with SU-DIPG-VI (**Fig. 3F**). SU-DIPG-VI and SU-DIPG-XIII cells, less sensitive to ONC201 clustered together, away from

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024

SU-DIPG-XXXVI, which is more sensitive to ONC201. Analysis using IPA revealed mitochondrial dysfunction and activation of ClpP/KDM5A following treatment with ONC201 across all cell lines (**Fig. 3G**), further validating ONC201 to be elucidating anti-DIPG effects through mitochondrial dysfunction. Treatment with ONC201 induced activation of PI3K/Akt signaling proteins (**Fig. 3G**), including Akt, IGF1, and downregulated PTEN signaling, in all cell lines, suggesting Akt activation is a reciprocal mechanism associated with ONC201 treatment; however, greater upregulation of Akt signaling was observed in cell lines less sensitive to ONC201 (z-score: Akt SU-DIPG-XXXVI = 1.067, SU-DIPG-VI = 1.692, SU-DIPG-XIII = 2.039, mTOR: SU-DIPG-XXXVI = 0.378, SU-DIPG-VI = 1.134, SU-DIPG-XIII = 1.890). Given that unbiased global proteomic profiling results predicted increased PI3K/Akt activity following ONC201 exposure, we orthogonally validated phosphorylation changes of proteins regulated by this pathway, all of which showed increased phosphorylation in cells refractory to ONC201 following treatment (**Fig. 3H**). Activated PI3K/Akt signaling potentiated phosphorylation of Akt at Thr308 and Ser473 across DIPG lines regardless of ONC201 sensitivity; however, activation of downstream pathway proteins GSK3α, GSK3β, and p70S6K was only present in cell lines showing reduced sensitivity to ONC201 (SU-DIPG-VI, SU-DIPG-XIII, and SU-DIPG-XVII; Supplementary Fig. S5E). In cell lines more sensitive to ONC201, the increase in Akt phosphorylation occurred earlier (24 hours for HSJD-DIPG-007); however, after 48 hours, these cells became apoptotic as indicated by increased cleaved PARP (**Fig. 3H**). Such data align with our recent demonstration that ONC201 drives mitochondrial ROS production and mitochondrial structural abnormalities (25), and thereby links these responses with the oxidative DNA damage seen in these cells (γH2AX, **Fig. 3D**).

Together, the increased mitochondrial oxidative stress caused by ONC201's ClpP agonism and electron leakage (25), commensurate with increased PI3K/Akt signaling activity, may be promoting the activity of the stress sensing transcription factor nuclear factor erythroid 2–related factor 2 (NRF2; **Fig. 3G**), as increased expression of its downstream target, the reductase NQO1 was detected following ONC201 treatment ($\log_2$-fold-change = 0.28, $P = 0.0017$ and orthogonally validated; **Fig. 3C**, **E**, and **H**). NQO1 is responsible for promoting redox homeostasis and cell survival (47). In this regard, KEAP1 is known to regulate the activity of NRF2, and is degraded with ONC201 treatment, leading to decreased abundance (**Fig. 3H**). These observations are in line with previous studies that show loss of expression/degradation of KEAP1 promotes the transcriptional activity of NRF2, resulting in partial epithelial-to-mesenchymal transition but only in tumors harboring *TP53* LoF mutations (48). These observations potentially explain the persistent proliferation of *TP53*-mutant DIPG cells even in the presence of high-dose ONC201.

ONC201-driven oxidative stress drives PI3K/Akt signaling, highlighting the potential of ONC201 combined with the PI3K/Akt inhibitor paxalisib

Proteomic profiling predicted that increased PI3K/Akt signaling may be leading to decreased sensitivity of DIPG cells to ONC201 (**Fig. 3**). Previously, we showed that ONC201 increased ROS production (25); therefore, we used the potent ROS scavenger *N*-acetyl-l-cysteine (NAC) to investigate whether there was a link between increased ROS and increased PI3K/Akt signaling. NAC abrogated phosphorylation of Akt, whereas hydrogen peroxide (H_2O_2) increased phosphorylation (**Fig. 4A**; Supplementary Fig. S6A and S6B). As such, we hypothesized that inhibition of PI3K signaling may prevent the Akt-mediated cell survival signaling induced following exposure to ONC201. To investigate this, we tested whether the brain penetrant PI3K/Akt inhibitor paxalisib (previously GDC-0084; refs. 28, 29) could also suppress PI3K/Akt signaling in response to ONC201. Paxalisib decreased phosphorylation of Akt in the H3.3K27M, *TP53*-mutant and ONC201-refractory model SU-DIPG-XVII either alone or in combination with ONC201 (**Fig. 4B**; ref. 49). Again, ONC201 modulated the abundance of proteins mapping to NRF2-regulated antioxidant response, including the loss of KEAP1, increased NQO1, both abrogated by the combination with paxalisib (**Fig. 4B**) to drive cell death.

To assess adhesion-independent cell proliferation and survival of DIPG cells treated with ONC201, we performed soft agar colony-forming assays using SU-DIPG-VI that show decreased sensitivity to ONC201 as a monotherapy. Encouragingly, at physiologically relevant dosing, single agents decreased colony formation (ONC201 −0.43 $\log_2$-fold, $P = 0.007$; paxalisib −0.5 $\log_2$-fold, $P = 0.0032$), with the combination of ONC201 and paxalisib significantly decreasing colony formation beyond that achieved using either of the single agents (combination vs. UT, −1.4 $\log_2$-fold, $P = <0.0001$, combination vs. ONC201, −1 $\log_2$-fold, $P = 0.0007$, combination vs. paxalisib, −0.93 $\log_2$-fold, $P = 0.0014$; **Fig. 4C**). Indeed, ONC201 in combination with paxalisib synergized, particularly in H3.3K27M *TP53*-mutant DIPG models, regardless of whether the treatment was performed under normoxic or low-oxygen conditions (**Fig. 4D** and **E**; Supplementary Figs. S7, S8A and S8B; Supplementary Table S10); however, the combination was additive in the UON-JUMP4 model, grown in low-oxygen conditions (Supplementary Fig. S8A and S8B). As an additional control, we assessed the sensitivity of human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* donated from healthy volunteers to each drug individually and in combination, which revealed no increase in cell death; however, a reduction in PI3K/Akt/mTOR signaling was observed (Supplementary Fig. S8C and S8D).

To determine whether *TP53* status influenced ONC201 PI3K/Akt signaling, we investigated the effect of ONC201 in the *TP53*-KD and *TP53*-KO HSJD-DIPG007 models via immunoblotting. Here, ONC201 decreased SDHA abundance and ERK1/2 phosphorylation regardless of p53 status (**Fig. 4F**). Again, ONC201 significantly increased phosphorylation of Akt at both T308 and S473 residues (**Fig. 4F**; Supplementary Fig. S9) across models, including cells harboring either *TP53*-KD or *TP53*-KO. Interestingly, *TP53*-KD and *TP53*-KO HSJD-DIPG-007 cells harbored significantly increased basal levels of phosphorylation of Akt at T308, a marker of active PI3K signaling compared with the NTCs, which was further potentiated using ONC201 (**Fig. 4F**; Supplementary Fig. S9). Therefore, to determine whether paxalisib could rescue the decreased response promoted by KD and KO of *TP53* in HSJD-DIPG-007 cells, we tested ONC201 in combination with paxalisib and identified very high-level synergy in the *TP53*-KD/*TP53*-KO cells, greater than three times that of parental cells and corresponding to the level of increased PI3K signaling seen (**Fig. 4G** and **H**; Supplementary Fig. S10). Together, these *in vitro* results highlight the potential for the use of paxalisib in combination with ONC201 even in highly aggressive H3.3K27M *TP53*-mutant DIPG models.

Preclinical optimization of ONC201 combined with paxalisib

Clinical trials testing ONC201 and paxalisib as monotherapies in DIPG/DMG have demonstrated acceptable safety and toxicity profiles (NCT03416530 and NCT03696355, respectively). Therefore, to test the preclinical utility of ONC201 combined with paxalisib, we first examined their efficacy using the SU-DIPG-VI/Luc (H3.3K27M, *TP53*-mutant) and HSJD-DIPG-007 (H3.3K27M, *TP53*-wild-type)

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024

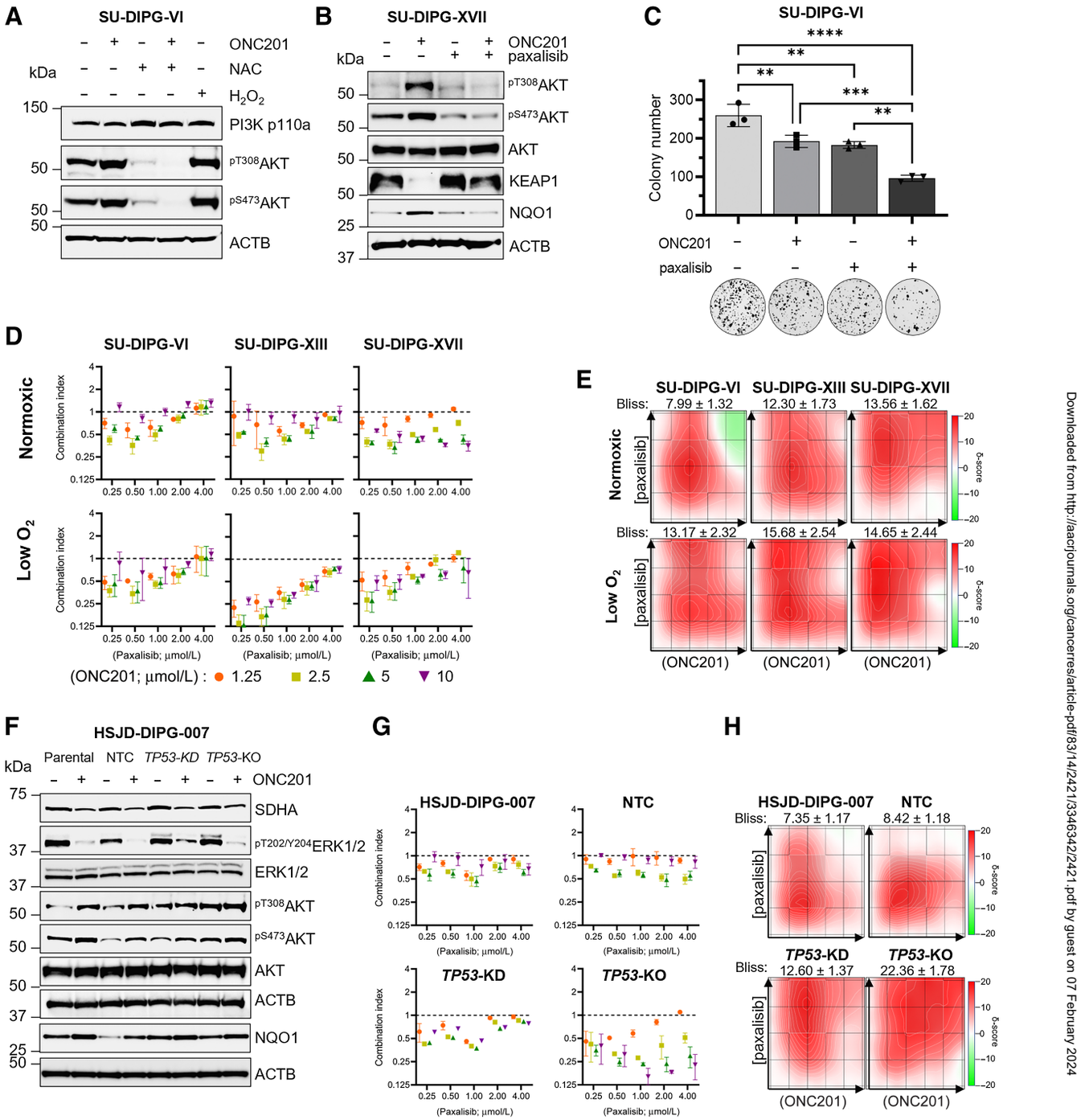


Figure 4.

ONC201 in combination with paxalisib is synergistic across DIPG models. **A,** SU-DIPG-VI was treated with 5 μmol/L ONC201 for 48 hours, 20 mmol/L NAC for 24 hours, and 1 mmol/L H_2O_2 for 1 hour, and protein changes downstream PI3K/Akt and reductase signaling were validated by Western blot. **B,** Western blot analysis of PI3K/Akt, Erk, and antioxidant response element (ARE) signaling in SU-DIPG-XVII treated with 5 μmol/L ONC201 (48 hours) and 1 μmol/L paxalisib (24 hours). **C,** SU-DIPG-VI was grown in soft agarose in colony formation for 2 weeks treated with 0.5 μmol/L ONC201, 100 nmol/L paxalisib, and the combination. The number of colonies was then quantified using ImageJ. Assay was performed in biological triplicate with representative images shown. One-way ANOVA; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$; values shown as mean ± SEM. **D** and **E,** DIPG cells SU-DIPG-VI, SU-DIPG-XIII, and SU-DIPG-XVII were passaged, grown in low oxygen (5% O_2, 5% CO_2) or atmospheric oxygen (20% O_2, 5% CO_2) conditions for a week, and then proliferation assays were performed using ONC201, paxalisib, or both for 96 hours ($n = 3$). Synergy was determined using Chou–Talalay via CompuSyn (**D**) or Bliss synergy (**E**) analysis where a combination index (CI), where <1 (dotted line) demonstrates a synergistic effect and Bliss score >10 represents a strong synergism. **F–H,** Parental wt-*TP53* HSJD-DIPG-007 and HSJD-DIPG-007 cell lines transduced with a nontargeting control (NTC) gRNA, harboring KO or KD of *TP53* were subjected to analysis following ONC201 treatment alone or in combination with paxalisib. **F,** Western blot confirmation of mitochondrial marker, SDHA, PI3K/Akt, Erk, and ARE signaling to ONC201 (5 μmol/L, 48 hours). **G** and **H,** Cells were treated with increasing concentrations of ONC201, paxalisib, or both for 96 hours, in biological triplicate. Synergy was determined using Chou–Talalay (**G**) or Bliss synergy (**H**) analysis. Chou–Talalayand Bliss synergy graphs are reported as mean ± SD.

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024

DIPG xenograft mouse models, using mouse equivalent MTDs (125 mg/kg once a week ONC201, in combination with paxalisib 10 mg/kg three times a week, or 5 mg/kg twice daily, respectively; refs. 42, 43), engrafted into the fourth ventricle/pons of NSG mice (**Fig. 5A**). SU-DIPG-VI/Luc mice were treated continuously and HSJD-DIPG-007 mice were treated for five weeks from treatment start (**Fig. 5A**). *In vivo* bioluminescence imaging (BLI) was performed immediately before drug or vehicle control administration to assess baseline tumor burden (Supplementary Fig. S11A and S11B). Using BLI as a surrogate for tumor size in SU-DIPG-VI/Luc, ONC201 had no significant effect on tumor size, whereas paxalisib significantly reduced tumor burden (paxalisib = 404.84 p sec^{-1} cm^{-2} sr^{-1}, $P = 0.0309$;

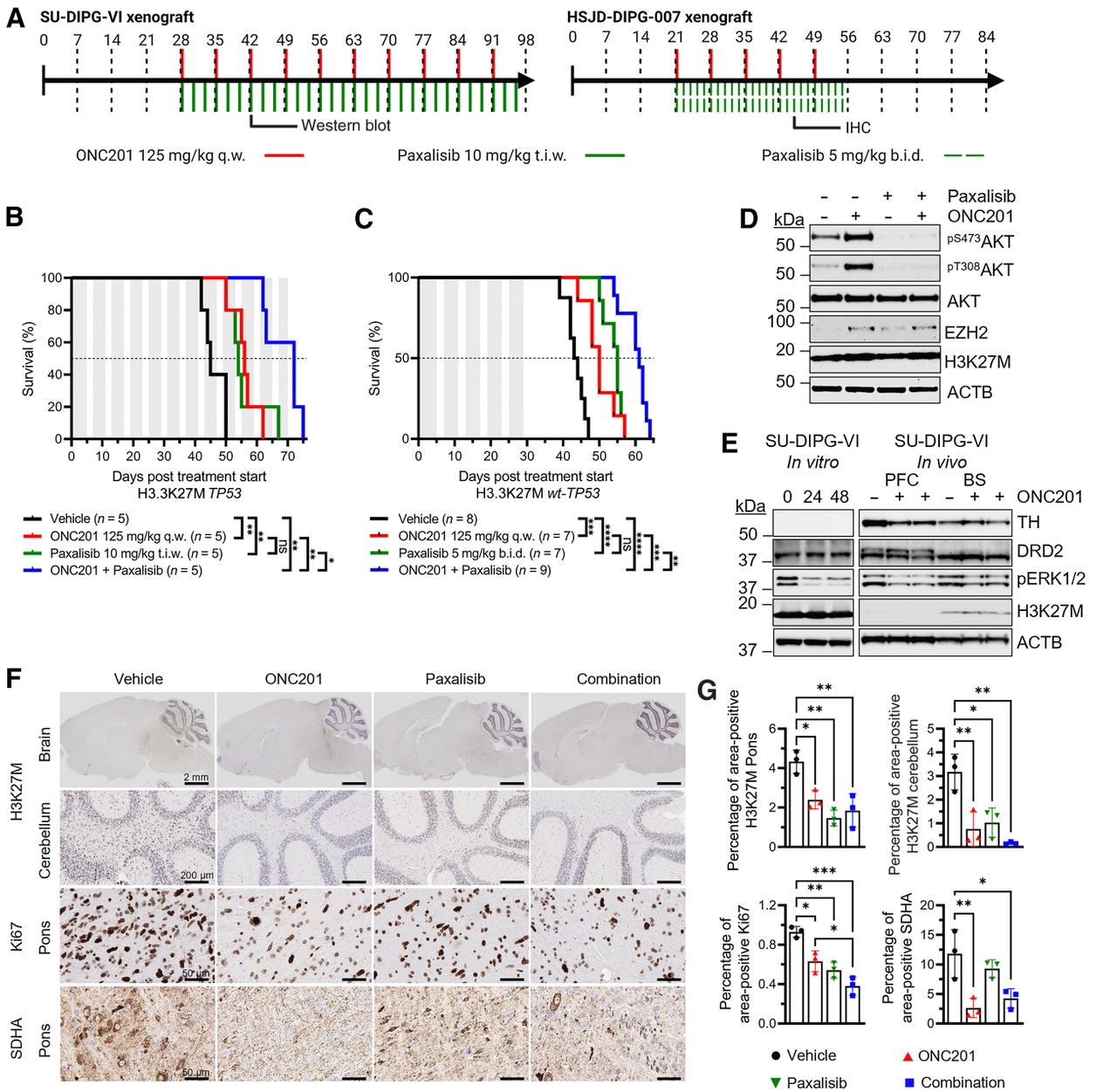


Figure 5.

ONC201 in combination with paxalisib is a synergistic drug combination in DIPG xenograft models. **A,** SU-DIPG-VI/Luc and HSJD-DIPG-007 cells were injected into the brainstem of NSG mice. Treatment was started at 4 or 3 weeks, respectively, from xenograft date. ONC201 and paxalisib were administered by oral gavage. Xenografts were sacrificed for pharmacodynamics and survival was tracked where they were culled at ethical endpoints. **B** and **C,** Survival curve analysis of days after treatment start at animal sacrifice, with significance determined by survival curve comparison for SU-DIPG-VI/Luc (**B**) and HSJD-DIPG-007 (**C**). Shading indicates treatment duration. Log-rank (Mantel–Cox) test. **D,** Tumor tissue from SU-DIPG-VI/Luc xenografts sacrificed at 2 weeks following start of treatment analyzed by Western blot. **E,** SU-DIPG-VI/Luc *in vitro* cells exposed to 5 µmol/L ONC201 for 0, 24, 48, and 72 hours compared with *in vivo* SU-DIPG-VI/Luc tissue collected from the prefrontal cortex (PFC) and brainstem (BS), treated with ONC201. **E,** Tumor tissue was resected from HSJD-DIPG-007 xenografts following 4 weeks of treatment and analyzed by IHC. **F,** Sections were stained for H3K27M, Ki67, and SDHA (representative images are presented). Scale bars, 2 mm, 200 or 50 µm. **G,** IHC images quantified via ImageJ (measured in technical triplicate, across biological replicates, $n = 3$). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$; ns, not significant. b.i.d., twice daily; q.w., once a week; t.i.w., three times a week.

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024

Supplementary Fig. S11A and S11B). ONC201, combined with paxalisib, decreased tumor burden throughout the treatment regimen compared with vehicle control (4-week mean BLI ONC201+paxalisib = 158.34 p sec^{-1} cm^{-2} sr^{-1}, $P = 0.0038$).

Both ONC201 and paxalisib as single agents significantly extended the survival of SU-DIPG-VI/Luc xenograft models compared with vehicle controls, with the combination significantly extending the survival compared with all treatments (vehicle = 45 days, ONC201 = 56 $P = 0.0082$, paxalisib = 54 days $P = 0.0082$, ONC201+paxalisib = 72 days, combination vs. vehicle $P = 0.0027$, combination *vs.* paxalisib $P = 0.0198$, and combination *vs.* ONC201 $P = 0.0044$, after treatment start; **Fig. 5B**; ref. 50). In the SU-DIPG/VI model, we identified some early toxicity using 10 mg/kg three times a week (Supplementary Fig. S11C); therefore, treated HSJD-DIPG-007 mice with 5 mg/kg twice daily to improve tolerability (Supplementary Fig. S11D). In the ONC201-sensitive, HSJD-DIPG-007 model, ONC201 provided an increased survival (vehicle = 43.5 vs. ONC201 = 50 days, $P = 0.0009$), and twice daily low-dose paxalisib also provided an improved survival advantage (vehicle vs. paxalisib = 55 days, $P < 0.0001$; **Fig. 5C**). Together the combination both significantly increased survival effect versus controls (combination = 61 days, $P < 0.0001$) and was synergistic compared with monotherapies (ONC201 vs. combination, $P = 0.0003$; paxalisib vs. combination, $P = 0.0019$; **Fig. 5C**). Analogous to *in vitro* studies (**Fig. 4**), tumors resected from SU-DIPG-VI/Luc^+ DIPG xenograft mice treated for two weeks, showed increased Akt phosphorylation and expression of EZH2 following ONC201 treatment alone, consistent with our *in vitro* proteomic profiling, with the former rescued using paxalisib (**Fig. 5D**). To determine the systemic effects of ONC201 treatment *in vivo*, we measured the expression of tyrosine hydroxylase (TH; **Fig. 5E**). ONC201 treatment decreased TH expression in the prefrontal cortex, but not in brainstem where the SU-DIPG-VI cell line was engrafted (**Fig. 5E**). ONC201 decreased Erk phosphorylation in both the prefrontal cortex and brainstem (**Fig. 5E**), commensurate with global effects on DRD2 inhibition, suggesting that systemic effects of DRD2 inhibition and Erk phosphorylation may contribute to efficacy observed in these models. To assess pharmacodynamic markers of treatment response, we performed IHC on fixed tumor tissue following 4 weeks of treatment. Tumor was detected in the pons of all animals; however, compared with the controls, decreased H3K27M staining was seen across biological replicates, including in the cerebellum of treated mice (**Fig. 5F** and **G**; $P < 0.05$). Compared with the controls, decreased staining of the proliferation marker Ki67 was also seen across treatments (ONC201, $P = 0.0114$; paxalisib, $P = 0.0023$; combination $P = 0.0002$), with the combination also significantly decreased compared with ONC201 alone ($P = 0.0275$; **Fig. 5F** and **G**). Significantly decreased staining for SDHA was seen in samples treated with ONC201 and the combination (ONC201, $P = 0.008$; ONC201+paxalisib, $P = 0.0436$, respectively; **Fig. 5F** and **G**).

Using the highly aggressive H3.3K27M SF8628 DIPG xenograft model (51), paxalisib alone and the combination of ONC201 and paxalisib decreased tumor burden at early time points (day 4; vehicle vs. paxalisib, $P = 0.0075$, vehicle vs. combination $P = 0.0152$, day 10; vehicle vs. paxalisib, $P = 0.0042$, vehicle vs. combination $P = 0.0032$; Supplementary Fig. S11E), commensurate with survival analysis, where paxalisib alone provided a significant survival benefit compared with the vehicle (vehicle = 22.5 days, paxalisib = 28 days, $P = 0.0453$) as did the combination therapy (ONC201+paxalisib = 28 days, $P = 0.0002$; Supplementary Fig. S11F). The combination of ONC201 and paxalisib also increased survival of xenograft mice compared with ONC201 alone ($P = 0.0024$), and provided a modest benefit compared with paxalisib alone ($P = 0.0442$; Supplementary Fig. S11F).

Case reports of ONC201 combined with paxalisib in patients with DIPG at diagnosis or disease progression

To demonstrate the potential utility of ONC201 in combination with paxalisib, we report two recent DIPG case studies of patients that received both ONC201 and paxalisib through compassionate access. These patients underwent radiographic analysis according to response assessment in pediatric neuro-oncology (RAPNO). The first is a 6-year-old patient diagnosed in March, 2021, harboring H3.1K27M, *ACVR1*, and *PIK3R1* mutant DIPG identified following biopsy (**Fig. 6A**). At diagnosis, a diffuse pontine lesion was identified (**Fig. 6B** and **C**, tumor area 1,554 mm^2). The patient received 54 Gy of RT delivered in 30 fractions of 1.8 Gy in the 1 to 3 months following diagnosis. After RT MRI indicated a tumor reduction of 38.1% compared with diagnosis (**Fig. 6B** and **D**; tumor area 962 mm^2). The patient began the combination treatment of ONC201 (15 mg/kg once a week) and paxalisib (27 mg/m^2 daily) 7 weeks following the after RT scan, corresponding to 5 months after diagnosis. Tumor size remained relatively stable over the next consecutive MRIs (**Fig. 6E** and **F**, tumor area = 1,156 and 1,224 mm^2, respectively). Encouragingly, 9 months after diagnosis, a substantial 62.1% decrease in tumor area based on T2-weighted images was recorded from the previous MRI, representing a 70.1% reduction compared with diagnosis and 51.8% reduction compared with after RT (**Fig. 6B** and **G**; tumor area = 464 mm^2), showing a partial response. Furthermore, 12 months after diagnosis, 8 months into the ONC201 and paxalisib combination, the tumor had reduced by 80.3% and 68.2%, compared with diagnosis and after RT, respectively (**Fig. 6B** and **H**; tumor area = 306 mm^2). Clinically, 24 months after diagnosis, the tumor remains stable (**Fig. 6I**) and the patient continues to do well, experiencing continued reduction in DIPG-associated clinical symptoms, and has returned to school. Intermittent toxicities during treatment included grade II mucositis during the initial few months on the combination, which responded well to dexamethasone mouthwash.

The second patient with DIPG was a 16-year-old diagnosed with DIPG (tumor area = 977.8 mm^2; **Fig. 6J–L**). The patient did not have a biopsy and began RT in combination with ONC201 (625 mg, once a week) soon after diagnosis. The patient then continued to receive ONC201 as a maintenance therapy. Clinical and radiological signs of first progression were detected 15 months after diagnosis (**Fig. 6K** and **M**; tumor area = 1,303.3 mm^2). The patient then received the combination of ONC201 and panobinostat (45 mg daily three times per week) but stopped after 3 months upon detection of further signs of disease progression (**Fig. 6K** and **N**, tumor area = 1,814 mm^2). The patient then immediately underwent re-irradiation (20 Gy delivered in 10×2 Gy fractions). Paxalisib (45 mg, 27 mg/m^2) was then combined with ONC201 (625 mg) 18 months after diagnosis and continued until the patient succumbed to Pneumocystis pneumonia (PCP), 24 months after diagnosis. The acquired PCP was attributed to concomitant steroid use and hence, the patient was unable to continue either therapy, ultimately passing away 6 months after re-irradiation. T2 axial MR scans during ONC201 and paxalisib treatment showed partial response, with a 34% reduction in total tumor area compared with regression (**Fig. 6N–P**) and 9% reduction during treatment with ONC201 and paxalisib (**Fig. 6O** and **P**), a reduction not seen when ONC201 was combined with RT at diagnosis (**Fig. 6K**, **O**, and **P**). Autopsy analysis revealed viable tumor with no evidence of growth when compared with the latest MRI 1 month earlier, with the family of

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024

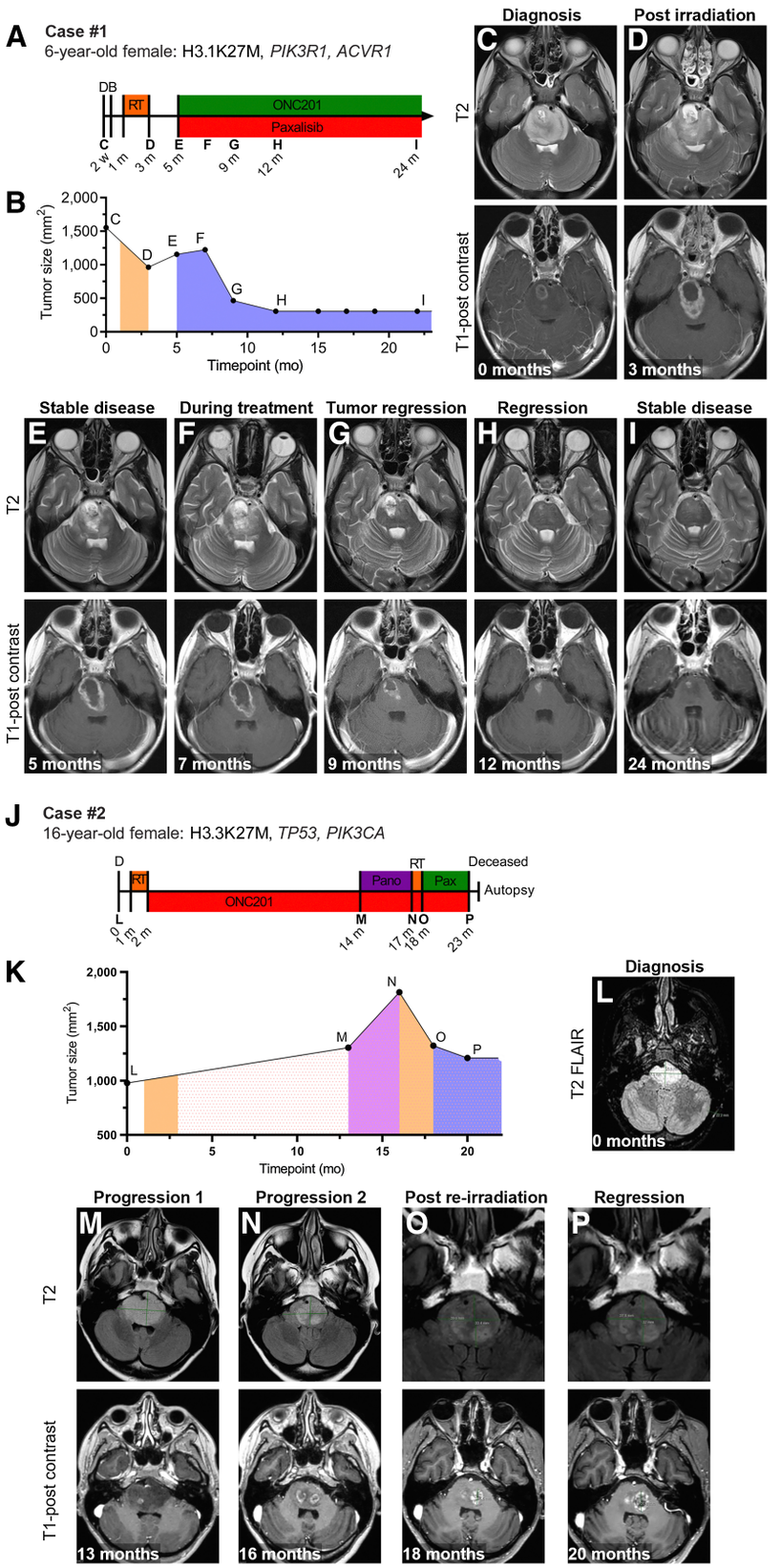


Figure 6.

ONC201 in combination with paxalisib drives tumor regression and increased survival in DIPG case studies. **A,** Six-year-old H3.1K27M, *PIK3R1, ACVR1* mutant patient with DIPG underwent biopsy soon after diagnosis and received 54 Gy radiotherapy over 30 fractions. MRI was performed six weeks after the completion of radiotherapy, and compassionate access was granted for the use of paxalisib to target *PIK3R1* mutations. Family of the patient sourced German ONC201 and started concurrently with paxalisib. **B,** Tumor size at diagnosis, following radiotherapy and throughout treatment. **C,** T2 and T1 after contrast MR axial scans at patient diagnosis, tumor area = 1,554 mm^2. **D,** Following radiotherapy, tumor area decreased by 38.1% to 962 mm^2 compared with diagnosis. **E,** MRI showed that tumor area was stable following radiotherapy = 1,156 mm^2, 20.2% progression. Following this scan, the ONC201 (15 mg/kg once a week) and paxalisib (27 mg/m^2 daily) combination was started. **F,** MRI following 8 weeks on the combination tumor area was stable (1,224 mm^2), 6% increase. **G,** Tumor regression was seen after 20 weeks on the drug combination. Tumor area = 464 mm^2; tumor reduction by 62% compared with the last scan. **H,** Most recent MRI. Tumor area = 306 mm^2; total tumor area reduction compared with diagnosis = 80%. **I,** The patient continues to remain on the combination 22 months following diagnosis. **J–P,** Sixteen-year-old H3.3K27M, *TP53, PIK3CA* mutant patient with DIPG received 54 Gy over 30 fractions. Patient enrolled in the ONC201 monotherapy trial NCT03416530 and experienced stable disease for 2 months. Following radiological and clinical progression, the patient received panobinostat (45 mg daily three times a week) with ONC201 (625 mg once a week). Further progression was seen in the subsequent MRI, where the patient then received reirradiation. The patient immediately commenced ONC201 and paxalisib, both on compassionate grounds. **K,** Tumor area measured throughout treatment. **L,** T2 and T1 after contrast MR axial scans at patient diagnosis. Tumor area = 977.8 mm^2. **M,** MRI following first progression. Tumor area = 1,303.3 mm^2. **N,** Patient received panobinostat in combination with ONC201; MRI image following the combination. Tumor area = 1,814 mm^2. Following, this patient received reirradiation and ONC201 (15 mg/kg once a week) and paxalisib (27 mg/m^2 daily) **O,** Tumor regression was seen 8 weeks after re-RT, while receiving ONC201 in combination with paxalisib. Tumor area = 1,322.6 mm^2. **P,** Tumor regression was again seen after 20 weeks on the combination; tumor area = 1,209 mm^2, 20 months after diagnosis. Patient continued to receive ONC201 and paxalisib for the next 3 months and then contracted pneumonia and passed away 24 months from diagnosis.

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024

the child also reporting no signs of DIPG-associated clinical symptoms before the infection. NGS of post-mortem tumor tissue identified typical H3.3K27M, *TP53*, *PIK3CA* mutations (**Fig. 6J**), highlighting the potential of combined use of ONC201 and paxalisib for the treatment of DIPG at diagnosis and disease progression.

Discussion

The recent development and sharing of patient-derived models has helped to illustrate the high level of inter- and intratumoral heterogeneity of DIPG and DMG, results that highlight the need for combined therapies that target the metabolic rather than the genomic/epigenetic heterogeneity of the disease (6, 13). In this study, we have used a pharmaco–proteogenomic approach to inform a combination treatment regimen to improve response to the imipridone, ONC201, and build upon the preliminary promising efficacy of the drug for the treatment of DIPG (15, 21).

ONC201 is currently being assessed in 12 clinical trials worldwide, including in H3K27-altered gliomas (NCT03295396, NCT03416530 and NCT02525692) that reveal a preliminary survival benefit (27). ONC201 increased median OS for H3K27M brainstem tumor patients (DIPG) to 20 months ($P = 0.0002$), from the historical 11.9 months. Patients who received ONC201 outside of trials purchased by their families from a German oncologist survived 18 months, whereas those who also underwent re-irradiation survived 22 months (15, 52). Although these preliminary results are favorable, patients still succumb within 18–20 months, with some patients failing upfront treatment, indicating mechanisms of intrinsic resistance. Here, we present evidence that decreased response is influenced by PI3K/Akt signaling; prompting us to test the clinically relevant PI3K/Akt inhibitor, paxalisib (NCT03696355; refs. 28, 49), both in DIPG cell line models that were sensitive and resistant to ONC201. Combined treatment with ONC201 and paxalisib rescued the therapeutic potential of ONC201 in refractory models, independent of the availability of oxygen and independent of *TP53* status, highlighting the potential for this drug combination therapy to combat the metabolic, spatial, and genetic heterogeneity of DIPG. Commensurate with these *in vitro* discoveries, combined treatment tested in two out of three DIPG xenograft models significantly extended the survival of mice compared with monotherapies, whereas the combination had an additive effect in the other.

We show that ONC201 targets DRD2 and ClpP in DIPG models *in vitro* and xenograft models *in vivo*. DIPG models harboring *TP53* mutations show decreased sensitivity to ONC201. This is distinct from previous studies revealing ONC201 to be effective in *TP53*-mutant non-DIPG cancer models (17). Irrespective of sensitivity, ONC201 elicits potent agonism of the mitochondrial protease, ClpP, which drives mitochondrial degradation and ROS production. Previous studies showed ONC201 to be a selective antagonist of DRD2 and DRD3, causing cell death through TRAIL signaling (22). Overexpression of DRD2 has been correlated with ONC201 sensitivity (53), with antagonism shown to decrease the pro-proliferative effects of DRD2 signaling in glioblastoma, mediated, in part, by Ras/Erk, confirmed in DMG cell lines *in vitro* (15). This mode of action is in agreement with the DRD2 antagonist activity of haloperidol, an FDA approved antipsychotic, which also decreased Erk activity, analogous to the response of DIPG cells that are refractory to ONC201 (15), while having no effect on Akt. The importance of DRD2 antagonism was further highlighted following CRISPR/Cas9–mediated DRD2 KD, a strategy that proved lethal to DIPG cells *in vitro*. In several DIPG cell line models, including SU-DIPG-VI, ONC201 showed limited cytostatic effects; however, when the same cell line was implanted into the brainstem of mice, ONC201 provided a significant survival advantage compared with controls. It is plausible that these *in vivo* results reflect ONC201's role in global DRD2 antagonism rather than in the tumor alone. DIPG synthesize and secrete dopamine, a characteristic that is likely supportive of DIPG gliomagenesis (54). In glioblastoma, elevated DRD2 expression is seen in glioma-initiating cell populations, with stimulation causing neuron-like hyperpolarization exclusively driving sphere-formation and increasing tumor engraftment in PDX models (47). Here, we observe that treatment of mice with ONC201 decreased expression of TH in the prefrontal cortex suggestive of global antagonism of DRD2; however, further mechanistic insights are needed to elucidate the antitumor benefit in DMGs at this time. It is highly probable that paracrine dopamine signaling also occurs in DIPG as these cells express TH, analogous to electrochemical communications between DIPG and neurons transmitted through synapses to drive proliferation, differentiation, and survival (55). It was recently shown that DIPG patients with increased ^{18}F-DOPA uptake during MRI showed decreased sensitivity to RT ($P = 0.001$) and experienced worse outcomes independently correlating ^{18}F-DOPA uptake with OS (54). These studies highlight the potential benefit in assessing ^{18}F-DOPA during routine MRI monitoring of patients receiving ONC201 and may contribute to predicting response to ONC201.

Our studies support the findings that ClpP is an important target of ONC201 in DIPG, where agonism caused mitochondrial dysfunction (22), and *CLPP* KD abrogated ONC201's anti-DIPG effects *in vitro* (24). Regardless of sensitivity, ONC201 drives oxidative stress (following ClpP-mediated degradation of SDHA, IDH3B, CLS, COX4LI1, COX5A, and COX10; ref. 24); however, in nonsensitive cells, promotes redox activation of PI3K/Akt; however, the mechanism promoting reduced sensitivity in *TP53*-mutant lines remains unknown. Akt inactivates GSK3α/β a well-characterized mechanism of metabolic rescue driven by increased glycogen and protein synthesis to promote cell survival (49). GSK3α/β also cooperates with Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1; ref. 50) to repress the activity of the transcription factor, NRF2 (*NFE2L2)*. Yet under mitochondrial and oxidative stress, KEAP1 is degraded and NRF2 translocates to the nucleus, binding to the antioxidant response elements at gene promoters to combat oxidative stress, by promoting expression of the two-electron reductase NQO1 (38), this response could be inhibited through the combination with paxalisib to drive cell death. Here, we show that *TP53*-KO in HJSD-DIPG-007 leads to increased phosphorylation of Akt at Thr308 and Ser473, further promoting expression of NQO1 in line with this proposed mechanism of action. In addition, treatment with ONC201 increases phosphorylation of Akt at Thr308 and Ser473 further promoting expression of NQO1. It is important to note that the DIPG xenograft mouse survival benefit provided by the combination was modest, commensurate with the insidious clinical journey experienced by DIPG patients. Early clinical experience from the two cases we report using ONC201 in combination with paxalisib is promising. Both patients demonstrated resolution of clinical symptoms and radiographic tumor regression. The first patient, who demonstrated the more dramatic response and continual regression of the primary tumor extending >24 months after diagnosis, remains on the combination at the time of submission. In addition, this strategy was also used in a H3.3K27M, *TP53*, *PIK3CA* mutant DIPG patient enrolled on the phase I clinical trial (NCT03416530) testing oral ONC201 in pediatric patients with newly diagnosed DIPG, experiencing an almost complete regression of the progressive tumor to initial diagnosis size and a reversal of clinical symptoms, regression not seen following upfront RT+ONC201, although the re-RT might have

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024

contributed to this response. Both patients tolerated the treatments well by combining treatment with dexamethasone mouthwash. The optimal dose and timing of the combination and whether these enhance the effects of standard-of-care RT either in the upfront or relapse setting remain to be determined, given that both patients also received either upfront or re-irradiation, respectively. However, in this study, we cannot explicitly rule out the contribution of paxalisib to patient response as both patients commenced ONC201 before or at the same time as paxalisib; furthermore, the contribution of paxalisib for patients harboring PI3K mutations has not yet been determined; questions that will be elucidated under clinical trial conditions. In addition, the off-target effects of paxalisib are currently unknown.

We acknowledge that ONC201 in combination with paxalisib may not be solely responsible for the almost complete resolution of the disease, particularly at advanced stages, given the modest xenograft results using immune-compromised mouse models. Indeed, H3K27M mutant DIPGs are known to reside in an immunologically cold tumor microenvironment devoid of inflammatory immune cells (7). The global loss of the H3K27me3-mediated epigenetic landscape within DIPG cells is similar to those seen in embryonic stem cells (56) characterized by little to no expression of the MHC I proteins, making these primitive cells less visible to the immune system (57). The observed change in the epigenetic landscape following ONC201 treatment and following modulation of oxidative stress may play a role in the immunogenicity of DIPG, particularly in patients with an active immune system. The partial restoration in H3K27me3 following ONC201 treatment is consistent with recent data showing that H3K27M mutations drive TCA cycle protein expression (58). Here, we show that ONC201 drives potent degradation of IDH3A/B and hence loss of mitochondrial TCA-cycle function. This, in turn, may modulate the production of epigenetic cofactors required to maintain hypomethylation of H3K27me3 (59). This highlights the emerging link between H3K27M mutations and metabolic and epigenetic plasticity (58), which may play a role in the immunogenicity of the tumor, driving an anticancer response from the immune system.

The preclinical and clinical data provided here underpin the recently commenced phase II clinical trial (NCT05009992), where we are seeking to determine whether ONC201 in combination with paxalisib is an effective regimen for treating patients with DIPG and DMG at diagnosis, after RT and at the time of progression when patients are eligible for re-irradiation. This multimodal clinical trial will assess safety of single agents in combination with upfront RT or re-irradiation for patients commencing the trial at advanced stages that we hope will form the backbone of future combination studies. We hypothesize that rationally designed combination trials, informed by rigorous preclinical data, will improve outcomes for these poor prognosis cancers. Integration of correlative studies will be critical for assessment of predictive biomarkers of response and refinement of inclusion and exclusion criteria for specific combination therapies.

Authors' Disclosures

A. Patabendige reports grants from NSW Ministry of Health, Australia and Hunter Medical Research Institute during the conduct of the study; as well as nonfinancial support from Pharmidex, UK and Flocel Inc. outside the submitted work. B. Day reports personal fees from Black Diamond Therapeutics, University of Sydney, and DC Europa outside the submitted work. J.R. Hansford reports personal fees from Bayer Australia, Boxer Capital, and Alexion Pharmaceuticals Australia outside the submitted work. R. Endersby reports other support from Cancer Council WA and Pirate Ship Foundation during the conduct of the study. N.G. Gottardo reports personal fees from Bayer, DayOne, and Eli Lily outside the submitted work. F. Alvaro reports personal fees from Norgine B.V. outside the submitted work. D.D. Eisenstat reports personal fees from Bayer Australia Ltd. outside the submitted work. M.D. Dun reports grants from Kazia Therapeutics during the conduct of the study. No disclosures were reported by the other authors.

Authors' Contributions

E.R. Jackson: Formal analysis, investigation, visualization, writing–original draft, writing–review and editing. **R.J. Duchatel:** Formal analysis, supervision, investigation, visualization, writing–original draft, writing–review and editing. **D.E. Staudt:** Formal analysis, investigation, writing–review and editing. **M.L. Persson:** Investigation. **A. Mannan:** Investigation. **S. Yadavilli:** Investigation. **S. Parackal:** Investigation. **S. Game:** Investigation. **W.C. Chong:** Investigation. **W.S.N. Jayasekara:** Investigation. **M. Le Grand:** Investigation, writing–review and editing. **P.S. Kearney:** Investigation. **A.M. Douglas:** Project administration. **I.J. Findlay:** Formal analysis, investigation. **Z.P. Germon:** Investigation. **H.P. McEwen:** Investigation. **T.S. Beitaki:** Investigation. **A. Patabendige:** Resources, writing–review and editing. **D.A. Skerrett-Byrne:** Investigation, methodology, writing–review and editing. **B. Nixon:** Methodology, writing–review and editing. **N.D. Smith:** Methodology. **B. Day:** Resources. **N. Manoharan:** Investigation, patient care. **S. Nagabushan:** Investigation, patient care. **J.R. Hansford:** Writing–review and editing. **D. Govender:** Investigation. **G.B. McCowage:** Investigation, writing–review and editing. **R. Firestein:** Writing–review and editing. **M. Howlett:** Writing–review and editing. **R. Endersby:** Writing–review and editing. **N.G. Gottardo:** Writing–review and editing. **F. Alvaro:** Investigation, writing–review and editing. **S.M. Waszak:** Investigation, writing–review and editing. **M.R. Larsen:** Methodology, writing–review and editing. **Y. Colino-Sanguino:** Writing–review and editing. **F. Valdes-Mora:** Writing–review and editing. **A. Rakotomalala:** Writing–review and editing. **S. Meignan:** Investigation, writing–review and editing. **E. Pasquier:** Resources, investigation, writing–review and editing. **N. Andre:** Writing–review and editing. **E. Hulleman:** Resources, writing–review and editing. **D.D. Eisenstat:** Writing–review and editing. **N.A. Vitanza:** Resources, writing–review and editing. **J. Nazarian:** Conceptualization, resources, supervision, writing–review and editing. **C. Koschmann:** Conceptualization, resources, supervision, writing–review and editing, patient care. **S. Mueller:** Conceptualization, resources, supervision, writing–review and editing. **J.E. Cain:** Conceptualization, resources, supervision, writing–review and editing. **M.D. Dun:** Conceptualization, resources, supervision, funding acquisition, visualization, methodology, writing–original draft, writing–review and editing.

Acknowledgments

The authors acknowledge all children and their families diagnosed with DIPG. The authors thank Profs. Michelle Monje and Angel Carcaboso for their generous gift of their DIPG cell line models. M.D. Dun is supported by a ChadTough Defeat DIPG New Investigator Grant and an NHMRC Investigator Grant—GNT1173892. The contents of the published material are solely the responsibility of the research institutions involved or individual authors and do not reflect the views of NHMRC. This project was supported by the ChadTough Defeat DIPG Foundation, RUN DIPG Ltd., Strategic Group, McDonald Jones Foundation, Vinva Foundation, PNOC Foundation, Yuvaan Tiwari Foundation, Kiriwina Investments, The Kids' Cancer Project, The DIPG Collaborative, including: The Cure Starts Now Foundation, The Cure Starts Now Australia, Brooke Healey Foundation, Wayland Villars Foundation, ChadTough Foundation, Aidan's Avengers, Austin Strong, Cure Brain Cancer, Jeffrey Thomas Hayden Foundation, Laurie's Love Foundation, Love Chloe Foundation, Musella Foundation, Pray Hope Believe, Reflections Of Grace, Storm the Heavens Fund, Aubreigh's Army, Whitley's Wishes, Ryan's Hope, Benny's World, The Isabella and Marcus Foundation, Lauren's Fight for Cure, Robert Connor Dawes Foundation, The Gold Hope Project, Julia Barbara Foundation, Lily Larue Foundation, American Childhood Cancer Organization, RUN DIPG, Gabriella's Smile Foundation, and Snapgrant.com, Charlie Teo Foundation, Little Legs Foundation, Tour de Cure, Fight on the Beaches, John Hunter Hospital Charitable Trust, Edie's Kindness Project, Liv Like A Unicorn Foundation, Maitland Cancer Appeal Committee Limited, BlackJack Pastoral Company, The Hirsch Family Funderpants, and the Hunter Medical Research Institute. Kazia Therapeutics provided funding to support personnel of M.D. Dun's laboratory. With thanks to the Isabella and Marcus Foundation, E.R. Jackson and S. Game are supported by the Miette Skiller Scholarship Fund (Josephine Dun and Elliot Gautsch Scholars, respectively), a sub-fund of the Australian Communities Foundation. E.R. Jackson is supported by an HCRA Scholarship. R.J. Duchatel is supported by a ChadTough Defeat DIPG Foundation Fellowship Grant. M. Le Grand, A. Rakotomalala, S. Meignan, and E. Pasquier received funding from "Association Wonder Augustine" and "Association Warrior Enguerrand" for their DIPG studies. M. Le Grand is supported by a postdoctoral

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024

fellowship from the French ARC Foundation. S. Parackal is supported by a Children's Cancer Foundation/Hudson Institute Scholarship. W.C. Chong is supported by a Monash University Postgraduate Award. J.E. Cain is supported by a Victorian Cancer Agency Mid-Career Fellowship (MCRF17014). N.G. Gottardo is supported by the Perth Children's Hospital Foundation Stan Perron Chair in Pediatric Oncology and Hematology. The authors would also like to acknowledge support from the Zero Childhood Cancer Initiative, Children's Cancer Foundation, and Bailey's Day. F. Valdes-Mora is supported by the Cancer Institute NSW Fellowship CDF181218. J.R. Hansford is supported through grants from the McClurg and Hospital Research Foundations. The clinical trial is supported by Mithil Prasad Foundation, ChadTough Defeat DIPG Foundation, and Storm the Heavens, the last also supporting S. Meignan. Proteomics was facilitated by N.D. Smith from The Analytical and Biomolecular Research Facility and The Academic and Research Computing Support (ARCS) team, within IT Services at the University of Newcastle, who provided high-performance computing (HPC) infrastructure for bioinformatics analyses. Histology services were provided by Cassandra Griffin, Fiona Richards, Megan Clarke, and Kaylee O'Brien from the HMRI Core Histology Facility. IHC optimization and staining services were provided by The University of Newcastle's "NSW Regional Biospecimen and Research Services," with support from NSW Health Pathology.

The publication costs of this article were defrayed in part by the payment of publication fees. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

Note

Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (http://cancerres.aacrjournals.org/).

Received March 22, 2023; revised April 26, 2023; accepted May 3, 2023; published first May 5, 2023.

References

1. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. Neuro Oncol 2017;19:v1–v88.
2. Warren K. Diffuse intrinsic pontine glioma: poised for progress. Front Oncol 2012;2:205.
3. Hoffman LM, Veldhuijzen van Zanten SEM, Colditz N, Baugh J, Chaney B, Hoffmann M, 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;36:1963–72.
4. Sulman EP, Eisenstat DD. World cancer day 2021—perspectives in pediatric and adult neuro-oncology. Front Oncol 2021;11:659800.
5. Pincus DW, Richter EO, Yachnis AT, Bennett J, Bhatti MT, Smith A. Brainstem stereotactic biopsy sampling in children. J Neurosurg 2006;104:108–14.
6. Findlay IJ, De Iuliis GN, Duchatel RJ, Jackson ER, Vitanza NA, Cain JE, et al. Pharmaco-proteogenomic profiling of pediatric diffuse midline glioma to inform future treatment strategies. Oncogene 2022;41:461–75.
7. Persson ML, Douglas AM, Alvaro F, Faridi P, Larsen MR, Alonso MM, et al. The intrinsic and microenvironmental features of diffuse midline glioma: implications for the development of effective immunotherapeutic treatment strategies. Neuro Oncol 2022;24:1408–22.
8. Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu XY, Fontebasso AM, Bouffet E, et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. Acta Neuropathol 2012;124:439–47.
9. Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. Nature 2012;482:226–31.
10. Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfort J, et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. Nat Genet 2012;44:251–3.
11. Antin C, Tauziede-Espariat A, Debily MA, Castel D, Grill J, Pages M, et al. EZHIP is a specific diagnostic biomarker for posterior fossa ependymomas, group PFA and diffuse midline gliomas H3-WT with EZHIP overexpression. Acta Neuropathol Commun 2020;8:183.
12. Chan KM, Fang D, Gan H, Hashizume R, Yu C, Schroeder M, et al. The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. Genes Dev 2013;27:985–90.
13. 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;32:520–37.
14. Duchatel RJ, Jackson ER, Alvaro F, Nixon B, Hondermarck H, Dun MD. Signal transduction in diffuse intrinsic pontine glioma. Proteomics 2019;19:e1800479.
15. 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.
16. Arrillaga-Romany I, Kurz S, Tarapore R, Lu G, Sumrall A, Butowski N, et al. Clinical efficacy of ONC201 in recurrent H3 K27M-mutant diffuse midline glioma patients. Neuro Oncol 2021;23:vi230-vi.
17. Ishizawa J, Kojima K, Chachad D, Ruvolo P, Ruvolo V, Jacamo RO, et al. ATF4 induction through an atypical integrated stress response to ONC201 triggers p53-independent apoptosis in hematological malignancies. Sci Signal 2016;9:ra17.
18. Wagner J, Kline CL, Zhou L, Khazak V, El-Deiry WS. Anti-tumor effects of ONC201 in combination with VEGF-inhibitors significantly impacts colorectal cancer growth and survival in vivo through complementary non-overlapping mechanisms. J Exp Clin Cancer Res 2018;37:11.
19. Greer YE, Porat-Shliom N, Nagashima K, Stuelten C, Crooks D, Koparde VN, et al. ONC201 kills breast cancer cells *in vitro* by targeting mitochondria. Oncotarget 2018;9:18454–79.
20. Fang Z, Wang J, Clark LH, Sun W, Yin Y, Kong W, et al. ONC201 demonstrates anti-tumorigenic and anti-metastatic activity in uterine serous carcinoma *in vitro*. Am J Cancer Res 2018;8:1551–63.
21. Arrillaga-Romany I, Chi AS, Allen JE, Oster W, Wen PY, Batchelor TT. A phase 2 study of the first imipridone ONC201, a selective DRD2 antagonist for oncology, administered every three weeks in recurrent glioblastoma. Oncotarget 2017;8:79298–304.
22. Allen JE, Krigsfeld G, Mayes PA, Patel L, Dicker DT, Patel AS, et al. Dual inactivation of Akt and ERK by TIC10 signals Foxo3a nuclear translocation, TRAIL gene induction, and potent antitumor effects. Sci Transl Med 2013;5:171ra17.
23. Ishizawa J, Zarabi SF, Davis RE, Halgas O, Nii T, Jitkova Y, et al. Mitochondrial ClpP-mediated proteolysis induces selective cancer cell lethality. Cancer Cell 2019;35:721–37.
24. Madhukar NS, Khade PK, Huang L, Gayvert K, Galletti G, Stogniew M, et al. A bayesian machine learning approach for drug target identification using diverse data types. Nat Commun 2019;10:5221.
25. 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.
26. Pruss M, Dwucet A, Tanriover M, Hlavac M, Kast RE, Debatin KM, et al. Dual metabolic reprogramming by ONC201/TIC10 and 2-Deoxyglucose induces energy depletion and synergistic anti-cancer activity in glioblastoma. Br J Cancer 2020;122:1146–57.
27. Kawakibi AR, Tarapore RS, Gardner S, Chi A, Kurz S, Wen PY, et al. Hgg-18. clinical efficacy of Onc201 in thalamic H3 K27m-mutant glioma. Neuro-oncol 2020;22:iii347–iii.
28. Duchatel R, Jackson E, Patabendige A, Cain J, Tsoli M, Monje M, et al. DIPG-03. targeting PI3K using the blood brain barrier penetrable inhibitor, GDC-0084, for the treatment of diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG). Neuro-oncol 2019;21:ii68–ii.
29. Wen PY, Cloughesy TF, Olivero AG, Morrissey KM, Wilson TR, Lu X, et al. First-in-human Phase I study to evaluate the brain-penetrant PI3K/mTOR inhibitor GDC-0084 in patients with progressive or recurrent high-grade glioma. Clin Cancer Res 2020;26:1820–8.

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024

30. Hutcheon K, McLaughlin EA, Stanger SJ, Bernstein IR, Dun MD, Eamens AL, et al. Analysis of the small non–protein-coding RNA profile of mouse spermatozoa reveals specific enrichment of piRNAs within mature spermatozoa. RNA Biol 2017;14:1776–90.
31. Khan A, Gamble LD, Upton DH, Ung C, Yu DMT, Ehteda A, et al. Dual targeting of polyamine synthesis and uptake in diffuse intrinsic pontine gliomas. Nat Commun 2021;12:971.
32. Dun MD, Anderson AL, Bromfield EG, Asquith KL, Emmett B, McLaughlin EA, et al. Investigation of the expression and functional significance of the novel mouse sperm protein, a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin Type 1 motifs number 10 (ADAMTS10). Int J Androl 2012;35:572–89.
33. Degryse S, de Bock CE, Demeyer S, Govaerts I, Bornschein S, Verbeke D, et al. Mutant JAK3 phosphoproteomic profiling predicts synergism between JAK3 inhibitors and MEK/BCL2 inhibitors for the treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2018;32:788–800.
34. Aoki Y, Hashizume R, Ozawa T, Banerjee A, Prados M, James CD, et al. An experimental xenograft mouse model of diffuse pontine glioma designed for therapeutic testing. J Neurooncol 2012;108:29–35.
35. Ozawa T, James CD. Establishing intracranial brain tumor xenografts with subsequent analysis of tumor growth and response to therapy using bioluminescence imaging. J Vis Exp 2010:1986. doi: 10.3791/1986.
36. Perez-Riverol Y, Bai J, Bandla C, Garcia-Seisdedos D, Hewapathirana S, Kamatchinathan S, et al. The PRIDE database resources in 2022: a hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. Nucleic Acids Res 2022;50:D543–D52.
37. Arrillaga-Romany I, Odia Y, Prabhu VV, Tarapore RS, Merdinger K, Stogniew M, et al. Biological activity of weekly ONC201 in adult recurrent glioblastoma patients. Neuro Oncol 2020;22:94–102.
38. Rakotomalala A, Bailleul Q, Savary C, Arcicasa M, Hamadou M, Huchede P, et al. H3.3K27M mutation controls cell growth and resistance to therapies in pediatric glioma cell lines. Cancers 2021;13:5551.
39. Bax DA, Little SE, Gaspar N, Perryman L, Marshall L, Viana-Pereira M, et al. Molecular and phenotypic characterisation of paediatric glioma cell lines as models for preclinical drug development. PLoS ONE 2009;4:e5209.
40. Xu C, Liu H, Pirozzi CJ, Chen LH, Greer PK, Diplas BH, et al. TP53 wild-type/PPM1D mutant diffuse intrinsic pontine gliomas are sensitive to a MDM2 antagonist. Acta Neuropathol Commun 2021;9:178.
41. Zhang M, Zhuang G, Sun X, Shen Y, Wang W, Li Q, et al. TP53 mutation-mediated genomic instability induces the evolution of chemoresistance and recurrence in epithelial ovarian cancer. Diagn Pathol 2017;12:16.
42. McLeod C, Gout AM, Zhou X, Thrasher A, Rahbarinia D, Brady SW, et al. St. Jude Cloud: a pediatric cancer genomic data-sharing ecosystem. Cancer Discov 2021;11:1082–99.
43. Martinez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. Nat Commun 2020;11:102.
44. Li J, Zhu S, Kozono D, Ng K, Futalan D, Shen Y, et al. Genome-wide shRNA screen revealed integrated mitogenic signaling between dopamine receptor D2 (DRD2) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in glioblastoma. Oncotarget 2014;5:882–93.
45. Ali AK, Nandagopal N, Lee SH. IL15–PI3K–AKT–mTOR: a critical pathway in the life journey of natural killer cells. Front Immunol 2015;6:355.
46. Pallmann N, Livgard M, Tesikova M, Zeynep Nenseth H, Akkus E, Sikkeland J, et al. Regulation of the unfolded protein response through ATF4 and FAM129A in prostate cancer. Oncogene 2019;38:6301–18.
47. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional regulation by Nrf2. Antioxid Redox Signal 2018;29:1727–45.
48. Drainas AP, Lambuta RA, Ivanova I, Sercin O, Sarropoulos I, Smith ML, et al. Genome-wide screens implicate loss of cullin ring ligase 3 in persistent proliferation and genome instability in TP53-deficient cells. Cell Rep 2020;31:107465.
49. He C, Xu K, Zhu X, Dunphy PS, Gudenas B, Lin W, et al. Patient-derived models recapitulate heterogeneity of molecular signatures and drug response in pediatric high-grade glioma. Nat Commun 2021;12:4089.
50. Rose WC, Wild R. Therapeutic synergy of oral taxane BMS-275183 and cetuximab versus human tumor xenografts. Clin Cancer Res 2004;10:7413–7.
51. Mueller S, Hashizume R, Yang X, Kolkowitz I, Olow AK, Phillips J, et al. Targeting wee1 for the treatment of pediatric high-grade gliomas. Neuro Oncol 2014;16:352–60.
52. Andre N, Buyens G, Bouffet E, Walker D, Dun MD. Access to new drugs in paediatric oncology: can we learn from the ongoing ONC201 saga? Lancet Oncol 2023;24:209–12.
53. Kline CLB, Ralff MD, Lulla AR, Wagner JM, Abbosh PH, Dicker DT, et al. Role of dopamine receptors in the anticancer activity of ONC201. Neoplasia 2018;20:80–91.
54. Morana G, Tortora D, Bottoni G, Puntoni M, Piatelli G, Garibotto F, et al. Correlation of multimodal (18)F-DOPA PET and conventional MRI with treatment response and survival in children with diffuse intrinsic pontine gliomas. Theranostics 2020;10:11881–91.
55. Venkatesh HS, Morishita W, Geraghty AC, Silverbush D, Gillespie SM, Arzt M, et al. Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. Nature 2019;573:539–45.
56. Harutyunyan AS, Krug B, Chen H, Papillon-Cavanagh S, Zeinieh M, De Jay N, et al. H3K27M induces defective chromatin spread of PRC2-mediated repressive H3K27me2/me3 and is essential for glioma tumorigenesis. Nat Commun 2019;10:1262.
57. Drukker M, Katz G, Urbach A, Schuldiner M, Markel G, Itskovitz-Eldor J, et al. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:9864–9.
58. Chung C, Sweha SR, Pratt D, Tamrazi B, Panwalkar P, Banda A, et al. Integrated metabolic and epigenomic reprograming by H3K27M mutations in diffuse intrinsic pontine gliomas. Cancer Cell 2020;38:334–49.
59. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, et al. Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. Cell 2016;164:550–63.

Downloaded from http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/14/2421/3346342/2421.pdf by guest on 07 February 2024