**THESE de DOCTORAT**

**Université de Lille**

**Ecole Graduée Biologie-Santé de Lille**

Spécialité : biologie cellulaire

# Etablissement et caractérisation d'un nouveau modèle d'étude préclinique de DMG-sur-puce

Présentée et soutenue publiquement par

**Lisa TERRASSOUX**

**Le 16 Juin 2025**

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

Membres du Jury

| | |
|---|---|
| **Dr. Sophie MARTIN**<br>Directrice de Recherche - CNRS | Rapportrice |
| **Dr. Virginie FIRLEJ**<br>Maîtresse de conférences - Université Paris Est Créteil | Rapportrice |
| **Dr. Maria- Carla PARRINI**<br>Ingénieure de Recherche - Institut Curie | Examinatrice |
| **Pr. Xuefen LE BOURHIS**<br>Professeure des Universités - Université de Lille | Examinatrice |
| **Dr. Samuel MEIGNAN**<br>Directeur de recherche - Centre Oscar Lambret | Examinateur |
| **Dr. Alessandro FURLAN**<br>Maître de conférences - Université de Lille | Directeur de thèse |

# Remerciements

Je tenais à exprimer ma reconnaissance en premier lieu auprès des membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'expertiser mon travail. Tout particulièrement, je remercie les Docteures Sophie MARTIN et Virginie FIRLEJ d'avoir accepté le rôle de rapporteures de cette thèse, ainsi que la Docteure Maria-Carla PARRINI, le Docteur Samuel MEIGNAN et la Professeure Xuefen LE BOURHIS en qualité d'examinateurs de mes travaux de recherche.

Mes travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'UMR Canther « Hétérogénéité, Plasticité et Résistance aux Thérapies des Cancers » (UMR 9020 CNRS – 1277 Inserm) de l'Institut ONCOLille, dirigé par la Docteure Isabelle VAN SEUNINGEN, que je tiens à remercier pour son accueil. Par ailleurs, je remercie le Professeur Xuefen LE BOURHIS pour son accueil au sein de l'équipe « Plasticité » depuis mon premier stage de Licence 3.

Je remercie également le Professeur Eric LARTIGAU, directeur du Centre Oscar Lambret, pour son accueil au sein de l'Unité Tumorigenèse et Résistance aux Traitements (UTRT).

Je tenais également à remercier l'Institut pour la Recherche Contre le Cancer de Lille, dirigé par le Professeur Michel SALZET, pour l'obtention de mon financement m'ayant permis de finaliser mes travaux de recherche. J'adresse aussi un merci particulier aux membres de cet Institut pour leur bienveillance et leur bonne humeur.

J'adresse également un profond merci au Docteur Fabrice SONCIN, pour sa gentillesse, sa patience, et son encadrement incroyable lors des extractions d'ARN, sans oublier les petites pauses goûter !

Un grand merci au Docteur Anthony TREIZEBRE, pour toutes ces heures passées à mettre au point le circuit microfluidique et pour sa bonne humeur constante.

Au sein de l'équipe UTRT, je tenais également à remercier Karine pour ses petites anecdotes ne manquant pas de pimenter nos repas au COL. Je remercie aussi Yousr pour ses précieux conseils sur l'analyse d'images.

Mélanie, je tenais à te remercier tout particulièrement pour m'avoir encadrée, notamment pour les Western blots, et pour nos petits débats avec Paulux en fin de journée ! Je te remercie également pour tous les bons moments passés ensemble, à la pause café ou encore au restaurant !

Merci également à Joanne pour m'avoir accompagnée sur ce sujet parfois glissant, et surtout pour ta patience et toutes les mises au point que tu as faites pour rendre ce projet d'autant plus

robuste. Je te remercie aussi pour ton sens de l'humour imparable et tous les fous rires qui en ont découlé à l'IRCL. Merci d'avoir su me rassurer à bien des égards sur les expériences, et d'avoir toujours été optimiste !

Calypso, merci pour tous ces moments partagés à l'IRCL, qui resteront de très bons souvenirs. Je te remercie aussi pour ce que tu as développé et réalisé sur ce projet, notamment la RT. Je te souhaite bon courage pour la suite de ta thèse et plein de réussites pour ton projet.

Pour compléter cette équipe de choc, il fallait deux commères : Paulux et Agathe, que je ne remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi, tant sur le plan professionnel que personnel. Paulux, merci pour toutes nos séances de papotage au labo, m'ayant permis de vider mon sac, merci d'avoir toujours été présent, d'avoir fait quelques missions de « sauvetages de manip » pour moi ! Merci pour ces débats, en fin de journée, à refaire le monde et pour tes cours d'histoire (la première guerre mondiale n'est-ce pas ^^) qui n'ont pas manqué de m'apprendre plein de choses. Merci à toi aussi, Agathe, pour tout ce que tu as fait pour ce projet, pour ta rigueur, et pour avoir été une binôme de PDMS en or ! Merci encore d'avoir été aussi présente pour moi, pour nos journées shopping, nos sorties, et pour m'avoir motivée à me mettre au sport (même si, avous-le, nos séances s'apparentent plus à des moments de papotages ^^). En tout cas, je suis très heureuse de vous avoir rencontré, encore merci à « la team point potins » pour tous ces moments passés en dehors du labo, et j'espère que beaucoup d'autres viendront !

Je tenais à exprimer ma profonde reconnaissance au Docteur Alessandro FURLAN pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet particulièrement original. Je vous adresse également mes remerciements pour vos relectures et commentaires sur mes écrits, qui ne manqueront pas de me faire progresser, anisi que pour vos précieux conseils et expertises sur la conduite du projet ! Par ailleurs, je vous remercie pour vos excellents tiramisus qui n'ont pas manqué de régaler nos papilles !

Forte de cette équipe, je me devais de garder le meilleur pour la fin : le Docteur Samuel MEIGNAN, qui m'a acceptée au sein de son équipe en Licence 3 et avec qui j'ai poursuivi l'ensemble de mes stages. Merci pour tout : votre bienveillance, votre encadrement qui m'a permis de progresser, vos précieux conseils lors des relectures et présentations. Je tenais également à vous remercier pour avoir mis en place un « système de gâteaux » bien rodé, nous permettant d'avoir toujours de quoi manger dans le bureau !

Je tenais également à grandement remercier mes parents et mes amis. Tout d'abord, Lolo et Paulo, mes deux confidents, qui savent toujours me redonner le sourire et qui ont toujours les mots justes pour me dé-stresser ! Ensuite, mes parents, sans qui cette aventure Lilloise aurait été difficilement réalisable et pour m'avoir soutenue dans cette aventure, et une mention spéciale à toi

Papa pour m’avoir aidé avec le codage de la macro Fiji, et toi Maman, pour avoir corrigé les fautes de mon manuscrit et l’organisation du pot (c’est très important la nourriture) !

Pour finir je tenais à remercier mon petit frère, Alex. Merci de m’avoir regardé avec des étoiles dans les yeux quand je te parlais de ce que je faisais. Merci de m’avoir rappelé la beauté de ce que l’on accomplit en faisant de la recherche, de m’avoir donné tant de courage et de confiance en moi. Tu as été mon inspiration durant tout mon parcours et tu continueras de l’être, ta force et ténacité sont un exemple pour tous, alors, je te dédie cette thèse.

# Résumé

**Mots-clés** : Gliomes diffus de la ligne médiane (DMG), Microenvironnement tumoral, Tumeur-sur-puce, Hypoxie, Microfluidique, Matrice extracellulaire, Evaluation de traitements

Les gliomes diffus de la ligne médiane sont des tumeurs cérébrales pédiatriques ayant un pronostic particulièrement sombre avec une médiane de survie inférieure à un an. Depuis l'entrée dans les standards d'une biopsie diagnostique systématique, la caractérisation de ces tumeurs a considérablement évolué avec notamment la découverte des mutations récurrentes H3 K27M. Ces connaissances nouvelles ont donné lieu à des stratégies anti-tumorales innovantes aux résultats précliniques prometteurs. Cependant, les essais cliniques basés sur ces thérapies développées en laboratoire échouent encore à améliorer la survie des jeunes patients.

Nous avons émis l'hypothèse que cette divergence entre les résultats précliniques et cliniques pourrait être due à l'absence, dans les modèles d'étude actuels, de divers éléments critiques du microenvironnement tumoral natif. L'objectif de ma thèse était donc de mettre au point un modèle préclinique innovant intégrant notamment une matrice extracellulaire 3D pertinente ainsi qu'une forte densité cellulaire amenant à la mise en place d'un gradient d'hypoxie. Une barrière hémato-encéphalique (BHE) se devait de pouvoir compléter ce modèle afin de mimer cet obstacle majeur dans l'accès des agents pharmacologiques aux tumeurs cérébrales.

Dans ce contexte, j'ai développé un modèle inédit de DMG-sur-puce basé sur une matrice 3D cellularisée et confinée entre deux substrats imperméables aux liquides et aux gaz. Ainsi, l'apport en oxygène mais aussi en nutriments n'est uniquement possible que de manière radiale, à partir de la gouttière périphérique entourant ce disque matriciel. L'ensemble, parfaitement compatible avec la microscopie, permet un suivi en temps réel de l'évolution et de la réponse aux traitements des cellules de DMG. De plus, la présence de connecteurs rend possible le raccordement du dispositif, *via* un circuit microfluidique, à un modèle de BHE humaine.

Après avoir défini le design, la composition et le paramétrage de ce modèle, nous en avons réalisé une caractérisation physique et biologique poussée. Celle-ci a révélé la mise en place rapide d'un gradient radial de densité cellulaire (lié à une prolifération cellulaire accrue en périphérie), du taux d'oxygène, mais aussi du niveau d'acidification. Une analyse RNAseq a, de plus, confirmé l'instauration d'une hypoxie centrale, associée à des remaniements métaboliques et à un stress cellulaire.

Forts de ce modèle, nous avons pu cartographier la réponse de lignées cellulaires de DMG à l'ONC201, ainsi qu'à la radiothérapie, traitement de référence de ces tumeurs, et ce, de façon spatio-temporelle. Ces expériences mettaient en lumière une hétérogénéité de réponse au sein de la puce mais également entre les lignées cellulaires. Dans ce contexte, nous avons également eu l'opportunité d'implémenter dans le dispositif un prélèvement de DMG directement issu d'un patient afin de nous rapprocher toujours plus de la réalité clinique.

Nos efforts ont ainsi abouti à l'obtention d'un nouveau modèle pertinent d'étude préclinique des DMG fonctionnel et caractérisé, désormais à la disposition de la communauté scientifique impliquée dans la lutte contre ces cancers. La versatilité de cet outil le rend, de plus, transposable à un large éventail de tumeurs solides demeurant encore aujourd'hui dans une impasse thérapeutique.

# Abstract

**Keywords**: Diffuse midline gliomas (DMG), Tumor microenvironment, Tumor-on-a-chip, Hypoxia, Microfluidics, Extracellular matrix, Treatment evaluation

Diffuse midline gliomas are pediatric brain tumors with a particularly poor prognosis, with a median survival of less than one year. Since the introduction of systematic diagnostic biopsy, the characterization of these tumors has evolved considerably, notably with the discovery of recurrent H3 K27M mutations. This new knowledge has led to innovative anti-tumor strategies with promising preclinical results. However, clinical trials based on these laboratory-developed therapies still fail to improve survival in young patients.

We hypothesized that this discrepancy between preclinical and clinical results could be due to the absence, in the current study models, of various critical elements of the native tumor microenvironment. Therefore, my thesis aimed to develop an innovative preclinical model incorporating a relevant 3D extracellular matrix and a high cell density, leading to the establishment of a hypoxia gradient. A blood-brain barrier (BBB) should complement the model to mimic this major obstacle to the access of pharmacological agents to brain tumors.

In this context, I have developed a novel DMG-on-a-chip model based on a cellularized 3D matrix confined between two liquid- and gas-impermeable substrates. Oxygen and nutrient supply is thus only possible radially, from the peripheral gutter surrounding the matrix disk. The whole system is perfectly compatible with microscopy, enabling real-time monitoring of the evolution of DMG cells and their response to treatment. In addition, plugs enable the device to be connected *via* a microfluidic circuit to a human BBB model.

After defining this model's design, composition, and parameterization, we carried out an in-depth physical and biological characterization of the chip. This revealed the rapid establishment of a radial gradient in cell density (linked to increased cell proliferation in the periphery), oxygen levels and acidification levels. RNAseq analysis also confirmed the establishment of central hypoxia, associated with metabolic changes and cellular stress.

Using this model, we could map the response of DMG cell lines to ONC201 and radiotherapy, the reference treatment for these tumors, in a spatio-temporal manner. These experiments highlighted the heterogeneity of response both within the chip and between cell lines. In this context, we also had the opportunity to implement a DMG sample directly from a patient in the device to get even closer to clinical reality.

Our efforts have thus resulted in a relevant, functional, and characterized new model for the preclinical study of DMGs, now available to the scientific community involved in the fight against these cancers. In addition, the versatility of this tool means that it can be transposed to a wide range of solid tumors that are still in therapeutic impasse

# Table des matières

**Introduction ..... 1**

I. Les tumeurs cérébrales pédiatriques ..... 1

A. Présentation des tumeurs cérébrales pédiatriques ..... 1

1. Généralités ..... 1

2. Origine cellulaire des gliomes ..... 1

3. La classification des gliomes pédiatriques ..... 2

4. Les symptomatologies et diagnostics ..... 4

B. Contexte moléculaire des DMG altérés H3 K27 ..... 5

1. L'Histone 3 ..... 5

2. L'altération de l'oncohistone H3 K27M et ses impacts au sein des DMG ..... 6

3. Les altérations secondaires dans les DMG altérés H3 K27M ..... 8

4. Impact de la mutation H3.3 K27M sur le phénotype des DMG ..... 9

C. Stratégies de traitements des DMG ..... 9

1. La radiothérapie comme traitement de référence des DMG ..... 9

2. Les innovations thérapeutiques ..... 10

II. Microenvironnement des gliomes pédiatriques de haut-grade ..... 16

A. Généralités sur le microenvironnement des gliomes pédiatriques de haut-grade ..... 16

1. La matrice extracellulaire ..... 16

2. Environnement cellulaire des pHGG ..... 20

B. Généralités sur l'hypoxie ..... 22

1. Les facteurs de transcriptions HIF ..... 24

2. Implication dans la résistance aux traitements au sein des tumeurs solides ..... 26

C. Barrière hémato-encéphalique ..... 32

1. Physiologie de la BHE ..... 32

2. Organisation de la barrière physique de la BHE ..... 35

3. Implications de l'unité vasculaire dans le développement des gliomes ..... 37

4. Altération de la barrière hémato-encéphalique dans le cadre des glioblastomes ..... 38

III. Les modèles d'études des DMG ..... 40

A. Modèles de cultures cellulaires des DMG ..... 40

1. Modèle de lignées cellulaires 2D et 3D ..... 40

2. Modèles d'organoïdes tumoraux ..... 41

B. Les différents modèles de DMG chez la souris ..... 42

1. Modèle transgénique ..... 42

2. Modèles de xénogreffes ..... 43

C. Les différents modèles de glioblastome-sur-puce ..... 45

1. Définition des organes-sur-puce et généralités ..... 46

2. Modèles de tumeurs- sur-puce ..... 50

**Objectif de la thèse ..... 58**

**Matériels et Méthodes ..... 59**

I. Culture cellulaire et traitements ..... 59

A. Culture des lignées de DMG altérés H3 K27 ..... 59

B. Composés pharmacologiques ..... 59

1. ONC201 ..... 59
2. Paxalisib ..... 59
C. Protocole d'irradiation ..... 60
II. Réalisation de la TSP ..... 60
A. Préparation du feuillet en PDMS ..... 60
B. Réalisation de la tumeur-sur-puce ..... 61
C. Modèle de BHE ..... 61
1. Etablissement du modèle de BHE ..... 61
2. Mesure de la perméabilité de la BHE ..... 62
III. Circuit microfluidique ..... 64
A. Matériaux et équipements utilisés ..... 64
B. Stérilisation des matériaux ..... 64
C. Montage du circuit microfluidique ..... 65
IV. Mesure du taux d'oxygène ..... 65
A. Utilisation du PtOEPK ..... 65
B. Utilisation des billes OxNano ..... 66
C. Utilisation du feuillet Presens ..... 66
V. Mesure de l'expression transcriptionnelle ..... 67
A. Extraction des ARN ..... 67
B. Dosage et analyse qualité des ARN ..... 68
C. RNA sequencing ..... 68
VI. Marquages fluorescents ..... 69
A. Prolifération cellulaire ..... 69
B. Mort cellulaire ..... 70
1. CellEvent™ Caspases 3/7 ..... 70
2. SYTOX™ green ..... 70
3. Iodure de Propidium ..... 70
C. Immunofluorescences dirigées contre HIF1-α ..... 71
D. Immunofluorescence contre pFAK ..... 71
1. Inclusion des matrices et réalisation des cryo-coupes ..... 71
2. Marquages ..... 72
VII. Analyse d'images ..... 72
A. Analyse d'images Presens pour le taux d'oxygène ..... 72
B. Analyse d'images confocal ..... 73
**Résultats ..... 74**
I. Détermination de la géométrie de la tumeur-sur-puce ..... 74
II. Composition de la matrice extracellulaire ..... 76
III. Caractérisation du gradient de densité cellulaire ..... 77
A. Détermination de la concentration cellulaire optimale ..... 77
B. Etude de la prolifération cellulaire ..... 80
C. Contraintes mécaniques liées à la haute densité cellulaire ..... 81
IV. Caractérisation du gradient d'hypoxie ..... 83
A. Mesure physique de la teneur en oxygène au sein de la matrice ..... 83
B. Mesure du pH au sein de la TSP ..... 88
C. Caractérisation moléculaire de l'hypoxie ..... 88

V. Etude du transcriptome ..... 90
A. Etude de la signature hypoxique ..... 92
B. Etude de la signature métabolique ..... 92
C. Analyse en GSEA de la voie de l'UPR ..... 94
D. Etude de la signature apoptotique ..... 95
VI. Réponse aux thérapies ..... 96
A. Mise au point de la visualisation de la mort cellulaire ..... 96
B. Evaluation de la réponse des cellules des DMG aux thérapies ..... 98
1. Réponse des cellules de DMG à la radiothérapie ..... 98
2. Réponse des cellules de DMG aux imipridones ..... 99
3. Evaluation préliminaire de la réponse des cellules de DMG au paxalisib ..... 99
VII. Implémentation de tumoroïdes issus de patients ..... 101
A. Visualisation de la morphologie cellulaire ..... 101
B. Mesure du taux d'oxygène ..... 102
C. Etude de la réponse des tumoroïdes à la radiothérapie ..... 102
VIII. Article 1 : "A novel DMG-on-Chip recapitulating tumour biophysical microenvironment unravels the heterogeneity of response to therapies" ..... 103
IX. Intégration microfluidique du modèle de BHE ..... 104
A. Mise en place du circuit microfluidique ..... 104
B. Caractérisation préliminaire du taux d'oxygène en condition dite « en flux » ..... 106
C. Impact du flux sur la perméabilité de la BHE ..... 107
**Discussion ..... 108**
**Conclusion générale ..... 119**
**Références Bibliographiques ..... 120**
**Annexe : "A Bloody Conspiracy—Blood Vessels and Immune Cells in the Tumor Microenvironment" ..... 143**

# Table des figures

Figure 1 : Présentation des différents sous-types de pHGG selon la classification de l'OMS. ..... 3

Figure 2 : Impact de l'oncohistone H3 K27M sur le paysage épigénétique des cellules de DMG. ..... 7

Figure 3 : Représentation des stratégies de traitements contre les DMG. ..... 15

Figure 4 : Représentation des différents composés de la matrice extracellulaire. ..... 17

Figure 5 : Représentation schématique des différentes sous populations cellulaires au sein d'un DMG altéré H3 K27M ..... 21

Figure 6 : Facteurs contribuant à l'instauration d'une hypoxie tumorale. ..... 23

Figure 7 : Régulation de la sous unité HIF1α. ..... 26

Figure 8 : Implication de l'hypoxie dans la radiorésistance. ..... 29

Figure 9 : Représentation schématique de la structure de la barrière hémato-encéphalique. ..... 33

Figure 10 : Exemples de différents modèles d'organe-sur-puce ..... 49

Figure 11 : Représentation schématique du dispositif de GBM-sur-puce permettant l'étude des cellules souches gliales. ..... 51

Figure 12 : Représentation schématique d'un modèle de GBM-sur-puce pour l'étude de l'angiogenèse. ..... 52

Figure 13 : Représentation schématique d'une puce mimant la niche périvasculaire. ..... 54

Figure 14 : Représentation shchématique du modèle de glioblastome-sur-puce. ..... 55

Figure 15 : Représentation schématique des deux configurations possibles du modèle Oxalis. ..... 56

Figure 16 : Représentation schématique de l'expérience. ..... 63

Figure 17 : Représentation schématique des dispositifs utilisés afin de créer une tumeur-sur-puce .. 75

Figure 18 : Images des différentes matrices testées afin de réaliser la TSP. ..... 77

Figure 19 : Photos des différentes concentrations cellulaires testées avec les cellules HSJD-DIPG-007. ..... 78

Figure 20 : Observation du choix de la concentration cellulaire de 10 000 cellules/µL et de la matrice hyaluronane à haut poids moléculaire avec différentes lignées cellulaires de DMG. ..... 79

Figure 21 : Analyse anatomopathologique d'une coupe de TSP et d'une coupe de DMG. ..... 80

Figure 22 : Visualisation du taux d'oxygène grâce à une sonde chimique, le PtOEPK. ..... 84

Figure 23 : Caractérisation physique du taux d'oxygène au sein de la TSP. ..... 86

Figure 24 : Analyse transcriptomique du centre et de la périphérie de la TSP. ..... 90

Figure 25 : Analyse des signatures transcriptomiques pour les lignées cellulaires HSJD-DIPG-007 et -012. ..... 91

Figure 26 : Analyse des signatures métaboliques. ..... 93

Figure 27 : Analyse d'enrichissements de la voie UPR. ..... 94

Figure 28 : Analyse de la signature apoptotique. ..... 95

Figure 29 : Visualisation de la mort cellulaire avec de l'iodure de propidium. ..... 97

Figure 30 : Evaluation préliminaire de la réponse des DMG au paxalisib. ..... 101

Figure 31 : Intégration du modèle de BHE au sein du circuit microfluidique. ..... 104
Figure 32 : Mesure du débit microfluidique..... 105
Figure 33 : Mesure du taux d'oxygène au sein d'une TSP en flux. ..... 106

# Abréviations

| | |
|---|---|
| **ABC** | ATP Binding Cassette |
| **ABCB1** | ABC subfamily B member 1 |
| **Ac-like** | Astrocyte- like |
| **ACVR1** | Activin A receptor, type 1 |
| **ADN** | Acide Désoxyribonucléique |
| **AH** | Acide Hyaluronique |
| **Akt** | Protéine Kinase B |
| **ARN** | Acide Ribonucléique |
| **ATP** | Adénosine triphosphate |
| **BAX** | Bcl-2 Associated X- protein |
| **BCL-2** | B-cell lymphoma 2 |
| **BCRP** | Breast Cancer Resistance Protein |
| **BHE** | Barrière Hémato-Encéphalique |
| **BIOMEDE** | Biological Medecine for DIPG Erradication |
| **BMP** | Bone Morphogenetic Protein |
| **CAF** | Cancer Associated Fibroblast |
| **CBP** | CREB-Binding protein |
| **Cellules NK** | Cellules Natural Killer |
| **CSG** | Cellules Souches de Glioblastome |
| **CI** | Checkpoint immunitaire |
| **ClpP** | Caseinolytic mitochondrial matrix peptidase |
| **COL5A1** | Collagen type V alpha 1 chain |
| **c-Src** | Proto-oncogene Tyrosine protein Kinase Src |
| **CTRL** | Contrôle |
| **CYP1A1** | Cytochrome P450, famille 1, sous-famille A, polypeptide 1 |
| **DE** | Différentiellement exprimé |
| **DIPG** | Diffuse intrinsic pontine glioma |
| **DMG** | Diffuse middline glioma |
| **DNA-PK** | DNA-dependant protein kinase |
| **DRD2** | Dopamin receptor $D_2$ |
| **EED** | Embryonic ectoderm develpment |
| **EdU** | 5-éthynyl-2'-déoxyuridine |
| **EGF** | Epidermic growth factor |
| **EGFR** | EGF receptor |
| **EMAP II** | Endothelial monocyte-activating polypeptide-II |
| **EPO** | Erythropoïétine |
| **ERK5** | Extracellular signal-related kinase 5 |
| **ESAM** | Endothelial cell adhesion molecule |
| **ESM1** | Endothelial cell specific molecule 1 |
| **ETFE** | Ethylène tétrafluoroéthylène |
| **EZH1/2** | Enhencer of Zeste 1/2 Polycomb repressive complex 2 subunit |
| **EZHIP** | EZH Inhibitory Protein |
| **FAK** | Focal Adhesion Kinase |
| **FASN** | Fatty acid synthase |
| **FGF** | Fibroblast Growth Factor |
| **FIH** | Factor- Inhibiting HIF |
| **FITC** | fluorescéine isothiocyanate |
| **GAG** | Glycosaminoglycane |
| **GBM** | Glioblastome |
| **GFAP** | Glial Fibrillary Acidic Protein |
| **GLUT** | Glucose transporteur |
| **GSEA** | Get Set Enrichement Analysis |
| **GSH** | Glutathion |
| **GST** | Glutathion S-Transférase |
| **Gy** | Gray |
| **HAS 1/2/3** | Hyaluronan Synthase 1/2/3 |
| **HAT** | Histones Acétyltransférase |
| **HBP** | Hexosamine Pathway |
| **HDAC** | Histone Désacétylase |
| **HIF** | Hypoxia Inducible Factor |
| **HIFAL** | lncRNA antisens *HIF1α* |
| **HUVEC** | Human Umbilical Vein Endothelial Cells |
| **HYAL1/2** | Hyaluronidase ½ |
| **ICV** | Injection intracrânienne intracérébroventriculaire |
| **IDH1** | Isocitrate déshydrogénase 1 |
| **IFN-ϒ** | Interféron- ϒ |
| **INCa** | Institut National du Cancer |
| **IP** | Iodure de Propidium |
| **IRM** | Imagerie par résonnance magnétique |
| **JACOP** | Junction Associated coiled protein |
| **JAK** | Janus kinase |
| **JAM** | Junctional adhesion molecules |
| **KAT3A/B** | Human bromodomain CREB Binding protein (CREBBP) |

| | |
|---|---|
| **KDM** | Histone Lysine déméthylase |
| **KMT** | Histone méthyltransférase |
| **KO** | Knock-out |
| **L-2HG** | L-2- hydroxyglutarate |
| **lncRNA** | Long non coding RNA |
| **LY** | Lucifer yellow |
| **MAGUK** | Membrane-associated guanylate kinase |
| **MAPK** | Mitogen-activated protein kinase |
| **MDSC** | Myeloid-derived suppressor cells |
| **MEC** | Matrice extracellulaire |
| **MES-like** | Mesenchymal-like |
| **MGMT** | $O^6$ – méthylguanine-ADN méthyltransférase |
| **MMP** | Métalloprotéase matricielle |
| **MPP7** | MAGUK p55 subfamily member 7 |
| **MRP** | Multidrug resistance associated proteins |
| **mTOR** | Mammalian target of rapamycin |
| **mTORC** | mTOR complexe |
| **NF-kB** | Nuclear factor-k B |
| **NGS** | Normal goat serum |
| **NHEJ** | Non homologous end joining |
| **NRF2** | Nuclear Factor (erythoid-derived 2)-like 2 |
| **OC-like** | Oligodendrocyte-like |
| **OCT** | Optimal cutting temperature |
| **ODD** | Oxygen dependent domain |
| **OLIG2** | Oligodendrocyte transcription factor 2 |
| **OMS** | Organisation mondiale de la santé |
| **OPC** | Oligodendrocyte précurseur |
| **OSP** | Organe-sur-puce |
| **PAF** | Paraformaldéhyde |
| **PBS** | Phosphate buffer salin |
| **PDGF** | Platelet-derived growth factor |
| **PDGFRA** | PDGF receptor alpha |
| **PDH** | Pyruvate déshydrogénase |
| **PDK1** | PDH kinase 1 |
| **PD-L1** | Programmed death-ligand 1 |
| **PDMS** | Poly-di-methyl-siloxane |
| **PDX** | Patient derived xenograft |
| **PECAM** | Platelet endothelial cell adhesion molecule |
| **P-gp** | Glycoprotéine P |
| **PHD1/2/3** | Prolyl hydroxylase 1/2/3 |
| **pHGG** | Pediatric high-grade glioma |
| **PI3K** | Phosphoinositide 3- Kinase |
| **pLGG** | Pediatric low-grade glioma |
| **PLOD** | procollagène-lysine 1,2-oxoglutarate 5-dioxygénases |
| **PM** | Poids moléculaire |
| **PPP** | Pentose phosphate pathway |
| **PPRC1** | Perixisome proliferator-activated receptor gamma coactivator related protein 1 |
| **PRC2** | Polycomb repressive complex 2 |
| **PTEN** | Phosphatase and tensin homolog |
| **PtOEPK** | Platinium (II) Octaethylprophyrin Keton |
| **PtTFPP** | Platinum (II) meso-tetrakis (pentafluorophenyl)porphyrin |
| **pVHL** | Von hippel-Lindau tumor suppressor |
| **RAS** | Rat sarcoma virus |
| **RBBP4/7** | RB binding protein 4/7 |
| **RE** | Réticulum endoplasmique |
| **RH** | Ringer-HEPES |
| **RNA- seq** | RNA sequencing |
| **ROS** | Reactive oxygen species |
| **sDMG** | Spinale DMG |
| **SEMA3A** | Sémaphorine 3A |
| **SET** | Su(var)3-9, enhancer-of-zeste and trithorax |
| **SLC** | Solute carriers |
| **SNC** | Système nerveux central |
| **SPINK1** | Serine peptidase inhibitor kazal type 1 |
| **STAT** | Signal transducer and activator of transcription |
| **STS** | Staurosporine |
| **SREBP-1** | Sterol regulatory element- binding protein |
| **STAT** | Signal transducer and activator of transcription |
| **SUZ12** | Polycomb repressive complexe 2 Subunit |
| **TAM** | Tumor associated macrophage |
| **TCA** | Cycle des acides tricarboxyliques |

| | |
|---|---|
| **TGF- α/ β** | Transforming growth factor alpha/béta |
| **TIMP** | Tissue inhibitor of MMP |
| **TMZ** | Témolozomide |
| **TNFα** | Tumor necrosis factor α |
| **TP53** | Tumor protein 53 |
| **T-reg** | T- régulateurs |
| **TSP** | Tumeur-sur-puce |
| **UMI** | Unique molecular identifiers |
| **UNGV** | Unité neuro-glio- vasculaire |
| **UPR** | Unfolded protein response |
| **VEGF** | Vascular endothelial growth factor |
| **WB** | Western blot |
| **Wnt** | Wingless-related integration site |
| **WT** | Wild type |
| **ZO** | Zona occludens |

# Introduction

## I. Les tumeurs cérébrales pédiatriques

### A. Présentation des tumeurs cérébrales pédiatriques

#### 1. Généralités

Chaque année en France, approximativement 2 300 enfants et adolescents sont diagnostiqués avec un cancer. Les plus fréquents sont les hémopathies malignes (comprenant les leucémies et les lymphomes) ainsi que les tumeurs du système nerveux central (SNC). Selon l'Institut National du Cancer (INCa), les tumeurs du SNC sont diagnostiquées chez près de 550 enfants par an et représentent ainsi 25 % des cancers de l'enfant ceux qui en font les tumeurs solides les plus fréquentes en pédiatrie.

Les enfants diagnostiqués avec une tumeur du SNC ont un taux de survie à 5 ans supérieur à 70 %, et sont majoritairement représentés par des gliomes de bas grade (pLGG) et les médulloblastomes pour lesquels le taux de survie à 5 ans est supérieur à 75 % (Pollack et al., 2019). Cependant, les enfants porteurs d'un gliome de haut grade (pHGG), représentant 15 % à 20 % des tumeurs cérébrales pédiatriques, possèdent, eux, un pronostic très défavorable avec un taux de survie à 2 ans compris entre 5 % et 30 % (ce dernier dépendant de la localisation de la tumeur) et sont de fait la première cause de mortalité par cancer chez les moins de 19 ans (Mackay et al., 2017; Ostrom et al., 2019).

#### 2. Origine cellulaire des gliomes

La glie, tissu à partir duquel se développent les gliomes, est composée de différents types cellulaires différenciés dont les principaux au niveau du SNC sont les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales :

- Les astrocytes possèdent diverses fonctions clés axées sur l'homéostasie du SNC, en particulier sur le recyclage des neurotransmetteurs et l'équilibre ionique, mais également sur le maintien de l'intégrité des fonctions de la barrière hémato-encéphalique.
- Les oligodendrocytes ont, quant à eux, pour rôle principal la formation de la gaine de myéline entourant les axones.
- Enfin, les cellules microgliales sont des cellules immunitaires résidentes du SNC, ayant pour rôle de surveiller et de protéger le système nerveux central. Elles ont la capacité de phagocyter les débris cellulaires et d'initier les réponses immunitaires dans le cerveau.

La glie comprend également des cellules progénitrices comme les précurseurs oligodendrocytaires (OPC). En fonction des régions du SNC et du stade de développement cérébral, la proportion de ces cellules varie (Allen and Lyons, 2018). Historiquement, la classification des gliomes reposait sur leur localisation, mais également sur leur similarité histologique avec ces différents type cellulaires sains composant la glie (Jones and Baker, 2014; Louis et al., 2007); les astrocytomes sont alors considérés comme issus des astrocytes, les oligodendrogliomes des cellules oligodendrocytaires, *etc*.

## 3. La classification des gliomes pédiatriques

Afin d'intégrer les spécificités moléculaires et de classifier plus finement les différents sous-types de gliomes, une nouvelle classification, publiée en 2021 a été élaborée pour donner lieu à la 5ème édition de la classification des tumeurs du SNC par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS CNS5). L'un des changements majeurs apporté par cette dernière version est la dichotomie qui est réalisée entre les gliomes adultes et pédiatriques. Ainsi, la nouvelle classification allègue que les gliomes pédiatriques et adultes ont des *drivers* moléculaires différents (Jones et al., 2017, 2012).

Les gliomes pédiatriques sont divisés en 2 catégories en fonction du pronostic qui leur est associé : d'une part les gliomes pédiatriques de bas grade (pLGG, correspondant aux grades 1 et 2) et d'autre part les gliomes pédiatriques de haut grade (pHGG, correspondant aux grades 3 et 4). Historiquement, l'attribution des différents grades, allant de 1 pour désigner des tumeurs curables par une chirurgie, à 4 pour les tumeurs malignes associées à une survie réduite et sans thérapie efficace sur le long terme, était uniquement basée sur des critères histologiques. Au sein de la 5ème classification des tumeurs du SNC de l'OMS CNS5, le grade de la tumeur est désormais déterminé en fonction des marqueurs moléculaires qui lui sont associés. Ainsi, la présence d'une altération au niveau de l'histone H3 (H3 G34 et H3 K27), présente au niveau de certains sous-types de gliomes pédiatriques diffus de haut grade, engendre une classification automatique de la tumeur en grade 4 et ce, quelle que soit son histologie (Louis et al., 2021, 2016). De cette façon, le profil mutationnel de l'histone H3 permet de distinguer différents sous types de pHGG :

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

Les pHGG, tout comme les gliomes adultes, peuvent être localisés au niveau des hémisphères cérébraux mais également, au niveau de la ligne médiane comprenant le thalamus, le cervelet, le tronc cérébral et la moelle épinière (Jones and Baker, 2014). Le thalamus est une structure cérébrale du

diencéphale impliquée notamment dans le relais et l'intégration des afférences sensorielles. Le tronc cérébral constitue, quant à lui, un centre de passage majeur des voies motrices et sensorielles, d'où émergent dix des douze paires de nerfs crâniens, et qui permet de contrôler différentes fonctions vitales telles que la respiration, le rythme cardiaque ou encore la pression artérielle. Situé à l'arrière du tronc cérébral, le cervelet a pour fonction principale la coordination des mouvements, le maintien de l'équilibre et de la posture. Enfin, la moelle épinière rend possible la communication entre le cerveau et le reste du corps via des influx moteurs et sensoriels. Ces DMG (Diffuse Midline Glioma) se caractérisent par la perte globale de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3 K27me3) et définissent 3 sous-types moléculaires : les DMG avec mutation H3 K27M (mutants H3.3 et H3.1 ou H3.2), les DMG avec H3 sauvage combiné à une surexpression d'EZHIP et les DMG avec altération de l'EGFR (Ostrom et al., 2021) (Figure 1).

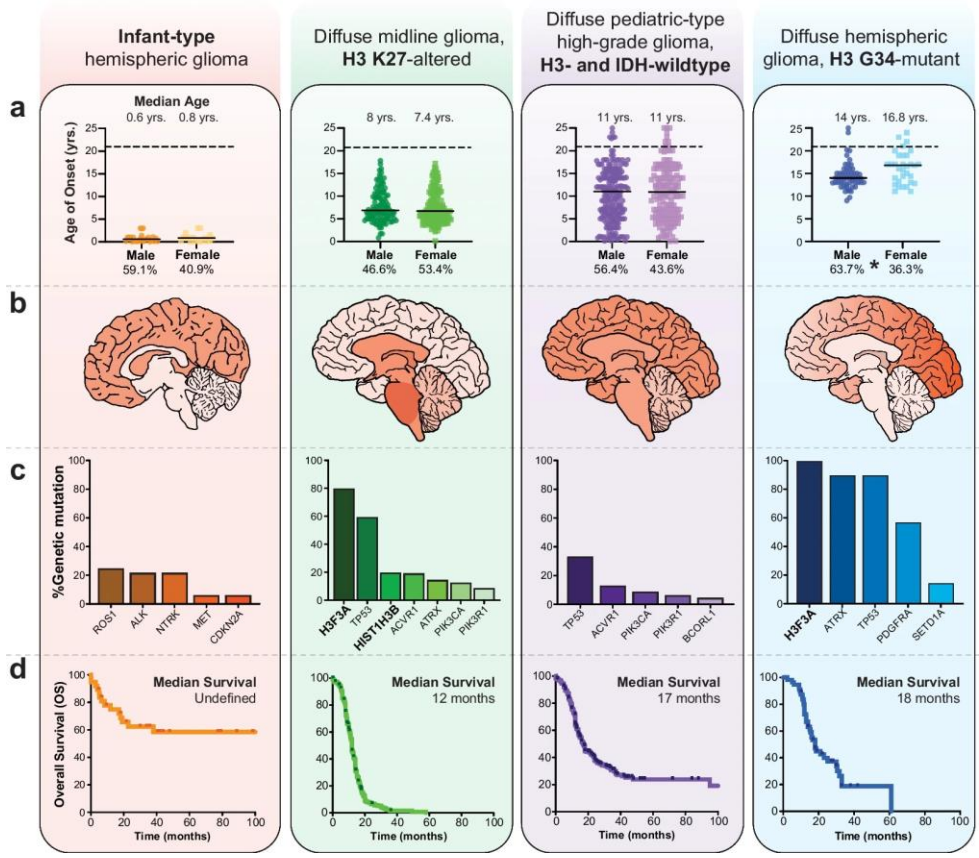



**Figure 1 : Présentation des différents sous-types de pHGG selon la classification de l'OMS.**
La première colonne (orange) représente les gliomes hémisphériques du nourrisson ; la deuxième (verte) représente les DMG altérés H3 K27 ; la troisième (violette) représente les gliomes pédiatriques diffus de haut grade H3WT et IDHWT et la dernière (bleue) les gliomes diffus hémisphériques mutés H3 G34. A. Représentation de l'âge médian, en fonction du sexe, du diagnostic des différents gliomes avec la répartition en pourcentage au sein des 2 catégories B. Représentation schématique des différentes localisations préférentielles des sous-types de gliomes. C. Histogrammes des mutations génétiques les plus fréquemment observées au sein des différentes pathologies (hors amplifications et délétions). D. Courbes de survie de Kaplan-Meier en mois des différents pHGG avec la survie médiane indiquée dans le coin supérieur droit. (Adapté d'Ocasio et al., 2023)

## 4. Les symptomatologies et diagnostics

Les symptômes dont sont atteints les enfants porteurs d'un DMG sont caractéristiques et se traduisent par une paralysie des nerfs crâniens 6 et 7 contrôlant les muscles des yeux et ceux du visage entrainant une vision double appelée diplopie, ainsi que du strabisme, des difficultés à la mastication ou à la déglutition, mais aussi des difficultés à fermer les paupières. Ces tumeurs induisent également une faiblesse dans les jambes et dans les bras, une ataxie ou encore un syndrome pyramidal (perte de contrôle des mouvements, perte de réflexes) (Robison and Kieran, 2014). De plus, le développement rapide de la tumeur provoque le plus souvent une obstruction à l'écoulement du liquide cérébro-spinal engendrant une augmentation de la pression au sein de la cavité crânienne se traduisant par des maux de tête et des vomissements.

Sur la base de ces symptômes caractéristiques et d'évolutions rapides, le diagnostic de la maladie se fait, essentiellement par IRM (imagerie par résonance magnétique) *via* la reconnaissance d'un ensemble tumoral diffus (Robison and Kieran, 2014). Historiquement, aucune biopsie n'était réalisée en raison de la localisation critique de la tumeur, ainsi le diagnostic reposait uniquement sur l'imagerie et les symptômes caractéristiques précédemment cités (Schumacher et al., 2007). En concomitance avec cette absence de biopsie, très peu de matériel biologique était disponible pour la recherche puisque que ce dernier était alors uniquement obtenu par autopsie. Ce n'est que depuis une dizaine d'année que la réalisation d'une biopsie stéréotaxique est devenue systématique. Cette biopsie, désormais prouvée comme ne portant pas préjudice au patient, permet de confirmer et d'affiner le diagnostic puisqu'elle permet d'obtenir des informations quant aux altérations géniques portées par la tumeur. Dans ce contexte, en 2014, un essai clinique international (regroupant des patients d'Europe et d'Australie) nommé BIOMEDE (Biological Medecine for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Eradication) a été initié par l'Institut Gustave Rousse à Paris. L'objectif de cet essai clinique était de réaliser un séquençage du génome des cellules cancéreuses issues des biopsies en vue de comparer le potentiel de l'erlotinib, l'évérolimus et le dasatininb (Burckel et al., 2015 ; Chi et al., 2019). Faisant suite à ce projet, BIOMEDE 2.0 a pour objectif de comparer l'ONC201 à l'évérolimus deux molécules ayant montré des résultats précliniques encourageants (Burckel et al., 2015; Chi et al., 2019).

## B. Contexte moléculaire des DMG altérés H3 K27

La chromatine comporte des nucléosomes constituants le premier niveau de compaction de l'ADN. Le cœur de ces derniers est composé de 8 histones : H2A, H2B, H3 et H4, chacun présent en 2 exemplaires. Ceux-ci sont le lieu de nombreuses modifications post-traductionnelles, ou marques épigénétiques influençant l'état de la chromatine et *de facto,* le transcriptome (Cutter and Hayes, 2015).

### 1. L'Histone 3

L'histone H3 est présente sous différentes formes dont les 3 principales isoformes (H3.1, H3.2 et H3.3) sont codées par 15 gènes différents. Au sein des histones H3, une distinction est faite entre les formes canoniques (H3.1 et H3.2) et les variants de l'histone H3 (H3.3, H3t, H3.X, H3.Y et CEMP-A). De nombreuses modifications épigénétiques sont représentées au niveau de l'histone H3 et peuvent être catégorisées en 4 groupes différents : (1) les acylations, ayant principalement lieu sur les résidus de lysine, (2) les marques *ubiquitin-like* sur les lysines, (3) les méthylations, pouvant être apposées sous forme de monomère, ou dimère, ou trimère sur les lysines et arginines et (4) les marques ciblant d'autres résidus que la lysine (Millán-Zambrano et al., 2022).

Les marques épigénétiques peuvent également être classées en fonction de leur action sur la conformation de la chromatine : soit ces dernières seront associées à une conformation ouverte de la chromatine, appelée euchromatine, soit ces marques seront responsables de la conformation fermée de la chromatine appelée hétérochromatine. Les marques épigénétiques H3 K9me2/3 ou H3 K27me2/3 sont associées à une conformation fermée de la chromatine et sont donc localisées au niveau des gènes réprimés (Barth and Imhof, 2010).

Ces marques épigénétiques réversibles sont régulées par des enzymes spécifiques d'un résidu particulier agissant en complexes. Les marques de méthylations sont apposées par des histones méthyltransférases et sont retirées par des déméthylases et les acétylations sont apposées par des histones acétyltransférases (HAT) et retirées par des histones désacétylases (HDAC) (Shvedunova and Akhtar, 2022).

- **La méthylation de la lysine 27 de l'histone H3**

La lysine 27 est le lieu de 2 types de marques épigénétiques antagonistes exclusives. D'une part, les méthylations pouvant se faire selon 3 niveaux différents (H3 K27me1/me2/me3) et d'autre part l'acétylation (H3 K27ac). Les marques H3 K27me1 sont retrouvées au niveau des régions transcriptionnellement actives alors que les marques H3 K27me2/me3 sont principalement situées au

niveau de l'hétérochromatine (Barth and Imhof, 2010; Ferrari et al., 2014; Mozzetta et al., 2015). Ce sont les lysines méthyltransférases (KMT) comprenant EZH1 et EZH2 qui catalysent l'apposition des marques de di-méthylations et de tri- méthylations sur H3 K27 (Laugesen et al., 2016). Ces enzymes fonctionnent en complexe *a minima* avec les protéines SUZ12, EED et RBBP4/7 pour former le complexe PRC2 (Mozzetta et al., 2015). Ces marques peuvent être retirées par les histones lysine déméthylases (KDM) (Greer and Shi, 2012).

- **L'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3**

Les marques H3 K27ac sont considérées comme des marques épigénétiques activatrices, car associées aux zones de la chromatine transcriptionnellement actives, notamment retrouvées au niveau des promoteurs actifs, le corps des gènes et au niveau des enhancers actifs. Ces marques sont déposées par les lysines acétyltransférases KAT3A et KAT3B (Roadmap Epigenomics Consortium et al., 2015) et leur retrait est assuré par les histones désacétylases HDAC1 et HDAC3 (Shvedunova and Akhtar, 2022).

## 2. L'altération de l'oncohistone H3 K27M et ses impacts au sein des DMG

- **Les différentes altérations de l'Histone H3**

Au niveau des pHGG, les altérations au niveau de l'histone 3 ont été décrites en 2012 par l'équipe du Pr. Nada JABADO ainsi que celle du Pr. Suzanne BAKER (Schwartzentruber et al., 2012; Wu et al., 2012). Comme évoqués précédemment, ces travaux, ont notamment permis de définir des classes à part entière de sous-types de pHGG (Louis et al., 2021; Ocasio et al., 2023). Ces altérations au niveau de l'histone 3 comprennent une substitution sur le résidu lysine en position 27 par une méthionine ou une substitution au niveau de la glycine située en position 34 par un résidu arginine ou valine (Louis et al., 2021; Ocasio et al., 2023). La mutation monoallélique K27M est présente exclusivement sur les gènes *HIST1H3B, HIST1H3C* et *HIST2H3C* qui codent pour les formes H3.1 et H3.2, et également sur le gène *H3F3A* qui code pour le variant H3.3. La substitution H3 G34R/V est présente uniquement sur le variant H3.3 (Mackay et al., 2017). Ces types d'oncohistones (H3 K27M et H3 G34R/V) sont présents dans au moins 60 % des pHGG. La substitution H3 G34R/V représente approximativement 16 % des pHGG. L'altération H3 K27M est quant à elle retrouvée dans 80 % des gliomes de haut grade localisés au niveau de la ligne médiane (Mackay et al., 2017).

- **Impact de l'altération H3 K27M**

Au sein des DMG altérés H3 K27M, cette modification engendre une perte de la marque épigénétique répressive H3 K27me3 (Bender et al., 2013). Ceci est mis au regard de la suppression du site de méthylation des histones mutés ainsi qu'une perturbation globale de l'activité des lysines méthyltransférases à domaine SET sur les histones non mutées (Lewis et al., 2013; Mozzetta et al., 2015). Le comportement dominant négatif des oncohistones H3 K27M perturbe l'efficacité du complexe PRC2 conduisant à une diminution globale de la di- et tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (Figure 2). Cette perturbation du complexe PRC2 par H3 K27M fait l'objet de nombreuses discussions. L'une des hypothèses les plus récente pour expliquer ce phénomène a été formulée par STAFFORD et collaborateurs. Dans un premier temps, une interaction transitoire entre les complexes PRC2 et le site H3 K27M a lieu, cependant les complexes PRC2 sont libérés de cette interaction probablement en raison de la présence de la mutation H3 K27M limitant la stabilité de PRC2 sur la chromatine. A la suite de cette interaction transitoire, les complexes PRC2 présentent une altération persistante de leur activité ce qui entrainerait une réduction de la méthylation au niveau des sites H3 K27 en présence de la mutation (Stafford et al., 2018) . Les oncohistones aurait la capacité de confiner l'activité de PRC2 à ses régions de fortes affinités (sites de nucléation), *de facto*, la marque H3 K27me3 serait uniquement au niveau de ces zones en raison d'une forte contrainte catalytique nécessaire pour l'apposition de ces marques H3 K27me3 au niveau d'autres sites. Il en résulte donc une diminution globale de la méthylation (Figure 2) (Harutyunyan et al., 2020, 2019). En concomitance, une augmentation globale de la marque H3K27ac est observée.

Ces dérégulations du paysage épigénétique entraînent des reprogrammations d'expressions géniques propres aux DMG altérés H3 K27M, avec notamment, l'expression de gènes normalement réprimés impliqués dans le maintien du caractère souche (Pajovic et al., 2020).

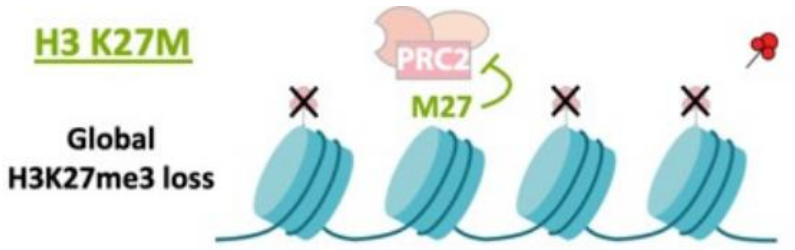



**Figure 2 : Impact de l'oncohistone H3 K27M sur le paysage épigénétique des cellules de DMG.**
Les mutations de type H3 K27M affectent l'activité de PRC2 engendrant une perte globale de la triméthylation de la lysine 27 sur l'ensemble des histones 3. (Extrait de Mackay et al., 2017)

### 3. Les altérations secondaires dans les DMG altérés H3 K27M

- **Les altérations du gène *ACVR1***

Des mutations sont également présentes au niveau du gène *ACVR1* dans approximativement ¼ des cas de DMG. Ce gène code pour le récepteur de l'activine A de type I (aussi nommé ALK-2 pour activin receptor-like kinase 2). Ces mutations (R206H, Q207E, R258G, G328E, G328V, G328W, et G356D) aboutissent à une activation constitutive du récepteur. Ces dernières sont quasiment retrouvées exclusivement dans les DMG altérés H3 K27M mutés H3.1 K27M (Mackay et al., 2017). Dans le contexte des DMG, la présence de la mutation H3.1 K27M couplée à une altération du gène *ACVR1* a montré au sein des modèles de xénogreffes murins, une tumorigenèse accentuée ainsi qu'une diminution significative de la survie (Hoeman et al., 2019).

- **Les altérations du gène *TP53***

Au sein des DMG altérés H3 K27M, des mutations au niveau du gène *TP53* sont également fréquentes. En effet, ces mutations sont retrouvées dans 50 % des cas de DMG mutés H3.3 K27M et assombrissent le pronostic des jeunes patients puisque la médiane de survie est inférieure à 9 mois lorsqu'une mutation *TP53* est présente (Mackay et al., 2017; Werbrouck et al., 2019). Ce gène code pour la protéine p53 qui possède un rôle central au niveau de la signalisation cellulaire puisque impliquée dans différents mécanismes de réponse au stress cellulaire : l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, ou encore la voie de réparation de l'ADN. Ainsi, les mutations sur *TP53* impactent fortement la réponse des cellules cancéreuses aux traitements, notamment de radiothérapie (Akamandisa et al., 2019; Werbrouck et al., 2019).

- **Les altérations du gène *PDGFRA***

Chez les patients atteints d'un DMG, on notera également qu'approximativement 40 % des cas présentent une amplification du gène *PDGFRA* codant pour le récepteur A du PDGF qui est impliqué dans différents processus tel que la différenciation, la croissance cellulaire ou encore la survie cellulaire (Mackay et al., 2017). Au sein des DMG, la présence de cette altération, en coopération avec la mutation H3 K27M et la perte d'activité du gène *TP53* favorise une histologie de haut grade et amplifie le caractère infiltrant des tumeurs (Cordero et al., 2017; Larson et al., 2019; Patel et al., 2020; Pathania et al., 2017). Au sein des DMG en l'absence de cette amplification du gène *PDGRFA*, les mutations H3 K27M permettant le maintien de l'expression de ce dernier *via* une hypométhylation de son promoteur (Haag et al., 2021).

### 4. Impact de la mutation H3.3 K27M sur le phénotype des DMG

- **Impact de la mutation H3 K27M sur la tumorigenèse**

Il est communément admis que les oncohistones K27M entraînent une dérégulation du paysage épigénétique faisant suite à la perturbation de l'activité du complexe PRC2. Parmi les effets pro-tumorinégique médiés par cette altération K27M, il y a un blocage de la différenciation cellulaire. En effet, au niveau des promoteurs des gènes impliqués dans la neurodifférenciation, les complexes PCR2 vont s'y accumuler bloquant ainsi leur expression. En concomitance avec cette accumulation, la distribution corrompue des marques H3 K27ac par les oncohistones empêchent l'accessibilité aux régions impliquées dans la différenciation neurale (Brien et al., 2021).

En plus de ce blocage de la différenciation des cellules, s'ajoute une capacité d'auto-renouvellement des OPC (Oligodendrocyte progenitor cell) (Funato et al., 2014; Pajovic et al., 2020). Ainsi, il semblerait que la mutation H3.3 K27M encourage l'expansion des OPC constituant un groupe de cellules plus favorable à l'accumulation d'autres altérations moléculaires secondaires et ainsi au développement d'un DMG (Larson et al., 2019). En ce sens, il a été montré par FILBIN et son équipe qu'au sein des DMG, la majorité des cellules tumorales possèdent un phénotype OPC-*like* peu différencié (Liu et al., 2022).

- **Impact de la mutation sur l'activation de voies oncogéniques**

En plus de ces effets sur le blocage de la différenciation cellulaire et de la promotion des OPC, la mutation H3.3 K27M induit l'activation de voies de signalisation oncogéniques impliquées dans la croissance tumorale des DMG. Parmi ces voies de signalisation, figure la cascade de signalisation faisant suite à l'activation de RAS et ERK5 amenant à la stabilisation du proto-oncogène MYC qui est impliquée dans la croissance cellulaire (Koncar et al., 2019).

En parallèle de cette voie, la mutation a également un impact sur la signalisation de NOTCH puisque dans un contexte H3 K27M il apparait que les ligands de la voie NOTCH sont surexprimés par rapport au tissu sain (Taylor et al., 2015).

## C. Stratégies de traitements des DMG

### 1. La radiothérapie comme traitement de référence des DMG

Jusqu'à présent, les DMG altérés H3 K27M se sont montrés fortement résistants aux traitements anti-cancéreux de chimiothérapie, radiothérapie et thérapies ciblées (El-Khouly et al.,

2019). De plus, l'exérèse totale de ces tumeurs est impossible en raison de leur localisation et de leur caractère infiltrant. Ainsi, la radiothérapie demeure le traitement de référence malgré des effets limités dans le temps et une re-progression de la tumeur quasi-systématique (Kim and Suh, 2023; Werbrouck et al., 2019). Le schéma de radiothérapie mis en place chez ces jeunes patients consiste en un total de 54 à 60 Gy administrés sous forme de doses fractionnées de 1,8 Gy à 2 Gy sur une période de 6 semaines (Cohen et al., 2017).

Ces radiations causent des dommages à l'ADN, soit directement par des effets d'ionisation sur les molécules, soit indirectement par la radiolyse de l'eau, ce qui génère un stress oxydant conduisant également à des dommages à l'ADN.

Concrètement, la radiothérapie est l'application de rayonnements ionisants au niveau du site tumoral. Ces radiations conduisent à des dommages à l'ADN, soit directement *via* des effets d'ionisation sur les molécules, soit indirectement *via* la radiolyse de l'eau générant un stress oxydant conduisant également à ces dommages à l'ADN (Wang et al., 2018). A *posteriori*, ces dommages à l'ADN conduisent à différents types de morts cellulaire (notamment l'apoptose et la ferroptose) (Adjemian et al., 2020; Lei et al., 2020).

La mort cellulaire induite par la radiothérapie est majoritairement liée aux cassures double brin de l'ADN. Ainsi, la capacité de réparation des dommages à l'ADN est au centre de la radiosensibilité des cellules (Huang and Zhou, 2020). Compte tenu du fait que la mise en place des mécanismes de réparation de l'ADN exige un remaniement de la chromatine, il y a une relation forte entre les processus épigénétiques, la réparation de l'ADN et la radiosensibilité (Cabrera-Licona et al., 2021). En ce sens les oncohistones K27M auraient la capacité d'influencer la réponse à la radiothérapie des cellules de DMG en agissant sur l'expression de facteurs impliqués dans les voies de réparation à l'ADN. Des travaux ont démontré qu'au sein des DMG mutés H3 K27M, la formation du complexe DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) serait favorisée ainsi que le recrutement des acteurs de la voie NHEJ, et donc *de facto*, la réparation des cassures doubles brin par NHEJ (Kaur et al., 2020; Stafford et al., 2018). Ainsi, les mutations H3 K27M semblent favoriser la réparation des dommages à l'ADN ainsi que la radiorésistance des DMG.

## 2. Les innovations thérapeutiques

- **Les épidrogues**

Compte tenu du caractère driver de la mutation H3K27 et de son implication sur le paysage épigénétique des DMG, des essais pré-cliniques ont été menés avec des épidrogues. Parmi ces dernières, le GSKJ4 est un inhibiteur d'histones déméthylases agissant spécifiquement sur

JMJD3/KDM6B et UTX/KDM6A (Hashizume et al., 2014). Celui-ci a montré des résultats encourageants avec un retour progressif des marques H3 K27me2/me3 (Chung et al., 2020; Hashizume et al., 2014). Également, au sein de modèles de xénogreffes de souris, cette épidrogue a permis une réduction de la croissance tumorale et une augmentation de l'effet de la radiothérapie (Katagi et al., 2019). Cependant, cette épidrogue n'est pas encore en phase d'essai clinique en raison de sa rapide conversion en GSKJ1 dont la perméabilité cellulaire est restreinte (Katagi et al., 2019).

Le panobinostat est quant à lui un inhibiteur d'histones désacétylases qui a montré des résultats prometteurs sur des cultures cellulaires de DMG et des modèles de xénogreffe orthotopique (Grasso et al., 2015). La hausse d'acétylation des histones 3 induite par cette molécule est associée à un rétablissement de la triméthylation des lysines 27 dans les cellules de DMG mutés H3 K27M. En ce sens, des investigations pré-cliniques au sein des DMG sont menées incluant des combinaisons avec le panobinostat (Anastas et al., 2019; Ehteda et al., 2021; Leszczynska et al., 2021; Lin et al., 2019). Parmi ces combinaisons, l'association du panobinostat avec le marizomib (inhibiteur du protéasome) a montré des résultats encourageants ayant conforté l'ouverture d'un essai clinique, en 2020, de phase I pour déterminer les doses maximales tolérées de chacune de ces 2 molécules (NCT04341311) (à noter que les résultats de cet essai clinique ne sont pas encore disponibles).

Cependant, à ce jour, les essais reposant sur l'utilisation d'épidrogues n'ont permis aucune amélioration notable de la survie des patients atteints d'un DMG.

- **Les imipridones**

Les imipridones sont une classe de molécules antogonistes des récepteurs DRD2 et agonistes de l'enzyme ClpP. Parmi lesquels l'ONC201 a montré des effets bénéfiques lors d'un essai clinique de phase II (NCT02525692). Ce dernier a été administré à 17 patients atteints de GBM récurrents, et une patiente âgée de 22 ans ayant une lésion secondaire liée à la présence d'un gliome thalamique H3.3 K27M, a bénéficié d'une régression quasiment complète de ses deux lésions après 8-11 mois de traitement (625 mg toutes les 3 semaines) (Arrillaga-Romany et al., 2017). Ce résultat clinique prometteur a ouvert la voie pour l'utilisation de l'ONC201 contre les DMG mutés H3 K27M (NCT03134131 et NCT03416530). Dans ce contexte, l'ONC201 a eu des effets bénéfiques, notamment pour une jeune patiente ayant obtenu une régression du volume tumoral supérieur à 40 % après traitement avec l'ONC201 faisant suite à un protocole de radiothérapie (Chi et al., 2019).

A la suite de ces résultats encourageants, des études pour comprendre la mécanistique de cette molécule ont été menées. Le mode d'action de cette molécule semble reposer sur 2 mécanismes : un effet antagoniste sur le récepteur à la dopamine (DRD2) couplé à un effet agoniste

sur la sous-unité ClpP de la protéase mitochondriale ClpXP (Bonner et al., 2020; Duchatel et al., 2021). Les cibles de cette protéase sont les protéines du cycle de Krebs et celles de la chaîne respiratoire mitochondriale. Après traitement à l'ONC201, une dégradation anormale de ces protéines est observée (Przystal et al., 2022), ainsi cette action sur le métabolisme mitochondrial serait responsable de l'efficacité de l'ONC201. De plus, au sein des cellules H3 K27M altérées, l'ONC201 restaurerait la triméthylation des lysines 27 des histones 3 (Venneti et al., 2023).

Actuellement, les patients Européens et Australiens sont inclus dans l'essai international BIOMEDE 2.0 (Biological Medecine for diffuse intrinsic pontine glioma eradication) coordonné par l'institut Gustave Roussy. Faisant suite à l'essai BIOMEDE 1 (comparant le potentiel de l'Erlotinib, l'everolimus et le dasatinib et stoppé pour manque d'efficacité), BIOMEDE 2.0 a pour objectif de comparer l'ONC201 à l'everolimus, deux molécules ayant montré des résultats précliniques encourageants (Burckel et al., 2015; Chi et al., 2019). L'évérolimus est quant à lui un inhibiteur de la kinase mTOR. La voie mTOR est impliquée dans la régulation de la croissance, de la prolifération et la survie cellulaires et est fréquemment dérégulée au sein des cancers.

- **Inhibiteur de la voie mTOR**

L'activation de la voie PI3K/Akt/ mTOR au sein de cellules cancéreuses conduit à différents processus parmi lesquels l'angiogenèse, la croissance et la survie de ces dernières (Duchatel et al., 2019). En ce sens, le ciblage de la voie PI3K/AkT/mTOR a été testé dans de nombreux cancers (Yang et al., 2019). Un arsenal conséquent de molécules (une 40aine) existe pour inhiber cette voie, mais seul les inhibiteurs de mTOR, tel que le temsirolimus (Hess et al., 2009), et l'évérolimus (Pavel et al., 2011) et les inhibiteurs de PI3K : idelasisib et le copanlisib (Furman et al., 2014) ont eu l'approbation de la FDA pour être utilisés comme thérapie anticancéreuse. A noter cependant qu'un inhibiteur d'Akt, le capivasertib a été approuvé en co-thérapie avec le fulvestrant dans le cadre du cancer du sein (Turner et al., 2023).

Le paxalisib, ciblant PI3K et mTOR1/2 a initialement été développé dans le cadre de traitement du GBM puisqu'approximativement 80% des cas présentent des mutations ou altérations au niveau des gènes impliqués dans la voie de signalisation PI3K (Brennan et al., 2013). C'est au sein des DMG que Duchatel et collaborateurs ont évalués la dépendance génétique de 38 lignées cellulaires de DMG à cette voie de signalisation (Duchatel et al., 2024). Ces résultats ont mis en évidence une forte dépendance de ces lignées pour *PIK3CA* et *mTOR*. Pour donner suite à cette première conclusion, confortant l'idée selon laquelle le ciblage de la voie PI3K/Akt/mTOR pourrait être une thérapie envisageable dans le cadre des DMG, l'équipe du Dr. DUN a testé cette molécule au sein de modèle murin par injection de cellules de patients SU-DIPG-XIII-P*. Subséquemment à l'administration du

paxalisib, une diminution de la phosphorylation de pAKT (Th208/Ser473) a été observée ainsi qu'une augmentation de la survie des modèles murins (Duchatel et al., 2024).

- **Les CAR**

Parmi les pistes envisagées pour lutter contre les DMG, la stratégie reposant sur l'utilisation des CAR (*Chimeric Antigen Receptor*) a montré des résultats prometteurs. Cette dernière repose sur l'ajout d'un récepteur CAR génétiquement modifié afin de cibler un antigène associé à la tumeur, principalement sur des cellules T ou NK (*Natural Killer*). Concrètement, les cellules T ou NK du patient sont isolées, génétiquement modifiées, généralement par transduction, pour permettre l'expression d'un CAR spécifique d'un antigène tumoral. Ces cellules nouvellement éditées sont ensuite amplifiées *ex vivo* et administrées au patient.

Dans le cadre des DMG altérés H3 K27M, le disialoganglioside GD2 est fortement exprimé au sein de la tumeur et peu exprimé dans le tissu sain en faisant une cible préférentielle pour les CAR (Majzner et al., 2022; Mount et al., 2018). En ce sens, l'équipe du Dr. Zhang, a testé l'efficacité des cellules NK92 exprimant un anti-GD2 sur 2 modèles de PDX (*patient derived xenograft*) de DMG, dont 1 exprimant fortement GD2. Les GD2-CAR NK-92 ont été administrés aux modèles murins ce qui a permis une diminution significative de la croissance de la tumeur pour le modèle où GD2 était fortement exprimé par la tumeur (Zuo et al., 2023). Des CAR – T cells ont également été développés avec pour objectif de cibler GD2 par l'équipe du Dr. MONJE (Majzner et al., 2022).

Dans ce contexte, plusieurs essais cliniques sont menés en utilisant des GD2- CAR T cells sur des patients arborant un DMG (NCT05544526, NCT04196413). L'essai clinique porté par l'équipe du Mr. MONJE (NCT04196413) a été mené avec pour objectif de déterminer la faisabilité de ce traitement, sa tolérabilité par les patients ainsi que la dose maximale. En ce sens, les GD2- CAR T cells ont été administrés aux patients ayant des DMG ou des sDMG (spinale DMG) par injection intracrânienne intracérébroventriculaire (ICV) soit à $1x10^6$/kg soit à $2,3x10^6$/kg. Les patients traités avec la seconde dose ont eu des effets secondaires associés au syndrome de libération de cytokines permettant d'établir que la dose maximale tolérée est de $1x10^6$/kg pour les patients. Pour 11 patients ayant reçu les GD2- CAR T cells, 4 patients ont observé une réduction du volume tumoral supérieur à 50 % de la masse tumorale et un patient a observé une régression de 100 % (Monje et al., 2025). Néanmoins, des épisodes inflammatoires importants, avec notamment le « syndrome de libération de cytokines » sont fréquemment observés chez les patients entrainant de la fièvre, frissons, et dans certains cas, une défaillance d'organes. D'autres symptômes ont également été constatés chez les jeunes patients à la suite d'un traitement avec des CAR-T, liés à la neurotoxicité du traitement déclenché en raison de

l'inflammation de la tumeur. Afin de pallier ces effets, des perfusions locorégionales des CAR-T pourraient limiter ces effets délétères (Thomas et al., 2023).

Cependant les CAR, ne ciblant majoritairement qu'un seul antigène tumoral, ne permettent pas de viser l'ensemble de la population tumorale à cause de l'hétérogénéité intratumorale. Afin de pallier cette contrainte d'hétérogénéité intratumorale, des multi-CAR T ont été développés et un essai clinique est en cours sur les DMG (NCT05768880). Ce dernier vise à cibler 4 antigènes tumoraux que sont : B7-H3, HER2, EGFR806 et IL-13Rα2 avec pour objectif de cibler le plus grand nombre de cellules tumorales.

- **Les vaccins thérapeutiques**

Les vaccins thérapeutiques reposent sur l'injection aux patients d'antigènes spécifiques de la tumeur, ce qui a pour objectif d'enrichir le répertoire des antigènes contre la tumeur reconnus par le système immunitaire, et notamment, les cellules T (Fan et al., 2023).

Au sein des DMG adultes, un essai national de phase I « INTERCEPT H3 » (NCT04808245) est en cours, avec pour objectif de tester l'efficacité d'un vaccin dirigé contre H3 K27M associé à la radiothérapie et à un inhibiteur du point de contrôle immunitaire l'atezolizumab (Grassl et al., 2023, 2023). D'autres essais cliniques sont également en développement, parmi lesquels l'un d'entre eux vise à tester l'efficacité du rHSC-DIPGVax sur des jeunes patients atteint d'un DMG. Ce vaccin repose sur une HSP (*head choc protein*) couplé à 16 peptides reflétant les néo-épitopes présents au sein des DMG. Cependant, bien qu'ayant montré des résultats prometteurs avec des modèles pré-cliniques, uniquement une partie de la population semble répondre à ce type de thérapie (Fan et al., 2023).

Finalement, de nombreuses stratégies thérapeutiques sont en cours de développement contre les DMG montrant des résultats prometteurs nécessitant néanmoins des ajustements afin de limiter, d'une part, les effets indésirables et d'autre part, de cibler l'ensemble de la population tumorale (Figure 3).

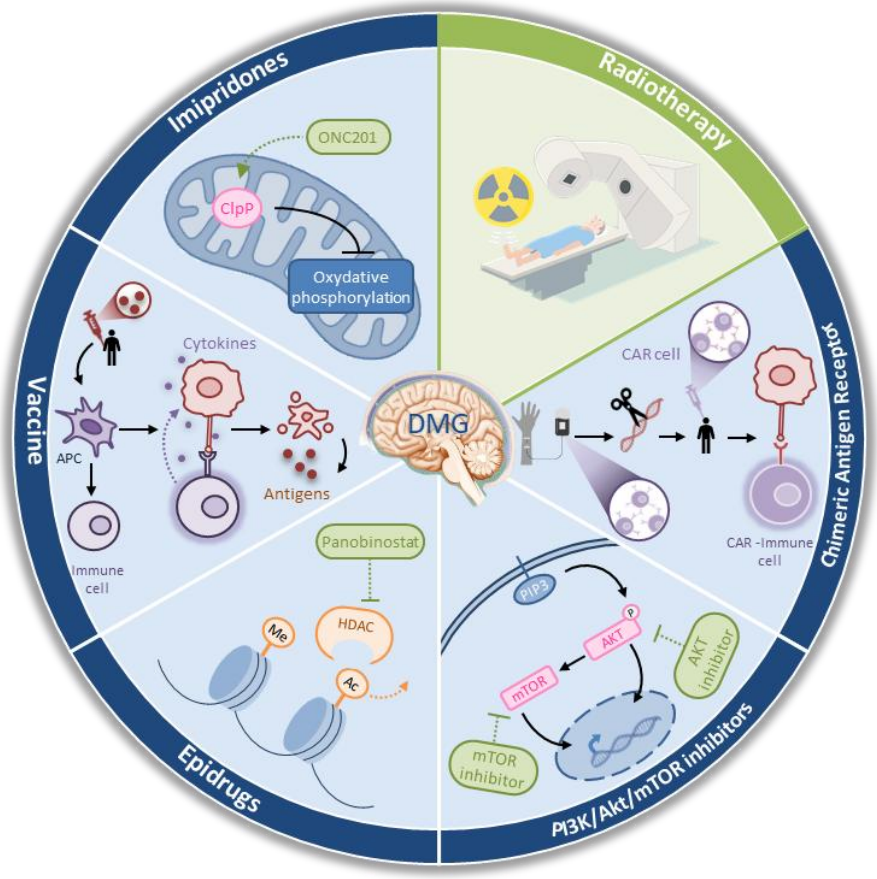



**Figure 3 : Représentation des stratégies de traitements contre les DMG.**
La **radiothérapie** est appliquée aux jeunes patients pour un total de 54 ou 60 Gy, mais systématiquement suivie d'une re-progression de la tumeur. L'utilisation des **CAR** repose sur la modification de cellules T ou NK ce qui permet un ciblage spécifique des cellules tumorales par ces cellules immunitaires. Les inhibiteurs de la voie **PI3K/AkT/mTOR**, comme le paxalisib, ont montré des résultats prometteurs en raison de la dépendance génétique des cellules tumorales à cette voie. Les **épidrugs**, sont des molécules impactant les mécanismes épigénétiques des cellules. L'utilisation des **vaccins** repose sur l'enrichissement du répertoire antigénique spécifique dirigé contre la tumeur**.** L'efficacité des **imipridones** sur les modèles pré-cliniques de DMG s'explique en partie par leur action agoniste sur la protéase ClpP amenant à une inhibition de la phosphorylation oxydative entraînant une apoptose.

# II. Microenvironnement des gliomes pédiatriques de haut-grade

## A. Généralités sur le microenvironnement des gliomes pédiatriques de haut-grade

L'environnement tumoral est composé de différents types cellulaires et également de matrice extracellulaire (MEC). En effet, en plus des cellules tumorales, un gliome comporte également des cellules endothéliales, des neurones, des astrocytes, des oligodendrocytes ainsi que des cellules immunitaires résidentes ou circulantes telles que les macrophages associés à la tumeur (TAM). Parmi les éléments matriciels de ce microenvironnement tumoral, les différentes molécules de la MEC possèdent un rôle clef puisqu'elles supervisent les interactions cellulaires, permettent la propagation de différents signaux et régulent également la capacité des cellules tumorales à migrer (Sharma et al., 2023).

### 1. La matrice extracellulaire

Dans le cadre des glioblastomes, la MEC est principalement constituée de protéoglycanes, de glycoprotéines telles que les collagènes, les élastines et les laminines, et de glycosaminoglycanes (GAG) comme l'acide hyaluronique (AH). Parmi ces différents composés, l'acide hyaluronique représente l'élément le plus abondant au sein de la MEC (Belousov et al., 2019).

Dans un contexte tumoral, des changements majeurs s'opèrent au sein de la MEC. En effet, les cellules de gliomes ont la capacité de produire différents composants matriciels parmi lesquels l'AH (acide hyaluronique) et la fibronectine, deux acteurs majeurs impliqués dans la mobilité cellulaire. Dans l'ensemble, les cellules de gliomes vont augmenter le nombre de composés matriciels afin de permettre aux cellules cancéreuses de se développer et de migrer plus aisément (Belousov et al., 2019) (Figure 4).

La matrice extracellulaire contrôle également la survie cellulaire au travers de nombreux signaux, notamment médiés par les intégrines. En effet, ces dernières ont la capacité de recruter et d'activer des tyrosines kinases non réceptrices telle que la kinase d'adhésion focale (FAK) et la c-Src (proto-oncogène tyrosine kinase Src) qui forment un double complexe kinase. Ce complexe activé favorise la motilité cellulaire, la progression cellulaire et la survie des cellules (Mitra and Schlaepfer, 2006).

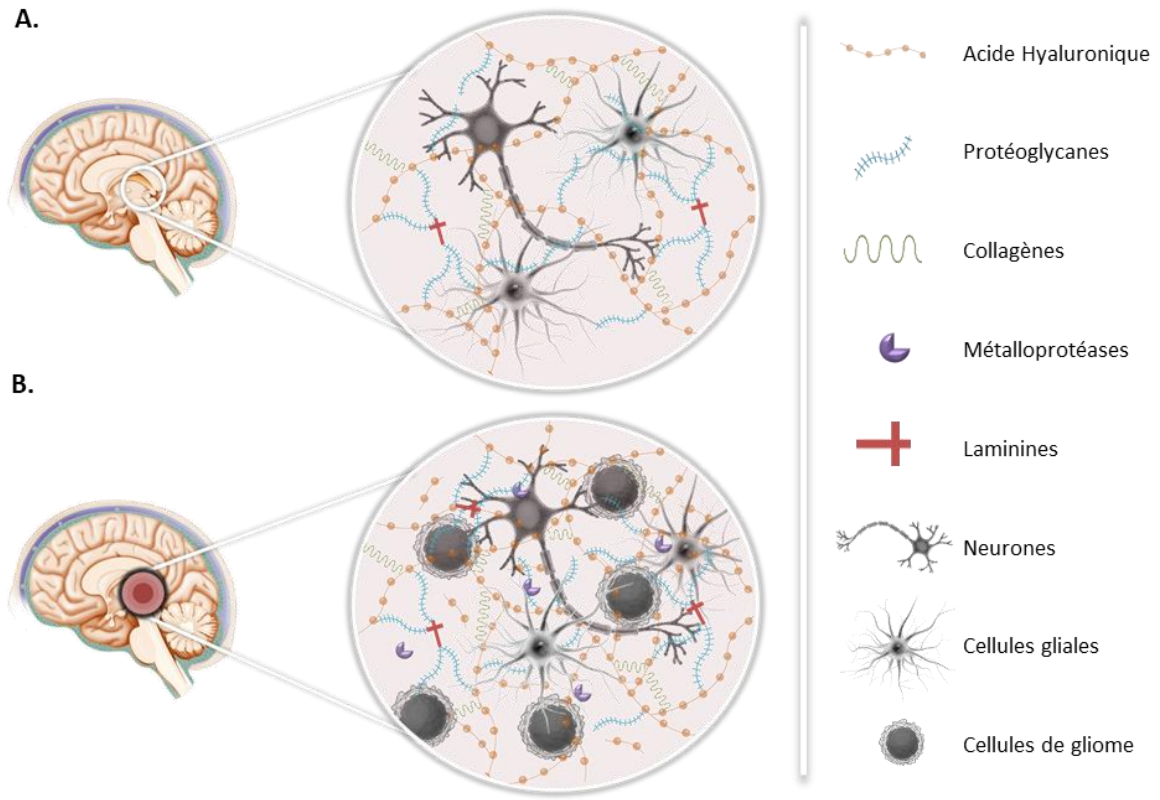



**Figure 4 : Représentation des différents composés de la matrice extracellulaire.**
**A.** Représentation de la MEC cérébrale dite saine. Les cellules sont au sein d'une MEC composée de protéoglycanes (neurocan, versican, aggrécan, brévican), d'acide hyaluronique, et laminine et de collagène. **B**. Représentation de la MEC de gliome. Les cellules de gliome sont au sein d'une MEC enrichie en composant matriciel, et en MMP (métalloprotéinases)permettant de dégrader la matrice pour faciliter la migration des cellules cancéreuses.

- **Rôles de la laminine au sein des glioblastomes**

La laminine est une glycoprotéine constituée d'un assemblage de 3 chaînes polypeptidiques nommées α, β et ϒ. Ces dernières se différencient par leur taille, et notamment par leur domaine constitutif. La laminine est un élément clef de la MEC interagissant, *via* les extrémités C-terminales, avec des récepteurs membranaires des cellules adjacentes permettant de médier différents types de signaux. L'extrémité N- terminale de la laminine est impliquée dans l'interaction avec les autres composés de la MEC (Aumailley, 2013).

Cette glycoprotéine possède un rôle critique dans le maintien des cellules souches neurales, des cellules souches de glioblastome (CSG) et également des cellules précurseurs d'oligodendrocytes. En effet, l'intégrine α6, récepteur de la laminine formant un hétérodimère avec les intégrines $\beta_1$ ou $\beta_4$, peut réguler la croissance des cellules souches neurales et est fortement exprimée au sein des CSG. (Hall et al., 2008 ; Lathia et al., 2010). De plus, l'intégrine α6 est impliquée dans la promotion de la radiorésistance au sein des glioblastomes adultes grâce à son rôle sur la modulation de la réponse aux dommages à l'ADN (Kowalski-Chauvel et al., 2018). De surcroit, SINHA et collaborateurs ont démontré

que le ciblage des intégrines α6 et β1 au sein des DMG conduit à une diminution de la radiorésistance des cellules de DMG et à une amélioration de la réponse des cellules au panobinostat (Sinha et al., 2024).

- **Rôles du collagène au sein des glioblastomes**

Le collagène est une glycoprotéine ayant pour rôle principal d'organiser la structure de la MEC. Cette dernière est composée de trois chaines α. En fonction de ces propriétés fonctionnelles et structurelles, le collagène est subdivisé en 28 types (Ricard-Blum, 2011). Parmi ces derniers, les collagènes de type I, V et XI, sont classés comme des collagènes fibrillaires. La biosynthèse de ces derniers peut être assurée par les cellules cancéreuses *via* différents facteurs de transcriptions, voies de signalisations et divers types de récepteurs. Le collagène peut influencer le devenir cellulaire grâce à son interaction avec, par exemple, les intégrines et les récepteurs tyrosines kinases afin d'influencer la croissance, l'invasion et la différenciation des cellules (Xu et al., 2019).

Dans le contexte des glioblastomes, l'expression du collagène de type V alpha 1 (COL5A1) est plus importante en comparaison avec un tissu sain. COL5A1 peut favoriser la migration et l'invasion cellulaire par l'activation de l'axe PPRC1- ESM1 (Tsai et al., 2021). En Effet, CAL5A1 peut promouvoir PPRC1 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-related protein 1) qui est un régulateur transcriptionnel dont l'une des cibles est ESM1 (endothelial cell specific molecule 1) qui a la capacité, dans le cadre des gliomes, de déclencher l'activité métastatique des cellules tumorales. En plus du collagène de type V, le collagène VI est également présent au sein des glioblastomes, notamment au centre de la tumeur, et influence la différenciation cellulaire (Cescon et al., 2023).

- **Rôles de l'acide hyaluronique**

L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane (GAG) présent au sein de la matrice extracellulaire ayant un rôle crucial dans de nombreux processus cellulaires tels que l'adhésion des cellules, la prolifération et la différenciation cellulaire. La concentration et la taille de ce GAG varient en fonction des tissus et de l'âge (Varki et al., 2015) . Ce GAG est décliné sous différents poids moléculaires lui permettant d'avoir des propriétés biologiques différentes ; sa synthèse et sa dégradation sont finement régulées par 3 synthases que sont HAS1, HAS2 et HAS3 et plusieurs hyaluronidases parmi lesquelles HYAL1 et HYAL2 considérés comme les acteurs principaux du catabolisme de l'AH (Csoka et al., 2001; Itano et al., 1999).

Au sein des tumeurs, la balance entre le catabolisme et l'anabolisme de l'AH penche en faveur d'une production plus importante d'AH engendrant une augmentation de la prolifération et une migration des cellules cancéreuses. De surcroit, les longs fragments d'AH (supérieurs à 5 MDa) possèdent des effets anti-angiogéniques et immunosuppresseurs. Et d'autre part, l'augmentation du catabolisme de l'AH permet de générer des fragments de GAG de petites tailles (6 kDa- 20kDa) impliquées dans l'induction de l'angiogenèse (Bayer, 2020; Sieger et al., 2019). Ces deux tailles de fragments sont présents au sein des tumeurs (Liu et al., 2019).

L'AH permet l'activation de signaux intracellulaires *via* son interaction avec le récepteur CD44 permettant ainsi de réguler différents processus biologiques tel que la prolifération cellulaire, l'adhésion et la migration des cellules (Misra et al., 2015). Les cellules de gliomes produisent une matrice extracellulaire enrichie en acide hyaluronique et expriment fortement le récepteur CD44 (Kim and Kumar, 2014). Ce récepteur est lié au cytosquelette d'actine grâce aux protéines ezrine, radixine et moésine qui sont surexprimées au sein des tissus tumoraux et permet de médier les signaux d'invasion (Kim and Kumar, 2014).

- **Remodelage de la matrice par les cellules tumorales**

Le remodelage de la matrice par les cellules tumorales est un élément clef dans la tumorigenèse puisque les protéines matricielles jouent un rôle de ligands pour de nombreux récepteurs membranaires tels que les intégrines et les syndécans. Ce processus de remodelage peut être divisé en 4 mécanismes pouvant être concomitants. Le premier est le dépôt de nouvelles protéines matricielles permettant de modifier les propriétés biophysiques de la MEC. Le deuxième mécanisme de remodelage, consiste en des modifications post-traductionnelles s'opérant au niveau des protéines de la MEC afin de modifier les caractéristiques structurelles de la MEC. Ces modifications permettent de changer les interactions entre la matrice et d'autres molécules tels que des récepteurs membranaires et peuvent également permettre la dégradation de la MEC. Par exemple, l'hydroxylation *via* les PLOD (procollagène-lysine 1,2-oxoglutarate 5-dioxygénases) du collagène permet une augmentation de la réticulation de ce dernier, ou encore, la sulfatation des glycosaminoglycanes par les sulfotransférases et héparanases permet de changer la signalisation entre les cellules et la matrice. Le 3$^{ème}$ mécanisme est caractérisé par la dégradation de la MEC engendrant la libération de fragments de protéines matricielles actifs. Le processus final, mène au remodelage physique de la matrice affectant alors l'organisation spatiale des différentes protéines composant la MEC avec pour objectif de permettre la migration cellulaire (Winkler et al., 2020).

Au sein des gliomes, la MEC est altérée sous l'influence des cellules tumorales. Elle est considérée comme étant plus dense et plus rigide. Les cellules de gliomes ont la capacité de produire différentes glycoprotéines et glycoaminoglycanes contribuant à ce phénomène d'augmentation de la densité et de rigidité de la MEC. Par ailleurs, les cellules tumorales peuvent également dégrader la MEC. Les acteurs majeurs de cette dégradation sont les métalloprotéinases (MMP), capables de dégrader le collagène, la fibronectine, la laminine, ou encore les protéoglycanes. Ces protéases sont sécrétées par les cellules stromales et les cellules cancéreuses. L'activité de ces protéases est régulée par des inhibiteurs de protéases TIMP (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) (Saw et al., 2019).

Au sein d'un contexte tumoral, les cellules cancéreuses et stromales vont exprimer des niveaux importants de protéases afin de dégrader la MEC pour promouvoir son réarrangement en MEC dite dérivée de la tumeur favorisant la motilité des cellules tumorales. Finalement, le clivage des composés de la MEC permet d'engendrer de nouveaux composés bioactifs, nommés matrikines, pouvant être impliqués dans la promotion de l'angiogenèse, comme les fragments dérivés de l'élastine ou à l'inverse, posséder des effets anti-angiogénique comme l'endostatine issue de la dégradation du collagène de type XVIII (Da Silva et al., 2018; O'Reilly et al., 1997).

## 2. Environnement cellulaire des pHGG

- **Les différents types cellulaires tumoraux composant un DMG altéré H3 K27M**

Au sein des DMG altérés H3K27M, Filbin et collaborateurs ont démontré que plusieurs phénotypes tumoraux sont présents parmi lesquels, les oligodendrocytes précurseurs like (OPC-like), les astrocytes like (AC- like), les oligodendrocytes-like (OC-like) ainsi que les mesenchymal-like (MES-like) (Liu et al., 2022). Une quantité limitée de cellules de type neuronales sont présentes au sein des DMG, et ce, indépendamment de l'âge du patient et la localisation du DMG. Il convient également de souligner qu'en fonction du lieu du DMG une différence majeure est observable : les DMG localisés au niveau du pont de Varole présentent une proportion plus importante de cellules immatures dites pré-OPC-like que les DMG localisés au niveau thalamique. Cette différence en fonction de l'emplacement de la tumeur peut être expliquée par l'interaction spécifique cellules-cellules au sein de chacune des régions. Ainsi, la localisation et donc l'environnement tumoral aurait la possibilité de favoriser différemment la différenciation des OPC. De surcroit, outre les différences liées à la zone de la tumeur, cette étude met en exergue une différence de la signature mésenchymateuse en fonction de l'âge des patients ; cette dernière augmente avec l'âge (Figure 5).

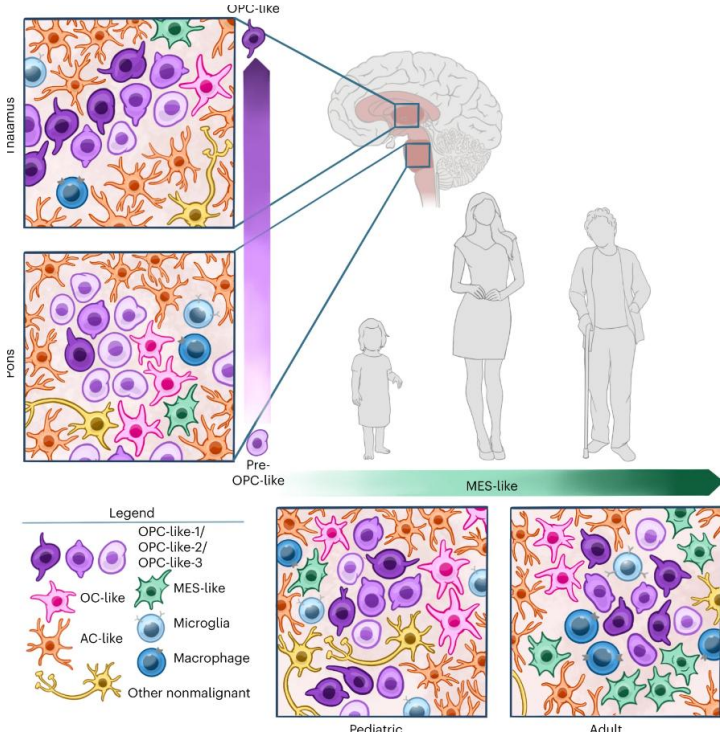



**Figure 5 : Représentation schématique des différentes sous populations cellulaires au sein d'un DMG altéré H3 K27M.** En fonction de la localisation tumorale, des différences sont présentes concernant le stade de différenciation des OPC. Pour les DMG au niveau du Pont de Varole, les OPC possèdent un stade de maturation moins avancé que les OPC présents au sein des DMG situés au niveau du thalamus. De plus, en fonction de l'âge la proportion de cellules MES-like est plus importante chez l'adulte que chez l'enfant. (Issus de Liu et al., 2022)

Pour compléter cette étude, FILBIN et collaborateurs ont, grâce à une analyse du transcriptome par single- cell spatial, identifié une niche de cellules tumorales proliférantes, constituant la population principale de cellules tumorales *in situ*, de type OPC-like et OC-like entourées de cellules de type AC-like (Liu et al., 2022).

- **Les cellules immunitaires dans les DMG**

Les DMG altérés H3 K27M sont considérés comme étant des tumeurs avec peu d'infiltra immunitaire et sont par conséquence, qualifiés de « tumeurs froides » (G. L. Lin et al., 2018). En comparaison avec des GBM adultes, les DMG altérés H3 K27M expriment un nombre limité de cytokines et de chimiokines pouvant justifier la pauvreté de l'infiltra immunitaire des DMG. La population de cellules immunitaires au seins des DMG est majoritairement représentée par la microglie et les macrophages qui peuvent représenter jusqu'à 20 % de la population cellulaire de la tumeur (Liu et al., 2022).

La microglie, population de cellules gliales au niveau du SNC, possède un rôle important dans la défense immunitaire en raison de ces capacités phagocytaires. Au sein des DMG, cette population

cellulaire exprime TIM-3 (T cell immunoglobulin mucin-3) qui a été montré comme étant impliqué dans les capacités prolifératives et métastatiques de différents cancers. En ce sens, AUSEJO-MAULEON et collaborateurs se sont intéressés à TIM-3 au sein des DMG et ont démontré que le ciblage de cette protéine permet d'augmenter la survie des modèles murins transplantés avec des HSJD-DIPG-007 (Ausejo-Mauleon et al., 2023). Ainsi, un modèle d'organoïde de DMG neuro-immuno compétant incorporant la microglie et diverses populations de neurones a été développé (Sarnow et al., 2024). Ce modèle permet entre autres, de mimer les capacités d'infiltration des DMG au sein du tissu environnement.

## B. Généralités sur l'hypoxie

Le concept d'un appauvrissement en oxygène au sein des tumeurs a été énoncé pour la première fois par THOMLISON et GRAY travaillant sur le cancer du poumon (Thomlinson and Gray, 1955). Par la suite et sur la base de données expérimentales, l'ensemble de la communauté scientifique a admis que ces zones hypoxiques sont particulièrement fréquentes au sein des tumeurs solides.

Dans les tissus sains, le taux d'oxygène varie globalement entre 3 et 7 %, avec toutefois certains organes pouvant atteindre une pression en $O_2$ de 13 % comme les poumons, ou *a contrario*, une faible pression en $O_2$ comme au niveau des intestins où elle peut descendre à 0,5% (Ast and Mootha, 2019). Au sein du cerveau, ce taux est compris entre 2% et 7 %. Les critères de définition de l'hypoxie fluctuent relativement selon les études, l'hypoxie est généralement définie comme une condition où le taux d'oxygène est compris entre 1 et 6 % (McKeown, 2014).

Au sein des gliomes, et plus largement au sein des tumeurs solides, ces régions hypoxiques, pathogéniques, se forment subséquemment à plusieurs phénomènes. L'éloignement des cellules tumorales de structures vasculaires contribue également à ce phénomène d'hypoxie. L'absence et/ou la déstructuration du système vasculaire est également l'un des facteurs amenant à la création de zones hypoxiques étant donné que ce dernier est garant de l'apport en oxygène. De plus, les cellules tumorales hypoxiques, acquièrent la capacité de promouvoir la formation de nouveaux capillaires sanguins qui sont toutefois désorganisés et ne permettent pas de répondre aux besoins en oxygène des cellules. De surcroît, les cellules tumorales présentent, pour la majorité, une prolifération accrue entraînant une augmentation de leur consommation en oxygène et *in fine* une diminution du taux d'oxygène disponible au sein de la tumeur. Le corollaire de cette prolifération importante des cellules est un métabolisme très actif nécessaire pour répondre à leurs forts besoins énergétiques. Or, lorsque les besoins métaboliques en oxygène dépassent l'apport possible, les cellules opèrent un switch

métabolique afin de s'adapter au manque en oxygène en activant de nouvelles signalisations pour adapter leur métabolisme (Chen et al., 2023) (Figure 6).

Globalement, les cellules hypoxiques vont favoriser un métabolisme glycolytique notamment *via* l'activation de HIF1α. En effet, ce dernier stimule l'expression de nombreuses enzymes impliquées dans la glycolyse et réprime l'activité des PDH *via* l'activation de PDK1 (pyruvate déshydrogénase kinase 1). L'initiation de PDK1 va donc inactiver PDH et ainsi empêcher la conversion du pyruvate en acétyl-coA. Le métabolisme lipidique est également altéré au sein des cellules hypoxiques afin de promouvoir la formation de membranes et la production d'ATP *via* l'oxydation des acides gras (Luo et al., 2017). En effet, HIF1α favorise SREBP-1 (sterol regulatory element- binding protein) qui est un régulateur transcriptionnel du gène *FASN* (Fatty acid synthase) favorisant ainsi la synthèse des acides gras synthases et *in fine* des lipides (Gao et al., 2016). Ainsi, les cellules hypoxiques vont contrecarrer la faible teneur en oxygène en adaptant leur métabolisme.

En fonction de la durée de ce manque en oxygène, l'hypoxie peut être qualifiée d'aigüe (i.e. d'une durée inférieure à 24 heures), de chronique (*i.e.* d'une durée supérieure à 24 heures) ou encore de cyclique (alternance entre les 2 précédents états) (Lee et al., 2020).

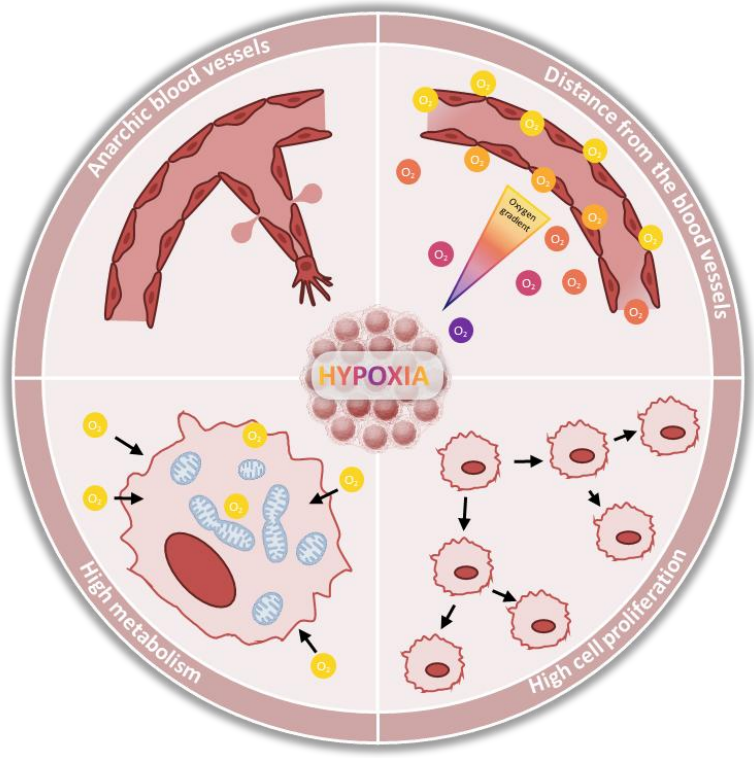



**Figure 6 : Facteurs contribuant à l'instauration d'une hypoxie tumorale.**
Les cellules tumorales éloignées des vaisseaux sanguins auront un apport en oxygène moindre, favorisant ainsi un phénotype hypoxique. Les cellules cancéreuses ont une capacité de prolifération accrue diminuant ainsi la teneur en oxygène disponible pour chacune des cellules.

1. Les facteurs de transcriptions HIF

L'hypoxie a la capacité d'induire un programme transcriptionnel spécifique, principalement contrôlé par les facteurs de transcription Hypoxia Inductible Factor 1 et 2 (HIF1 et 2), permettant aux cellules de s'adapter au manque d'oxygène. Ces facteurs de transcriptions sont des hétérodimères constitués d'une sous unité HIFα et d'une sous unité HIFβ. Les sous unités HIF1α sont majoritairement régulées par la teneur en oxygène au sein du tissu, mais également par les voies de signalisation telles que JAK-STAT3, la voie NF-kB, la voie des MAPK, la voie Wnt / β-caténine (Lau et al., 2011), la voie Notch (Y. Li et al., 2020) et les suppresseurs de tumeur comme p53, PTEN ainsi que la voie IDH1-R123H-FAT1-ROS-HIF1α (L.-C. Li et al., 2020).

Les facteurs de transcription HIF vont agir sur un large panel de gènes impliqués dans différentes fonctions cellulaires telles que la prolifération, l'angiogenèse, la glycolyse ou encore l'invasion (Keith et al., 2011). Les facteurs de transcriptions HIF1 et HIF2 peuvent avoir des effets antagonistes sur la régulation des gènes et n'exercent pas leur fonction simultanément (Raval et al., 2005). De plus, HIF1 est exprimé au sein de l'ensemble des tissus contrairement à HIF2 qui semble principalement exprimé au sein de certains tissus tels que les cellules endothéliales vasculaires et les macrophages. Au niveau des cellules souches de gliomes, il semblerait qu'HIF2 soit également exprimé (Li et al., 2009).

En condition d'hypoxie, les facteurs de transcriptions HIF n'ont pas la même régulation temporelle, HIF1α est rapidement stabilisé en cas d'hypoxie aiguë et sévère (selon la littérature, l'hypoxie sévère est décrite comme étant comprise entre 0% et 5% d'$O_2$), alors qu'HIF2α s'accumule progressivement au cours d'une hypoxie chronique et moins sévère (>5% d'$O_2$). Ces derniers ont également la possibilité d'induire des programmes génétiques qui leur sont spécifiques ; HIF1 régule ainsi principalement la glycolyse anaérobie et la mort cellulaire alors que HIF2 contrôle surtout des gènes impliqués dans la synthèse de l'érythropoïétine (EPO) ainsi que le caractère souche ou pluripotent des cellules tumorales (Cowman and Koh, 2022). A noter également qu'en condition hypoxique, les sous unités HIF ont la capacité de s'auto-réguler grâce à un rétrocontrôle positif *via* un lncRNA antisens *HIF1α* (HIFAL) et également grâce à la présence d'une HRE au niveau du promoteur du gène *HIF1α* (Koyasu et al., 2018; Zheng et al., 2021).

- **Régulation de la sous unité HIFα**

En condition dite de physioxie, correspondant à un niveau d'oxygène supérieur à 5%, des prolyl hydroxylase (PHD1, PHD2 et PHD3), et principalement PHD2, vont hydroxyler les résidus de prolines 402 et/ou 564 de HIF1α et les résidus prolines 405 et/ou 531 de HIF2α au sein de leur domaine ODD

(oxygen dependent domain). Il est à noter que ces PHD requièrent la présence d'oxygène, mais aussi de $Fe^{2+}$, et d'α-cétoglutarate pour exercer leur fonction. Cette réaction d'hydroxylation est couplée à une décarboxylation de α-cétoglutarate en succinate et $CO_2$. Dans ce contexte, l'interaction entre les sous-unités HIFα et le complexe composé de la pVHL (protéine suppresseur de tumeur Von Hippel-Lindau suppressor), l'élongine BC et de CUL2 est rendue possible. Cette interaction est dépendante de l'hydroxylation de deux résidus proline dans le domaine ODD des HIFα par les PHD. Ce contact entraine le recrutement du complexe E3- ubiquitine-ligase amenant *in fine* à la poly-ubiquitynilation des sous unités HIFα. Par la suite, les sous unités HIFα sont prises en charge et dégradées par le protéasome.

L'activité de ces sous unités, en plus d'être régulée par l'oxygène, est également finement contrôlée par le facteur inhibant HIF1 (FIH1) aussi nommé l'asparaginyle hydroxylase HIF, faisant partie de la famille des dioxygénases dépendantes du $Fe^{2+}$ et de l'α-cétoglutarate. FIH1 hydroxyle un résidu asparagine au niveau du domaine C-terminal des sous unités HIFα empêchant ainsi le recrutement des coactivateurs de transcription p300 et CBP, limitant ainsi l'activité transcriptionnelle et le rétrocontrôle positif exercé par les facteurs HIF (Zhang et al., 2010).

En condition hypoxique, les PHD ne pouvant exercer leur activité à cause du manque d'oxygène, les sous unités HIFα ne sont plus hydroxylées et ainsi, échappent à la dégradation par le protéasome. En conséquence, les sous unités HIFα sont stabilisées et peuvent se dimériser avec les sous unités HIFβ, exprimées de manière constitutive et localisées au noyau, afin de former un complexe transcriptionnel actif. Ce complexe nouvellement formé permet alors le recrutement de coactivateurs transcriptionnels (p300 / CBP) au niveau des différentes zones HRE (*Hypoxia response element*) présentes au sein de plusieurs promoteurs. Ainsi, la stabilisation de ce complexe permet aux cellules d'initier l'activation d'un programme transcriptionnel leur permettant de s'adapter à l'hypoxie (Figure 7).

Les ROS (*reactive oxygen species*), produits en condition hypoxique par le complexe mitochondrial III, permettent également la stabilisation de ces sous- unités en initiant l'inactivation des PHD (Chandel et al., 2000) (Guzy et al., 2005). Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer ce mécanisme d'action. L'une d'entre elles, émise par Lee et collaborateurs stipule que les ROS mitochondriaux générés en condition hypoxique permettent l'oxydation des résidus cystéine de la PHD2 induisant son inactivation et conduisant ainsi à la stabilisation des sous unités HIFα (Lee et al., 2016). En plus des ROS, les métabolites ont également un rôle dans l'inhibition de l'activité de PHD2. Dans le cadre de mutations conduisant à l'accumulation de succinate et de fumarate, ces derniers

inhibent également l'activité de PHD2 en rentrant en compétition avec son substrat l'α-cétoglutarate entrainant ainsi une accumulation d'HIFα (Pollard et al., 2005).

Enfin, la production de L-2-hydroxyglutarate (L-2HG), antagoniste à l'α-cétoglutarate, est favorisée en condition hypoxique, en concomitance à l'acidose entrainant ainsi la stabilisation des sous-unités HIFα (Intlekofer et al., 2017).

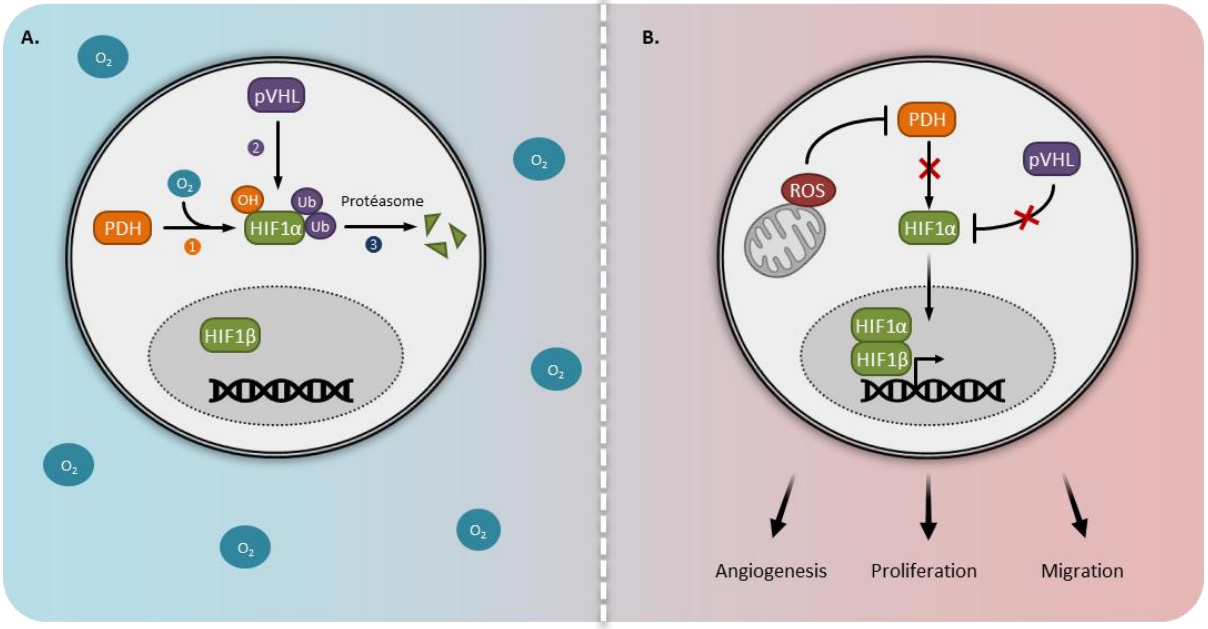



**Figure 7 : Régulation de la sous unité HIF1α.**
**A.** En condition de physioxie, (1) les PHD vont hydroxyler la sous unité HIF1α entrainant ainsi (2) la poly-ubiquitinylation d'HIF1α par la pVHL. Enfin (3), HIF1α sera dégradé par le protéasome. **B.** En condition hypoxique, les PHD ne pourront pas hydroxyler HIF1α entrainant ainsi sa stabilisation et sa translocation vers le noyau. Une fois au sein de ce dernier, HIF1α se dimérise avec HIF1β permettant ainsi l'expression de programme génique spécifique à l'hypoxie.

## 2. Implication dans la résistance aux traitements au sein des tumeurs solides

Les facteurs de transcription HIF sont largement exprimés au sein des tumeurs solides et corrèlent souvent avec un sombre pronostic. En effet, l'adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie entraine un switch métabolique contribuant aux phénomènes de résistance aux thérapies des cellules cancéreuses.

- **Impact sur la réponse à la radiothérapie**

L'action de la radiothérapie repose en partie sur une radiolyse de l'eau amenant à la production de ROS et à l'induction de dommages à l'ADN, avec principalement des cassures doubles brins conduisant à une mort cellulaire. L'efficacité de la radiothérapie dépend de plusieurs phénomènes impliquant le microenvironnement tumoral et l'ensemble de la population cellulaire de

la tumeur, réunis sous le terme des « 5R de la radiothérapie » avec : Réparation (des cassures de l'ADN après radiothérapie), Redistribution (des cellules dans le cycle cellulaire), Repeuplement (des cellules tumorales après la session d'irradiation), Réoxygénation (des cellules tumorales ayant résisté à la radiothérapie), et Radiosensibilité intrinsèque. Un nouveau paramètre émergeant est désormais admis : la Réactivation, faisant référence à l'implication du système immunitaire dans la réponse à la radiothérapie (Boustani et al., 2019) (Rakotomalala et al., 2021).

Néanmoins, de nombreuses tumeurs finissent par échapper à la radiothérapie, engendrant une reprogression de la tumeur. La présence de régions hypoxiques au sein des tumeurs solides est l'une des causes expliquant la radiorésistance de ces tumeurs récalcitrantes (Horsman and Overgaard, 2016). En effet, l'adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie entraine le remaniement de certaines voies de signalisation ; notamment impliquées dans l'autophagie, la détoxification des ROS ainsi que la mort cellulaire ; pouvant justifier la radiorésistance des cellules.

De plus, la faible oxygénation du tissu tumoral tend à diminuer les dommages à l'ADN induits par la radiothérapie, et ainsi à limiter la destruction des cellules (Begg and Tavassoli, 2020). L'une des hypothèses pour étayer cette diminution a été formulée par Richardson et Harper, suggérant que les radiations augmentent les ROS mitochondriaux perturbant ainsi le métabolisme mitochondrial ; ce qui est d'autant plus délétère pour les cellules en condition aérobie que les cellules en conditions hypoxiques (Richardson and Harper, 2016). De surcroit, en condition hypoxique, des voies de signalisation permettant la réparation de l'ADN sont activées, notamment grâce à la stimulation qu'HIF1α exerce sur l'expression de la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN causés par les radiations ionisantes (Mukherjee et al., 2009).

D'autre part, l'adaptation du programme génique opérée par les cellules tumorales en réponse au facteur de transcription HIF1 permet, entre autres, l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1) qui a pour rôle d'inactiver la pyruvate déshydrogénase (PDH) qui est responsable de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA pour alimenter le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) favorisant ainsi la glycolyse (Wigfield et al., 2008). De surcroit, PDK1 promeut le maintien d'un faible niveau de ROS dans les cellules hypoxiques, minorant ainsi les effets de la radiothérapie (Kim et al., 2006). En conséquence, l'hypoxie a la possibilité de soutenir la radiorésistance des cellules en favorisant les processus de détoxification des ROS et en maintenant un métabolisme glycolytique.

Afin de favoriser un métabolisme glycolytique, les cellules hypoxiques favorisent des voies de signalisation telles que celle des pentoses phosphates (PPP) participant à l'hémostasie rédox (Nagao et al., 2019). De surcroit, une hypoxie cyclique sévère peut accroitre le taux de glutathions (GSH) grâce à une régulation positive de *SLC25A1* et *SCLC25A10 ;* transporteurs de citrates localisés au niveau de

la membrane interne mitochondriale ; amenant à une réduction des ROS mitochondriaux couplée à un potentiel de détoxification accrue entrainant alors une résistance à la radiothérapie (Hlouschek et al., 2018a, 2018b).

L'inhibiteur de la sérine peptidase Kazal de type 1 (SPINK1), sous le contrôle des facteurs de transcription HIF, est sécrété afin de réduire des dommages à l'ADN induits, et ainsi contribue à améliorer la résistance des cellules à la radiothérapie. De plus, cette enzyme a la possibilité d'agir de manière paracrine afin de protéger les cellules adjacentes des effets de la radiothérapie par l'intermédiaire de l'EGFR et du facteur nucléaire 2 lié aux érythroïdes (NRF2) (Suwa et al., 2021).

Dans le cadre de plusieurs modèles de cancer, la présence d'hypoxie au niveau de la tumeur combinée à un traitement par radiothérapie entraine une activation de l'autophagie (Patel et al., 2014). L'autophagie, dans la majorité des cas, est un mécanisme protégeant les cellules des dommages, et notamment après irradiation *via* le recyclage des composants cellulaires. Par ailleurs, l'autophagie peut amoindrir le stress oxydatif lié à l'irradiation et ainsi en diminuer les effets (Wei et al., 2023).

L'implication des cellules souches cancéreuses est également un élément crucial expliquant la récidive tumorale après radiothérapie grâce à leurs propriétés d'auto-renouvellement. Or, l'hypoxie est un acteur clef dans le maintien du caractère souche des cellules (Emami Nejad et al., 2021; Liu et al., 2020). L'hypoxie chronique a notamment un rôle prépondérant dans le maintien des cellules souches persistantes. En effet, l'hypoxie maintient les cellules $CD133^+$ de glioblastomes dans un stade indifférenciées et favorise leur capacité à l'auto-renouvellement (Soeda et al., 2009). L'hypoxie a en effet la possibilité d'induire la phosphorylation d'AKT et ainsi, d'activer la voie Akt/Wnt /β-caténine. La voie NOTCH possède également un rôle dans le maintien des propriétés d'auto-renouvellement et est médiée par les facteurs de transcription HIF dans les cellules de glioblastome (Luo et al., 2018) (Figure 8).

Finalement, bien que la mort des cellules en zones physioxiques post-irradiation entraîne une meilleure diffusion de l'oxygène et ainsi, conduit à une « Réoxygénation » des zones hypoxiques, un stress oxydatif se met en place qui *in fine* favorise HIF1 (Moeller et al., 2004). En effet, la réoxygénation conduit à l'activation de la signalisation AKT/mTOR dépendante du glucose qui entraine par la suite une stabilisation d'HIF1 (Harada et al., 2009). L'implication de la « Réoxygénation » sur la radiorésistance apparait cependant quelque peu ambiguë.

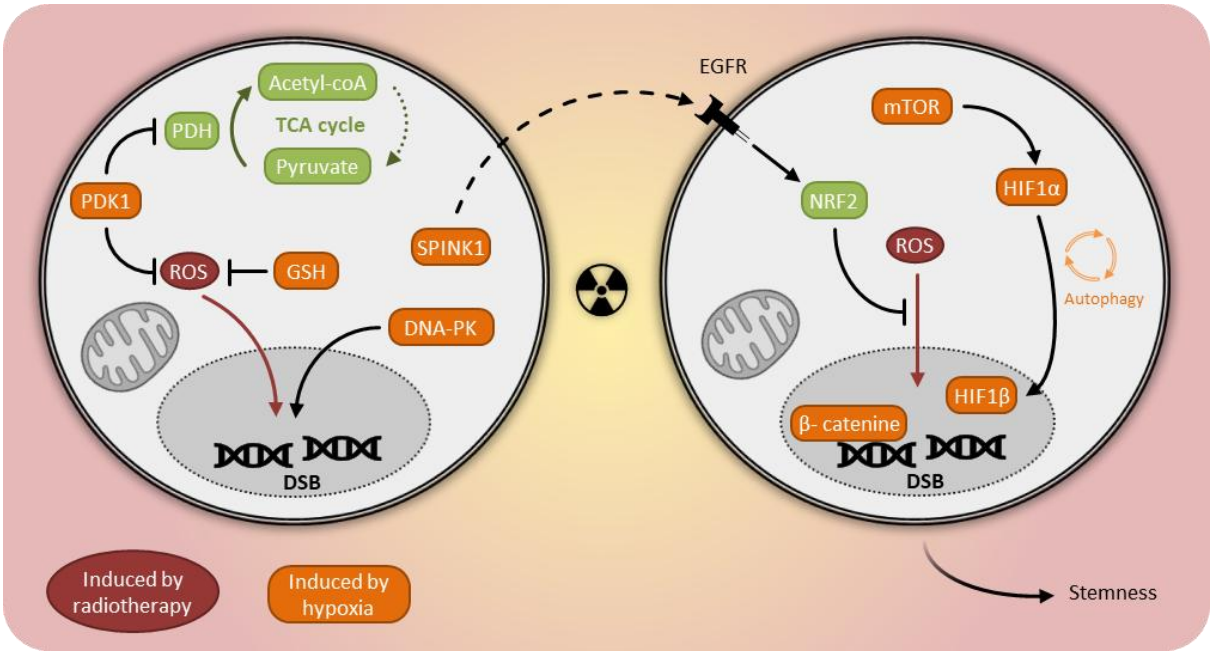



**Figure 8 : Implication de l'hypoxie dans la radiorésistance.**
La radiothérapie induit la mort cellulaire *via* la production de radicaux libres entrainant des dommages à l'ADN. En condition hypoxique, l'expression de PDK1 est augmentée favorisant ainsi la glycolyse ainsi que la diminution des dommages à l'ADN. De plus, HIF1α favorise l'expression de l'ADN-PK impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN. En condition hypoxique, les cellules tumorales ont la capacité de sécréter SPINK1 augmentant la réponse antioxydante *via* NRF2 pour limiter les effets liés à la radiothérapie. D'autres mécanismes d'action sont également mis en place par les cellules tumorales induisant une résistance à la radiothérapie tels que l'autophagie, l'activation de la voir mTOR qui conduit à la stabilisation du facteur HIF1α lors de la réoxygénation du tissu, un renforcement du système redox, et également, l'activation de la β-caténine, responsable du caractère souche des cellules de gliomes.

- **Impact sur la réponse aux traitements anticancéreux**

En raison du switch métabolique s'opérant en condition hypoxique, les cellules tumorales deviennent plus résistantes aux thérapies à cause de l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la résistance aux traitements.

L'expression de ces gènes nouvellement exprimés en zone hypoxique entraine notamment une diminution de la concentration intracellulaire de la molécule thérapeutique. Ce phénomène est principalement lié aux actions de la glycoprotéine P (P-gp) et de BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) qui sont des transporteurs ABC (ATP- bingind cassette) et des pompes d'excrétion de médicaments dépendantes de l'ATP. L'expression de la P-gp et de la BCRP est, en effet augmentée *via* les ROS générés en condition hypoxique (Pinzón-Daza et al., 2017).

L'acidification du milieu en zone hypoxique est également un paramètre clef dans la résistance aux traitements puisque permet notamment de maintenir le caractère souche des cellules tumorales, contribuant ainsi à l'auto-renouvellement et à l'augmentation de la masse tumorale (Sharifzad et al., 2019). De surcroit, cette acidification peut limiter, voir inhiber les effets des bases faibles et de nombreux autres agents thérapeutiques protonés.

En plus des voies de signalisation favorisant ce caractère souche telles que Wnt et Notch, d'autres voies de signalisation sont également médiées par HIF comme la survie cellulaire avec les voies MAPK, PI3K/ Akt/mTOR et NF-kB, contribuant à la chimiorésistance des cellules en limitant les effets apoptotiques des agents thérapeutiques (Doktorova et al., 2015).

Les tumeurs hypoxiques présentent également une altération de l'expression de TP53 puisque ce dernier est régulé négativement par l'hypoxie. Cette déstabilisation en concomitance avec la régulation positive de la topoisomérase 2A et de DNA-PK, Ku80 et Ku70 contribue à limiter les effets des agents thérapeutiques engendrant des dommages à l'ADN (Wirthner et al., 2008). La présence d'hypoxie au sein de la tumeur est en lien avec une régulation négative de l'expression de Bid et BAX, protéines de la famille BCL-2 impliquées dans l'apoptose et dans la mort cellulaire par catastrophe mitotique (Erler et al., 2004).

Finalement, l'ensemble de ces facteurs tendent à expliquer la résistance s'opérant au sein des cellules tumorales en condition hypoxique.

- **Impact sur la réponse aux immunothérapies**

Le microenvironnement tumoral peut inclure divers types de cellules immunitaires tels que, les macrophages associés à la tumeur (TAM), les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC), les cellules T et les cellules Natural Killers (NK).

Les TAM subsistent selon 2 états de polarisation différents : le phénotype M1 présentant des caractéristiques suppressives de tumeurs et le phénotype M2 favorisant la tumorigenèse. Au sein d'un contexte hypoxique, la sécrétion de chimiokines et de métabolites (tels que le VEGF, la sémaphorine 3 (SEMA3A), le peptide II d'activation des monocytes endothéliaux (EMAP II)) par les cellules tumorales attire les macrophages pour induire leur polarisation vers un phénotype M2. De surcroit, l'hypoxie peut impacter directement le phénotype des macrophages en déclenchant le programme génétique responsable de la polarisation des macrophages vers un type M2 (Laoui et al., 2014). Le relargage de lactate, induit par la glycolyse qui est favorisé par HIF1α, favorise également cette polarisation des TAM vers un phénotype M2 (Colegio et al., 2014). De ce fait, Les TAM – M2 sont majoritaires au sein des tumeurs hypoxiques engendrant ainsi un microenvironnement immunosuppresseur *via* le relargage de facteurs tel que le PDGF, VEGF ou encore TGF-β. En outre, la signalisation HIF1α au sein des TAM peut entrainer la sécrétion d'IL-23, cytokine stimulant la prolifération des T-reg et régulant positivement l'expression de cytokines immunosuppressives contrecarrant l'activité cytotoxique des lymphocytes (Fu et al., 2019). Enfin, JEONG et collaborateurs émettent l'hypothèse selon laquelle les TAM ont la capacité de maintenir un microenvironnement tumorale hypoxique. En effet, l'épuisement

de ces derniers réduit l'hypoxie, promeut l'infiltration des cellules lymphocytes T et contribue à l'amélioration de l'efficacité des immunothérapies (Jeong et al., 2019).

D'autre part, au sein d'un environnement hypoxique, les cellules tumorales ont la capacité, sous le contrôle d'HIF1α, d'exprimer des chimiokines tel que CXCL12/SDF-1, CCL5, CCL28, pour appâter des cellules immunosuppressives dont les MDSC et les cellules T-reg (Du et al., 2008 ; Lin et al., 2012).

Par ailleurs, le récepteur NKG2D des cellules NK posséderait un rôle central dans la médiation des réponses de ces cellules contre la tumeur, or HIF1α inhibe l'expression de ce dernier, entraînant une altération des capacités cytotoxiques des cellules NK (Champsaur and Lanier, 2010). En outre, l'hypoxie diminue les capacités des cellules NK à sécréter l'IFN-ϒ, le TNF-α, le CCL3 et le CCL5 (Parodi et al., 2018). Enfin, l'hypoxie *via* une fission excessive des mitochondries au sein des cellules NK promeut la diminution de la cytotoxicité de ces cellules amenant à un échappement des cellules tumorales aux cellules NK (Zheng et al., 2019).

Les lymphocytes T, autres acteurs majeurs dans la réponse immunitaire, voient leur recrutement également altéré par l'hypoxie. En effet, l'hypoxie peut entrainer un enrichissement des tumeurs en collagène créant ainsi une barrière physique limitant l'extravasation et l'infiltration des lymphocytes T $CD8^+$ vers la tumeur (Kuczek et al., 2019). De plus, l'hypoxie favorise l'infiltration de cellules immunosuppressives sécrétant des cytokines et chimiokines telles que l'IL-10, l-IL-35, le TGF-β, le CCL, CCL28 et le CXCR4 altérant la réponse immunitaire des lymphocytes T (Viguier et al., 2004 ; Yan et al., 2011).

Enfin, l'hypoxie peut également moduler directement les checkpoints immunitaires (CI) et également agir sur les ligands de ces CI au niveau des cellules immunitaires et des cellules tumorales. En effet, le gène *PD-L1* possède une HRE qui est une cible directe d'HIF1α. Une fois activé, PD-L1 active la voie mTOR, favorisant la survie cellulaire et la régulation positive d'HIF1α (Clark et al., 2016). Ainsi, les inhibiteurs des CI sont plus performants dans les zones oxygénées qu'au sein des zones appauvries en oxygène.

## C. Barrière hémato-encéphalique

L'un des premiers indices de l'existence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) a été apporté par Paul EHRLICH en 1885. Au cours de ses travaux, ce dernier a en effet réalisé des tests d'injection de colorants hydrophiles dans la circulation sanguine d'animaux entrainant la coloration de tous les organes à l'exception de la moelle épinière et du cerveau. La conclusion apportée à ces résultats fut que le SNC est protégé du reste de l'organisme (Ehrlich, 1885). En 1913, Edwin GOLDMAN injecta, au contraire, du bleu de trypan dans le liquide cérébrospinal et observa que seul le tissu cérébral était coloré mettant ainsi en évidence la présence d'une barrière entre le cerveau et le sang (Goldmann, 1913). C'est en 1922, que STERN entérine le terme de « Barrière Hémato-Encéphalique » (Menaceur et al., 2021). Au fil des années, le rôle de la BHE a alors été finement décrit comme une structure protégeant le SNC en limitant l'entrée des toxines, des pathogènes, des cellules immunitaires et de subvenir aux besoins énergétiques du cerveau en transportant les métabolites nécessaires de manière sélective (Wu et al., 2023).

### 1. Physiologie de la BHE

La BHE est présente au niveau de l'ensemble du système vasculaire cérébral mais ses fonctions s'exercent principalement au niveau des capillaires qui représentent 85 % de la surface vasculaire du cerveau et sont le principal lieu d'échanges entre le sang et le parenchyme cérébral (Gould et al., 2017). Ces échanges sont finement contrôlés grâce aux capacités restrictives de la BHE conférées par des intercommunications entre les cellules endothéliales et cellules environnantes (Daneman and Prat, 2015).

Les capillaires du SNC sont composés d'une monocouche de cellules endothéliales formant la paroi vasculaire. Ces dernières partagent la membrane basale avec les péricytes et astrocytes qui vont leur apporter un soutien structurel et fonctionnel (Abbott et al., 2006; Armulik et al., 2010) et l'ensemble est partiellement recouvert de pieds astrocytaires. Ces différentes cellules interagissent avec les cellules environnantes comme les neurones, les oligodendrocytes et la microglie. Cet ensemble forme « l'unité neuro-glio-vasculaire » (UNGV) et la communication au sein de cette unité permet notamment d'informer les cellules endothéliales des besoins métaboliques des neurones (Kugler et al., 2021) (Figure 9).

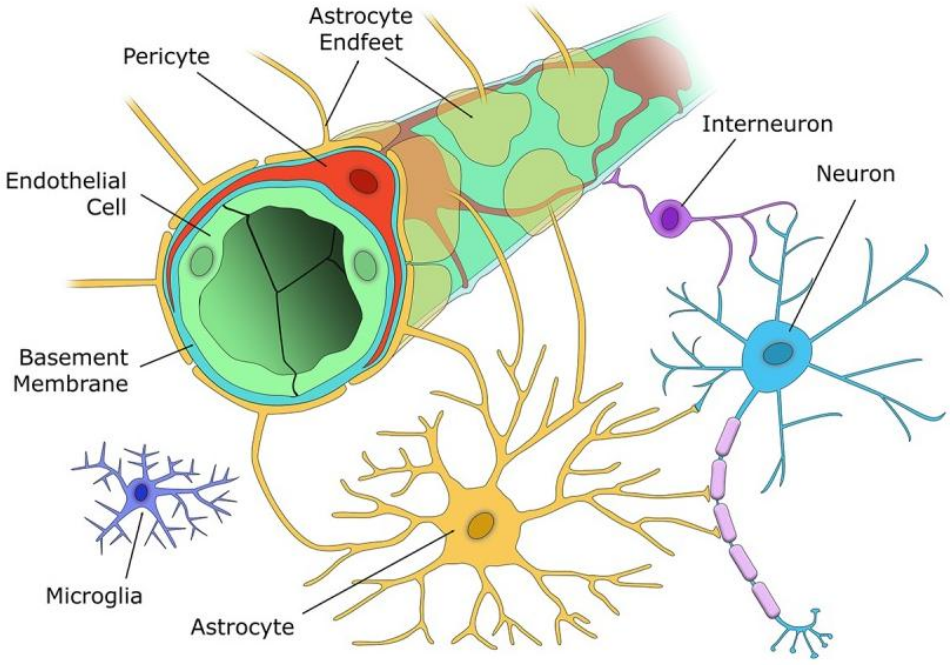



**Figure 9 : Représentation schématique de la structure de la barrière hémato-encéphalique.**
Les capillaires sont composés d'une monocouche de cellules endothéliales (en vert), entourée par des péricytes (en rouge). Ces deux types cellulaires sont ancrés dans la même membrane basale (en bleu). Cet ensemble est complété par des pieds astrocytaires (en jaune). L'UNGV contient également des cellules microgliales (en bleu / violet) et de neurones (en bleu). (Issus de Brown et al., 2019)

Finalement, chacun de ces 3 types cellulaires possède une fonction qui lui est propre et coopère entre eux afin d'assurer les fonctions de barrière et de filtre de la BHE.

- **Les cellules endothéliales**

Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux ont des spécificités les distinguant des cellules endothéliales en dehors du SNC (nommées cellules endothéliales périphériques). Ces propriétés sont liées à la présence de complexes jonctionnels régissant le passage d'ions et de molécules par la voie paracellulaire (Reese and Karnovsky, 1967). De surcroit, ces cellules sont dépourvues de fenestrations et de canaux trans-endothéliaux et ne possèdent qu'une faible quantité de vésicules d'endocytose et de pinocytose limitant ainsi les échanges par la voie transcellulaire (Chu et al., 2008; Wu et al., 2023). Le passage des cellules immunitaires est, quant à lui, limité par le faible niveau d'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales cérébrales par rapport aux cellules endothéliales périphériques (Rössler et al., 1992). Les cellules endothéliales sont également très riches en mitochondries permettant de fournir l'ATP nécessaire à l'activité des transporteurs fournissant les nutriments essentiels au cerveau et évacuant les déchets (Wu et al., 2023).

La surface de l'endothélium est recouverte d'un glycocalyx (mélange complexe de protéoglycanes et de glycoprotéines chargés négativement) particulièrement dense et participant à l'imperméabilité de la BHE en limitant les interactions des molécules et des cellules avec l'endothélium (Kutuzov et al., 2018). Autour de ce glycocalyx, se trouvent les péricytes ayant pour fonction de renforcer le rôle de filtre et de barrière des cellules endothéliales.

- **Les péricytes**

Les péricytes sont particulièrement présents au niveau du cerveau où ils sont enchâssés dans la membrane basale partagée avec les cellules endothéliales (Sun et al., 2021). Le SNC possède le taux de recouvrement de l'endothélium par les péricytes le plus important variant entre 30 et 70 % (Dalkara et al., 2011; Trost et al., 2016). Entre les cellules endothéliales et les péricytes se trouve une fine membrane basale, mais les 2 types cellulaires ont aussi des contacts directs. Ces contacts sont de plusieurs natures ; il existe des contacts de types *peg and socket,* mais également des plaques d'adhésion qui se forment entre ces 2 types cellulaires grâce aux N-cadhérines et connexines. Ces contacts permettent l'échange d'ions, de métabolites, de seconds messagers et d'ARN (Vandenhaute et al., 2011).

Les péricytes sont impliqués dans la formation de la BHE et son maintien au cours de l'âge adulte ainsi que dans l'angiogenèse, la stabilisation des vaisseaux, la synthèse de protéines de la MEC, la régulation de l'infiltrat leucocytaire, et dans le contrôle du flux sanguin grâce à leur propriété contractile (Brown et al., 2019; Daneman et al., 2010; Rössler et al., 1992).

- **Les astrocytes**

Parmi les sous-populations de cellules gliales, les astrocytes sont majoritaires et ont la capacité de faire des prolongements cellulaires pour former des pieds astrocytaires au contact des capillaires, et plus précisément au contact des cellules endothéliales et des péricytes (Abbott et al., 2006). Ces pieds recouvrent entre 80 et 90% de la surface des capillaires et sont reliés entre eux par des jonctions GAP et des desmosomes (Mills et al., 2022).

Les astrocytes sont au contact des synapses et des vaisseaux sanguins ce qui permet de détecter l'activité neuronale et de transmettre localement des signaux régulant le flux sanguin (Iadecola, 2004).

## 2. Organisation de la barrière physique de la BHE

Afin d'assurer son rôle de barrière et de filtre, la BHE possède différents atouts. En effet, cette dernière est notamment composée de différents complexes jonctionnels afin de garantir le rôle de barrière de la BHE. De surcroit, la BHE possède également des pompes d'efflux et des enzymes de détoxifications pour limiter et contrôler le passage des molécules vers le parenchyme cérébral.

- **Les différents complexes jonctionnels**

Les propriétés de barrière de la BHE sont principalement liées à la présence de complexes jonctionnels entre les cellules endothéliales comprenant des jonctions serrées et des jonctions adhérentes nécessitant l'intervention de protéines transmembranaires et cytoplasmiques (Santa-Maria et al., 2021). A noter que le glycocalyx est également un acteur important limitant l'accès des molécules anioniques à la membrane plasmique des cellules endothéliales

Les **jonctions adhérentes** permettent la création d'adhésions cellule-cellule, et rendent possible le premier contact nécessaire à la formation des jonctions serrées. Ces jonctions ont également un rôle dans l'organisation de l'actine, la modulation de la signalisation intracellulaire, et la régulation de la transmigration des leucocytes. Les principales jonctions adhérentes sont les platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) et des vascular endothelial (VE)-cadhérine (Sweeney et al., 2019).

Les **jonctions serrées** permettent, elles, de sceller les espaces intercellulaires au niveau des cellules endothéliales de la BHE et sont constituées de claudines et d'occludines (protéines transmembranaires). En plus de ces dernières, des protéines cytoplasmiques participent à l'organisation de ces jonctions et permettent de les relier au cytosquelette. Parmi ces protéines, on retrouve notamment les zonula-occludens-1 (ZO1), ZO-2, ZO-3 appartenant à la famille des membrane-associated guanylate kinases (MAGUK).

D'autres complexes jonctionnels participent également aux propriétés de barrière de la BHE parmi lesquels les molécules transmembranaires junctional adhesion molecules (JAMs) et l'endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM) faisant partie de la superfamille des immunoglobulines qui modulent l'étanchéité des jonctions serrées et la transmigration des leucocytes (Sweeney et al., 2019). Ces jonctions serrées sont aussi retrouvées au niveau des cellules endothéliales périphériques et ne peuvent donc pas expliquer à elles seules les propriétés de la BHE. Certains adaptateurs cytoplasmiques ainsi que des protéines d'adhésion tripartie sont enrichies au niveau du SNC chez la souris et seraient potentiellement impliquées dans la restriction du passage paracellulaire (Daneman et al., 2010).

- **Les pompes d'efflux**

Les pompes d'efflux ont pour objectif de limiter l'entrée des molécules (potentiellement néfastes) au sein du SNC pour le protéger. Cette classe de biomolécules est majoritairement représentée par les transporteurs de la superfamille ATP-binding cassette (ABC) ainsi que par les transporteurs de la superfamille des solutés ou SLC (solute carriers) (Hosoya et al., 2002).

Afin de transporter une molécule contre son gradient de concentration au travers de la membrane plasmique, les pompes d'efflux de la superfamille ABC utilisent l'hydrolyse de l'ATP. Au sein de la BHE les principales pompes ABC retrouvées sont : la P -Glycoprotéine (P-gp ou ABCB1), la BCRP (breast cancer resistance protein ou ABCG2) qui est la pompe d'efflux la plus exprimée au niveau de la BHE et les MRPs (multidrug resistance associated proteins) (Demeule et al., 2002; Lingineni et al., 2017). Ces pompes d'efflux sont localisées au niveau des cellules endothéliales, et plus particulièrement au niveau des membranes luminales et rejettent leur substrat dans le sang.

Les transporteurs SLC permettent, eux, un transport dans le sens du gradient de concentration (Al-Majdoub et al., 2019).

- **Les enzymes de détoxification**

Les enzymes de détoxification limitent l'accès de nombreux composés vers le cerveau, et sont présentes au niveau des cellules endothéliales, des péricytes et des pieds astrocytaires (Meyer et al., 1990; Shawahna et al., 2011). Ces dernières sont réparties au sein de 2 classes : les enzymes dites de phase I et les enzymes de phase II, intervenant respectivement aux 2 stades du métabolisme du médicament (Mohsin et al., 2024).

Les enzymes de phase I agissent par modification de leur substrat *via* des réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse et de cyclisation (Shawahna et al., 2013). Les principaux représentants de cette classe d'enzymes sont l'enzyme du cytochrome P450 et les monoamines oxydase (MAO). Ces dernières protègent tout particulièrement le cerveau des neurotransmetteurs circulants et des substances exogènes grâce à leur capacité à catalyser la désamination oxydative des amines (Agúndez et al., 2014). Au sein de la classe des enzymes de phase II, les glutathions-S-transférases (GST) sont les enzymes les plus exprimées au niveau des microvaisseaux cérébraux humains et ont un rôle important dans la neutralisation des ROS (Shawahna et al., 2011).

Ensemble, ces différents mécanismes contribuent au renforcement du rôle de barrière métabolique du cerveau, et permettent de filtrer de nombreuses molécules provenant de la circulation sanguine vers le cerveau.

- **Les propriétés de sélection de la BHE**

Dans le corps humain, le cerveau consomme 20 % de l'$O_2$, ainsi que 2/3 du glucose circulant (Dienel, 2019; Gustafsson et al., 2024). En ce sens, l'endothélium permet une diffusion rapide du $CO_2$ et de l'$O_2$ et également des petites molécules lipophiles ou autres molécules gazeuses, qui ont la capacité de diffuser de manière passive. Cependant, il existe des transports spécifiques pour les nutriments et pour l'exportation des déchets métaboliques vers la circulation sanguine. En raison de la présence des complexes jonctionnels, les molécules telles que les nutriments doivent emprunter la voie transcellulaire pour passer la BHE (Morris et al., 2017). Pour le transport du Glucose, il existe un transporteur nommé GLUT1 qui est le transporteur majoritaire de glucose au niveau de la BHE permettant le transfert bidirectionnel du glucose et d'autres hexoses (Pardridge et al., 1990). Quant au transport des acides aminés, ce dernier est assuré par 2 types de transporteurs, les transporteurs dépendants des ions $Na^+$ et les transporteurs des acides aminés indépendants des ions $Na^+$ (O'Kane and Hawkins, 2003).

Le passage des molécules à haut poids moléculaires se fait lui par transcytose. Ce mécanisme peut se faire par adsorption ou peut être initié par des récepteurs au niveau de l'endothélium (Ayloo and Gu, 2019).

Enfin, le transport de l'eau et des ions doit être finement régulé pour ne pas compromettre les signaux chimiques et électriques entre les neurones. Pour ce faire, des aquaporines et des canaux ioniques assurent la préservation de la composition du fluide interstitiel cérébral (Abbott, 2013).

## 3. Implications de l'unité vasculaire dans le développement des gliomes

- **Rôle des cellules endothéliales dans la migration des cellules de gliome**

Les gliomes ont la capacité de migrer le long des vaisseaux sanguins pour infiltrer les tissus environnants. L'un des mécanismes de migration des cellules de gliome est exercé grâce à la sécrétion de la bradykinine par les cellules endothéliales qui se fixe sur le récepteur B2 situé à la surface des cellules de gliome ce qui aura pour conséquence d'attirer les cellules de gliomes vers les vaisseaux sanguins (Liu et al., 2001; Montana and Sontheimer, 2011).

Les gliomes adultes s'associent préférentiellement aux artérioles et aux capillaires, ce qui leur permet de prendre le contrôle de la régulation du tonus vasculaire au travers de la libération de $K^+$. Ce contrôle permet aux gliomes d'induire une vasodilatation pour augmenter l'apport sanguin ou une vasoconstriction pour agrandir l'espace périvasculaire et faciliter l'invasion tumorale autour des microvaisseaux (Watkins et al., 2014).

- **Rôles des cellules astrocytaires dans la migration, et prolifération des cellules de gliome**

Dans le cadre d'une tumeur cérébrale, les astrocytes sont dans un état de gliose réactive se traduisant par une augmentation de l'expression de filaments intermédiaires GFAP (glial fibrillary acidic protein) et de la vimentine (phénomène observé dans des modèles murins de xénogreffes DMG altérés H3 K27M) (Plessier et al., 2017). Ce phénomène, en condition physiologique, permet de réparer les lésions cérébrales *via* la sécrétion de facteurs stimulant la croissance axonale. Dans le cas des tumeurs, la libération de facteurs de croissance couplée à celle de cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'à des protéases par les astrocytes réactifs permet d'induire la prolifération, la migration ainsi que l'échappement des cellules tumorales aux thérapies (Pekny and Nilsson, 2005).

## 4. Altération de la barrière hémato-encéphalique dans le cadre des glioblastomes

La perturbation des communications au seins de l'UNGV causée par des cellules tumorales de gliome, que ce soit adulte ou pédiatrique, peut engendrer une augmentation de la perméabilité endothéliale (Lyle et al., 2016). Il est à noter que ce phénomène d'altération de la BHE dépend du type de la tumeur, de sa localisation, de son grade, et sa croissance.

En clinique, dans le cadre des DMG, l'absence de rehaussement du signal en IRM observée après injection du produit de contraste traduit un potentiel maintien de la l'imperméabilité endothéliale (Warren, 2018). Par ailleurs, 80 % des cellules de DMG de la ligne médiane altérés H3 K27 surexpriment OLIG2, et il a été montré que les cellules de glioblastomes $OLIG2^+$ s'associent aux vaisseaux sanguins par co-option (contact des cellules tumorales à des vaisseaux pour récupérer de l'$O_2$ et des nutriments sans création de nouveaux vaisseaux sanguins) sans altération de la BHE. Dans ce contexte, CHAVES et collaborateurs se sont intéressés à l'étude de l'impact des DMG altérés H3K27M sur l'intégrité de la BHE. Il en résulte qu'au sein de modèles de xénogreffes de rats, les niveaux protéiques des transporteurs P-gp, BCRP, MRP1 et MRP4 au niveau du tronc cérébral demeurent inchangés (Chaves et al., 2020).

En ce sens, il semblerait que les DMG altérés H3K27M n'aient qu'un impact limité sur la BHE, permettant donc à cette barrière de conserver son intégrité et notamment son rôle de restriction limitant notamment la distribution des agents pharmacologiques (Warren, 2018). En effet, les pompes d'efflux au niveau des capillaires et des cellules tumorales contribuent à limiter l'accès des composés antitumoraux vers la zone tumorale cérébrale et ainsi aux cellules cancéreuses (Gomez-Zepeda et al., 2019) . *In fine,* la connaissance de la nature des pompes d'efflux chez les DMG est d'autant plus importante pour définir l'accessibilité d'un potentiel traitement thérapeutique puisque la majorité des traitements antinéoplasiques sont des substrats de transporteurs ABC (El-Khouly et al., 2017). En plus

de ces pompes d'efflux limitant l'efficacité des composés thérapeutiques, les CYPs agissent également en ce sens grâce à leur capacité de transformer les agents dit actifs en agents inactifs ou en substrats des pompes d'efflux (Ghosh et al., 2016). De surcroit, DELIGNE et collaborateurs ont mis en évidence que la co-culture d'un modèle de BHE sur transwell composée de cellules endothéliales et de péricytes humains avec une lignée de DMG altérée H3 K27M (HSJD-DIPG-007 ou HSJD-DIPG-013 ou HSJD-DIPG-014) mène à une augmentation de l'expression d'une enzyme de détoxification : CYP1A1 par les cellules de la BHE (Deligne et al., 2020).

Ensemble, ces mécanismes peuvent contribuer à la chimiorésistance observée au sein des DMG. La BHE représente donc un obstacle majeur à la diffusion des agents pharmacologiques ainsi qu'à leur efficacité (Warren, 2018).

Ainsi, l'hypoxie, la matrice extracellulaire, ainsi que la présence de la BHE sont des acteurs importants à prendre en compte pour évaluer la réponse des DMG à différentes stratégies thérapeutiques. A ce titre, différents modèles de DMG ont été développés, comportant chacun des avantages et des inconvénients, intégrant ou non ces différents paramètres.

# III. Les modèles d'études des DMG

## A. Modèles de cultures cellulaires des DMG

### 1. Modèle de lignées cellulaires 2D et 3D

Les lignées cellulaires, obtenues à partir d'un échantillon tumoral de patient, constituent le modèle le plus employé en laboratoire en raison de sa facilité d'utilisation et de son faible coût en comparaison avec des modèles plus complexes comme les organoïdes ou les modèles animaux. Les lignées cellulaires peuvent être cultivées en 2D ainsi qu'en 3D. Dans ce dernier cas, les cellules forment des sphères et se développent en suspension. C'est notamment le cas des cellules NCI-H82 (lignée issue d'un carcinome à petites cellules du poumon) cultivées sous forme de sphères ou encore les lignées de DIPG, HSJD-DIPG-007, ce qui permet de se rapprocher de la structuration physiologique d'une tumeur et notamment de conserver un phénotype plus proche de la tumeur d'origine. Les lignées cellulaires sont particulièrement utilisées pour étudier le potentiel de traitements thérapeutiques, notamment pour en évaluer l'impact sur la viabilité des cellules. De surcroit, certaines de ces lignées, si elles sont transplantées au sein de modèles souris, autorisent le développement d'une tumeur, présentant une histologie proche de celle de la tumeur d'origine. Ceci permet ainsi de réaliser des études plus complexes notamment dans le cadre du développement de nouvelles thérapies (Masters, 2000).

Toutefois, une instabilité génomique peut apparaitre au cours de la culture des cellules en raison d'un biais induit *via* notamment la sélection de clones se développant le plus rapidement au cours des passages. En outre, ces lignées, le plus souvent assez homogènes, ne permettent pas de récapituler l'hétérogénéité tumorale ni l'ensemble des acteurs cellulaires composant la tumeur et pouvant influencer fortement la réponse aux traitements (Masters, 2000).

Les lignées de DMG, sont majoritairement cultivées au sein d'un milieu de culture ayant une composition proche des cellules souches neurales avec du Neurobasal, DMEM- F12 supplémenté avec du PDGFRAA, PDGFRBB, FGF, EGF et de l'héparine. Ces cellules peuvent se développer sous forme de sphères ou comme cellules adhérentes.

Par l'entremise de ces lignées, des combinaisons thérapeutiques potentiellement intéressantes ont toutefois été identifiées dans les DMG. Par exemple, Monje et son équipe ont réalisé un criblage à haut débit de 2 706 molécules approuvées ou expérimentales sur plusieurs lignées cellulaires de DMG. Cette étude a ainsi permis d'identifier une potentielle combinaison thérapeutique pour les DMG comprenant des inhibiteurs d'HDAC et du protéasome (Lin et al., 2019).

## 2. Modèles d'organoïdes tumoraux

Les modèles organoïdes peuvent être réalisés à partir d'un échantillon tumoral ou encore grâce à l'introduction de mutations oncogéniques *via* génie génétique au sein d'organoïdes cérébraux. Les organoïdes sont cultivés au sein d'un environnement 3D permettant ainsi de mimer une structure tridimensionnelle se rapprochant de la physiologie de la tumeur primaire (Bian et al., 2018).

A ce titre BRUSCHI et collaborateurs ont développé des organoïdes de DMG afin d'étudier l'invasion tumorale. Pour ce faire, les auteurs sont partis du postulat que les cellules souches de gliome (CSG) sont les acteurs majoritairement responsables des propriétés malignes des DMG. De ce fait, des CSG dérivés de patients ont été utilisées afin de former des organoïdes tumoraux. Ces derniers ont été utilisés pour réaliser des tests d'invasions. De surcroit, les auteurs ont analysé le transcriptome de ces organoïdes afin d'étudier la mécanistique responsable du phénotype invasif de ces modèles. Ainsi, les auteurs ont mis en évidence que les organoïdes reflètent le comportement invasif des tumeurs parentales ainsi que l'importance de BMP7 dans le mécanisme d'invasion (Bruschi et al., 2023).

Les organoïdes dérivés de patient offrent la possibilité de récapituler avec finesse l'hétérogénéité intra- et inter-tumorale associée à la tumeur primaire et permettent de conserver au mieux les caractéristiques génétiques, protéomiques, morphologiques et environnementales de la tumeur *in vivo*. En revanche, ces modèles nécessitent un accès aux échantillons pouvant être contraignant dans le cadre des DMG en raison du faible nombre de cas et de l'accessibilité à la tumeur limitée, notamment en termes de quantité de matériel disponible pour la recherche dans le cas d'une biopsie stéréotaxique. De plus, afin de réaliser ces modèles, le tissu tumoral est, dans la plupart des cas, dissocié en cellules uniques, impactant de fait l'architecture du tissu initial (LeSavage et al., 2022).

Aujourd'hui, l'utilisation des modèles *in vitro* permet, en première intention, d'évaluer une hypothèse ou le choix d'une thérapie qui seront souvent validés par la suite au sein de modèle plus complexe. En ce sens, DUCHATEL et collaborateurs, ont effectué des tests préliminaires quant à l'efficacité du paxalisib, un inhibiteur de la voie PI3K / AkT / mTOR, sur différentes lignées de DMG, validant ainsi l'impact de cette molécule sur la viabilité des cellules avant de conclure par l'utilisation de modèles de xénogreffes chez la souris (Duchatel et al., 2024).

## B. Les différents modèles de DMG chez la souris

### 1. Modèle transgénique

La modification génétique de modèle murin permet d'analyser la fonction d'un gène ou plusieurs gènes en particuliers, et *in fine* d'en étudier l'impact sur la tumorigenèse. Globalement, ces souris sont obtenues soit, par injection pronucléaire afin de générer des modèles exprimant une protéine d'intérêt ectopique soit, par ciblage génétique dans le génome des cellules souches embryonnaires (CSE) de souris (Devoy et al., 2012).

Ces modèles de souris transgéniques ont notamment été utilisés afin d'étudier le rôle driver de la mutation H3.3 K27M au cours de la tumorigenèse. Dans ce contexte, SALOMONI et collaborateurs ont développé des modèles murins transgéniques grâce à l'utilisation de différentes techniques de génie génétique afin de déterminer le stade au cours duquel l'apparition de la mutation H3.3 K27M serait susceptible d'induire un gliome de haut grade (Pathania et al., 2017). L'introduction de la mutation H3.3 K27M combinée ou non avec le KO de ATRX et p53 a été réalisé au sein des cellules embryonnaires de souris, ou au sein de cellules progénitrices neurales sous le contrôle de promoteur NES ou GFAP durant le développement et dans le cerveau post-natal ou *via* une approche par électroporation *in vivo* intracrânienne chez des souris néonatales. Cependant, ces 3 techniques n'ont pas permis d'aboutir à la formation d'une tumeur, questionnant ainsi l'importance du stade d'apparition de la mutation. Subséquemment, les auteurs ont testé une électroporation *in utero* pour permettre la surexpression de H3.3 K27M et le KO de *Trp53* au cours du développement embryonnaire ce qui a permis le développement de gliome sustentoriel ou au niveau de la ligne médiane. Dans un contexte où les pHGG mutés H3.3 sont souvent associés à des mutations secondaires, les auteurs se sont également intéressés à leur impact sur la tumorigenèse. Ainsi, il semblerait que la mutation H3.3 K27M combinée à la perte de fonction de p53 soient suffisantes pour induire une tumorigenèse chez des modèles murins. De plus, la perte de fonction *ATRX* diminue le caractère invasif des tumeurs et la surexpression de PDGFRA promeut l'invasion tumorale (Pathania et al., 2017).

Les souris génétiquement modifiées permettent d'étudier l'évolution des gènes au cours du développement de la souris et de son importance. Cependant, ces modèles de souris transgéniques ne permettent pas de reproduire toute la complexité des mutations secondaires associées à une pathologie donnée.

## 2. Modèles de xénogreffes

- **Modèles de xénogreffe dérivés de lignée cellulaire**

Les modèles de xénogreffe dérivés de lignées cellulaires sont obtenus par injection de ces dernières le plus souvent chez la souris. Ces injections peuvent être orthotopiques, c'est-à-dire que les cellules sont introduites au niveau d'une zone anatomique similaire à celle de l'Homme, ou hétérotopiques, dans ce cas, les cellules sont injectées dans une zone anatomique différente à celle d'origine. Ces modèles permettent de fournir une structure 3D complexe. L'utilisation de lignée pour réaliser ces modèles permet également de réaliser, en amont, des modifications génétiques afin d'incorporer, par exemple, des rapporteurs fluorescents pour le suivi de la croissance, ou encore, de réaliser des KO sur des gènes d'intérêt et d'en évaluer l'impact sur la croissance tumorale ou encore sur la survie. Cependant, les modèles de xénogreffe réalisés à partir de lignée cellulaire ne permettent pas de récapituler l'ensemble de la complexité et de l'hétérogénéité tumorale (Foss and Pathania, 2023).

Ce modèle a notamment été utilisé afin d'étudier l'impact du panobinostat, un inhibiteur d'histone désacétylase montrant des effets encourageants *in vitro*, sur les DMG localisés au niveau du tronc cérébral. Dans ce contexte, les auteurs ont pu observer une diminution de la croissance de la masse tumorale lors de l'administration du panobinostat aux souris ayant été greffées avec une lignée arborant une mutation H3.3 K27M (Grasso et al., 2015). Malgré ces résultats prometteurs le panobinostat, lors de différents essais cliniques, n'a pas montré des résultats satisfaisants notamment liés à des interrogations quant à sa capacité à franchir la BHE et mais également quant à sa toxicité *in vivo* (Hayden et al., 2021).

- **Modèles de xénogreffe dérivés du patient**

Les modèles PDX (patient derived xenograft) sont obtenus par transplantation de tissus tumoraux de patients au sein de modèles immunodéprimés ou humanisés (modèle basé sur la transplantation de cellules ou tissus humains pour établir un système immunitaire). Cette implantation peut être réalisée par voie orthotopique ou hétérotopique (qui est souvent sous-cutanée). Pour un maintien dans le temps, la tumeur formée peut ensuite être extraite et réimplantée dans un nouvel animal afin de demeurer strictement dans un contexte *in vivo*. Ces modèles permettent de conserver au mieux la complexité de la tumeur étudiée, et notamment de rendre compte de l'hétérogénéité intratumorale. En outre, ces modèles permettent de préserver les caractéristiques génétiques du patient, ouvrant ainsi la voie à la médecine de précision. Très couteux à mettre en œuvre et à entretenir, les PDX sont principalement utilisés dans le cadre du développement et de l'étude de

nouveaux traitements anticancéreux ou encore afin d'étudier différentes combinaisons thérapeutiques (Y. Liu et al., 2023).

Ce modèle de souris PDX a notamment été utilisé afin d'étudier l'impact de l'ONC201 et l'ONC206 sur les DMG. Les auteurs ont pu démontrer que l'utilisation de ces 2 imipridones permettait d'accroitre la survie des modèles de DMG (Przystal et al., 2022).

Ces modèles possèdent néanmoins des limites : après 2 à 5 passages, le stroma tumoral du patient est quasiment entièrement remplacé par le stroma de la souris, offrant une fenêtre d'analyse optimale réduite. De surcroit, en raison de spécificités d'espèce, les cytokines et les chimiokines de souris ne parviennent pas à maintenir les fonctions des cellules immunitaires au sein du modèle humanisé. En effet, l'interleukine-2 murine possède un effet minime sur l'activation des lymphocytes T humains, et de manière similaire l'interleukine-15 de souris n'a que des effets limités sur l'activation des cellules NK humaines (Collins, 1989; Huntington et al., 2009). Cependant, des stratégies plus avancées, notamment axées sur le développement de souris génétiquement modifiées exprimant des cytokines ou des facteurs de croissance humains pourraient pallier cette limite. De plus, des études ont mis en évidence que ces modèles PDX sous représentaient l'hétérogénéité subclonale, aspect pouvant être limitant dans le cadre de criblage de médicaments (Dang et al., 2020).

Finalement, les modèles murins offrent la possibilité de reproduire des tumeurs 3D au sein d'un environnement complexe. Cependant, peu de protéines sont conservées à 100 % entre l'Homme et la souris, et les différences entre les séquences orthologues peuvent avoir des conséquences fonctionnelles (Chinwalla et al., 2002). De plus, la mise en œuvre de xénogreffes orthotopiques demeure complexe dans l'étude des DMG localisés au niveau du Pont de Varole en raison de la taille réduite de ce dernier chez la souris (environ 2 à 3 mm). En effet, la taille estimée d'une DMG au niveau de cette zone *via* IRM chez l'enfant est d'approximativement 2 à 3 cm au moment du diagnostic (à noter que l'estimation est difficile en raison du caractère diffus de la tumeur). Ainsi, la reproduction d'une tumeur de cette taille apparait complexe au sein d'un modèle souris, or la taille est un paramètre important pouvant notamment influencer sur la création d'un gradient de nutriments et d'oxygène. De surcroit, bien que des solutions aient été développées pour l'imagerie des petits animaux, le suivi en temps réel de la tumeur reste contraignant. Enfin, nombre de stratégies thérapeutiques ont été menées avec succès au sein de ces modèles animaux mais se sont finalement soldées par un échec lors du transfert vers la clinique reflétant ainsi un manque d'adéquation de ces modèles pour certaines applications (Tableau 1).

| Modèles / Critères | Lignée cellulaire | Organoïdes | Modèles de xénogreffes | Modèles PDX | Modèles murins transgéniques |
|---|---|---|---|---|---|
| Espèce humaine | ✓✓ | ✓✓ | ✓ | ✓ | ✗ |
| Hétérogénéité cellulaire | ✗✗ | ✓✓ | ✗ | ✓ | ✓ |
| Organisations 3D | ✗✗ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Matrice extracellulaire | ✗✗ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Perfusion | ✗✗ | ✗ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Système immunitaire | ✗✗ | ✗ | ✗ | ✗ | ✓ |
| Suivi en temps réel | ✓✓ | ✓ | ✗ | ✗ | ✗ |
| Haut débit | ✓✓ | ✓ | ✗ | ✗ | ✗ |
| Facilité d'utilisation | ✓✓ | ✓ | ✗ | ✗ | ✗ |
| Prédiction réponse aux traitements | ✗ | ✓ | ✓ | ✓ | ✗ |

**Tableau 1** : Récapitulatif des différents modèles de DMG avec leurs avantages et leurs inconvénients.

## C. Les différents modèles de glioblastome-sur-puce

Issu des organes-sur-puce, l'essor des tumeurs-sur-puce repose sur une succession de découvertes scientifiques. En 1665 lorsque Robert HOOKE, biologiste, découvre l'existence de ce qu'il croit être des cellules en observant une tranche de liège. Il introduira le terme de « cellule » dérivé du latin *Cella* signifiant « petite chambre » dans son ouvrage « *Micrographia, or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses : with observations and inquiries thereupon* ». Près de 300 ans plus tard, le Dr. George GEY, entre 1952 et 1955 s'attellera à mettre au point la première lignée cellulaire humaine à partir d'un prélèvement métastatique du cancer du col de l'utérus et nommée « HeLa » faisant référence au nom de la patiente, Henrietta LACKS. Une étape majeure a également eu lieu dans les années 50 dans la complexification des modèles avec l'utilisation de sphéroïdes comme modèle de culture ; bien que le terme n'ait était employé que 20 ans plus tard dans la littérature pour décrire des cellules pulmonaires du hamster formant des sphères presque parfaites. Ayant constaté la précision avec laquelle les sphéroïdes étaient capables d'imiter les

interactions cellulaires, le Dr. Mina BISSELL a démocratisé la culture 3D dans les années 80 en soulignant l'importante de la matrice extracellulaire sur l'expression des gènes. Une étape supplémentaire a été franchie avec l'avènement des organoïdes grâce à l'utilisation pour la première fois en 2007 des cellules souches pluripotentes induites humaines par l'équipe du Pr. Shinya YAMANAKA (Takahashi et al., 2007). Grâce à l'ensemble de ces éléments, quelques années plus tard, le Pr. Donald INGBER mettra au point le premier modèle d'organe-sur-puce ce qui permettra par la suite, dans les années 2010 d'avoir les premiers modèles de tumeurs-sur-puce (Huh et al., 2010).

## 1. Définition des organes-sur-puce et généralités

Dans ce contexte, une nouvelle catégorie de modèle d'étude préclinique a émergé : les organes-sur-puces. Ces derniers peuvent être définis comme des systèmes biomimétiques où la biologie peut être couplée à la microfluidique avec pour objectif de reproduire certaines fonctions physiologiques et/ou mécaniques d'un organe (Leung et al., 2022) . Issus du monde de la nano et micro- ingénierie, ils sont composés de cellules placées dans un dispositif aux dimensions de l'ordre du micromètre au millimètre. Ces modèles ont pour objectif d'intégrer différentes modalités de culture cellulaire au sein d'un design adapté à la question biologique, mimant un ou plusieurs aspects physiologiques, et autorisant, par microfluidique, une communication dynamique entre les différents compartiments (Low et al., 2021).

Les organes-sur-puces possèdent l'avantage de permettre le contrôle de l'ensemble des paramètres physiologiques (shear stress, environnement matriciel, …) et un suivi en temps réel de différentes variables biologiques. Ensemencés avec des cellules humaines, ces modèles sont utilisés dans le cadre de criblages de molécules en vue d'une médecine personnalisée. Au-delà de la finesse de leur paramétrage et des observations rendues possibles, ces modèles limitent également le recours aux modèles animaux en accord avec la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) (Xie et al., 2023).

La majorité des modèles d'organes-sur-puces peuvent être classés selon 2 grandes catégories : les puces issues de la micro fabrication (par lithographie, usinage…) et les puces réalisées en bioimpression 3D (Xie et al., 2023). D'autres techniques peuvent être utilisées pour réaliser des TSP à façon.

Parmi les différentes techniques de lithographie, la plus couramment utilisée est la lithographie douce (Soft Lithography). Cette dernière permet de créer un motif particulier répondant aux exigences du modèle souhaité au sein d'un disque de silicium. Ce wafer sert, dans la majorité des cas, de matrice qui sera recouverte de polydiméthylsiloxane (PDMS) pour en faire un négatif optiquement transparent et biocompatible. Le PDMS est un polymère qui est perméable au gaz et

élastique, utilisé pour ses propriétés adhésives sur le verre et biocompatible. Ce dispositif ainsi obtenu, imprégné du motif souhaité, sera placé sur un substrat tel que du verre, puis connecté à un circuit microfluidique afin de permettre un échange dynamique entre les différents compartiments (Figure 10) (Bhatia and Ingber, 2014).

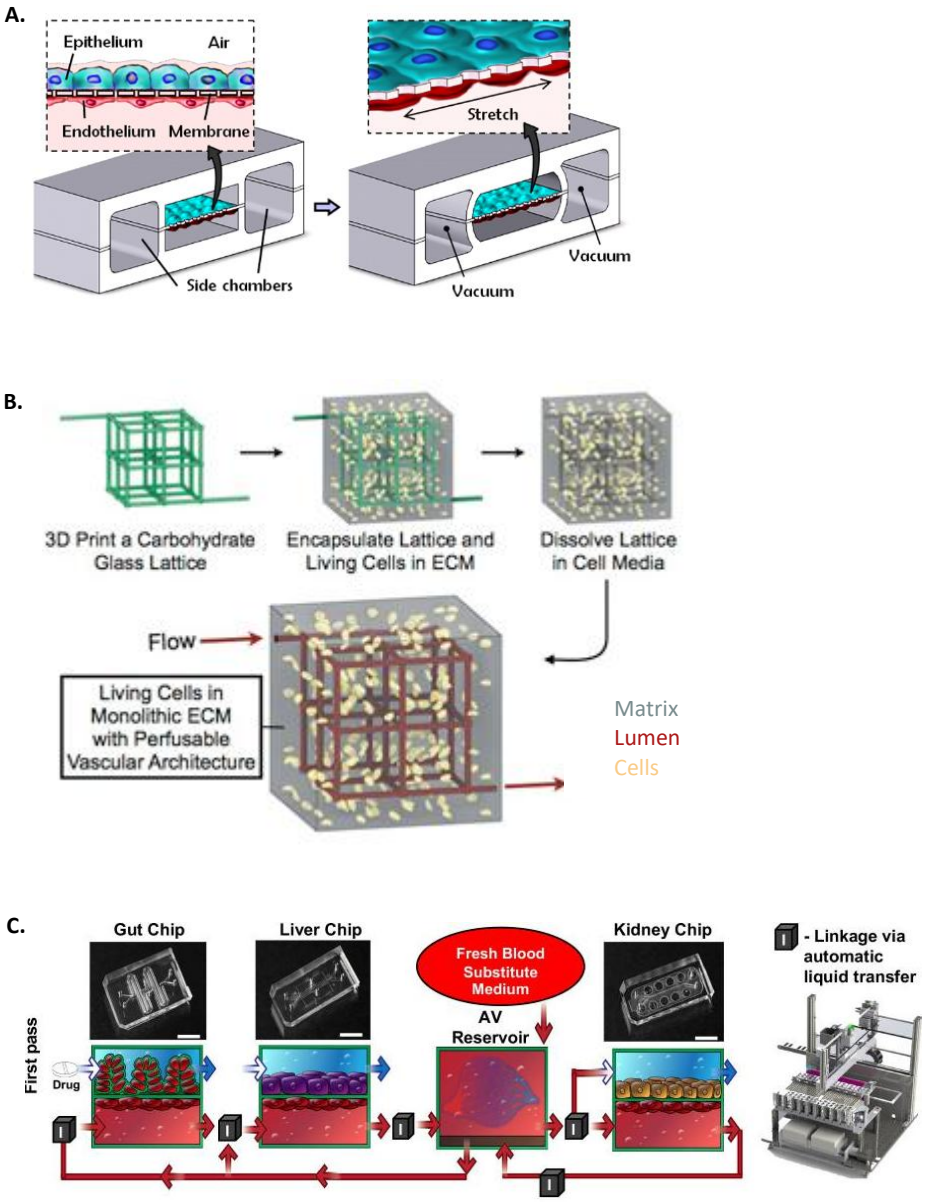
L'impression 3D d'organe-sur-puce permet de modeler différents types de matériaux, vivants ou non, afin de créer une organisation complexe en 2D ou en 3D pour reproduire un tissu (Moroni et al., 2018). Il existe différentes méthodes de bio-impression parmi lesquelles l'extrusion est la plus utilisée. Cette méthode permet d'obtenir un filament continu de bio-encre qui se réticulera grâce à la température, aux UV ou encore grâce à des ions. Les bio-encres, de natures synthétiques ou naturelles, peuvent également être biodégradées par hydrolyse ou action enzymatique. L'utilisation de ce procédé permet ainsi la création de structures complexes d'une résolution allant d'une centaine de micromètres à plusieurs centaines de micromètres en fonction de la technique utilisée (Figure 10) (Daly et al., 2021).

Historiquement les premières avancées dans ce domaine ont été faites dans le champ des organes-sur-puces. L'un des premiers modèles reconnu d'organe-sur-puces a été développé en 2010, par le Dr. Donald INGBER, et son équipe (Huh et al., 2010). Ayant pour objectif d'étudier l'introduction de nanoparticules au niveau pulmonaire, les auteurs ont développé une puce mimant la fonction pulmonaire, et plus particulièrement les interfaces au niveau alvéolaires, en utilisant la lithographie douce. Ce modèle se composait d'une membrane micro-poreuse tapissée, sur une face de cellules humaines épithéliales alvéolaires et de l'autre de cellules microvasculaires endothéliales. Cette membrane, en PDMS, était enchâssée au sein d'une chambre possédant des parois ayant la capacité de se déformer, permettant ainsi d'étirer la membrane poreuse afin de mimer les mouvements physiques du poumon. Cette étude a notamment permis de révéler que la contrainte mécanique subie par les cellules augmente l'absorption des nanoparticules et stimule leur entrée dans le canal microvasculaire (Figure 10.A).

L'une des premières puces bio-imprimées a été réalisée en 2012 par l'équipe du Dr. Christopher S.CHEN. Afin de contrecarrer l'apparition d'un cœur nécrotique dans leur modèle 3D à haute densité cellulaire, les auteurs ont développé un modèle permettant de mimer un réseau vasculaire perfusable. Ce modèle reposait sur l'impression en 3D d'un réseau de canaux à partir d'un polymère sacrificiel de carbohydrate qui était ensuite recouvert par une matrice biocompatible contenant des cellules. Après la polymérisation de cette matrice, les filaments de carbohydrate précédemment imprimés sont éliminés permettant la formation de canaux au niveau desquels sont injectés des cellules HUVEC jouant ainsi le rôle de réseaux vasculaires perfusables. En comparant un

modèle 3D hautement cellularisé présentant un tel réseau vasculaire à un second modèle dépourvu de ce réseau, les auteurs ont montré qu'il y avait une mortalité cellulaire plus importante dans le modèle privé de réseau. Ainsi, les auteurs mettaient en évidence que leur stratégie permettait de répondre aux exigences, en termes d'apport en nutriments et en gaz, des cellules et ainsi de limiter les zones nécrotiques (Miller et al., 2012) (Figure10.B).

En outre, grâce à la microfluidique, il est possible de connecter différents organes-sur-puces entre eux afin d'obtenir des modèles plus complexes. En effet, il est intéressant de connecter plusieurs organes-sur-puces entre eux pour permettre un échange dynamique entre ces derniers, se rapprochant au mieux de la physiologie. Ainsi, l'équipe du Dr. INGBER a mis au point un modèle comportant des organes-sur-puces de foie, d'intestin, de moelle osseuse et de rein reliées et pouvant être perfusées avec un substitut sanguin. D'une manière générale, les OSP de ce modèle, toutes réalisées en PDMS, reposent sur le même schéma avec un compartiment supérieur microvasculaire et un compartiment inférieur comportant des cellules spécifiques à l'organe. La communication entre ces différents organes-sur-puce est permise grâce à un système automatisé ayant la capacité de connecter jusqu'à 10 organes-sur-puces entre eux (Novak et al., 2020). L'objectif final de ce modèle était d'analyser la pharmacocinétique de différentes drogues et de prédire l'absorption des médicaments, ainsi que leur distribution, leur métabolisation, leur excrétion et leur toxicité afin d'améliorer *in fine* la conception des médicaments (Herland et al., 2020) (Figure. 10.C).




**<u>Figure 10</u> : Exemples de différents modèles d'organe-sur-puce.**
**A**. Représentation schématique du premier organe-sur-puce visant à mimer les interfaces alvéolaires. Ce dernier est composé d'une membrane poreuse sur laquelle sont tapissées des cellules humaines épithéliales alvéolaires d'un côté et de l'autre côté des cellules microvasculaires endothéliales. Cette membrane est enchâssée au sein d'une chambre centrale et est entourée, de part et d'autre, de chambres secondaires. Ces dernières permettent la déformation de la membrane grâce à un vide qui peut y être effectué pour exercer une force d'aspiration sur les parois de la chambre centrale entraînant une déformation de la membrane poreuse (Issu de Huh et al., 2010). **B**. Représentation schématique d'un modèle bioimprimé de vaisseaux. En premier lieu, une structure 3D en carbohydrate est créée puis encapsulée dans une matrice contenant des cellules. Le carbohydrate est ensuite dissous laissant place à des canaux creux perfusables (Issu de Miller et al., 2012) **C**. Schématisation d'un ensemble de différents organes-sur-puce contrôlé grâce à un système robotisé. Cet ensemble est composé d'une puce intestinale, hépatique et rénale. Toutes contiennent un compartiment sanguin et un compartiment parenchymateux. Ces puces sont reliées à un réservoir contenant un substitut de sang. Le sens du flux régissant les échanges entre ces différents compartiments est indiqué en rouge et les cubes notés « I » indiquent les zones de perfusion possible du milieu (Issu de Herland et al., 2020).

2. Modèles de tumeurs- sur-puce

Les tumeurs-sur-puces permettent de répondre à des problématiques définies et à ce titre, différents modèles de tumeurs-sur-puce ont été développés, avec des géométries et des techniques différentes. Préférentiellement, l'accent a été mis sur les modèles de TSP de GBM.

Le glioblastome de l'adulte est l'une des tumeurs malignes neurologiques avec le plus fort taux de mortalité. En effet, la médiane de survie des patients après le protocole Stupp, incluant l'utilisation du témolozomide (TMZ) en concomitance avec la radiothérapie, n'est que de 9,8 % après 5 ans (Schaff and Mellinghoff, 2023; Stupp et al., 2009). Ce pronostic des plus sombres est lié à la résistance des cellules tumorales aux thérapies qui peut, en partie, s'expliquer par les différentes caractéristiques de ces tumeurs. Comme précédemment évoqué, le glioblastome est une tumeur ayant une forte hétérogénéité cellulaire limitant ainsi l'utilisation de thérapies ciblées (Patel et al., 2014). De plus, le caractère infiltrant des cellules de glioblastome empêche la résection chirurgicale complète de la tumeur et la localisation même du GBM limite la réussite des thérapies (Jackson et al., 2015). En outre, l'environnement immunitaire du glioblastome évolue au cours du développement de la tumeur, passant d'un environnement pro-inflammatoire lors du stade précoce de la tumorigenèse à un environnement immunitaire pro-tumorigénique pour les stades les plus avancés (Yeo et al., 2022).

Au cours de ces dernières années, différents types de modèles de glioblastome-sur-puce ont été développés. Chacun de ces modèles permet de reproduire une ou plusieurs caractéristiques biologiques des glioblastomes afin d'en appréhender le rôle et d'évaluer la pertinence de différentes stratégies thérapeutiques. Parmi les différents aspects physiopathologiques des glioblastomes impliqués dans la résistance aux traitements, les aspects les plus couramment reproduits dans les TSP sont : la barrière hémato-encéphalique, les interactions cellulaires, le système immunitaire, l'environnement matriciel ainsi que le caractère infiltrant des GBM.

- **Modèle-sur-puce d'étude de l'invasion et de la migration des cellules de GBM**

Les cellules de glioblastomes sont caractérisées par une invasion importante des tissus adjacents participant ainsi à la résistance aux traitements puisque ces cellules ayant envahi le tissu environnant échappent à la résection chirurgicale ainsi qu'aux thérapies locales. Ainsi, de nombreuses études sont menées afin d'évaluer le potentiel migratoire des cellules de glioblastomes (Wong et al., 2021).

L'équipe du Dr. KONSTANTOPOULUS a notamment développé un modèle de glioblastome-sur-puce avec pour ambition de prédire la survie sans progression des patients. En partant du postulat que

les cellules métastatiques possèdent des capacités accrues de mobilité et de prolifération cellulaire liées à l'agressivité et au caractère invasif du cancer, les auteurs ont évalué ces 2 critères physiologiques pour déterminer la survie des patients (Wong et al., 2021).

Ce modèle est composé de 2 canaux parallèles permettant d'une part, l'apport du milieu de culture et d'autre part, l'ajout des cellules au sein de la puce. Ces 2 canaux sont séparés par des microcanaux en forme de Y ayant une largeur de 10 µm pour l'un des bras et de 3 µm pour l'autre et sont recouverts de laminine. Les canaux de taille de 3 µm permettent d'évaluer la déformation du noyau et du cytosquelette des cellules. Ce design de puce a initialement été développé pour prédire le potentiel migratoire et prolifératif des cellules du cancer du sein, et par extrapolation pour évaluer les capacités métastatiques des cellules cancéreuses (Yankaskas et al., 2019).

Les auteurs ont effectué une analyse transcriptomique des cellules prolifératives et mobiles ayant traversé le Y et des cellules non prolifératives et non mobiles. Ces résultats mettent en évidence des signatures transcriptomiques différentiellement exprimées entre ces deux groupes de cellules. Les patients ayant des cellules qualifiées de prolifératives et mobiles possèdent une survie globale réduite en comparaison avec les patients dont les cellules ne présentent pas ces 2 caractéristiques, suggérant ainsi que l'analyse des paramètres de prolifération et d'invasion cellulaire représenterait un facteur pronostique (Wong et al., 2021) (Figure 11).

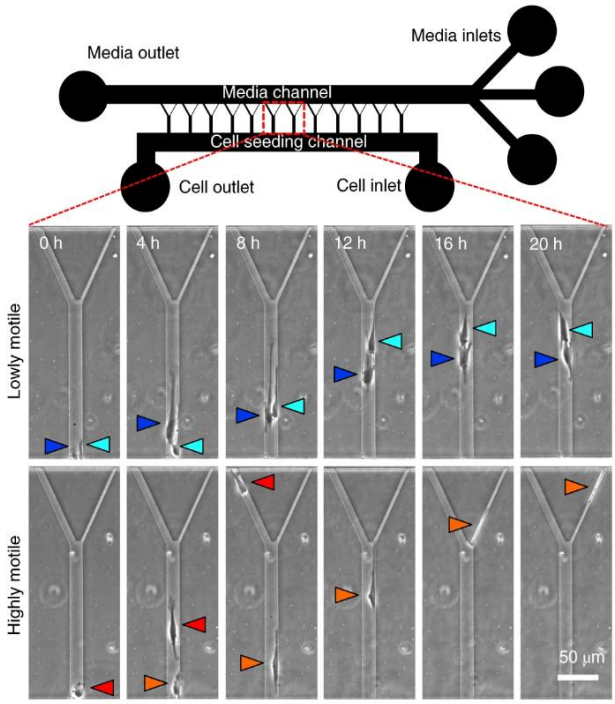



**Figure 11 : Représentation schématique du dispositif de GBM-sur-puce permettant l'étude des cellules souches gliales.** Cette puce se compose de deux canaux parallèles reliés entre eux par des canaux ayant un design particulier permettant d'évaluer la motilité des cellules. Les différentes images représentent un time- lapse de GBM714 avec sur la série d'images en haut, des cellules (triangles bleus) ayant une faible motilité, et dans la série d'images inférieures, des cellules (triangles orangés) présentant une motilité importante. (Issu de Wong et al., 2021)

- **Modèle pour évaluer l'impact des GBM sur l'angiogenèse et l'environnement immunitaire**

L'angiogenèse, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, est un mécanisme important pour la croissance tumorale, l'invasion et la création de métastases, qui est régulé par des molécules pro- et antiangiogénique. En effet, ce phénomène est nécessaire à la croissance tumorale puisque cette dernière a un besoin en oxygène et en nutriments qui est important pour alimenter son centre. (Z.-L. Liu et al., 2023). Ainsi, la reproduction de l'angiogenèse au sein d'un modèle d'étude pré-clinique est un élément important puisque faisant partie des caractéristiques fondamentales des cancers (Hanahan, 2022). Les glioblastomes peuvent induire un environnement angiogénique et immunosuppressif grâce à la sécrétion de facteurs tel que le VEGF et le facteur de croissance transformant bêta (TGF-β1), favorisant ainsi la vascularisation de la tumeur et limitant la fonction des cellules T cytotoxiques (Motz and Coukos, 2011). L'équipe du Dr. CHEN s'est donc intéressée aux rôles des macrophages, puisque particulièrement présents au sein des GBM, et de cette vascularisation afin d'identifier des potentiels cibles thérapeutiques pour limiter les effets anti-inflammatoires et la néovascularisation des GBM.

Pour ce faire, les auteurs ont développé un modèle au sein duquel se trouve une chambre principale comportant 2 canaux parallèles. Ces 2 canaux sont recouverts avec du collagène de type 1 et tapissés de cellules endothéliales. Les cellules de GBM sont ensuite ensemencées au niveau de la chambre, soit autour des 2 canaux, au sein d'une matrice 3D de collagène modifiée avec les macrophages préalablement activés. Ainsi, les auteurs ont réalisé des images au cours du temps afin d'évaluer l'angiogenèse au niveau de ce dispositif sous l'effet de différents traitements (Figure 12).

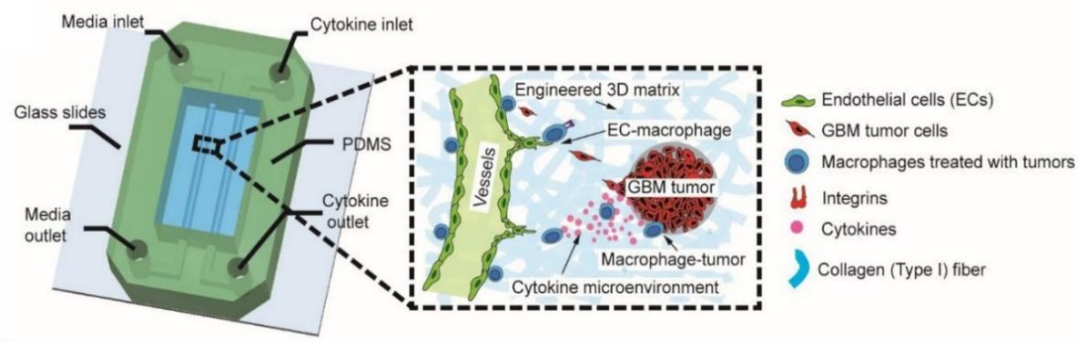



**Figure 12** : **Représentation schématique d'un modèle de GBM-sur-puce pour l'étude de l'angiogenèse.**
Cette puce est composée d'une chambre en PDMS comportant 2 canaux coatés avec du collagène de type I, tapissés de cellules endothéliales avec pour objectif de former des pseudo-capillaires. Ces 2 canaux sont entourés d'un mélange matriciel contenant des cellules de GBM ainsi que les macrophages activés (Issu de Cui et al., 2018).

Les auteurs ont ainsi pu mettre au point un modèle permettant l'étude des effets immunosuppressifs des macrophages, et également, des interactions entre les macrophages et les cellules endothéliales médiées par les intégrines aboutissant notamment à la formation de nouveaux capillaires. Les auteurs ont notamment montré que le ciblage de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ et du récepteur TGFβ-R1 permet de bloquer l'angiogenèse induite par les cellules du GBM *via* les macrophages de type M2 (Cui et al., 2018).

Les différents dispositifs microfluidiques destinés à l'étude de l'angiogenèse tumorale sont plus amplement détaillés dans l'article « A Bloody Conspiracy- Blood Vessels and Immune Cells in the Tumor Microenvironment » en annexe.

- **Modèle-sur-une-puce de GBM pour évaluer la chimiorésistance au témolozomide**

A ce jour, le traitement de référence des glioblastomes est, en fonction de la localisation de la tumeur, une exérèse chirurgicale, suivi d'un cycle de radiothérapie en concomitance avec un traitement de chimiothérapie par témozolomide (Stupp et al., 2005). Ce dernier est un agent alkylant qui voit ses effets contrecarrés par l'enzyme de réparation à l'ADN $O^6$ – méthylguanine - ADN méthyltransférase (MGMT) qui est une enzyme de réparation de l'ADN. Dans le cadre des GBM, le promoteur du gène codant pour cette enzyme de réparation à l'ADN est hypométhylé entrainant une augmentation de l'expression de l'enzyme MGMT. Le profil épigénétique de ce promoteur est amené à évoluer au cours du développement du GBM, mais globalement, il a été démontré que ce promoteur est généralement hypométhylé dans les cas de récidives des GBM. Par ailleurs, les glioblastomes comportent une population cellulaire à caractère souche responsable de la propagation tumorale post-chimiothérapie (Chen et al., 2012). En effet, les cellules souches cancéreuses ont la capacité de s'autorenouveller et possèdent également des aptitudes importantes de dissémination et de résistance aux thérapies. Ainsi, afin d'évaluer la résistance aux thérapies des cellules souches de gliomes, l'équipe du Dr. LIN a développé un modèle sur puce mimant la niche périvasculaire d'un gliome.

Ce modèle est composé de deux couches en PDMS comportant chacune un micro-canal, l'un est ensemencé avec des cellules endothéliales, et le second avec des cellules souches de gliomes. Ces deux couches sont séparées par une membrane poreuse de polycarbonate percée de pores de 3 µm permettant une communication cellulaire entre les 2 compartiments. Après traitements des cellules au témolozomide pendant 72 heures, l'ADN est extrait et une détection des biomarqueurs 6-O-methylguanine (6-O-MeG) et 7-methylguanine (7-MeG) impliqués dans la chimiorésistance est réalisée (Figure. 13).

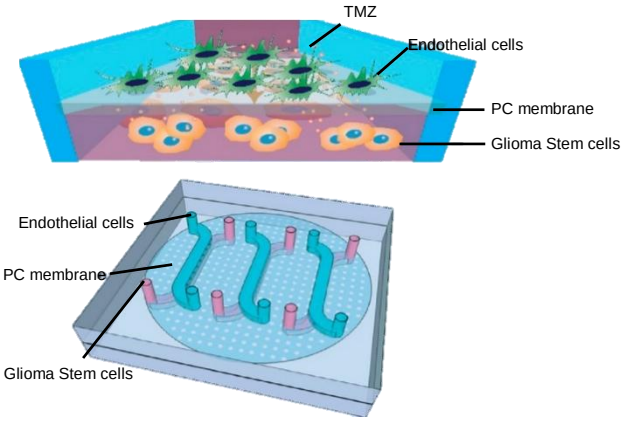



**Figure 13 : Représentation schématique d'une puce mimant la niche périvasculaire.**
Au sein du compartiment supérieur de la puce (en bleu) se trouve les cellules endothéliales et au sein du compartiment inférieur (en rouge) sont cultivés les cellules de gliomes. Les deux compartiments sont séparés par une membrane poreuse laissant diffuser les différentes thérapies injectés dans le compartiment supérieur vers le compartiment inférieur (Issus de C. Lin et al., 2018).

Ainsi, les auteurs ont mis au point un modèle permettant de mimer la chimiorésistance des glioblastomes et de démontrer l'importance de l'interaction entre les cellules souches du gliome et les cellules endothéliales, interaction qui semble exacerber la chimiorésistance des cellules du gliomes (C. Lin et al., 2018).

- **Modèles-sur-puce pour l'étude de l'impact d'un environnement hypoxique**

L'hypoxie est un acteur majeur influencant la réponse des cellules aux thérapies puisqu'amenant à un swith métabolique, entrainant généralement une résistance aux thérapies. En ce sens, l'équipe du Dr. CHO, a développé un modèle de glioblastomes-sur-puce, bio-imprimé, permettant la mise en place d'un gradient d'hypoxie. Ce dispositif a pour objectif d'étudier la réponse des cellules tumorales en fonction de ce gradient.

Pour ce faire, 2 suspensions cellulaires sont préparées, dans de la matrice de cerveau de porc décellularisée, l'une comportant des cellules vasculaires humaines et la seconde les cellules de glioblastomes dérivés du patient. Un disque à partir de l'encre comportant les cellules de GBM est déposé sur une lame de verre puis entouré par les cellules vasculaires (HUVEC) ayant vocation à mimer la barrière hémato-encéphalique. Une troisième encre, en silicone, est ensuite déposée sur cette lame de verre afin de former un design particulier qui permettra de supporter une lamelle de verre et de créer une gouttière au sein de laquelle circulera le milieu. Le disque de cellules étant enchâssé entre une lame et une lamelle de verre, il y aura création d'un gradient d'hypoxie (Figure 14).

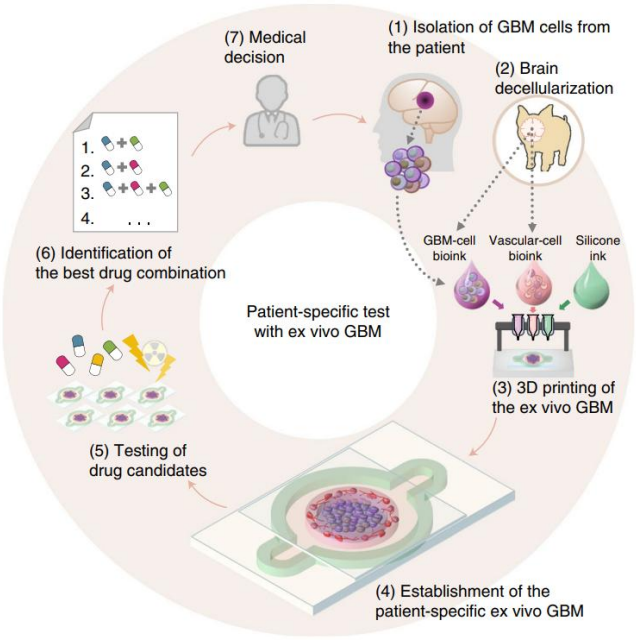



**Figure 14 : Représentation schématique du modèle de glioblastome-sur-puce.**
(1) Les cellules de glioblastome du patient sont isolées. (2) Obtention de la matrice décéllularisée de porc pour la réalisation de la bio-encre. (3) Impression du modèle de GBM-sur-puce spécifique du patient en utilisant les cellules de patients ainsi que des cellules HUVEC afin de mimer la BHE et du silicone pour sceller le dispositif. (4) Le modèle est cultivé pendant 1 à 2 semaines afin qu'il puisse récapituler au mien les différents aspects pathologiques de la tumeur du patient. (5) Le modèle est utilisé pour tester différentes combinaisons thérapeutiques. (6) Un classement des combinaisons les plus prometteuses est effectué. (7) Le corps médical adapte la thérapie pour le patient (Issu de Yi et al., 2019).

Les auteurs ont validé l'hétérogénéité de réponses aux traitements observée chez les patients en comparant la réponse obtenue après traitements des puces avec la radiothérapie et le témozolomide, aux résultats observés en cliniques. Il en ressort que les résultats observés à la suite des traitements des GBM-sur-une-puce sont similaires à ceux constatés en clinique. Ainsi, le modèle mis au point permet de mimer la réponse aux traitements des patients, et peut être utilisé dans l'optique de prédire la réponse des patients à un traitement (Yi et al., 2019).

Compte tenu de l'importance que possède le niveau d'oxygène sur le métabolisme cellulaire, un modèle de tumeur-sur-puce, nommé Oxalis (OXygen ALImentation System) a été développé par l'équipe du Dr. Stéphanie DESCROIX afin de contrôler finement le niveau d'oxygène au sein de cette puce. Ce modèle repose sur l'équilibrage au préalable du milieu de culture en gaz dissous, notamment en oxygène et est déclinable selon deux méthodes.

Au sein de ces deux configurations, se trouvent une TSP ensemencée avec des cellules de cancers du poumon, ainsi qu'un contrôleur de flux et un réservoir contenant le milieu de culture qui est relié à une valve d'émission. Pour la première méthode, le circuit microfluidique est contrôlé par une pompe à pression, permettant d'équilibrer en gaz le milieu de culture et de perfuser la TSP simultanément. L'ensemble est complété par une bouteille de gaz comportant un pré-mix avec un

pourcentage déterminé au préalable en $O_2$ et en $CO_2$ qui est connecté à une vanne puis à un contrôleur de débit de gaz permettant de maîtriser le débit de gaz allant vers le réservoir contenant le milieu de culture cellulaire. La deuxième configuration repose sur l'utilisant d'un mélangeur de gaz, ici, il y a 3 vannes en parallèle avec un contrôleur de débit pour chacun des gaz (air, $CO_2$, $N_2$). Le contrôle du flux au sein de ce deuxième circuit microfluidique est assuré en modifiant la pression au niveau du réservoir de milieu de culture. Si cette pression augmente, le débit pour l'entrée d'air est recalculé et ajusté pour un maintien de la pression en $O_2$ constant (Figure 15) (Bouquerel et al., 2022).

La concentration en oxygène dissous au sein de ce modèle peut être mesurée à différents endroits du circuit microfluidique, soit directement dans le milieu de culture soit, à l'intérieur même de la puce mirofluidique. Cette mesure est réalisée grâce à l'utilisation de senseurs optiques adhésifs au sein de ces 2 compartiments. De plus, des nanoparticules sensibles au taux d'$O_2$ sont également incorporées dans la puce pour mesurer le niveau en oxygène. Le pH peut également être mesuré dans le milieu de culture par l'utilisation d'un pH-mètre standard.

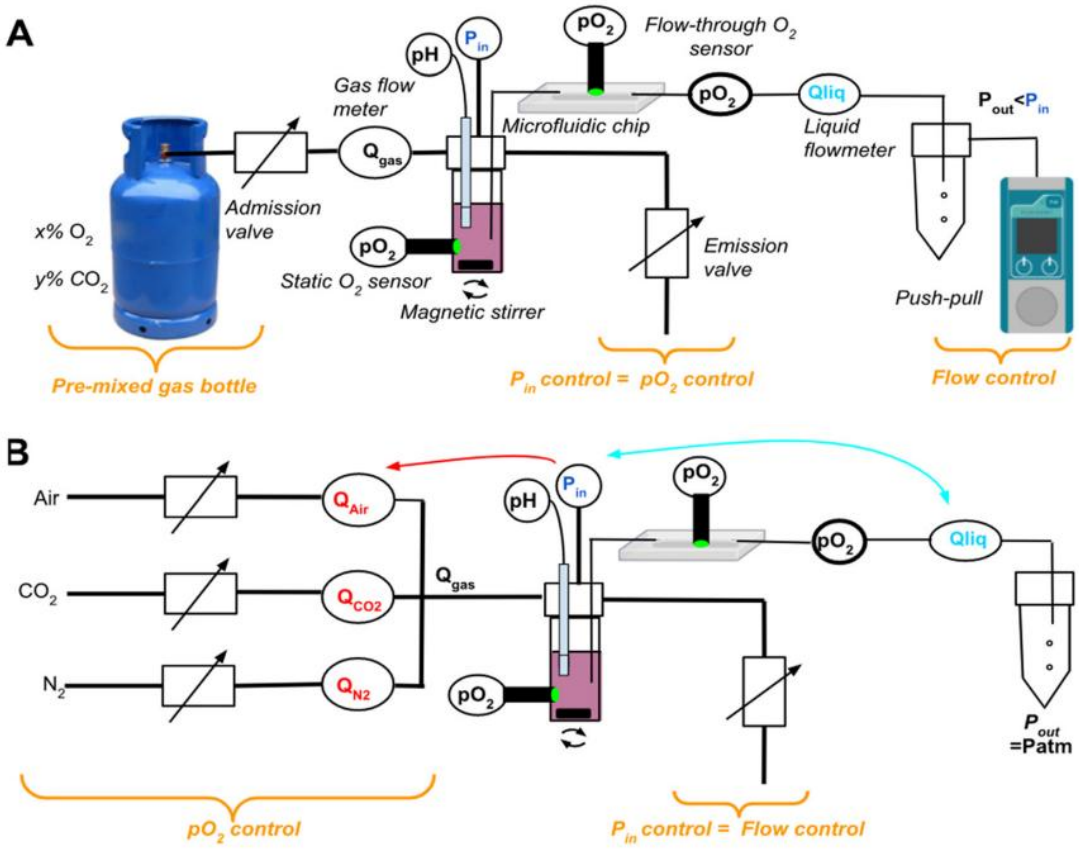



**Figure 15 : Représentation schématique des deux configurations possibles du modèle Oxalis.**
Ces deux configurations comportent une tumeur-sur-puce ensemencée avec des cellules du cancer du poumon ainsi qu'un réservoir de milieu de culture cellulaire. Au sein de ces deux compartiments, il est possible de faire des mesures de la pression en $O_2$ à l'aide de senseurs optiques. Dans le réservoir, il est également possible de mesurer le pH, directement *via* l'utilisation d'un pH-mètre. **A**. Utilisation d'une bouteille contenant un pré-mix de gaz aux concentrations souhaitées. Cette bouteille est connectée à un contrôleur de débit qui est lui-même relié à un réservoir contenant le milieu de culture. Ce dernier est connecté à la puce microfluidique qui est reliée à un réservoir de sortie connecté lui-même à un contrôleur de pression. **B.**

Uitilisation d'un mélangueur de gaz (Air, $CO_2$, $N_2$). Le débit au sein de ce circuit est contrôlé en modifiant la pression d'entrée « $P_{in}$ » au sein du réservoir contenant le milieu de culture auquel est relié le mélangueur de gaz. Ce réservoir de milieu est ensuite connecté à la puce microlfuidique qui est reliée à un réservoir de sortie. (Issu de Bouquerel et al., 2022).

Les auteurs ont confirmé la capacité de ce modèle à instaurer une hypoxie en réalisant des analyses sur l'expression de CA9 au sein des cellules tumorales qui ont montré une expression plus importante de cette enzyme lors de la diminution de la pression $O_2$. L'originalité de ce modèle repose donc dans sa capacité à contrôler précisément le niveau d'oxygène ainsi que le pH, permettant de se rapprocher, au mieux, des conditions de physioxie de l'environnement physiologique de la tumeur étudiée.

D'autres modèles sont également développés afin d'évaluer la faisabilité de traitements innovants tel que la photothérapie, la thérapie magnétique par hyperthermie ou encore l'usage d'ultrasons focalisés.

Finalement, il existe de nombreux design de glioblastome-sur-puce. Ces derniers se différencient par leur design, les matériaux utilisés, le processus de fabrication de la puce, le choix des cellules et de matrice utilisée. Ces modèles permettent d'étudier différents aspects de la physiologie des GBM, tel que la réponse des cellules aux traitements ou encore l'impact de ces cellules sur l'angiogenèse et les mécanismes qui y sont associés. Cependant, tous les modèles de puces ne prennent en considération le rôle important de l'hypoxie dans la réponse aux traitements et nombres d'entre eux utilisent uniquement des cellules endothéliales (HUVEC) pour mimer le rôle de la BHE. Enfin, un autre élément critique, la composition de la matrice extracellulaire, pour la plupart des modèles est négligée puisque n'incorporant pas d'acide hyaluronique.

# Objectif de la thèse

Les DMG altérés H3 K27 font partie des tumeurs cérébrales pédiatriques avec l'un des pronostics le plus sombre puisque leur médiane de survie à 5 ans est inférieure à 1 %. En effet, ces DMG sont fortement résistants aux traitements anti-cancéreux de chimiothérapie, radiothérapie et thérapies ciblées. De plus, l'exérèse totale de ces tumeurs est impossible en raison de leur localisation et de leur caractère infiltrant. Ainsi, la radiothérapie demeure le traitement de référence malgré des effets limités dans le temps et une re-progression de la tumeur quasi-systématique.

En raison de leur résistance aux diverses thérapies, de nombreux essais précliniques ont été réalisés, amenant à des résultats prometteurs. Cependant, lors du transfert à la clinique, ces stratégies validées en laboratoires se sont soldées par des échecs, reflétant ainsi la capacité limitée des modèles expérimentaux conventionnels, tant *in vitro* que *in vivo*, à prédire l'efficacité des traitements chez le patient.

C'est dans ce contexte que s'inscrit l'objectif de ma thèse, à savoir développer un nouveau modèle d'étude préclinique de DMG altérés H3 K27 ayant vocation à reproduire au mieux les caractéristiques du microenvironnement tumoral de ces tumeurs afin d'évaluer et de prédire avec justesse la réponse aux traitements. Parmi les caractéristiques de ce microenvironnement que nous identifions comme primordiales, les principales sont :

- une **matrice extracellulaire 3D relevante**, puisque contrôlant notamment la survie cellulaire au travers de nombreux signaux,
- une **forte densité cellulaire**, qui, entre autre, constitue l'un des obstacles à la diffusion des agents pharmacologiques,
- la **présence d'un gradient d'hypoxie,** connu pour participer activement à la résistance des cellules aux traitements, notamment *via* l'induction de programmes géniques encore peu connu dans les DMG,
- ainsi que la **présence d'une barrière hémato-encéphalique**, principal acteur limitant l'accès des composés antitumoraux vers les tumeurs cérébrales.

Fort de ce constat, le but de mon projet de thèse **est de développer et de caractériser un dispositif de type tumeur-sur-puce microfluidique intégrant ces divers éléments clefs du microenvironnement** impliqués dans la réponse des cellules aux thérapies afin de disposer d'un nouvel outil d'évaluation thérapeutique pertinent pour les DMG.

# Matériels et Méthodes

## I. Culture cellulaire et traitements

### A. Culture des lignées de DMG altérés H3 K27

Les expériences ont été réalisées sur les lignées cellulaires HSJD-DIPG-007 et HSJD-DIPG-012 obtenues auprès du Dr Angel MONTERO CARCABOSO (Hospital Saint Joan de Deu, Barcelone). La lignée HSJD-DIPG-007 présente notamment une mutation au niveau du gène *ACVR1* et du gène *PIK3CA*. Les HSJD-DIPG-012 sont porteuses, entre autres, d'une altération génétique sur le gène *TP53*. Toutes deux sont mutées H3.3 K27M.

Le milieu de culture (nommé TSM fille) de ces cellules est constitué pour moitié de Neurobasal-A- Medium, et de D-MEM F-12, complémenté avec de l'HEPES (10 mM), du pyruvate de sodium (1 mM), des acides aminés non essentiels (100 µM), du GlutaMAX-I supplement (2 mM) et d'un cocktail antibiotique- antimycosique (100 unités/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 250 ng/mL d'amphotéricine B), du B27 (1X), d' EGF (20 ng/mL), de FGF- basic (20 ng/mL), de PDGF-AA (10 ng/mL), PDGF-BB (10 ng/mL) et d'héparine (2 µg/mL). Ces cellules sont cultivées en suspension sous forme de gliosphères sur support non adhérent, au sein d'un incubateur à 37°C avec 5 % de $CO_2$.

Pour la réalisation des comptages cellulaires, les cellules sont prélevées et centrifugées pendant 3 minutes à 300G. Après aspiration du surnageant, 500 µL de TrypLE sont ajoutés pour dissocier les sphères pendant 5 minutes. La suspension cellulaire dissociée est ensuite reprise par 4 mL de milieu de culture, et le nombre de cellules en suspension est déterminé par numération au bleu de trypan grâce à un compteur automatique de type TC20 (Biorad).

### B. Composés pharmacologiques

1. ONC201

L'ONC201 (Selleckhem, S7963) est une imipridone agoniste de la protéase mitochondriale ClpP entrainant, *in fine*, une inhibition de la phosphorylation oxydative. Cette molécule a été utilisée à une concentration finale de 1 µM ou de 10 µM. Les TSP sont réalisées et cette molécule est incorporée dans le milieu de culture entourant la puce. Le milieu, ainsi que l'ONC201, sont renouvelés toutes les 24 heures sauf mention contraire.

2. Paxalisib

Le paxalisib est un inhibiteur de PI3K et de mTOR qui a été utilisée à 2 µM dans le milieu de culture situé dans la gouttière du dispositif. Le milieu ainsi que le paxalisib sont renouvelés toutes les 24 heures sauf mention contraire.

### C. Protocole d'irradiation

Les puces ont été ensemencées avec les cellules HSJD-DIPG-007 ou -012 à raison de 10 000 cellules / µL et irradiées selon un schéma monodose à 0, 2 ou 4 Gy avec un débit de dose de 0,7 Gy / min grâce à un irradiateur de paillasse CellRad$^{+}$. Le milieu de culture a été renouvelé toutes les 24 heures. Les puces ont ensuite été démontées pour être marquées à l'iodure de propidium et au Hoechst 48 heures post- irradiations. Les puces ont été rinçées 3 fois au PBS préalablement à la prise d'images au confocal LSM880.

## II. Réalisation de la TSP

### A. Préparation du feuillet en PDMS

Dans l'objectif de réaliser une TSP, du PDMS (polydiméthylsiloxane) (Sylgard® 184) est préparé afin de réaliser le design de la gouttière. Ce dernier régit la hauteur du disque matriciel et se devait donc d'être d'une épaisseur suffisante pour permettre la création, *in fine*, d'une matrice comportant des cellules dans différents plans en 3D. De surcroit, l'épaisseur de ce PDMS a été choisie pour correspondre à celle du FlexDym™, qui est le polymère utilisé pour les dispositifs en fluidique avec une hauteur calibrée.

La préparation de ce PDMS repose sur le mélange précis de deux composants : une base élastomère et un agent de réticulation (ou durcisseur). Le processus commence par le mélange des deux composants dans un rapport typique de 10:1 (10 parts de base pour 1 part de durcisseur). Une fois les deux composants combinés, le mélange est soigneusement homogénéisé en l'agitant pendant plusieurs minutes afin d'assurer une répartition uniforme du durcisseur. La mixture est ensuite chauffée pendant 1 min et 30 sec à 70°C permettant de la rendre plus liquide, et *in fine,* rendant son étalement plus homogène. Celle-ci est versée sur une plaque de verre préalablement recouverte d'un film plastique rigide et entourée de plots de FlexDym™ ayant une épaisseur de 750 µm sur lesquels une seconde plaque de verre est déposée, définissant ainsi l'épaisseur finale du feuillet de PDMS. Une cuisson est alors réalisée pendant 30 minutes à 70°C. Le lendemain (pour permettre une

polymérisation complète du PDMS) le polymère peut être découpé selon le design souhaité pour permettre la création de la gouttière.

## B. Réalisation de la tumeur-sur-puce

Une chambre en FlexDym™ ou PDMS (Polydiméthylsiloxane), découpée selon la forme prédéfinie, est disposée sur une lamelle en verre. La quantité nécessaire de cellules dissociées est alors centrifugée pendant 3 minutes à 300G pour obtenir un culot comportant le nombre de cellules souhaité. Ce culot est dissocié et repris dans une matrice composée de 25% d'acide hyaluronique à haut poids moléculaire (GLR002, R&D Systems) et de 75% de Matrigel® GFR (352637, Corning). Le mélange matrice et cellules ainsi formé est déposé au centre du dispositif et une lamelle en verre est déposée sur le dessus. Ainsi, le seul apport en nutriments et en gaz se fait grâce à la gouttière située au pourtour de ce disque (Figure 17).

Pour la connexion en microfluidique un second dispositif a été conçu et usiné par le Dr. Anthony TREIZEBRE, chercheur à l'IEMN (Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie), afin d'assurer une meilleure étanchéité sous flux. Dans cette seconde version, le dispositif lamelle inférieure/moule/disque de cellules en matrice repose sur un cadre-support en plexiglas et est recouvert d'une plaque de plexiglas qui vient se visser au cadre (Figure 17).

## C. Modèle de BHE

### 1. Etablissement du modèle de BHE

Le modèle de barrière hémato-encéphalique (BHE) est développé par le laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique de Lens (LBHE). Ce modèle breveté repose sur l'utilisation de cellules endothéliales et péricytes humains (Deligne et al., 2020).

Les cellules endothéliales utilisées pour ce modèle sont issues de sang de cordon ombilical humain, provenant de la maternité du Centre Hospitalier de Béthune. Les cellules souches hématopoïétiques $CD34^+$ sont isolées et différenciées en cellules endothéliales en les cultivant avec du milieu de culture pour cellules endothéliales (EGM ; Lonza). Les péricytes cérébraux humains ont été obtenus auprès du Pr. Takashi KANDA (Department of Neurology and Clicnial Neurosience, Yamaguchui University Graduate School of Medecine, Japon). Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 4,5 g/L de D-Glucose, 10 % de FCS décomplémenté, 1 % de L-Glutamine, et 1 % de pénicilline / streptomycine.

Pour la mise en place de ce modèle de BHE, la partie inférieure du filtre (Costar Transwell, 0,4 µm, Corning) est recouverte de collagène de type I afin de permettre l'ajout des péricytes à raison de $5x10^4$ cellules / filtre. Le filtre est ensuite placé pendant 3 heures à 37°C afin de permettre la polymérisation du mix collagène de type I et péricytes puis, le filtre est placé dans une plaque 12 puits. Par la suite, la partie supérieure du filtre est recouverte de Matrigel™ (BD Biosciences), et les cellules endothéliales sont ensemencées à raison de $8x10^4$ cellules / filtres.

Le modèle de BHE est ensuite cultivé avec du milieu de culture ECM-5 qui se compose d'EGM, supplémenté avec 5 % de SVF décomplémenté, 1 % d'endothelial cell growth supplement (Sciencell) et 0,5 % de gentamicine. Cette culture se fait dans une atmosphère humide à 37°C avec 5% de $CO_2$. Afin que l'instauration du phénotype de BHE se mette en place, une culture de 6 jours est nécessaire.

## 2. Mesure de la perméabilité de la BHE

Le test de perméabilité repose sur l'utilisation du Lucifer Yellow (LY) (Sigma Aldrich) qui est une molécule hydrophile ayant un poids moléculaire de 457,25 g/mol et de fait, ne traversant que très peu la BHE. Ce test nécessite l'utilisation, comme contrôle, de filtres ensemencés avec des cellules endothéliales, sans péricyte, n'acquérant ainsi pas les propriétés peu perméables de la BHE.

Les filtres de BHE sont alors placés au sein d'une plaque 12 puits contenant 1,5 mL/puit de Ringer-HEPES (RH) chauffé au préalable à 37°C (150 mM NaCl ; 5,2 mM KCl ; 2,2 mM $CaCl_2$ ; 0,2 $MgCl_26H^2O$ ; 6 mM $NaHCO_3$ ; 5 mM HEPES ; 2,8 mM de glucose ; pH 7,4). A noter que 3 puits ne contiennent pas de RH (ils sont donc vides), afin d'estimer en fin de protocole la quantité de LY absorbée par les cellules. Le milieu de culture contenu dans le compartiment supérieur des BHE est remplacé par du RH avec 50 µM de Lucifer Yellow. L'ensemble est placé à 37°C et 20 minutes après l'ajout du LY, le filtre est transféré vers un nouveau puit. Ce procédé est répété 2 fois. Après 60 min d'incubation au total, le contenu du compartiment supérieur est récupéré et placé dans les derniers puits ne contenant pas de RH (Figure 16). Cette étape permet de mesurer *a posteriori* la quantité de LY dégradée ou absorbée par les cellules en faisant le rapport de la quantité de LY détectée au sein de ce puit sur la quantité de LY dans la solution initiale.

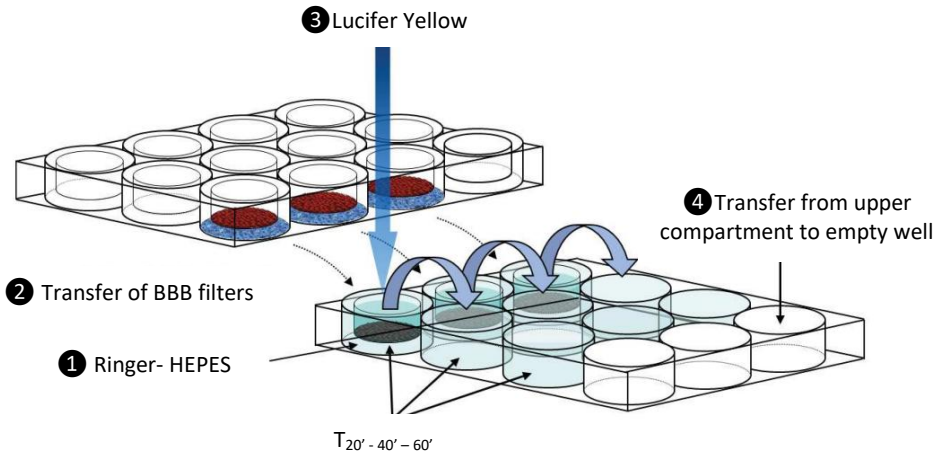



**Figure 16 : Représentation schématique de l'expérience.**
(1) Une partie des puits est remplie de RH préalablement chauffé à 37°C. (2) Les filtres de BHE sont placés dans ces puits. (3) Le lucifer Yellow est ajouté dans le compartiment supérieur et une incubation de 20 minutes à 37°C est faite avant de placer les filtres dans le puit suivant. De nouveau, une incubation de 20 minutes est faite, et les filtres de BHE sont placés dans de nouveaux puits. (4) Le contenu du panier supérieur de la BHE est placé dans les puits ne contenant pas de RH.

La quantité de Lucifer Yellow ($\lambda_{excitation\ /\ émission}$ : 432 / 538 nm) est mesurée au sein de chacune de ces solutions par fluorescence avec un fluorimètre (Synergy™ H1, BioTek Instruments). Le volume clairé (*i.e* passé du compartiment supérieur au compartiment inférieur) est obtenu en divisant la quantité de LY dans le compartiment inférieur par la concentration du compartiment supérieur. Ceci permet de tracer une courbe représentant le volume clairé en fonction du temps, le coefficient directeur de la pente est estimé par régression linéaire et permet de donner la valeur PS*f*.

- Le PS*f* correspond à la perméabilité pour les inserts coatés avec le Matrigel, le collagène de type I et les péricytes
- Le PS*t* est le coefficient de perméabilité pour les inserts avec les cellules endothéliales, le revêtement en Matrigel, le collagène de type I et les péricytes.

Le coefficient de perméabilité de la BHE, nommé PS*e*, peut alors être calculé grâce à la méthode de Siflinger-Birnboim et est exprimé en cm/min. Cette méthode repose sur la formule suivante : $\frac{1}{Pse} = \frac{1}{Pst} - \frac{1}{Psf}$ . Enfin, pour obtenir une valeur en cm/min, la valeur PS*e* est divisée par la surface de la membrane poreuse de l'insert (1,12cm$^2$).

# III. Circuit microfluidique

## A. Matériaux et équipements utilisés

Afin de réaliser la connexion entre la TSP et la BHE, des tubulures en silicone coatées au Platinium sont utilisées (Darwin, SE-TUB-SIL-1*1) avec un diamètre externe de 3 mm et un diamètre interne de 1 mm. Ce coating permet de limiter l'absorption des molécules pharmacologiques par le silicone. Les connecteurs utilisés pour raccorder les différentes tubulures, ainsi que la BHE, et la cassette de la TSP sont en polypropylène ou en ETFE (éthylène tétrafluoroéthylène) Tefzel™.

Le contrôle du flux, permettant une communication dynamique entre la BHE et la TSP, est assuré par une pompe péristaltique (Darwin, SHE-LabV1-MC10 (10)). La mesure de ce flux a été réalisée en utilisant un FlowUnitM (Fluigent).

La mesure du shear stress a été faite selon la formule suivante : $\tau_w = \frac{4\,\mu Q}{\pi R^3}$ avec :

- $\tau_w$ représente la valeur de shear stress (Pa)
- $\mu$ représente la viscosité dynamique du fluide (dans notre cas, 1 Pa.s)
- $Q$ représente le débit volumique ($m^3/s$)
- $R$ le rayon interne (m)

Des rampes de perfusion médicales peuvent également être utilisées afin de connecter plusieurs puces entre elles. C'est notamment le cas, dans le cadre de la mesure du taux d'oxygène avec les dispositifs en flux.

Les supports de BHE ont été imprimés en 3D par le Dr. Anthony TREIZEBRE avec une résine médicale (FormLabs, RS-F2-BMCL-01) (Figure 31). La taille de ces derniers a été adaptée pour qu'un couvercle de boite de Petri de 35 mm puisse recouvrir l'ensemble.

## B. Stérilisation des matériaux

L'ensemble des tubulures ainsi que les connecteurs, supports de BHE et les bouteilles utilisées pour réaliser le circuit microfluidique sont préalablement nettoyés en respectant le cycle suivant : eau, éthanol 70 %, eau, soude à 0,2M puis eau. La totalité de ces composants est ensuite stérilisée par autoclavage.

Les cassettes de plexiglass servant pour les TSP sont nettoyées sous PSM avec de l'éthanol à 70 % et essuyées avec des compresses stériles. Le FlexDym™ qui est utilisé pour les designs en flux de la TSP est découpé à façon puis stérilisé sous une lampe UV pendant 1 heure.

### C. Montage du circuit microfluidique

Après stérilisation et nettoyage de l'ensemble du matériel, les TSP sont réalisées en utilisant les dispositifs nécessaires à la mise en flux. Les TSP sont alors incubées pendant 1 heure à 37°C avant la mise en flux pour prévenir la dégradation de la matrice sous l'impact du flux et permettre à la matrice une polymérisation complète.

Pendant cette heure de polymérisation, le circuit microfluidique est monté sous PSM et les tubulures sont amorcées en injectant du milieu de culture. Ce dernier est retiré, puis renouvelé. Enfin, les TSP sont connectées sous le PSM et l'ensemble est placé dans l'incubateur, hormis la pompe placée à proximité. Cette dernière est réglée sur un débit de 250 µL / min pour limiter le shear-stress et permettre une communication paracrine entre le modèle de BHE et la TSP.

## IV. Mesure du taux d'oxygène

Élément central de notre stratégie, il nous a fallu tester plusieurs méthodes permettant de mesurer le taux d'oxygène au sein de la TSP.

### A. Utilisation du PtOEPK

Le PtOEPK (Platinium complexes of octaethyl porphyrin ketone) est une molécule utilisée comme sonde fluorescente pour mesurer la teneur en oxygène. Cette dernière est quenchée en présence d'oxygène, plus le taux d'$O_2$ est faible, plus l'intensité de fluorescence du PtOEPK est importante. Cette molécule présente un double pic d'absorption à 398 nm et 590 nm avec un pic d'émission à 760 nm.

La réalisation de cette solution de PtOEPK se fait en dissolvant des pastilles de polystyrènes dans du toluène pour aboutir à une solution 7 % m/m. Le PtOEPK est ensuite ajouté à la solution pour obtenir une solution de 1mg /mL (Khan et al., 2017).

Afin de réaliser le coating de lamelle avec le PtOEPK, ces dernières sont nettoyées à l'éthanol 70% et séchées avec un pistolet d'azote et placées dans un spin-coateur avant de déposer 150 µL de solution de PtOEPK et spin-coater 30s à 1 000 rpm. Afin de faire, par la suite, barrage à la toxicité du PtOEPK pour les cellules, du PDMS est ensuite coaté sur la lamelle de verre à raison de 100 µL à 3 000 rpm pendant 30 secondes. Les lamelles sont ensuite séchées pendant 1 nuit avant utilisation.

Ces lamelles de verre ainsi coatées ont ensuite été utilisées pour réaliser les TSP. Les images ont été effectuées en utilisant un microscope à champ large fluorescent le BZX-700 (Keyence) avec un objectif 4X Fluor, et un filtre Cy5.

## B. Utilisation des billes OxNano

Les billes OxNano, développées par Pyroscience, permettent de mesurer l'oxygène dissous au sein d'un système transparent et fermé. Ces billes sont composées d'un senseur qui est quenché en présence d'oxygène. Ce dernier est excitable à 610-630 nm et l'émission se fait entre 760-790 nm.

Ces billes sont couplées à l'utilisation d'une caméra, PICO $O_2$, émettant une lumière rouge, ayant la capacité d'exciter ces billes et de capter l'émission dépendante du taux d'oxygène. Ainsi, ces billes, ayant été resuspendues initialement dans du PBS à 5 mg/mL sont mélangées dans la matrice pour obtenir une concentration finale de 0,5 mg /mL. La suite du protocole de fabrication des TSP est ensuite suivie.

Les mesures d'intensité de fluorescence avec la caméra PICO $O_2$ ont été faites en plaçant la caméra au contact direct de la lamelle de verre supérieure du dispositif. L'utilisation de cette caméra est couplée au logiciel Pyro Oxygen Logger qui permet de mesurer l'intensité de fluorescence au niveau du champ mesuré.

## C. Utilisation du feuillet Presens

La technologie développée par Presens repose sur l'utilisation d'un feuillet (SF-RPSU4) sensible au taux d'oxygène. Celui-ci est composé de différentes couches : une pellicule de polyester permettant de bloquer les interférences avec l'oxygène ambiant, la couche sensible au taux d'oxygène composée d'une sonde densible au taux d'oxygène (rouge) et d'une sonde normalisatrice (verte), et d'une dernière couche servant d'isolant optique bloquant le bruit de fond pouvant provenir de l'environnement extérieur.

La molécule sensible à l'$O_2$ est une sonde qui est quenchée par l'$O_2$ engendrant une diminution de son intensité de fluorescence. Ainsi, moins il y a d'oxygène, plus le feuillet fluoresce. La seconde molécule composant la partie du feuillet, insensible au taux d'$O_2$, sert de normalisateur interne. Ces 2 sondes sont excitables à 420 nm, l'émission de la sonde sensible à l'$O_2$ présente un pic à 650 nm et celle de la sonde normalisatrice un pic à 510 nm.

Ce feuillet sensible à l'$O_2$ est commercialisé avec deux types de caméra, soit la DU01, soit la caméra VisiSensTD. Cependant, aucune de ces caméras ne nous permettaient d'obtenir des résultats reproductibles et avec la résolution spatiale souhaitée. Afin de surmonter ces limites de caméras, nous nous sommes tournés vers l'utilisation de notre microscope à fluorescence plein champ Keyence BZX-810 moyennant une adaptation des cubes filtres. Un premier cube a ainsi été monté avec un filtre d'excitation 410/10 nm, un filtre d'émission 510/10 nm et un miroir dichroïque à 425 nm. Un second cube a également été créé avec un filtre d'excitation 410/10 nm, un filtre d'émission 647/10 nm et un miroir dichroïque 425 nm. Grâce à ce dispositif, j'ai pu utiliser la chambre d'incubation du Keyence pour suivre à des intervalles réguliers le taux d'oxygène au sein des puces, et ce, avec une excellente résolution spatiale.

Afin de mesurer le taux d'oxygène au sein des TSP, des bandelettes de 2 mm x 1 cm sont découpées au sein du feuillet et placées entre la lamelle inférieure et la matrice cellularisée (avant de déposer celle-ci au sein de la TSP). Ainsi, il est possible de suivre le taux d'oxygène depuis le centre jusqu'à la périphérie de la matrice et dans la gouttière entourant la matrice. L'utilisation de sodium sulfite, piégeant l'oxygène, permet d'obtenir une valeur correspondant à « 0% » d'oxygène propre au feuillet. Les TSP sont ensuite placées dans la chambre d'incubation du Keyence pour suivre, au cours du temps et de façon spatiale, l'évolution de la fluorescence et donc le taux d'oxygène. A l'issue de cette expérience, des images de la TSP dans 3 canaux sont obtenues : en lumière blanche, en vert (pour la sonde normalisatrice ayant une émission à 510 nm), et en rouge (pour la sonde sensible au taux d'oxygène ayant une émission à 650 nm).

# V. Mesure de l'expression transcriptionnelle

## A. Extraction des ARN

Afin de collecter des ARN et d'en étudier le niveau d'expression au centre et en périphérie de la puce, des TSP sont ensemencées avec la lignée HSJD-DIPG-007 ou HSJD-DIPG-012 à raison de 10 000 cellules/µL. Vingt-quatre heures post-ensemencement, les matrices sont découpées à l'aide d'un punch de 0,8 cm de diamètre permettant de collecter 2 zones : l'une dite « périphérique », et une zone « centrale » correspondant à la surface couverte par le punch. Les deux découpes de matrices sont ensuite placées dans 500 µL de Trizol (Invitrogen, 15596-026), vortexées et placées en agitation pendant 10 minutes à température ambiante. Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C.

Après décongélation, l'extraction des ARN se fait par ajout de 100 µL de chloroforme dans chacun des échantillons suivi d'un temps de repos de 5 min à température ambiante pour séparer les

phases. Par la suite, les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes à 12 000 G à température ambiante. Le surnageant est ensuite récupéré pour être repris dans 100 µL de chloroforme. De nouveau, il y a un temps de repos de 5 minutes suivi d'une centrifugation à 12 000 G pendant 15 minutes à température ambiante à la suite de laquelle, seul le surnageant est conservé. Les ARN sont ensuite précipités par ajout d'1 µL de glycogène (Thermo Scientific, R0561) et 250 µL d'isopropanol par tube et centrifugés à 4°C à 20 000 G pendant 30 minutes. Le surnageant est éliminé et 500 µL d'éthanol à 75% sont ajoutés pour laver le culot avant une nouvelle centrifugation pendant 10 minutes à 20 000 G à la suite de laquelle le surnageant est aspiré. Les culots sont ensuite séchés pendant 10 minutes avant d'être repris dans 25 µL d'eau pure. Les ARN sont ensuite placés à 55°C pendant 10 minutes bouchons ouverts puis à 37°C pendant 2 heures et enfin conservés à -80°C.

## B. Dosage et analyse qualité des ARN

La quantité d'ARN est mesurée à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop One (Thermo Fisher). La concentration en ARN au sein des échantillons est déterminée *via* la mesure de l'absorbance à 260 nm. La pureté des ARN est estimée grâce au rapport d'absorbance 260/280 nm.

Le contrôle qualité des ARN se fait en utilisant la technologie Agilent selon le protocole du fabricant. Cette technique repose sur le principe de l'électrophorèse, permettant de séparer les différents ARN. Concrètement, une puce microfluidique (RNA NanoChip, Agilent Technologies) est remplie de gel afin de former les différents canaux. Les échantillons sont ensuite injectés au sein de cette puce avec un intercalant de l'ARN et un marqueur de taille des ARN (fragments d'ARN de tailles connues). Le RIN (RNA Integrity Number) est ensuite calculé en fonction de l'électrophérogramme. Seuls les échantillons avec un RIN supérieur à 8 ont été séquencés.

## C. RNA sequencing

Le séquençage a été réalisé à partir de 8 échantillons pour chacune des deux lignées, HSJD-DIPG-007 et HSJD-DIPG-012, à savoir 4 pour le centre et 4 pour la périphérie. Un séquençage en 3' des ARN à partir de la queue poly-A a été effectué par la plateforme de Go@L de l'Université de Lille. Le séquençage a été réalisé avec la technologie Illumina sur un Nova 6000. Pour s'affranchir des biais de quantification et de séquençage, des UMI (unique molecular identifiers) sont ligués aux fragments à segmenter. Le nombre de reads pour les échantillons était en moyenne de 6,51 millions après déduplication des UMI. La normalisation des matrices de comptage des échantillons a été effectuée avec DESeq2.

Les analyses ont été réalisées par la plateforme Go@L, ainsi qu'avec les logiciels GSEA et ShinyGO (version 0.80). Pour le GSEA, la banque de données h.all.v2024.1.Hs.symbols.gmt a été utilisée et pour ShyniGO Hallmark. MSigDB.

# VI. Marquages fluorescents

## A. Prolifération cellulaire

Afin de mettre en évidence les cellules proliférant au sein de la matrice, le Kit Click-iT EdU 488 pour imagerie (ThermoFisher, C10337) a été utilisé. Ce kit repose sur l'utilisation de l'EdU (5-éthynyl-2'-déoxyuridine), un analogue de la thymidine modifié pour contenir un groupement alkyne et s'incorporant dans l'ADN nouvellement synthétisé. L'EdU sera ensuite reconnu par l'AlexaFluor portant un groupement azide, ce qui permettra une réaction de Click (catalysée par du cuivre), entre l'alkyne et l'azide, et ainsi, la détection des cellules contenant de l'ADN nouvellement synthétisé et donc prolifératives.

Concrètement, les différents composants sont d'abord resuspendus en suivant le protocole fourni par ThermoFisher. A savoir, 2 mL de DMSO sont ajoutés à l'EdU pour obtenir une concentration stock de 10 mM, 70 µL sont incorporés à la poudre de l'AlexaFluor, les 4 mL de la solution tampon réactif Click-iT EdU sont transférés dans un Falcon de 50 mL pour être complétés avec 36 mL d'eau osmosée et la poudre de tampon additif Click-iT est solubilisée dans 2 mL d'eau déminéralisée.

Les TSP sont réalisées, avec des cellules HSJD-DIPG-007 ou HSJD-DIPG-012 à hauteur de 10 000 cellules/µL en incorporant 2 µM d'EdU dans la matrice. Une puce sans EdU est également réalisée comme contrôle pour l'autofluorescence de l'AlexaFluor. Après 48 heures de culture, les puces sont fixées au PAF 4 %. Pour ce faire, le milieu de culture contenu dans la gouttière de la puce est remplacé par du PAF 4 % pendant 30 minutes puis, le PAF est retiré ainsi que la lamelle de verre supérieure et du PAF 4% est de nouveau ajouté pendant 30 minutes. Cette fixation est suivie de 3 rinçages en cascade avec de la BSA 3 % diluée dans du PBS. Les matrices sont ensuite perméabilisées pendant 72 heures à 4°C dans du Triton-X100 dilué à 0,5 % dans du PBS. Les TSP sont ensuite rincées avec du PBS- 3 % BSA 3 fois en 24 heures. La solution de détection contenant l'AlexaFluor est incubée avec les matrices pendant 7 jours à 4°C. Faisant suite à cette incubation, 3 rinçages au PBS-3 % BSA sont réalisés et un contre-marquage des noyaux au Hoechst (Thermo Fisher,33342) dilué au 1/1000$^{ème}$ dans du PBS est réalisé pendant 1 heure à température ambiante. Les matrices sont rincées une dernière fois au PBS, puis montées avec du Fluoromount- G (Thermo Fisher,00-4958-02).

Les images des matrices sont acquises au confocal Zeiss LSM710 avec un objectif 10X. Afin de réaliser la segmentation des noyaux et des cellules ayant proliférés, un Z-stack est réalisé sur 50 µm d'épaisseur avec un intervalle de 1,69 µm entre chaque Z.

## B. Mort cellulaire

### 1. CellEvent™ Caspases 3/7

Le CellEvent™ Caspase 3/7 (ThermoFisher, C10423) est une sonde fluorescente permettant de détecter l'activité des caspases 3 et 7. En effet, cette sonde sera clivée par ces deux enzymes (activées dans les cellules en apoptose) au niveau d'une séquence peptidique DEVD permettant à la sonde de se lier à l'ADN et de devenir fluorescente.

La sonde a été utilisée à une concentration de 5 µM et a été ajoutée directement au sein de la matrice ou extemporanément avec une incubation à 37°C pendant 1 heure. Le pic d'excitation de cette sonde est de 502 nm et le pic de son émission est à 530 nm.

### 2. SYTOX™ green

Le SYTOX™ Green (ThermoFisher, S7020) est une sonde fluorescente ayant la capacité de pénétrer au sein des cellules ayant une membrane compromise donc ayant enclenché un programme de mort cellulaire. Une fois au sein de la cellule, cette sonde se lie à l'ADN et devient fluorescente.

Après démontage de la TSP, cette sonde est utilisée à 200 nM pendant 1 heure à 37°C. Cette dernière est excitable à 504 nm et son émission maximale est à 523 nm. Les images ont été acquises avec le Keyence BZX-810.

### 3. Iodure de Propidium

L'iodure de propidium (IP) est un agent intercalant de l'ADN ayant la capacité de pénétrer au sein des cellules avec une membrane plasmique compromise. Ainsi, la fixation de l'IP à l'ADN, devenant fluorescent, permet de mettre en évidence les cellules ayant enclenché un programme de mort cellulaire. Après démontage de la TSP, l'IP (FP36774A, Interchim) est utilisé dilué au 1/100$^{ème}$ dans du TSM fille sans rouge-phénol pendant 30 minutes à 37°C avant rinçage au PBS. Pour l'acquisition des images au Keyence BZX-810, l'excitation de cette sonde a été faite à 545/25 nm et la réception de son émission à 605/70 nm.

## C. Immunofluorescences dirigées contre HIF1-α

Dans le cadre de la caractérisation moléculaire de l'hypoxie, différents anticorps dirigés contre HIF1-α ont été testés : NB100-134 (Novus Biologicals), NB100-122 (Novus Biologicals), BD610958 (BD Biosciences), 36169S (Cell Signaling), ab51608 (Abcam)

En premier lieu, ces derniers étaient testés sur des cellules HSJD-DIPG-007 platées en lame multi-chambres (à raison de 50 000 cellules/puits) en utilisant du TSM base supplémenté avec 10 % de SVF. Afin de mimer l'hypoxie, une partie des cellules est traitée avec du Chlorure de Cobalt ($CoCl_2$) inhibant la dégradation d'HIF1-α à raison de 200 µM pendant 24 heures.

Les cellules sont alors rincées avec du PBS pour être fixées pendant 30 minutes au PAF 4%. Les cellules sont de nouveau rincées et perméabilisées avec du PBS-0,5 % Triton X100 pendant 1 heure à température ambiante. Après avoir rincé les cellules 3 fois pendant 5 minutes avec du PBS, une saturation est faite avec du NGS (Normal Goat Serum) 10 % pendant 2 heures. L'anticorps primaire est alors dilué au 1/100$^{ème}$ dans la solution de saturation et incubé à 4°C pendant la nuit. Après quoi, 3 rinçages de 5 minutes sont effectués et l'anticorps secondaire dilué au 1/200$^{ème}$ dans le tampon de saturation est incubé pendant 1 heure à 4°C. De nouveau, 3 rinçages de 5 minutes au PBS sont effectués et les noyaux sont marqués avec du Hoechst au 1/2000$^{ème}$ pendant 10 minutes. Les cellules sont rincées et imagées avec le Keyence BZ-X800.

## D. Immunofluorescence contre pFAK

### 1. Inclusion des matrices et réalisation des cryo-coupes

Afin de réaliser un marquage contre phospho-FAK, des cryo-sections des TSP, ensemencées avec des HSJD-DIPG-007 à 10 000 cellules/µL, sont réalisées. Pour ce faire, la lamelle de verre supérieure des TSP est retirée, le milieu aspiré, et la matrice est transférée au sein d'un cryo-moule. Ce dernier est rempli d'OCT (Optimal Cutting Temperature) (KWA-0100-00A, CellPath) et l'ensemble est plongé au sein d'un bain d'isopentane se trouvant dans le snapfrost maintenant une température de – 80°C. Les cryo-moules ainsi obtenus sont stockés à -80°C. Par la suite, le cryostat est utilisé afin de réaliser des coupes de 20 µm d'épaisseur pour les HSJD-DIPG-007 et 25 µm pour les HSJD-DIPG-012. Le support est à une température de -12°C et la lame de coupe à -20°C. Les coupes sont déposées sur des lames à charge positive (7695019, Labsolute) et conservées à -20°C.

2. Marquages

Dans l'objectif de réaliser un immunomarquage dirigé contre phospho-FAK (pY397), les lames sont laissées 30 minutes à 37°C afin de sceller la coupe sur la lame. Une fixation à température pendant 15 minutes est effectuée avec du PAF à 4 % suivie de 3 rinçages de 5 min avec du PBS. La perméabilisation est faite avec du PBS- 0,5 % Triton X100 pendant 10 minutes à température ambiante. De nouveau, 3 rinçages de 5 minutes au PBS sont effectués. La saturation est ensuite réalisée avec du NGS (Normal Goat Serum) (10000C, InvitrogenTM) à 5 % à température ambiante pendant 1 heure. L'anticorps primaire (611722, BD Biosciences) est utilisé dilué au 1/100$^{ème}$ dans la solution de saturation à 4°C sur la nuit. L'anticorps primaire est rincé 3 fois pendant 5 minutes avec du PBS à température ambiante sous agitation.

A la suite de quoi, l'anticorps secondaire dilué au 1/500$^{ème}$ dans le tampon de saturation est incubé pendant 1 heure à température ambiante à l'abri de la lumière. De nouveau, 3 rinçages au PBS de 5 min sont effectués. Du Fluoromount- G (00-4958-02, ThermoFisher) est utilisé comme milieu de montage et une lamelle de verre est apposée sur le dessus de la coupe. L'ensemble est conservé à 4°C.

Les images ont été acquises au Keyence BZX-810 avec comme un objectif Plan Apo 10X avec un temps d'exposition de 1/10sec pour la visualisation de pFAK.

# VII. Analyse d'images

## A. Analyse d'images Presens pour le taux d'oxygène

Afin d'avoir une vue d'ensemble du niveau d'$O_2$ au sein de la puce, un premier stitching des images est réalisé afin d'obtenir une représentation de l'entièreté de la TSP pour chacun des 3 canaux. La deuxième étape consiste en la création d'un composite rassemblant les images des différents temps à analyser pour chacun des canaux.

Pour déterminer le pourcentage en oxygène au cours du temps, j'ai développé une macro avec Fiji reposant sur une relation linéaire entre l'intensité de fluorescence et le pourcentage en oxygène. En effet, grâce à la mesure réalisée avec le sodium sulfite (*i.e.* 0 % $O_2$) et une mesure supplémentaire faite en dehors de la matrice à $t_0$ (*i.e.* 18,6 % $O_2$), il est possible de faire une régression linéaire à partir de ces 2 points et de déterminer le taux d'oxygène sur toute la surface de la bandelette. La macro permet donc de convertir la valeur de chacun des pixels en pourcentage en oxygène.

A la suite de cette conversion, les valeurs des pixels sont récupérées pour être représentées sous forme d'un graphique présentant le taux d'$O_2$ en fonction de la distance (la valeur de 0 µm correspondant au bord de la matrice, à l'interface du milieu de culture présent dans la gouttière latérale).

## B. Analyse d'images confocal

Dans le cadre de la réponse à la radiothérapie, les images ont été acquises au confocal LSM980 (Zeiss) avec un objectif 10X/NA0,45. L'acquisition en live de ces puces s'est faite sous forme de bandelette, d'approximativement 1 600 µm d'épaisseur sur 1 cm de longueur. Grâce au marquage des cellules avec l'IP (iodure de propidium) au 1/100$^{ème}$ et au Hoechst au 1/1000$^{ème}$, il est possible de déterminer le pourcentage de mort cellulaire en fonction de la position des cellules au sein de la puce.

Pour ce faire, une macro a été développée avec Fiji, permettant en premier lieu de découper l'image en différentes ROI de 500 µm à partir du centre de l'image. Un auto-threshold est ensuite appliqué pour chacun des canaux avec la méthode Shanbhag pour les cellules marquées avec le Hoechst et la méthode par défaut pour les cellules marquées avec l'IP. La fonction Watershed est également utilisée pour permettre de séparer les cellules proches les unes des autres. Afin de dénombrer le nombre de cellules $IP^+$ & $Hoechst^+$, l'ensemble des images obtenu est dupliqué et une LUT rouge est appliquée sur les images permettant de voir l'IP et une LUT bleue sur les images Hoechst. Ces images sont ensuite superposées et un seuillage est réalisé pour ne conserver que les cellules violettes, soit les cellules à la fois $IP^+$ & $Hoechst^+$.

Une fois les images seuillées, la fonction analyze particules est utilisée pour permettre la segmentation des cellules. Ainsi, cette macro permet de compter le nombre de cellules $Hoechst^+$, cellules $IP^+$ ainsi que les cellules $IP^+$ & $Hoechst^+$. Il est donc possible de déterminer le nombre de cellules mortes *via* la formule suivante :

$$\frac{\text{cellules } IP^+}{(\text{cellules } IP^+ + \text{cellules } Hoechst^+) - \text{cellules } IP^+ \,\&\, hoechst^+}$$

# Résultats

## I. Détermination de la géométrie de la tumeur-sur-puce

Afin de répondre à notre objectif qui est d'établir un nouveau modèle de DMG, le dispositif devait induire la formation d'un gradient d'hypoxie et être connectable, *via* un circuit microfluidique, au modèle de Barrière Hémato-Encéphalique développé par le LBHE de Lens. Pour cela nous avons choisi un design en partie inspiré des travaux de YI et collaborateurs ayant développé un modèle de GBM-sur-puce permettant de créer un gradient d'hypoxie (Yi et al., 2019). Ce dernier repose sur la délimitation d'une chambre bio-imprimée en silicone autour d'une matrice contenant des cellules de GBM, le tout entre deux lamelles de verre. Ce design a toutefois été adapté à nos objectifs, notamment pour permettre la connexion de la puce au modèle de BHE *via* des connecteurs microfluidiques rendant possible sa mise en flux. De plus, notre modèle ne repose pas sur la bio-impression, mais sur des polymères biocompatibles et facilement maniables. Enfin, l'apport en gaz et en nutriments au sein de notre TSP se fait uniquement de façon latérale depuis la gouttière située au pourtour de la matrice et non par le dessus de la matrice, comme cela est le cas dans le modèle de YI et collaborateurs. L'apport uniquement radial en gaz et en nutriments viserait ainsi à assurer une distribution depuis la périphérie et ce, sur toute l'épaisseur de la matrice (Figure 17.C).

A ce titre, deux dispositifs, reposant sur la même géométrie ont été développés. Le premier dispositif, dit « statique », a été utilisé pour la mise au point et la caractérisation du modèle en raison de sa facilité de mise en œuvre. Le deuxième dispositif, dit « en flux », était développé en vue d'une connexion microfluidique de la BHE à la TSP.

Dans sa version finalisée, le cœur de notre tumeur-sur-puce était un disque de matrice extracellulaire composée d'éléments se rapprochant de la MEC cérébrale. Cette matrice se devait de contenir suffisamment de cellules de DMG pour induire la mise en place d'un gradient de densité cellulaire et d'hypoxie. Compte tenu de la taille moyenne d'un DMG de la ligne médiane observée en clinique (3-4 cm), et de notre volonté d'instaurer un cœur hypoxique manifeste, nous avons choisi un diamètre de matrice initial d'1 cm (Hayward et al., 2008).

Pour le design statique, la matrice cellularisée est entourée de PDMS (Poly-Di-Methyl-Siloxane) ayant une épaisseur de 750 µm et est enchâssée entre deux lamelles de verre. Ainsi, la hauteur de la matrice est définie par l'épaisseur du PDMS. Le PDMS est un biopolymère transparent et perméant aux gaz ayant l'avantage d'avoir des propriétés adhésives au verre, permettant la création d'une gouttière contenant le milieu de culture de façon étanche tout en autorisant un démontage aisé du dispositif (Figure 17.A). Pour le design en flux, la gouttière délimitant la chambre contenant le milieu

et la matrice est constituée de FlexDym™ de 750 µm d'épaisseur, enchâssée d'une part, d'une lamelle de verre, reposant sur un support en plexiglass, et d'autre part d'un couvercle en plexiglass percé de connecteurs microfluidiques. Bien que plus onéreux et plus difficile à découper et à démonter, le FlexDym™, un biopolymère transparent, est utilisé ici pour ses propriétés adhésives plus importantes que celles du PDMS. Ce polymère est donc utilisé pour les dispositifs en microfluidique afin de prévenir les risques de fuites inhérents à la mise en flux. Afin de maximiser l'étanchéité, les deux parties en plexiglass sont assemblées par vissage (Figure 17.B).

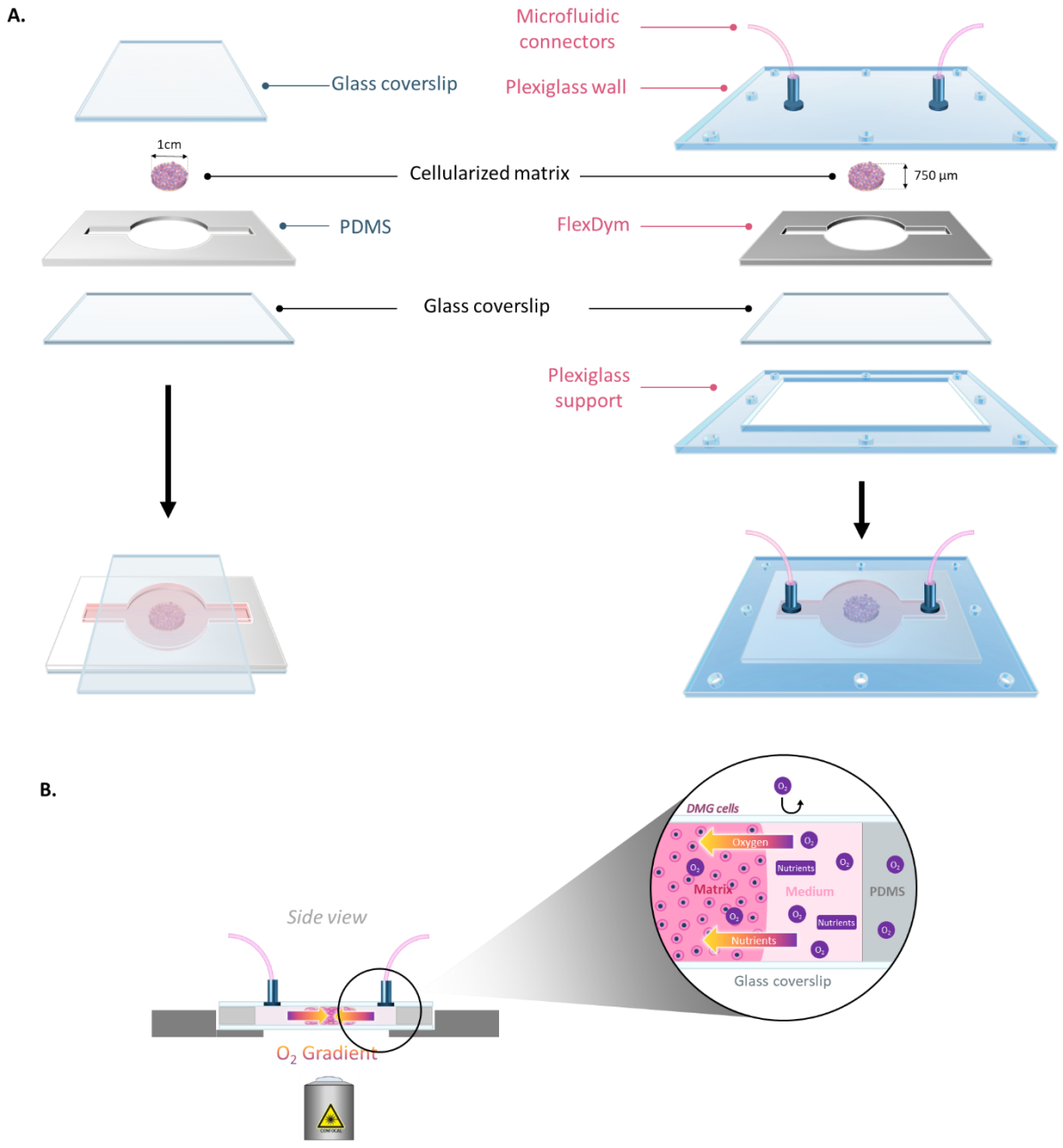



**Figure 17 : Représentation schématique des dispositifs utilisés afin de créer une tumeur-sur-puce**
**A.** Designs en statique et en flux, reposant sur l'enchâssement de la matrice entre deux lamelles de verre pour le design statique et une lamelle de verre et une paroie en plexiglass pour le design en flux. **B**. Vue de profil montrant l'observation en temps réel des cellules au sein de la matrice ainsi qu'un apport en nutriments et en gaz uniquement radial.

## II. Composition de la matrice extracellulaire

Différentes matrices extracellulaires ont été testées pour générer le disque cellularisé présent au sein de la tumeur-sur-puce. L'acide hyaluronique étant le composé majoritaire au niveau du parenchyme cérébral, différents types d'acide hyaluronique ont été testés. Cette matrice devait notamment permettre l'obtention d'une répartition des cellules dans toute la hauteur de la matrice, autoriser les cellules à prendre une forme fusiforme, se présenter sous la forme de gel suffisamment maniable pour être démonté en vue des analyses *a posteriori*, mais cependant résistant au flux.

A ce titre, le composé Hystem® a d'abord été testé. Ce dernier est vendu sous forme d'un lyophilisat à resuspendre et qui polymérise suite à l'ajout d'un cross-linker. Une fois l'Hystem® polymérisé, son module de Young est de l'ordre de 300 Pa, sachant que celui du cerveau est estimé entre 100 et 2 000 Pa. Afin de le compléter en composants de la MEC cérébrale et d'obtenir une consistance gélifiée, du Matrigel® y a été ajouté à hauteur de 20 %. Le Growth Factor-reduced Matrigel® a été choisi pour ne pas apporter d'excédent de facteurs de croissance exogènes, et ce, sous sa version sans rouge de phénol afin d'interférer le moins possible avec les applications de microscopie de fluorescence prévues.

Toutefois, lors de l'observation au cours du temps d'une tumeur-sur-puce sur 48 heures, nous avons pu observer que les cellules ne migraient que peu, voire pas du tout, au sein de cette matrice malgré le caractère infiltrant des DMG. De plus, le diamètre des matrices s'est avéré rétrécir au cours du temps, certainement en raison de l'utilisation du cross-linker chimique (ExtraLinker) nécessaire à la réticulation de l'Hystem. Cette matrice a ainsi permis la majorité des développements techniques de la TSP, mais du fait de ces défauts et en raison de difficultés d'approvisionnement, le choix d'une nouvelle matrice a dû être consenti.

En ce sens, le hyaluronane non méthacrylé, (ici dénommé HA), à différents poids moléculaires a été testé en combinaison avec du Matrigel® à différentes concentrations. Tout d'abord, l'HA à moyen poids moléculaire (PM), compris entre 75 et 350 kDa, a été testé avec des concentrations de Matrigel® de 25, 50 et 75 % du volume total du mix matriciel. Celui-ci ne permettait cependant pas une polymérisation complète de la matrice qui restait trop liquide et ne répondait donc pas à nos exigences en termes de répartition des cellules. L'HA à haut PM, *i.e.* > 950 kDa, a aussi été évalué en le couplant à différentes concentrations de Matrigel®. L'HA à haut PM à hauteur de 25 % du volume final de la matrice (*i.e.* mixé à 75 % de Matrigel®) permettait aux cellules de migrer, et d'adopter un phénotype fusiforme en périphérie de la matrice (Figure 18). De plus, les tests préliminaires semblaient montrer que cette dernière ne se détériorait pas en condition de flux. C'est donc cette composition de matrice que nous avons sélectionnée pour la suite de la caractérisation de la TSP.

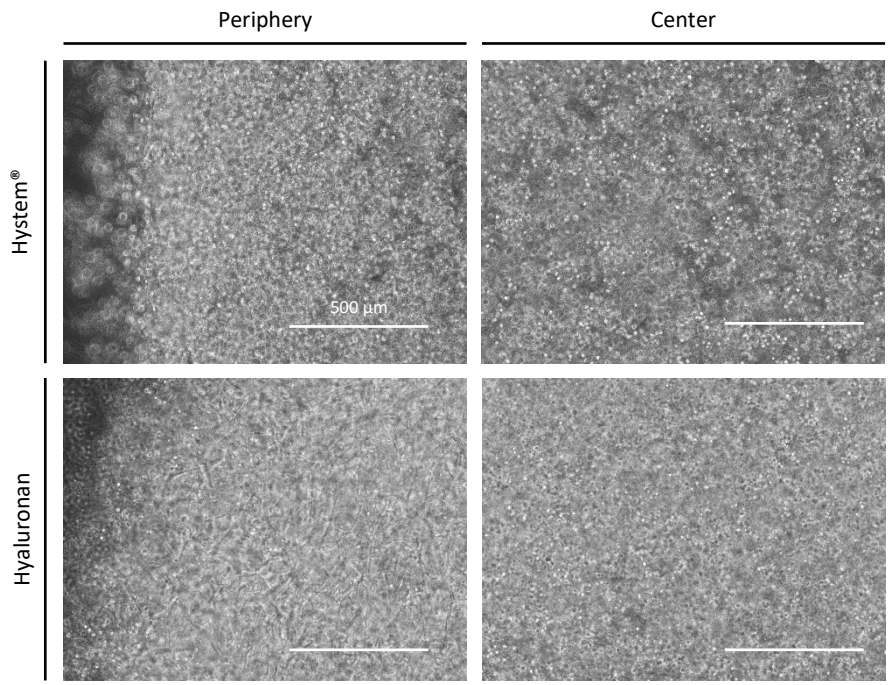



**Figure 18** : **Images des différentes matrices testées afin de réaliser la TSP.**
Images du centre et de la périphérie d'une matrice réalisée avec un mix Hystem® / Matrigel® 80/20 ou avec un mix Matrigel® / hyaluronane à haut poids moléculaire 75/25, à J2 post-ensemencement de cellules HSJD-DIPG-007 à 10 000 cellules/µL. Les images ont été réalisées à l'aide du microscope Keyence BZ-X810.

# III. Caractérisation du gradient de densité cellulaire

## A. Détermination de la concentration cellulaire optimale

La densité cellulaire jouant un rôle crucial dans l'apparition de zones d'hypoxie et la biodistribution des agents pharmacologiques au sein de la tumeur, il nous est paru important, au sein de notre tumeur-sur-puce, d'intégrer une forte densité cellulaire.

Nous avons testé différentes concentrations cellulaires pour observer leur impact sur le phénotype cellulaire. A ce titre, des tests d'ensemencement des cellules HSJD-DIPG-007 avec 1 000, 5 000 ou 10 000 cellules/µL ont été effectués, initialement avec la matrice Hystem® (Figure 19).

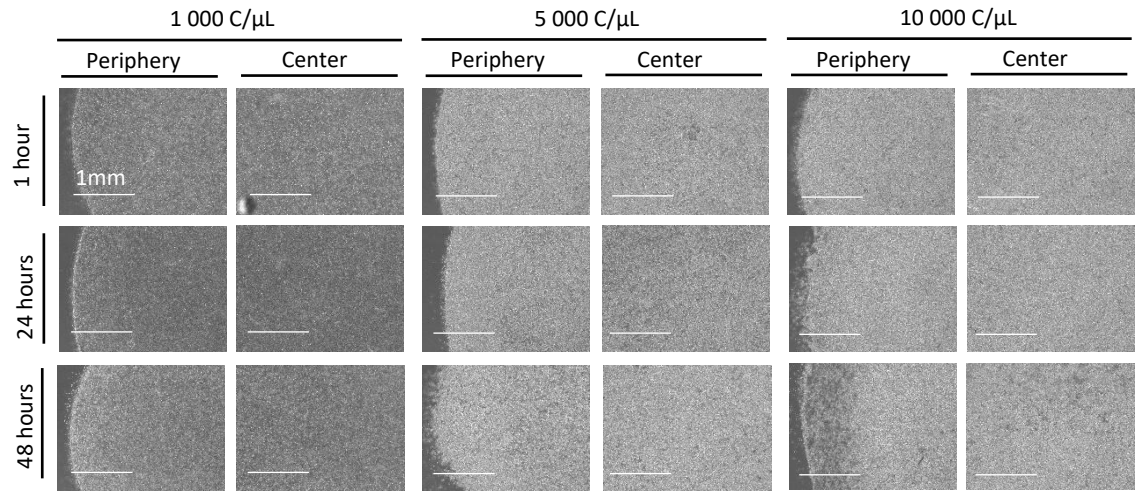



**Figure 19 : Photos des différentes concentrations cellulaires testées avec les cellules HSJD-DIPG-007.**
Les matrices de diamètre 1 cm ont été ensemencées, avec 1 000, 5 000 ou 10 000 cellules de HSJD-DIPG-007 par µL. Les images ont été réalisées à différents temps post-ensemencement grâce à un microscope de type Evos M5000 à un grossissement de 4X.

Pour la concentration de 1 000 cellules/µL, nous avons obtenu une densité cellulaire relativement faible et homogène à 24 heures. A 48 heures post- ensemencement, une zone périphérique semblait présenter une densité cellulaire légèrement supérieure à celle du centre

A partir de 5 000 cellules/µL, un gradient de concentration cellulaire s'établit dès 24 heures après l'ensemencement, avec une densité cellulaire plus importante à la périphérie de la tumeur-sur-puce qu'au centre de celle-ci. Ce gradient est d'autant plus visible que la densité cellulaire initiale est importante, ce qui semble indiquer que les cellules en périphérie disposent de conditions de développement, *i.e* accès aux nutriments et aux gaz, plus favorables que les cellules au centre du dispositif.

La puce ayant pour vocation de recréer une telle inégalité d'accès aux nutriments et aux gaz, le choix de 5 000 ou 10 000 cellules/µL est apparu comme étant le plus adapté puisque donnant lieu au gradient de densité cellulaire attendu. La concentration cellulaire de 10 000 cellules/µL a par la suite été validée pour la matrice hyaluronane à haut poids moléculaire avec 3 lignées cellulaires de DMG différentes (Figure 20.A).

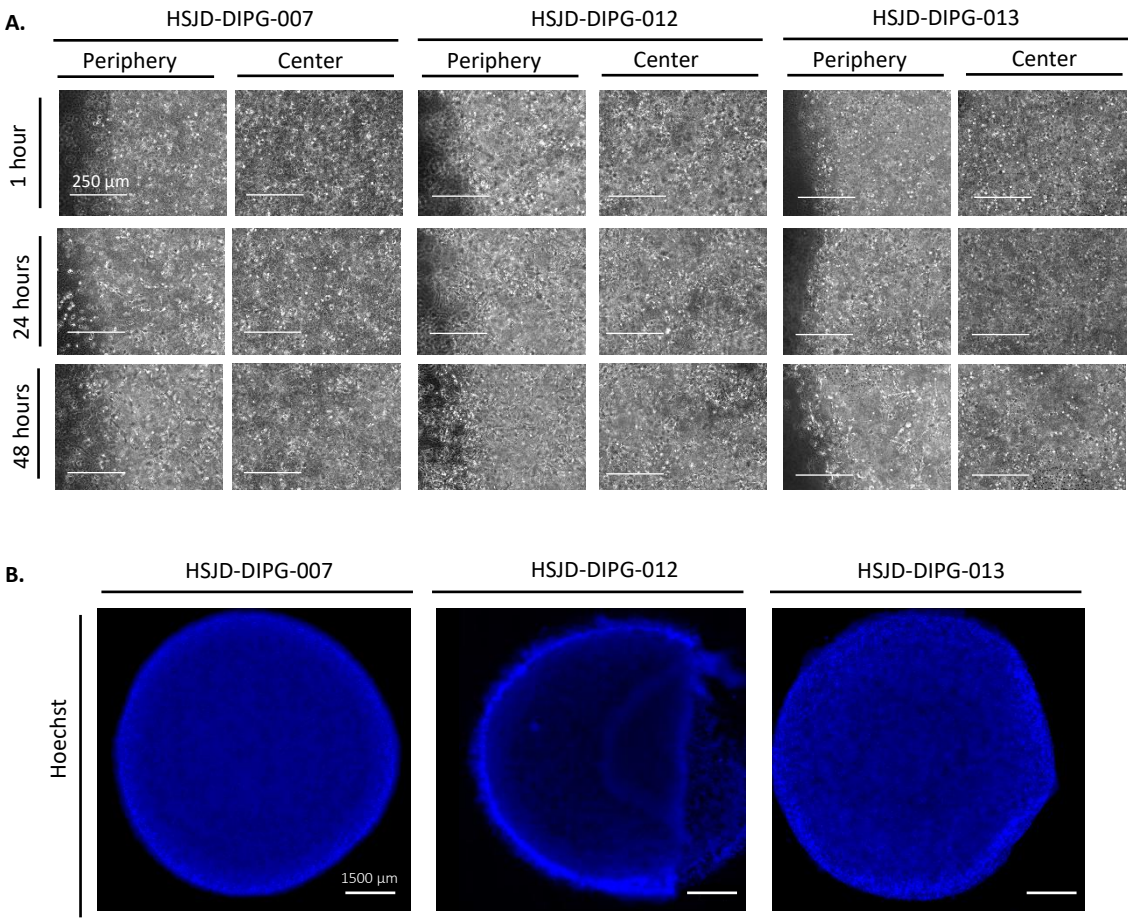



**Figure 20 : Observation du choix de la concentration cellulaire de 10 000 cellules/µL et de la matrice hyaluronane à haut poids moléculaire avec différentes lignées cellulaires de DMG.**
**A**. Les matrices ont été réalisées à raison de 10 000 cellules/µL avec 3 lignées cellulaires différentes : HSJD-DIPG-007 ou HSJD-DIPG-012 ou HSJD-DIPG-013 et imagées au Keyence BZ-X800. **B**. Marquage au Hoechst des différentes matrices, à 48 heures post-ensemencement pour les HSJD-DIPG-007/-013 et 72 heures post-ensemencement pour les HSJD-DIPG012.

Le marquage au Hoechst des différentes matrices ensemencées à 10 000 cellules/µL permet de mettre en avant la présence d'un gradient de densité cellulaire radial croissant du centre à la périphérie de la matrice et ce, dans les 3 lignées cellulaires testées. En effet, une couronne d'approximativement 1 000 µm dont l'intensité de fluorescence en Hoechst est supérieure à celle mesurée au centre de la matrice est observable (Figure article 1.E et Figure 20.B). De surcroit, il est tout à fait intéressant de noter que pour ces 3 lignées cellulaires, au centre, les cellules ont plutôt une morphologie ronde, alors qu'en périphérie, les cellules sont fusiformes. Ce changement de forme cellulaire entre la périphérie et le centre semble être lié au gradient de densité cellulaire. Ce dernier peut résulter de conditions plus favorables pour l'accès aux nutriments et aux gaz en périphérie de la matrice qu'en son centre qui favorisait ainsi un phénotype d'apparence plus invasif des cellules.

Cette différence de densité cellulaire s'explique par une prolifération plus importante en périphérie mais aussi par une migration de certaines cellules vers une zone plus favorable à leur

développement ou encore, en raison d'un stress cellulaire plus important au centre de la TSP induisant une mort cellulaire accrue.

Pour étayer notre choix de la densité celllulaire, un marquage hématoxyline et éosine a été réalisé sur une coupe de matrice faite avec les cellules HSJD-DIPG-007 ensemencées à 10 000 cellules/µL et comparée avec une coupe histologique issue d'une biopsie de DMG (Figure 21).

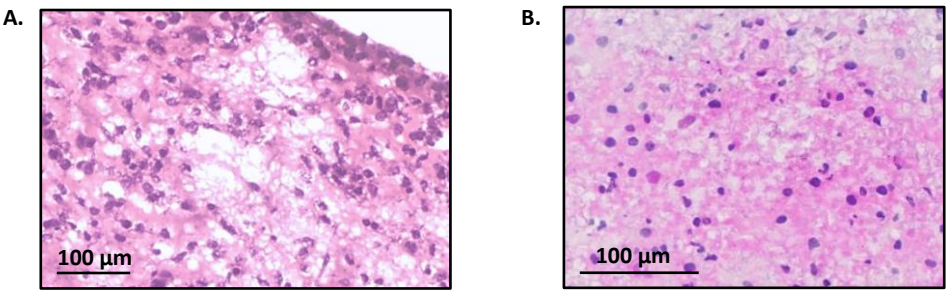



**Figure 21 : Analyse anatomopathologique d'une coupe de TSP et d'une coupe de DMG.**
**A.** Coupe histologique d'une TSP réalisée avec les cellules HSJD-DIPG-007 ensemencées à raison de 10 000 cellules/µL. **B.** Coupe histologique d'une biopsie de DMG. Les coupes ont été colorées selon la même méthode, à savoir hématoxyline et éosine.

Cette analyse histologique, visée par les pathologistes du CHU de Lille, révèle que la concentration cellulaire choisie de 10 000 cellules/µL est cohérente avec celle observable au sein d'une biopsie de DMG permettant ainsi d'entériner notre choix de 10 000 cellules/µL pour la suite de nos expériences.

Pour déterminer l'origine du gradient de densité cellulaire, un test de migration cellulaire a été réalisé visant à observer les cellules au sein d'une TSP ensemencée à raison de 10 000 cellules/µL avec les HSJD-DIPG-007 (Figure article supplémentaire 4). Ce test indique que, dans l'ensemble, les cellules migrent peu avec toutefois une migration cellulaire, tant en termes de distance parcourue que de vitesse, plus importante en périphérie qu'au centre de la matrice. Ainsi, il est peu probable que le gradient de densité cellulaire observé soit lié à la migration des cellules au sein de la puce.

## B. Etude de la prolifération cellulaire

Afin de déterminer si ce gradient de densité cellulaire est lié à une prolifération différentielle, un marquage à l'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) a été effectué. L'utilisation de ce dernier repose sur l'incorporation au sein de l'ADN nouvellement synthétisé, d'un analogue de la thymidine qui est l'EdU pouvant être visualisé par la suite en fluorescence.

Des tumeurs-sur-puces ont donc été réalisées avec des cellules HSJD-DIPG-007 ensemencées à raison de 10 000 cellules/µL mélangées avec de l'EdU directement incorporé dans la matrice. En effet, l'ajout direct de l'EdU au sein du mix matriciel en assure une biodisponibilité homogène pour

toutes les cellules, en s'affranchissant d'un éventuel biais de pénétration de la molécule au sein de la matrice en cas d'ajout extemporané. Après 48 heures, les matrices sont ainsi fixées, perméabilisées et un mélange contenant notamment du cuivre et l'AlexaFluor 488 est ajouté pour une semaine. Une réaction de click se produit entre le groupement azide (porté par l'Alexa Fluor 488) et le groupement alkyne de l'EdU incorporé par les cellules lors de la phase S. Les cellules prolifératives ont ainsi pu être mises en évidence par le marquage avec l'AlexaFluor Azide 488 et les matrices ont alors été imagées au confocal LSM710 (Zeiss) avec un objectif 10X.

L'analyse des images a été réalisée avec le logiciel Imaris, en réalisant une segmentation de l'ensemble des noyaux basé sur un filtrage en fonction de leur taille et de leur intensité de fluorescence. Les noyaux verts (*i.e.* marqués avec l'AlexaFluor Azide 488) ont également été segmentés en utilisant là aussi un seuillage de taille et d'intensité. Ceci a permis le calcul d'un pourcentage de prolifération en fonction de la distance à laquelle se situent les cellules par rapport au centre de la matrice (Figure article 3).

Cette analyse a révélé la présence d'un gradient radial de prolifération cellulaire avec davantage de cellules en division en périphérie de la puce qu'en son centre. En effet, le pourcentage de prolifération est d'approximativement 40 % sur le premier millimètre périphérique, puis décroit progessivement pour atteindre 0% à partir de 2,5 mm du bord de la puce.

Ainsi, **le gradient de densité cellulaire précédemment observé serait lié à un gradient de prolifération cellulaire** résultant probablement de conditions plus favorables en périphérie (*i.e* l'accès à l'oxygène ainsi qu'aux nutriments) qu'au centre de la TSP.

## C. Contraintes mécaniques liées à la haute densité cellulaire

Afin de déterminer si la mise en place de cette forte densité cellulaire affecte les forces mécaniques au sein de la puce, une caractérisation de ces contraintes a été faite de manière indirecte par utilisation de billes en polyacrylamides fluorescentes permettant d'évaluer les forces compressives. Ainsi, les billes, ayant un module élastique nominal de 4,5 kPa (ordre de grandeur des forces observables dans un sphéroïde), ont été incorporées directement dans la matrice avec 10 000 cellules HSJD-DIPG-007/µL dès l'ensemencement (Dolega et al., 2017). Des images de ces puces ont été prises au moment de l'ensemencement et après 24 heures au microscope à fluorescence Keyence BZ-X800. L'analyse de ces images a permis de mesurer l'aire de chaque bille, grâce à la fonction Analyze Particule de Fiji, et ainsi d'observer les forces compressives exercées sur celles-ci (Figure article 5. A. B).

Cette analyse, réalisée avec l'aide de notre ingénieure d'étude Mme. Agathe LARATTE, révèle une compression de 53 % entre J0 et J1 mettant en lumière la présence de forces de compression significatives au sein de la puce. A noter que cette expérience a également été réalisée avec une matrice sans cellule, afin de s'assurer que la compression des billes résulte exclusivement de forces mécaniques exercées par les cellules, et n'a pas permis d'observer de différence entre J0 et J1. Ainsi, les forces de compression précédemment observées apparaissent dépendantes de la présence des cellules.

Ces forces mécaniques issues du microenvironnement sont perçues par les cellules grâce à différents types de récepteurs médiant, en aval, plusieurs types de signaux tels que la prolifération, la migration et la survie cellulaire. Cette signalisation de la mécanotransduction se fait notamment *via* la phosphorylation de la protéine FAK (focal adhesion kinase). Ainsi, pour faire suite à l'observation des forces de compression au sein de la puce, l'activation de FAK a été étudiée par immunofluorescence sur des coupes de puces HSJD-DIPG-007 (10 000 cellules/µL) réalisées 48 heures post-ensemencement. Les images ont été acquises au microscope à fluorescence Keyence BZ-X800 avec un objectif 10X et analysées avec le logiciel Fiji pour déterminer l'intensité moyenne de fluorescence du marquage pFAK et des noyaux (marqués au Hoechst) en périphérie et au centre de la puce (Figure article 5. C. D).

Ces images et leur analyse révèlent que l'activation de FAK est plus importante en périphérie qu'au centre de la puce. Cette différence apparaît cohérente avec le gradient de densité cellulaire observé, cette dernière pouvant amplifier les forces mécaniques activant FAK.

L'ensemble de ces résultats suggère que **notre puce est capable d'induire des contraintes mécaniques présentes au sein de la plupart des tumeurs solides à forte densité cellulaire.** Contrainte mécanique perçue par les cellules au travers de l'activation différentielle de FAK observée entre la périphérie et le centre.

# IV. Caractérisation du gradient d'hypoxie

L'intention première de la TSP est de mimer un gradient d'hypoxie, nous nous sommes attachés à caractériser le taux d'oxygène au sein de la puce.

## A. Mesure physique de la teneur en oxygène au sein de la matrice

Afin de réaliser la caractérisation spatiale du taux d'oxygène dans la TSP, différentes techniques ont été utilisées.

La première, développée par PyroScience, consiste en l'utilisation de billes, nommées OxNano, couplées à l'utilisation d'une caméra, Pico $O_2$. Cette dernière excite les cristaux avec une lumière rouge et capte les signaux émis par les billes dans l'infra-rouge. Les billes étaient incorporées directement au sein de la matrice pour permettre une répartition homogène de ces dernières. La mesure de l'intensité de fluorescence de ces OxNano était faite au travers la lamelle de verre avec la caméra. Cependant, cette technologie ne permettait pas d'avoir une résolution spatiale suffisante rendant impossible une évaluation fine de la mise en place d'un gradient d'oxygène au sein de notre puce. En effet, les billes OxNano n'étaient pas réparties de manière homogène au sein de la matrice.

Pour répondre à cette exigence de résolution spatiale, le PtOEPK a été utilisé. La fluorescence de ce composé est dépendante du taux d'oxygène. Cette molécule doit cependant être préalablement coatée sur une lamelle de verre, qui est ensuite recouverte d'une fine couche de PDMS pour empêcher l'interaction directe des cellules avec ce composé toxique. La nécessité de réaliser ce coating sur lamelle de verre entraînait une variabilité quant à l'épaisseur de la couche de PtOEPK au sein et entre les différentes lamelles de verre et ainsi un signal irrégulier (Figure 22).

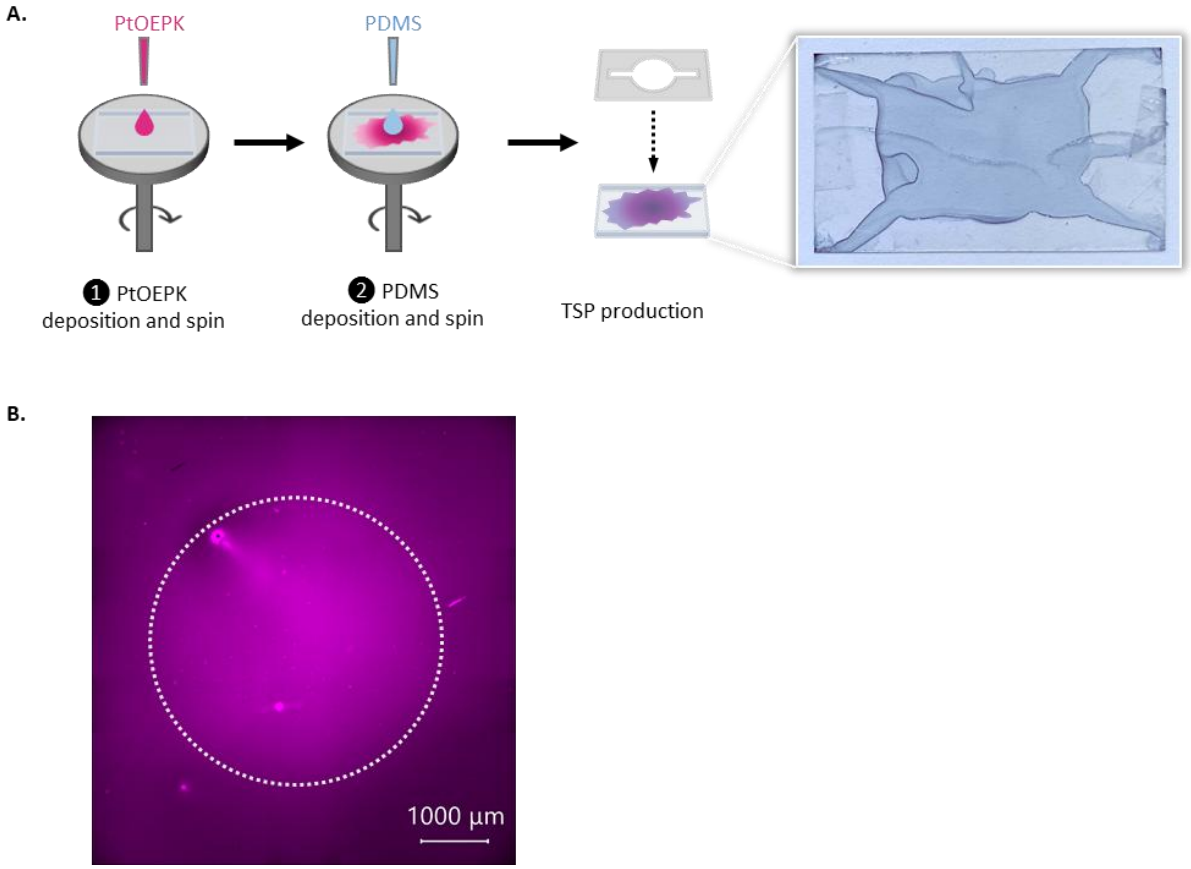



**Figure 22 : Visualisation du taux d'oxygène grâce à une sonde chimique, le PtOEPK.**
**A.** Représentation schématique de la préparation du dispositif. La lamelle de verre est spin-coatée avec le PtOEPK, l'ensemble est ensuite recouvert de PDMS. Cette lamelle est ensuite utilisée pour réaliser la TSP qui a été ensemencée avec des HSJD-DIPG-007 à raison de 10 000 cellules/µL. **B**. Image réalisée à J1 post ensemencement au Keyence BZX-700. Le cercle blanc en pointillés représente le contour de la matrice.

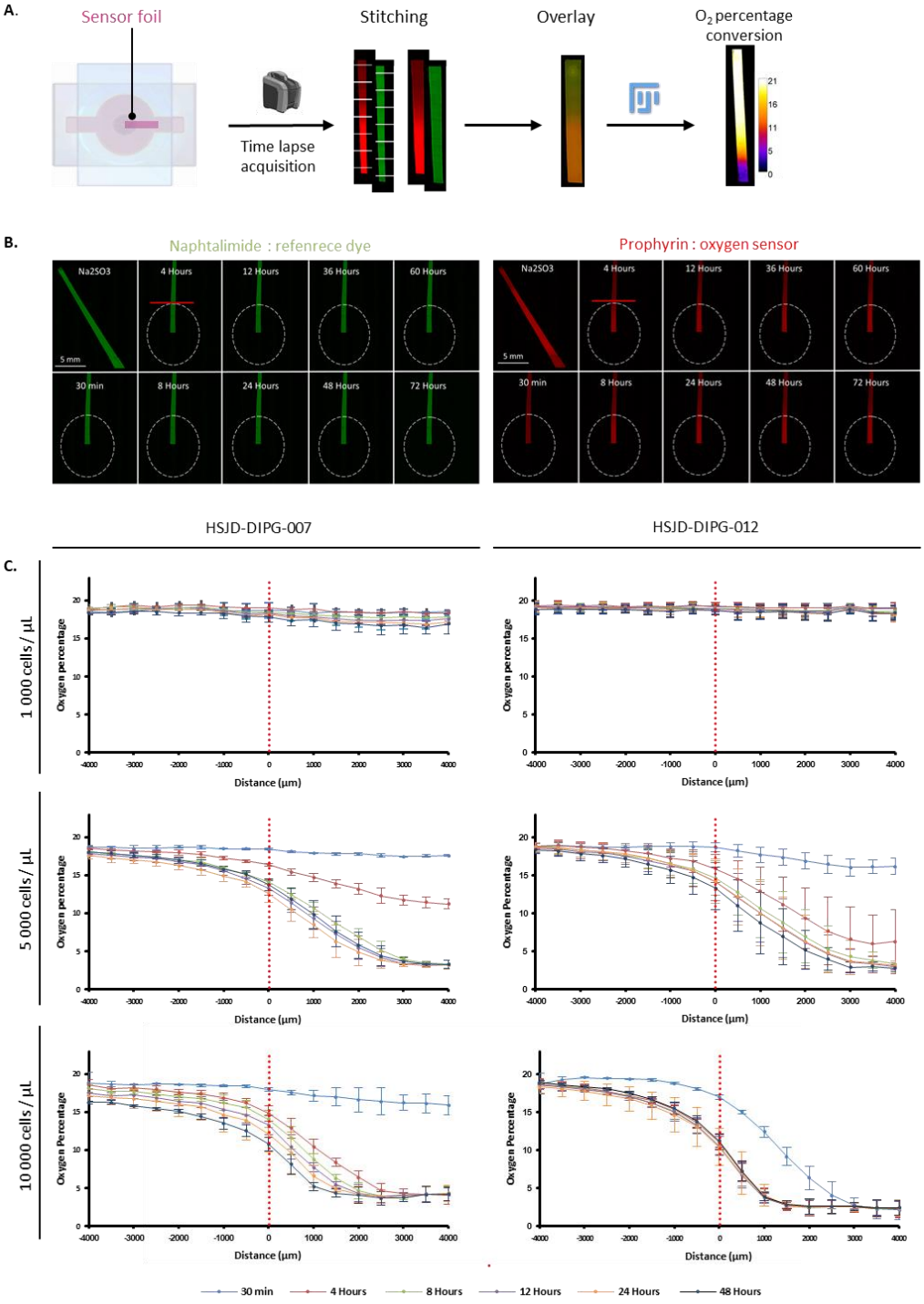
Dans ce contexte, une troisième technologie a été testée. Développée par Presens, celle-ci repose sur l'utilisation d'un feuillet sensible au taux d'oxygène. Ce feuillet, sensible au taux d'oxygène, est composé de 2 molécules. La première, une sonde ratiométrique fluorescente dans le rouge est sensible au taux d'oxygène, et la seconde, fluorescente dans le vert, sert de composant normalisateur de l'intensité de fluorescence. Ce dernier est placé entre la matrice et la lamelle inférieure.

Dans un premier temps, les différentes caméras commercialisées par Presens ont été testées pour imager ce feuillet, mais ces dernières ne permettaient pas d'obtenir des résultats satisfaisants. En effet, la DU01 s'est révélée trop peu résolutive pour les applications souhaitées, à savoir la cartographie d'une puce de 5 à 10 mm de diamètre. De plus, nous observions une instabilité de signal importante entre les différentes prises de vue de la puce séparées seulement d'une minute. Concernant la caméra VisiSensTD, une expérience menée au sein d'une station hypoxie où la concentration en oxygène était augmentée progressivement révélait une forte instabilité dans les mesures avec des valeurs ratiométriques variant d'un extrême à l'autre au sein d'un même morceau

de feuillet. Ainsi, pour surmonter ces limites de caméras, nous avons choisi d'utiliser le Keyence BZX-810. Pour ce faire, il nous a fallu en modifier les cubes filtres à façon. Grâce à ce dispositif, la chambre d'incubation du Keyence a pu être utilisée pour suivre à intervalles réguliers le taux en oxygène au sein des puces, et ce, avec une résolution spatiale très satisfaisante (de l'ordre de 4 µm).

L'un des critères de notre cahier des charges étant la mise en place spontanée d'un gradient du taux d'oxygène, mimant le microenvironnement tumoral d'un DMG, différentes concentrations cellulaires au sein de la TSP ont été évaluées quant à leur capacité à induire un gradient d'hypoxie. Ces différentes concentrations cellulaires testées étaient : 1 000, 5000 ou 10 000 cellules / µL avec deux lignées cellulaires : les HSJD-DIPG-007 et les HSJD-DIPG-012. Après ensemencement, les TSP étaient placées dans la chambre d'incubation du Keyence, permettant une visualisation, au cours du temps, de l'évolution du gradient d'oxygène (Figure 23.A).

En guise de calibration, un contrôle « 0 % » d'oxygène est réalisé en utilisant un piège à oxygène, le sodium sulfite ($Na_2So_3$), un deuxième contrôle, « 18,6 % » en oxygène est fait en mesurant l'intensité de fluorescence du feuillet, à $t_0$, en dehors de la matrice, au sein du milieu de culture pleinement oxygéné. Grâce à ces 2 points, il nous est alors possible de faire une régression linéaire et de convertir chaque valeur d'intensité de pixel en pourcentage d'$O_2$ (Figure 23).




**<u>Figure 23</u> : Caractérisation physique du taux d'oxygène au sein de la TSP.**
**A**. Représentation schématique de l'expérience. Le feuillet est placé entre la matrice cellularisée et la lamelle inférieure et l'ensemble du dispositif est placé au sein du microscope Keyence comportant une chambre d'incubation à 37°C sous 5% de $CO_2$. Les images sont prises toutes les 4 heures pendant 72 heures. **B**. Images du feuillet à différents temps pour une matrice ensemencée avec des HSJD-DIPG-007 à 10 000 cellules/µL. Les images en vert correspondent à la sonde de référence et en rouge correspondent à la sonde sensible au taux d'$O_2$. Les pointillés en blanc représentent le contour de la matrice. Le $Na_2SO_3$ est utilisé comme point de calibration 0 % en $O_2$. Le trait rouge représente le bord de la matrice, à savoir l'origine (0 µm) utilisée par la suite pour l'axe des distances. **C**. Graphiques représentant le pourcentage en oxygène en fonction de la distance pour les HSJD-DIPG-007 et HSJD-DIPG-012. La distance 0 µm correspond au bord de la matrice, les valeurs négatives représentent les mesures dans la gouttière et les valeurs positives dans la matrice.

Pour l'ensemble des conditions testées, il est tout à fait intéressant de noter qu'aucune variation signatifive en termes d'intensité de fluorescence n'a été observée avec la molécule normalisatrice (canal vert) (Figure 23.B).

Ce résultat montre que, pour les deux lignées cellulaires testées, à 1 000 cellules/µL, aucun gradient du taux d'$O_2$ ne se met en place. L'absence d'hypoxie au sein de cette condition révèle donc qu'une telle concentration cellulaire est insuffisante pour l'instauration d'un gradient d'oxygène.

Pour la condition à 5 000 cellules/µL avec les HSJD-DIPG-007, un gradient d'oxygène s'instaure dès 4 heures, avec approximativement 17 % d'$O_2$ à la périphérie de la matrice pour arriver à 12 % en son centre. Ce phénomène s'accentue au cours du temps et semble se stabiliser vers 48 heures, temps pour lequel le pourcentage en oxygène est de 14 % à la périphérie et de 3 % au centre de la matrice. En comparaison, les cellules HSJD-DIPG-012 semblent consommer plus rapidement l'$O_2$ puisqu'à 4 heures, le taux au centre de la puce est d'approximativement 7 % contre 12 % pour les HSJD-DIPG-007. Cette différence entre les deux lignées cellulaires semble néanmoins s'atténuer, puisque dès 8 heures, leur consommation d'oxygène parait similaire avec 14% d'$O_2$ en périphérie de la puce et approximativement 4% au centre. Il est également intéressant de noter, qu'avec les deux lignées cellules testées, une diminution du taux d'oxygène s'instaure au cours du temps au sein de la gouttière. En effet, pour une distance de -500 µm, à savoir dans la gouttière, à 30 minutes, ce taux d'oxygène est d'approximativement de 19% pour finalement diminuer à 15% à 48 heures. Ce phénomène est notable jusqu'à une distance de -2 000 µm et tend à s'amoindrir lorsque l'on séloigne de la périphérie de la matrice.

Enfin, pour la condition à 10 000 cellules/µL, une différence dans le profil des courbes est notable entre les deux lignées cellulaires ; les HSJD-DIPG-012 semblent consommer plus rapidement l'oxygène présent au sein de la matrice, phénomène visible dès la première mesure à 30 min et atteignant son maximum dès 4 heures. En revanche, pour les HSJD-DIPG-007, à 30 min, une légère diminution du taux d'$O_2$ dans la matrice est observable. C'est à partir de 4 heures que le gradient d'oxygène apparaît avec une valeur de l'ordre de 4 % au centre de la matrice. Si cette valeur seuil ne change pas au cours du temps, on observe que l'hypoxie en périphérie de la matrice, et même dans la gouttière, s'intensifie jusqu'à 48h post ensemencement, pour atteindre environ 11 % d'$O_2$ à l'interface matrice-gouttière (distance = 0µm). En effet, de la même manière que pour les matrices réalisées à 5 000 cellules/µL, un appauvrissement en oxygène est notable au sein même de la gouttière, avec une valeur initiale à -500 µm d'environ 19 % qui atteindra les 14 % d'oxygène après 48 heures. Ce phénomène est remarquable jusqu'à une distance de -3 000 µm et semble donc plus accentué lorsque la concentration cellulaire augmente.

Ensemble, ces résultats démontrent que **notre design de TSP permet l'instauration d'un gradient radial du taux d'oxygène, mais également que la densité cellulaire a un impact sur la mise en place de ce gradient.**

## B. Mesure du pH au sein de la TSP

Le changement métabolique opéré par les cellules au sein d'un environnement hypoxique a été décrit comme pouvant un relargage de protons et de lactates entrainant une acidification de l'environnement extracellulaire. Afin de mesurer si le gradient d'oxygène observé s'accompagne d'une telle acidification, un feuillet Presens sensible au pH a été utilisé selon le même protocole que pour le feuillet Presens sensible au taux d'oxygène. Ce feuillet pH est composé de 2 molécules, l'une est sensible aux variations de pH, la fluorescéine isothiocyanate (FITC) et la seconde sonde, le $Ru(dpp)_3$ (tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline) ruthenium (II) dichloride complex) sert de contrôle. En résumé, les matrices ont été ensemencées avec les cellules HSJD-DIPG-007 à hauteur de 10 000 cellules/µL sur le feuillet sensible au pH et placées au sein de la chambre d'incubation du Keyence BZ-X800 pour permettre la visualisation au cours du temps du pH pendant 48 heures (Figure article 2. E).

Les résultats obtenus à l'issue de cette expérience montrent une légère acidification du milieu qui semble se stabiliser dès 12 heures avec au centre de la puce un pH de 7,2 contre 7,5 en périphérie et ce pour une valeur du pH initiale d'approximativement 8,1 au centre comme en périphérie. De manière similaire à l'oxygène, il semblerait qu'il y ait une acidification qui se mette en place au niveau de la gouttière. Ainsi, ces résultats semblent indiquer que la présence du gradient d'oxygène s'accompagne d'un remodelage métabolique aboutissant à un gradient de pH au sein de notre puce.

## C. Caractérisation moléculaire de l'hypoxie

Dans l'objectif de réaliser une caractérisation moléculaire de l'hypoxie, et compte tenu du rôle majeur d'HIF1α dans l'adaptation des cellules tumorales à cet environnement, des immunofluorescences dirigées contre HIF1α ont été réalisées. Pour ce faire, plusieurs anticorps primaires dirigés contre cette cible ont été testés, en première intention sur des cellules de HSJD-DIPG-007 platées sur une lame à 8 chambres. Les cellules ont été préalablement incubées en station hypoxie sous 1 % d'$O_2$ ou traitées avec 200 µM de Chlorure de cobalt ($CoCl_2$) pendant 24 heures. Cependant, aucune des conditions testées ne permettait d'obtenir des résultats satisfaisants en termes de différentielle d'intensité de fluorescence entre la condition normoxique et les conditions hypoxiques ou pseudo-hypoxiques (cellules traitées avec le $CoCl_2$). Ainsi, un western blot a été réalisé en cinétique

après avoir incubé les cellules en station hypoxie (1 % $O_2$) à différents temps, sans toutefois permettre de mettre en évidence, de façon reproductible, un diférentiel satisfaisant entre la condition hypoxique et la condition normoxique.

De surcroît, des immunofluorescences dirigées contre GLUT1, gène cible d'HIF1α surexprimé au sein d'un environnement hypoxique, ont été réalisées. Néanmoins, aucune différence n'était observée entre les conditions normoxique, hypoxique ou pseudo-hypoxique.

Ces difficultés techniques ont pu être compensées par la réalisation d'un RNA sequencing sur la périphérie versus le centre de la matrice.

# V. Etude du transcriptome

Afin de caractériser les différentes populations cellulaires au sein de la TSP, un RNA-sequencing a été réalisé. En ce sens, des matrices ont été ensemencées à raison de 10 000 cellules/µL avec des HSJD-DIPG-007 ou des HSJD-DIPG-012. Ces dernières ont été découpées à l'aide d'un scalpel 24 heures après l'ensemencement pour procéder à l'extraction des ARN (Figure 24.A).

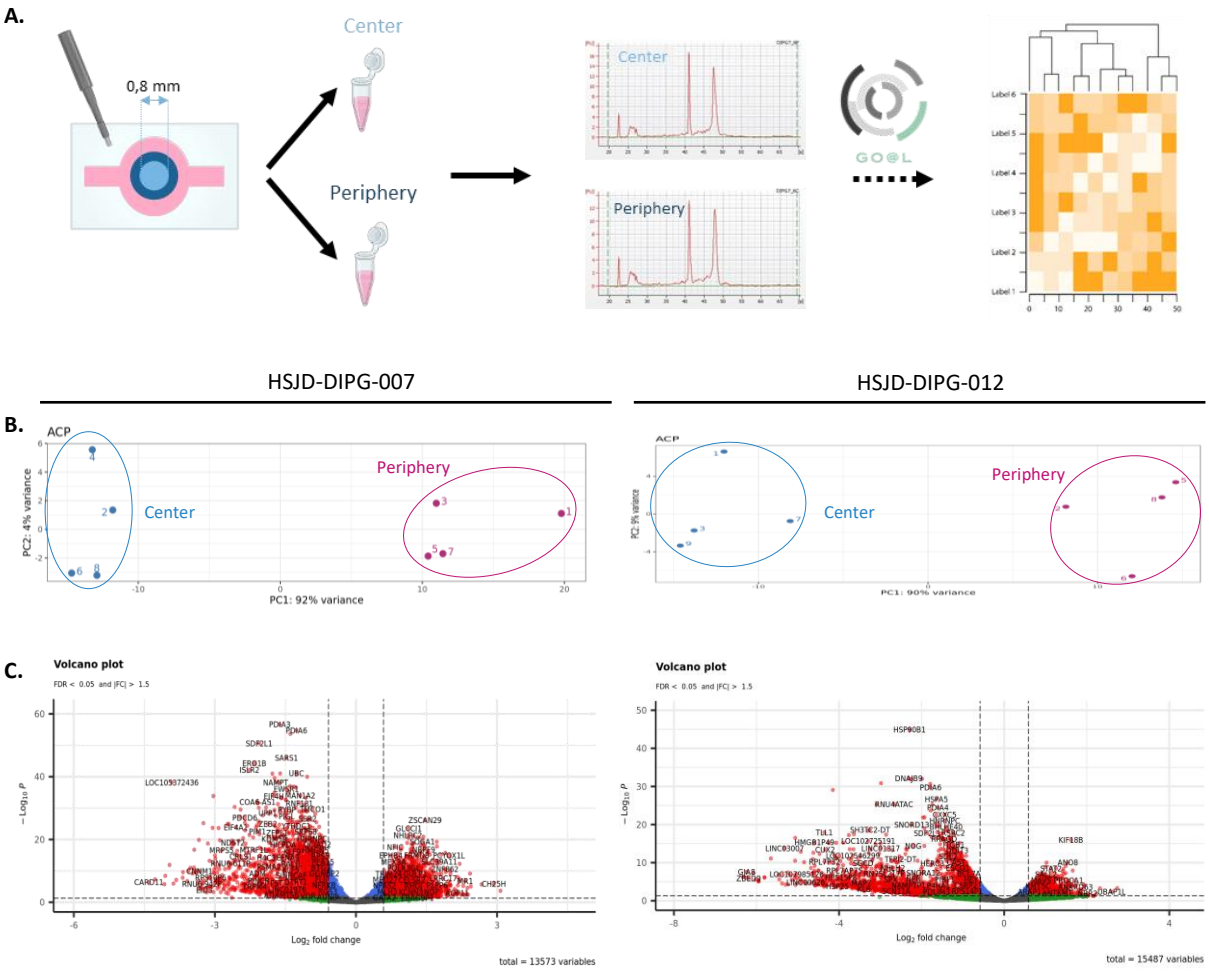



**Figure 24 : Analyse transcriptomique du centre et de la périphérie de la TSP.**
**A**. Représentation schématique de l'expérience. En premier lieu, les TSP sont réalisées à raison de 10 000 cellules/µL avec des cellules HSJD-DIPG-007 ou HSJD-DIPG-012. Après 24h, un punch de 0,8 cm est utilisé pour isoler la périphérie et le centre de la matrice. Une extraction au trizol des ARN issus de chaque zone est ensuite réalisée suivie d'un contrôle qualité des ARN avant d'être envoyés à la plateforme Go@L pour analyse RNAseq. **B**. Analyse en composante principale des échantillons pour les HSJD-DIPG-007 et HSJD-DIPG-012 avec en bleu le centre et en violet la périphérie de la matrice. **C**. VolcanoPlots représentant le nombre de gènes différentiellement exprimés avec un FC >1,5. En rouge sont représentés les gènes DE, en bleu et en vert les gènes non DE statistiquement.

L'analyse en composante principale a montré une clustérisation en PC1 importante entre le centre et la périphérie avec des valeurs de 92% et 90% pour les HSJD-DIPG-007 et HSJD-DIPG-012 respectivement. Concernant la lignée HSJD-DIPG-007, 7778 gènes apparaissent différentiellement exprimés (DE) entre les deux conditions, contre 4 902 dans les HSJD-DIPG-012 (Figure 24 B et C). Ces

résultats démontrent une forte clusterisation en fonction de la localisation des cellules au sein de la puce et ce, pour les 2 lignées cellulaires. De façon surprenante, les volcanoplots mettent en lumière le fait qu'une majorité des gènes DE est surexprimée au centre de la puce comparée à la périphérie et ce, de façon d'autant plus accentuée pour la lignée HSJD-DIPG-012.

Dans un premier temps, une analyse sans *a priori* a été réalisée sur ces données de RNAseq en utilisant l'outil ShinyGO sur l'ensemble des gènes pour chacune des deux lignées avec pour objectif d'identifier les différentes signatures moléculaires associées à ces gènes DE (Figure 25). Cette analyse vise à effectuer une analyse d'enrichissement sur la liste de gènes DE dans l'optique de mettre en lumière des signatures biologiques préférentiellement représentées au sein de cette liste.

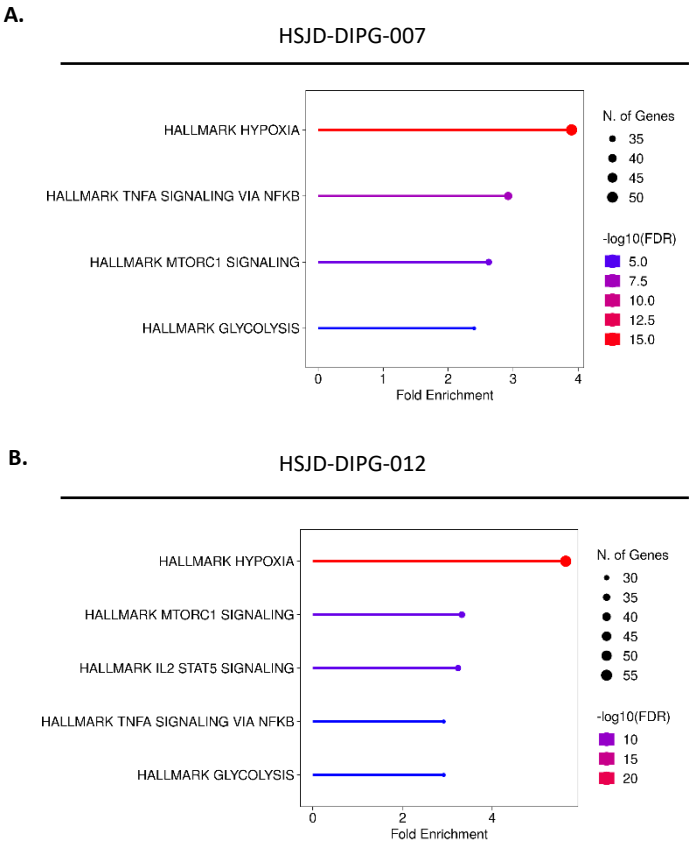



**Figure 25 : Analyse des signatures transcriptomiques pour les lignées cellulaires HSJD-DIPG-007 et -012.**
**A**. Lollipop plots des signatures transcriptomiques obtenus après analyse avec le logiciel ShinyGO sur l'ensemble des gènes DE avec un logFC ≥ 2 avec la lignée HSJD-DIPG-007. **B**. Lollipop plots des signatures transcriptomiques obtenus après analyse avec le logiciel ShinyGO sur l'ensemble des gènes DE avec un FC ≥ 2 avec la lignée HSJD-DIPG-012.

De façon intéressante, et en accord avec les mesures du taux d'oxygène dans la puce, cette analyse d'enrichissements sur l'ensemble des gènes DE a révélé, en premier lieu, une signature relative à l'hypoxie marquée, et ce, pour les deux lignées cellulaires étudiées (Figure 25).

Par ailleurs, un certain nombre de similitudes entre les deux lignées est présent, avec notamment un enrichissement pointant les voies mTORC1, NFκB décrites comme impliquées dans la tumorigenèse, la prolifération et la motilité cellulaire des GBM (Jhanwar-Uniyal et al., 2022; Soubannier and Stifani, 2017), ainsi que la glycolyse.

Dans l'objectif d'approfondir nos résultats, une étude ciblée de certains enrichissements avec le logiciel GSEA (G*enes set enrichement analysis*) a été réalisée pour les deux lignées cellulaires étudiées.

## A. Etude de la signature hypoxique

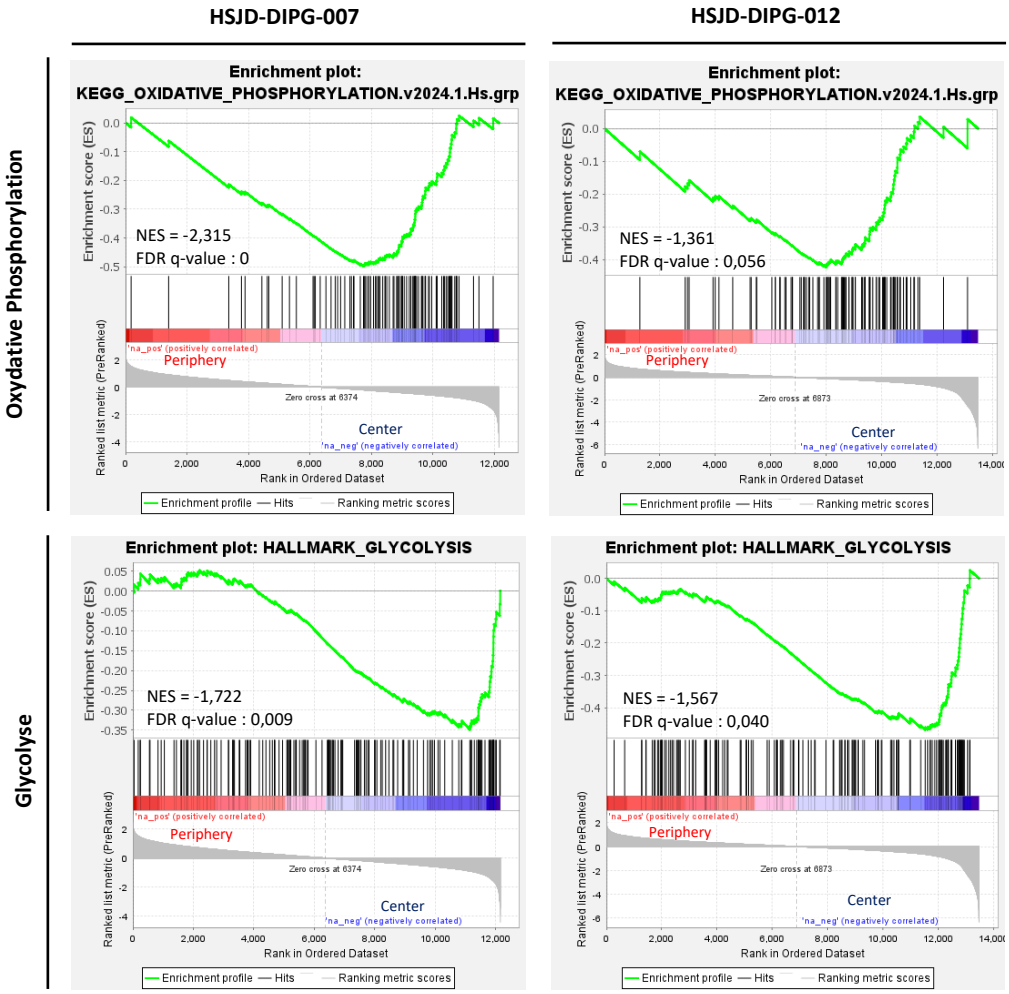
La caractérisation moléculaire de l'hypoxie *via* la détection d'HIF1α dans la puce n'ayant pas abouti et compte tenu de la signature hypoxique révélée par l'analyse ShinyGO, nous avons complété celle-ci par une analyse ciblée en GSEA (Figure article 4). Celle-ci conforte les résultats précédemment obtenus et permet de mettre en évidence que les gènes DE correspondant à une signature hypoxique sont majoritairement exprimés dans le centre de la puce et ce, pour les deux lignées cellulaires testées.

Parmi ces gènes, il est important de noter que plus d'une trentaine de gènes sont communs entre les 2 lignées cellulaires parmi lesquels : le *VEGFA* (vascular endothelial growth factor A) qui est un gène codant pour un facteur de croissance, VEGFA, un régulateur clef dans l'angiogenèse (Rehn et al., 2011). Mais aussi, le gène *PDK1* (pyruvate déshydrogénase kinase 1) qui code pour la PDK1, kinase inhibitrice de la pyruvate déshydrogénase. Cette kinase est impliquée dans la régulation de l'oxidation du glucose en bloquant l'entrée du pyruvate dans le cycle des acides tricarboxyliques (Velpula and Tsung, 2014). Et également, *HK2* (hexokinase 2)qui est un gène codant une enzyme HK2 phosphorylant le glucose pour produire du glucose-6-phosphate, étape importante dans le métabolisme du glucose (DeWaal et al., 2018).

Ainsi, l'analyse moléculaire du gradient d'oxygène au sein de la TSP corrobore les résultats obtenus avec les analyses physiques et indique que les **cellules au sein de la TSP perçoivent ce gradient d'hypoxie et sont à même d'adapter leur programme transcriptionnel à cet environnement.**

## B. Etude de la signature métabolique

Eu égard à cette signature glycolytique révélée par l'analyse ShinyGO, des analyses d'enrichissements orientées sur le métabolisme ont été effectuées avec le logiciel GSEA (Figure 26).




**<u>Figure 26</u> : Analyse des signatures métaboliques.**
L'analyse a été réalisée avec le logiciel GSEA pour les lignées HSJD-DIPG-007/ -012 sur différentes signatures métaboliques à partir de l'ensemble des gènes pour chacune des deux lignées.

Dans un contexte hypoxique, les cellules adaptent leur programme transcriptionnel induisant de profonds changements métaboliques. Parmi les remaniements les plus remarquables, les cellules hypoxiques opèrent un switch de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse anaérobie pour leur production d'énergie. Pour les deux lignées cellulaires étudiées, il y aurait une tendance à ce que la glycolyse soit enrichie au centre de la puce. Il est donc particulièrement surprenant de constater, dans cette analyse GSEA, que la phosphorylation oxydative tend à être enrichie au centre de la puce par rapport à la périphérie, et ce, de façon encore plus marquée pour la lignée des HSJD-DIPG-007.

## C. Analyse en GSEA de la voie de l'UPR

Cette différence concernant l'enrichissement au centre de la TSP de la phosphorylation oxydative pourrait être expliquée par la formation de super complexes respiratoires mitochondriaux en réponse à la voie UPR induisant une activation de la phosphorylation oxydative (Balsa et al., 2019). L'activation de cette voie UPR (unfolded protein response) fait suite à un stress au niveau du RE (réticulum endoplasmique) en raison de l'accumulation de protéines ayant une mauvaise conformation. Ainsi, cette voie est majoritairement activée dans un environnement contraignant pour les cellules, par exemple, une faible teneur en oxygène et une privation de nutriments (Wouters and Koritzinsky, 2008). Au sein des gliomes, cette voie a été démontrée comme étant impliquée dans la progression tumorale et également dans la régulation des cellules souches du GBM (Peñaranda Fajardo et al., 2016; Peñaranda-Fajardo et al., 2019). Ainsi, pour interroger cette hypothèse, une étude d'enrichissement dirigée contre la voie UPR a été faite (Figure 27).

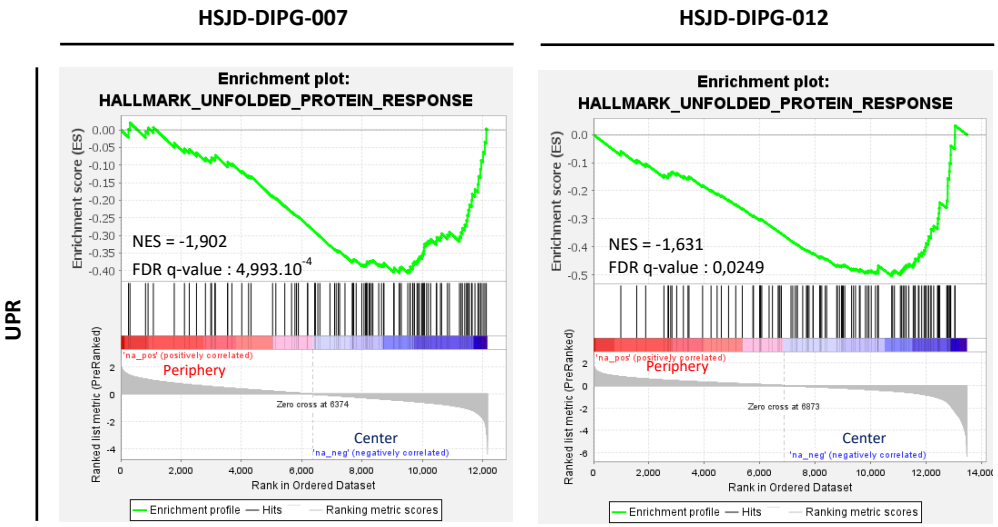



**Figure 27 : Analyse d'enrichissements de la voie UPR.**
L'analyse a été réalisée avec le logiciel GSEA pour les lignées HSJD-DIPG-007/ -012 à partir de l'ensemble des gènes pour chacune des deux lignées.

De façon intéressante, la voie UPR s'est avérée être enrichie au centre de la TSP pour les deux lignées cellulaires. Ainsi, l'activation de cette voie UPR serait possiblement en lien avec un appauvrissement en nutriments au centre de la puce causé par sa géométrie. L'enrichissement de la phosphorylation oxydative au centre de la matrice pour la lignée HSJD-DIPG-007 pourrait être expliqué par la formation de super complexes mitochondriaux faisant suite à l'activation de la voie de l'UPR.

## D. Etude de la signature apoptotique

Compte tenu des résultats précédemment obtenus avec l'analyse en GSEA montrant un enrichissement de la voie UPR au centre de la puce et également de la différence de morphologie cellulaire observée entre le centre et la périphérie, il apparaissait important de questionner l'apoptose. Pour ce faire, l'outil GSEA a de nouveau été utilisé pour étudier la présence d'enrichissements en gènes liés à l'apoptose au sein de la puce (Figure 28).

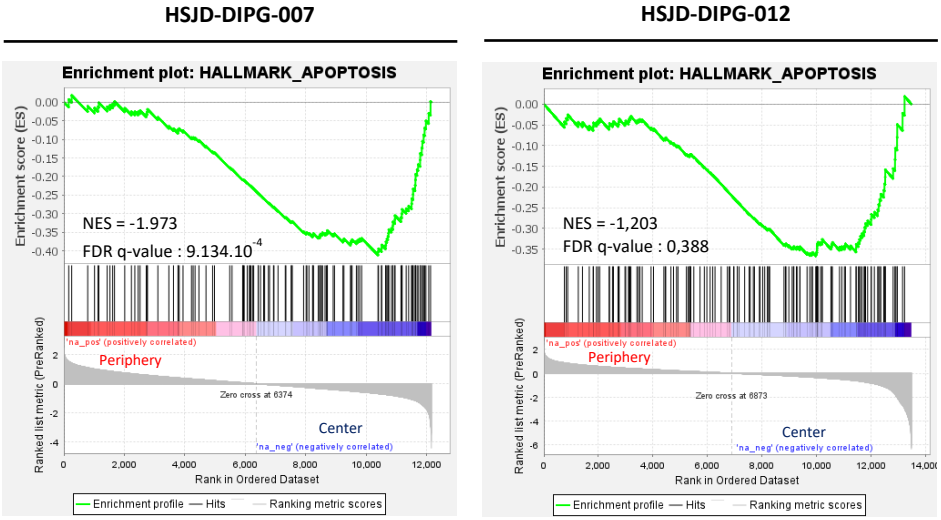



**Figure 28 : Analyse de la signature apoptotique.**
L'analyse a été réalisée avec le logiciel GSEA pour les lignées HSJD-DIPG-007/ -012 à partir de l'ensemble des gènes pour chacune des deux lignées.

Cette analyse par GSEA a mis en évidence une signature apoptotique plus importante au centre de la TSP qu'en périphérie, pour la lignée HSJD-DIPG-007. Ce différentiel semble cohérent, compte tenu des conditions contraignantes imposées aux cellules au centre de la puce comme le faible taux d'oxygène et le pH acide précédemment mesurés. La signature liée à l'apoptose, prépondérante au centre de la puce, fait écho avec la différence de morphologie observée entre les cellules du centre (rondes) et les cellules en périphérie (fusiformes) de la puce.

# VI. Réponse aux thérapies

## A. Mise au point de la visualisation de la mort cellulaire

Afin d'évaluer l'efficacité des différentes stratégies thérapeutiques qui seront évaluées au sein de ce modèle, nous avons testé différentes sondes permettant d'observer la mort cellulaire, idéalement en temps réel :

- Le *CellEvent Caspase,* qui est clivé en présence de caspase 3 ou 7 activée et lui permet de se fixer à l'ADN et de devenir fluorescent.
- Le *Live Or Dye*, qui est capable de pénétrer au sein des cellules ayant leur membrane plasmique compromise et de réagir avec les amines intracellulaires pour fluorescer.
- Le *Sytox Green*, le *NucSpot* et *l'iodure de propidium* qui vont également pénétrer dans les cellules ayant leur membrane plasmique compromise pour se fixer à l'ADN et fluorescer.

Afin de réaliser ces tests de validation des sondes fluorescentes, les cellules ont été cultivées en conditions adhérentes pour s'affranchir des difficultés de fluorescence non spécifique liées à la présence de la matrice, et observer plus aisément les cellules. Pour ce faire, les cellules étaient dans le milieu TSM non supplémenté en facteurs de croissance et complété avec 10 % de sérum de veau fœtal. Ces tests ont été effectués avec les cellules HSJD-DIPG-007 et en les traitant avec 500 nM de staurosporine (STS) pour avoir un contrôle positif à la mort cellulaire puisque la STS permet d'induire l'apoptose grâce à l'activation de la caspase 3.

Le Live or Dye et le NucSpot n'ont toutefois pas permis d'obtenir de fluorescence même dans la condition STS. Le SYTOX Green, ainsi que le CellEvent Caspase, permettaient de mettre en évidence des cellules mortes. Cependant, ces 2 marqueurs ne permettaient pas d'obtenir des résultats reproductibles. Nous nous sommes donc orientés vers l'utilisation de l'iodure de propidium ayant démontré sa robustesse, notamment en cytométrie en flux.

L'IP est un agent intercalant des acides nucléiques, pénétrant uniquement au sein des cellules ayant une membrane plasmique compromise. Cette sonde a été évaluée sur des matrices ensemencées avec des HSJD-DIPG-007 à 10 000 cellules/µL, traitées ou non avec 0,5 µM de staurosporine pendant 48 heures avec un renouvellement du milieu et de la STS à 24 heures. Les matrices ont par la suite été démontées pour être marquées pendant 30 minutes à 37°C avec de l'IP et au Hoechst (Figure 29).

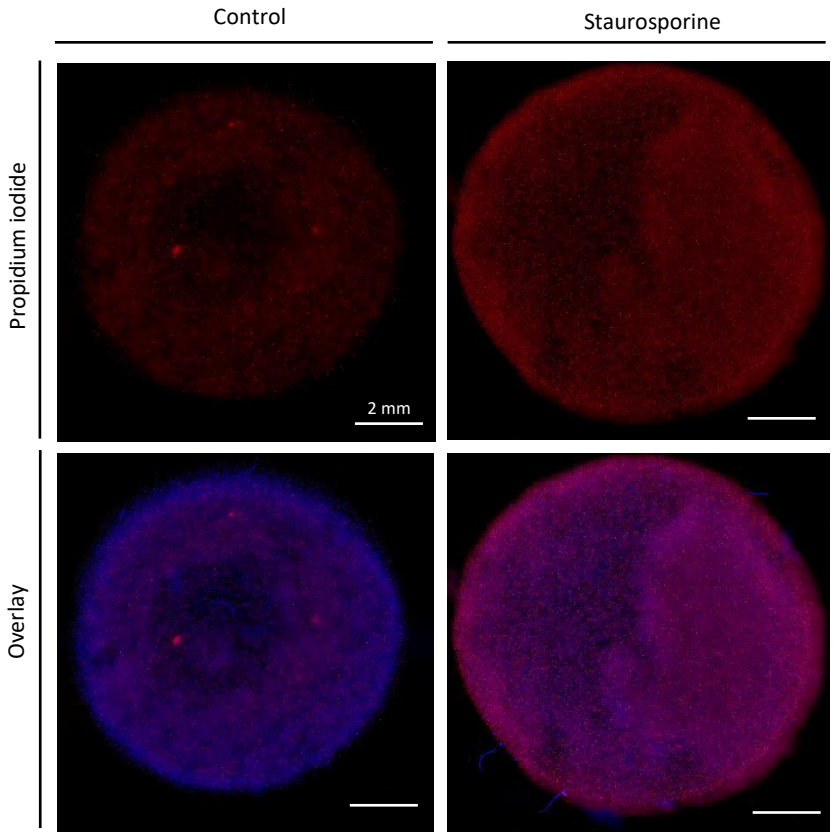



**Figure 29 : Visualisation de la mort cellulaire avec de l'iodure de propidium.**
Les TSP ont été réalisées avec des HSJD-DIPG-007 ensemencées à raison de 10 000 cellules/µL. Ces dernières ont été traitées avec 0,5 µM de staurosporine (STS) pendant 48 heures. Par la suite, les TSP ont été démontées et marquées avec l'IP au 1/100$^{ème}$ et au Hoechst au 1/1000$^{ème}$ et visualisées au Keyence BZ-X800 avec un objectif 10X.

De manière intéressante, le marquage à l'IP a permis d'observer de manière adéquate et reproductible la mort des cellules dans les matrices, avec un différentiel notable en termes d'intensité de fluorescence entre la condition traitée avec la STS, et la condition non traitée. De ce fait, cette sonde a été utilisée pour évaluer la réponse des cellules de DMG à différents composés.

En concomitance avec ces mises au point de read-out, des essais de biosenseurs visant à suivre l'activité de la caspase 3 en temps réel ont été menés. Pour ce faire, les cellules de HSJD-DIPG-007 ont été infectées par un lentivirus commercial codant pour le biosenseur pCDH-puro-CMV-VC3AI (Addgene 78907). Cependant, ces tests se sont avérés infructueux, ne permettant pas de mettre en avant les cellules mortes. Ainsi, des mises au point supplémentaires seront encore nécessaires en vue d'utiliser ces biosenseurs au sein de la TSP.

## B. Evaluation de la réponse des cellules des DMG aux thérapies

En préambule de l'évaluation de la réponse des cellules de DMG aux thérapies, des tests de diffusion ont été effectués avec un FITC- Dextran à 4 kDa et de la doxorubicine pour leurs propriétés fluorescentes. Ces tests sur les TSP ont montré que le temps de diffusion pour que ces composés atteignent le centre est compris entre 4 et 6 heures (Figure article 6).

### 1. Réponse des cellules de DMG à la radiothérapie

La radiothérapie étant le traitement de référence des DMG, nous avons évalué l'efficacité d'une irradiation monodose au sein de la TSP. Pour ce faire, des TSP ont été ensemencées avec les deux lignées cellulaires HSJD-DIPG-007 et -012 à raison de 10 000 cellules/µL. Vingt-quatre heures post-ensemencement les puces ont été irradiées à 0, 2 ou 4 Gy. Après 48 heures, la viabilité des cellules a été évaluée par marquage à l'IP et Hoechst suivie d'une segmentation permettant le calcul d'un pourcentage de mort cellulaire en fonction de la distance au centre de la puce (Figure article 8).

De façon intéressante, des différences importantes apparaissent dans la réponse des cellules à la radiothérapie entre les deux lignées.

- Concernant le niveau basal de marquage à l'IP (à 0 Gy), dans les puces HSJD-DIPG-007, la mortalité des cellules est globalement plus importante qu'au sein des puces HSJD-DIPG-012. Pour les puces HSJD-DIPG-007, au centre, le taux de mortalité est d'approximativement 35 % et entre 20 et 30 % en périphérie contre 20 % de mortalité au centre et entre 10 et 15 % en périphérie pour les puces HSJD-DIPG-012.
- Du point de vue de la réponse à l'irradiation, les cellules HSJD-DIPG-007 montrent une réponse, en termes de mort cellulaire, dose dépendante, à l'inverse des HSJD-DIPG-012 qui présentent un marquage IP équivalent quelles que soient les conditions.
- Dans les conditions irradiées, d'un point de vue spatial, il apparaît, dans les puces HSJD-DIPG-007, un marquage IP périphérique plus important qu'au centre. Pour les puces HSJD-DIPG-012 compte tenu de l'absence de réponses à l'irradiation, ce différentiel centre vs. périphérie suit la condition contrôle (0 Gy).

Ensemble, ces résultats semblent indiquer qu'une radiorésistance se met en place au centre des puces HSJD-DIPG-007 en raison d'un pourcentage de mort cellulaire plus important en périphérie qu'au centre de la matrice. De plus, les puces HSJD-DIPG-012 ne semblent pas répondre aux irradiations. Cette différence entre les deux lignées pourrait être justifiée par le profil mutationnel des

deux lignées, puisque les cellules HSJD-DIPG-012 ont une mutation sur le gène *TP53* que les HSJD-DIPG-007 ne possèdent pas.

## 2. Réponse des cellules de DMG aux imipridones

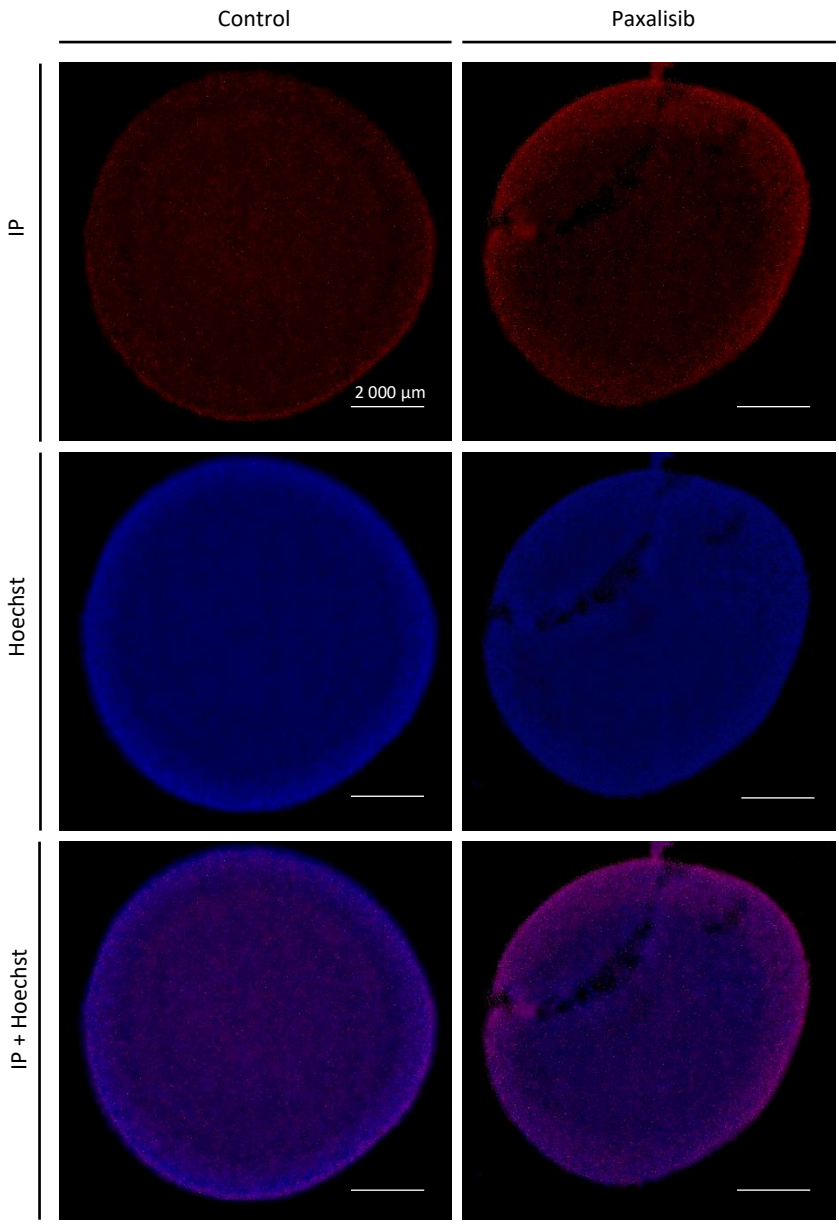
En clinique, les imipridones se sont révélées être, à ce jour, les seules thérapies ayant permis d'augmenter la survie des patients. A ce titre, l'ONC201 a été testé au sein de notre TSP, dans un premier temps, sur des cellules HSJD-DIPG-007 ensemencées à raison de 10 000 cellules/µL, et ce, afin de déterminer si le gradient d'hypoxie influence la réponse des cellules à cette molécule. Pour ce faire, l'ONC201 a été utilisé à 1 et 10 µM pendant 48 heures avec un renouvellement du milieu ainsi que de la molécule à 24 heures.

Après ce traitement, les cellules ont été marquées à l'IP et au Hoechst et les puces ont été acquises au microscope à fluorescence afin de calculer un pourcentage de mort cellulaire, au centre et en périphérie (Figure article 7). Cette analyse nous permet de conclure quant à un effet significatif de l'ONC201 à 10 µM.

## 3. Evaluation préliminaire de la réponse des cellules de DMG au paxalisib

Le paxalisib, inhibiteur de la voie PI3K/ mTOR a montré des résultats prometteurs dans le cadre de son utilisation seul comme en combinaison avec l'ONC201 (Duchatel et al., 2024; Jackson et al., 2023). A ce titre, j'ai testé le paxalisib à raison de 2 µM dans des puces HSJD-DIPG-007 ensemencées à raison de 10 000 cellules/µL. Un renouvellement du milieu ainsi que la molécule était effectué à 24 heures. Comme précédemment, les cellules étaient marquées à l'IP et au Hoechst et les images acquises au microscope pour calculer le pourcentage de mort cellulaire au sein de différentes zones de la puce (Figure 30).

**A.**


Control
Paxalisib
IP
Hoechst
IP + Hoechst
2 000 µm

**B.**

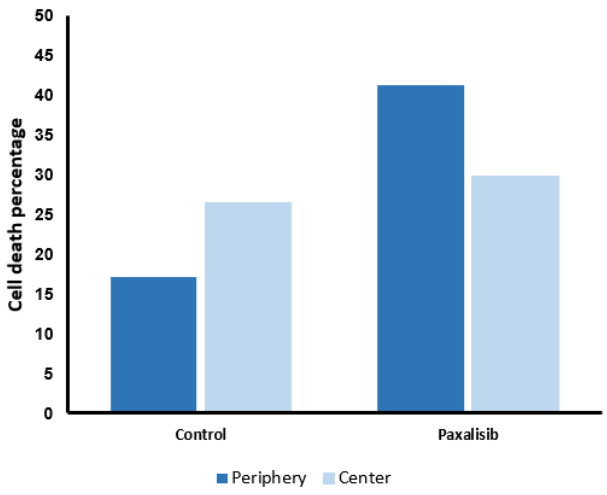

Cell death percentage
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Control
Paxalisib
Periphery
Center

**Figure 30 : Evaluation préliminaire de la réponse des DMG au paxalisib.**
Les TSP ont été réalisées avec les cellules HSJD-DIPG-007 ensemencées à raison de 10 000 cellules/µL. Les cellules ont été traitées avec 2 µM de paxalisib. Les marquages au Hoechst et à l'IP ont été réalisés 48 heures post-ensemencement (N=2). **A.** Images réalisées au Keyence BZ-X800 des différentes matrices avec en bleu, un marquage au Hoechst et en rouge, un marquage IP. **B.** Histogramme représentant la quantification de la mort cellulaire au sein des différentes conditions. Cette quantification a été réalisée avec le logiciel Fiji avec la fonction Analyze Particle en réalisant un pourcentage du nombre de cellules $IP^+$ par rapport au nombre de noyaux.

Ces analyses préliminaires réalisées avec le paxalisib tendent à montrer que la molécule induit environ 40 % de mort cellulaire en périphérie à 48 heures contre 30 % au centre, et ce, alors qu'initialement, nous mesurions davantage de cellules mortes au centre (26 %) qu'en périphérie (17 %).

Ainsi, il semblerait que le paxalisib soit en mesure d'induire préférentiellement la mort des cellules en périphérie. L'une des hypothèses pour expliquer cette différence entre le centre et la périphérie pourrait être la présence de l'hypoxie au centre de la puce, qui rendrait les cellules résistantes à ce traitement.

# VII. Implémentation de tumoroïdes issus de patients

## A. Visualisation de la morphologie cellulaire

L'un des objectifs de ce nouveau modèle d'étude pré-clinique étant de se rapprocher au mieux de la réalité des DMG, un prélèvement de patient a été ensemencé au sein de la TSP. Ce dernier a été obtenu à la suite d'une biopsie diagnostic réalisée au CHU de Lille. Ce prélèvement, ainsi naïf de tout traitement, était issu d'une fille âgée de 3 ans et a été dénommé UTRT-DMG-001. D'un point de vue moléculaire, ce prélèvement est muté au niveau du gène *HIST1H3B* codant pour l'histone H3.1 et comporte une mutation *ACVR1*.

Ce prélèvement a donc été utilisé pour réaliser des TSP et en première intention, la morphologie des cellules a été observée au microscope au cours du temps. A l'inverse des puces réalisées avec les lignées cellulaires, ces TSP faites avec les tumoroïdes UTRT-DMG-001 ne présentent pas de différence de morphologie cellulaire entre le centre et la périphérie de la puce (Figure article 9). Ces cellules ont une morphologie fusiforme, semblable à celle observée en périphérie de la puce chez les cellules issues de lignées cellulaires.

Suite à cette observation, nous avons investigué la consommation en oxygène par les cellules en utilisant la même technologie que précédemment, basée sur un feuillet sensible au taux d'oxygène.

## B. Mesure du taux d'oxygène

Comme précédemment, un feuillet sensible au taux d'oxygène a été utilisé. En ce sens, des TSP ont été ensemencées avec 5 000 cellules UTRT-DMG-001/µL et placées au sein de la chambre d'incubation du Keyence pour permettre le suivi au cours du temps du taux d'oxygène (Figure article 9).

Grâce à cette expérience, nous avons pu montrer que, comme avec les lignées cellulaires, un gradient d'oxygène radial s'instaure avec ce modèle tumoroïde. Toutefois, il est intéressant de noter que les cellules composant ce tumoroïde semblent consommer plus d'oxygène que les lignées cellulaires testées, puisque le taux d'oxygène au centre de cette TSP, 0 % à 48 heures, est inférieur à celui des puces réalisées avec les cellules HSJD-DIPG-007 et -012, 4 % à 48 heures, traduisant une hypoxie plus sévère. Ce gradient semble néanmoins s'instaurer plus lentement en comparaison avec les lignées cellulaires, suggérant une consommation en oxygène moins rapide, mais *in fine* plus prononcée.

## C. Etude de la réponse des tumoroïdes à la radiothérapie

La radiothérapie demeurant le traitement de référence des DMG, il nous est apparu intéressant de tester cette thérapie avec les tumoroïdes au sein de notre modèle d'étude pré-clinique. A ce titre, des puces ont été ensemencées à raison de 5 000 cellules/µL issues du prélèvement UTRT-DMG-001 et irradiées à 0, 2 ou 4 Gy 24 heures après ensemencement. Quarante-huit heures post-irradiation, les puces ont été démontées et marquées à l'IP et au Hoechst. Les puces ont ensuite été imagées au Confocal LSM980 avec un objectif 10X. Ceci a permis de réaliser une segmentation des noyaux avec le logiciel Fiji et ainsi, de dénombrer les cellules mortes afin de déterminer le pourcentage de mortalité en fonction de la distance au centre (Figure article 9).

Les résultats obtenus mettent en avant une absence de réponse de ce prélèvement aux radiations ionisantes. En effet, au niveau du pourcentage de mort cellulaire, aucune différence significative notable est observée entre la condition 0 Gy et les conditions 2 ou 4 Gy. Par ailleurs, il n'y a aucune différence entre la périphérie et le centre de la puce, et ce, même au sein de la condition contrôle 0 Gy, en accord avec les observations morphologiques des cellules.

**L'ensemble de ces résultats sont présentés de manière exhaustive, et complété d'un modèle de modélisation mathématiques de notre tumeur-sur-puce réalisé par le Dr. Antony BAZIR, dans l'article ci-après intitulé « A novel DMG-on-Chip recapitulating tumour biophysical microenvironment unravels the heterogeneity of response to therapies ».**

# A novel DMG-on-Chip recapitulating tumour biophysical microenvironment unravels the heterogeneity of response to therapies

Lisa Terrassoux[1,2,*], Calypso Hazard[1,2,*], Agathe Laratte[1,2], Joanne Balsamelli[1,2], Mélanie Arcicasa[1,2], Elisa Fong[1,2], Léo Baland[1,2], Fabrice Soncin[3,4], Giovanni Capello[5], Claude-Alain Maurage[6], Antony Bazir[7], Fabrizio Cleri[7], Anthony Treizebre[7], Eric Lartigau[8], Yousr Rekik[1,2,$], Samuel Meignan[1,2,**,$] and Alessandro Furlan[1,2,**,$]

* These authors contributed equally to this work

** Shared last authors

§ Correspondence to: yousr.rekik@inserm.fr ; s-meignan@o-lambret.fr ; alessandro.furlan@univ-lille.fr

Running title: A new DoC to decipher resistance to therapies

Affiliations
1. Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277-CANTHER-Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France
2. Tumorigenesis and Resistance to Treatment Unit, Centre Oscar Lambret, F-59000 Lille, France
3. CNRS/IIS/Centre Oscar Lambret/Lille University SMMiL-E Project, CNRS Délégation Hauts-de-France, 43 Avenue le Corbusier, 59800 Lille, France
4. CNRS, IRL2820, Laboratory for Integrated Micro Mechatronic Systems, Institute of Industrial Science, University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8505, Japan
5. Laboratory of Interdisciplinary Physics (LIPhy), University Grenoble Alpes, CNRS, F-38000, Grenoble, France
6. Institut de Pathologie, CHU Lille, 59000, Lille, France
7. Univ. Lille, CNRS, Centrale Lille, Univ. Polytechnique Hauts-de-France, UMR 8520-IEMN-Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie, 59000 Lille, France
8. Oscar Lambret Center, Academic Radiation Oncology Department, Lille, France

Keywords: DMG, microenvironment, tumour-on-chip, hypoxia, resistance, therapy

## *Abstract*

Despite considerable efforts in translational research over the last decades, Diffuse Midline Gliomas (DMGs) remain to date an incurable disease. Although promising results were obtained in preclinical studies, most pharmacological approaches failed to improve the survival of young patients.

In that frame, by integrating key elements of the biophysical tumour microenvironment known to regulate the response to therapies, we aimed to develop a new pre-clinical device to better predict antitumoral strategies' efficacy. For that purpose, we designed a novel DMG-on-Chip (DoC), composed of a 3D dense tumour disk embedded in extracellular matrix, accessible to real-time monitoring by wide-field phase contrast or confocal fluorescence microscopy. Through a geometry driving oxygen supply solely in a radial manner, we achieved the establishment of a hypoxia gradient within the chip, that we could correlate to changes in DMG cell phenotypes and proliferation capacities. We characterised the cell transcriptomic landscape and evidenced a rewiring of metabolic and stress responses in this microenvironment. Since hypoxia can modulate response to therapies, we finally took profit of this DoC to analyse through cell segmentation the spatial heterogeneity of response of DMG cell lines and patient-derived 3D cultures to treatments.

Altogether, our data validate this new device as an interesting tool to assess the efficacy of novel strategies to tackle DMG and to identify niches of resistant cells associated with biophysical or biochemical cues in the tumour microenvironment.

## *Introduction*

Drug attrition rates in the field of oncology are much higher than in other medical disciplines, with a vast majority of compounds demonstrating promising efficacy in pre-clinical tests that subsequently fail to increase the patient prognosis in clinical trials. This dismal situation is particularly dramatic for aggressive tumours with poor prognosis. Among this category, Diffuse Midline Gliomas (DMG) are pediatric brain tumours for which radiotherapy, although only palliative, has remained the standard of care for over 50 years.

Unsuccess in curing DMG was long attributed to poor knowledge of their molecular features, and to the translation of strategies aimed at treating adult brain tumours, although they share distinct characteristics from these latter [1]. In this context, the rise of molecular diagnosis and the identification of driver mutations affecting histone genes in DMG [2,3] led to a great hope to finally find efficient cures against these tumours. Especially, since these mutations drive an epigenetic reshaping [4], epidrugs represented promising tools to target them, and HDAC (Histone deacetylase) or demethylase inhibitors, such as panobinostat or GSK-J4 respectively, actually demonstrated significant efficacy in pre-clinical studies [5,6]. Unfortunately, such compounds have failed to improve patient survival in clinics so far [7].

This reflects the lack of pertinent preclinical models reproducing some biophysical features that control tumour cell responses to therapies. In that frame, we chose to create a tumour-on-chip model of DMG that integrated two key elements of the tumour microenvironment known to regulate the response to therapies: hypoxia and the presence of an extracellular matrix carrying survival signals.

Actually, hypoxia was associated with radioresistance and chemoresistance in various solid tumours [8,9]. Concerning DMG, magnetic resonance imaging and spectroscopy revealed the hypoperfusion of tumours, correlated with an increased citrate concentration as a marker of hypoxia [10]. Consistently, hypoxic conditions were shown to be necessary to better recapitulate in cell culture the metabolic traits observed in a cohort of DMG patients [11]. A deeper analysis of DMG cell metabolism further revealed a rewiring driven by H3K27M mutation, leading to elevated concentrations of the oncometabolite alpha-ketoglutarate, essential to maintain H3K27M hypomethylation, and offering therapeutic opportunities [12]. In the same vein, the imipridone compound ONC201, which disrupts integrated metabolic and epigenetic pathways, revealed a promising efficacy against DMG [13]. Although restricted to a subset of patients, it was the first drug to provide a clinical benefit for DMG patients in terms of survival [14].

A second element that we considered paramount to integrate into our device to properly assess the therapy sensitivity was the perception of extracellular matrix (ECM) components by cells, which is able to trigger intracellular signalling promoting survival and migration [15]. Moreover, the matrix stiffness additionally triggers mechanotransduction signals, which may modulate the malignant phenotype [16]. In the field of neuro-oncology, reshaping of the brain parenchyma ECM was described in brain tumours, with a notable enrichment in hyaluronic acid (HA) [17]. Interestingly, HA in conjunction with hypoxia can increase the proportion of stem-like cells in glioblastoma patient-derived cells cultured in hydrogels [18]. Besides, laminin was shown to be produced by healthy brain tissue in response to the presence of glioma cells [19]. Interestingly, gene expression analysis also revealed an increased expression of laminin and collagen IV notably in glioblastoma cells when compared to normal brain glial cells [20] and, in addition, laminin was shown to drive infiltrative behaviour of DMG cells [21]. We therefore incorporated these components in our 3D ECM gel composition to recapitulate this pathophysiological matrix scaffold at best.

Tumours-on-chips (ToC) have emerged in the last years as precious tools to unravel pathophysiological mechanisms as tumour avatars and pre-clinical tools [22,23], with microfluidics helping in reproducing dialogues between tumours and their microenvironment [24,25]. In that frame, a tumour-on-chip was used to evidence the importance of hypoxia in adult glioblastoma cell physiology [26]. Thanks to a simple and smart design, namely setting the cell disk between two glass planes, the authors generated a radial oxygen gradient and showed that they could recapitulate the global response of patients to chemotherapy and radiotherapy. In the present work, inspired by that study, we aimed to decipher the DMG response to current therapeutical strategies and increased the resolution to the cell level, thanks to multidisciplinary approaches. We first optimised the assembly of the novel DMG-on-Chip (DoC) with PDMS moulds/spacers to reach a precise thickness and allow final disassembly for staining or RNA extraction, and we used only glass coverslips. We also adjusted the matrix environment to enable cells to display their infiltrating phenotype. We then realised a cartography of oxygen gradients achieved in the DoC and showed a rapid depletion in oxygen levels over a few hundred microns from the interface between the hydrogel and the gutter supply, leading to a blockade of cell proliferation.

Consistently with a shift in metabolism, we could evidence an acidification thanks to pH-sensitive foils as well. Transcriptomic approaches then allowed a deeper insight into the global rewirings of molecular expression occurring in this hypoxic and acidified microenvironment. Finally, we took advantage of this DMG avatar to assess and correlate responses to therapies with these biophysical features, and notably, we found evidence of heterogeneous responses of patient-derived DMG cells.

## *Results*

To assess the efficacy of novel therapeutic strategies against DMG, we developed a new pre-clinical model integrating critical tenets of resistance demonstrated in solid tumours. To stick with DMG knowledge, we first focused our attention on two features, namely the high cell density that, coupled with high consumption of nutrients and oxygen, can drive the generation of nutrient-depleted and hypoxic zones, and the presence of a remodelled extracellular matrix that provides cells with survival and migration signalling cues.

**A novel DMG-on-Chip (DoC) recapitulating a densely cellularised 3D matrix.**

To recapitulate this DMG microenvironment, we designed a novel device called thereafter DoC (DMG-on-Chip), based on the embedding of a high amount of cells in a 3D ECM (extracellular matrix) gel, between two #1 glass coverslips (Fig.1A). We controlled the thickness of the ECM gel by using a PDMS mould/spacer of 750 µm defined height. HSJD-DIPG-007 cells in the hydrogel solution were thus poured as a dome at the centre of the cavity formed by the mould/spacer upon the lower coverslip, and the smooth apposition of the upper coverslip led to the perfect shaping of a regular disk. Once this cell-containing hydrogel polymerised, we smoothly filled the lateral gutter around it with culture medium by capillarity, hence ensuring a radial supply to cells within the hydrogel (Suppl. Movie 1).

Following the descriptions of brain tumour extracellular matrix composition [17,19,20], we ended up with the choice of laminin, collagen and hyaluronic acid mixed together. The first two components were provided with the Matrigel®, chosen in its growth factor-reduced version to minimise variations in growth factor composition and keep the robust cell homeostasis by the controlled cocktail present in our culture medium. The third compound, namely hyaluronan, was added in a high molecular weight version (> 950 kDa), to fit the brain tumour ECM description in the literature. In the absence of a quantitative description of ECM components in the DMG context, we ended up with an empiric mix made of 75% Matrigel® and 25% hyaluronan, giving rise to a hydrogel that could be maintained in culture for up to five days. Still, the matrix remained fragile and delicate to handle, like the brain parenchyma.

Several other compounds were also evaluated but failed to meet the requirements of an adequate 3D culture model, either because the matrix was too liquid and failed to form a *bona fide* 3D hydrogel or because cells adopted a rounded phenotype in cross-linked gels, or even because it was too opaque and not amenable to remodelling (data not shown).

Various densities of HSJD-DIPG-007 cells (1,000, 5,000 or 10,000 cells/µL) at seeding were used to determine which cell concentration would be pertinent to handle and homogenously mix within a viscous matrix, and whether this parameter would influence the capacity to get an inward depletion of oxygen and nutrients. First, we could check the ability to handle all the different cell concentrations to get a homogenous deposit. Second, after 48 hours of culture, whereas cell distribution remained relatively homogeneous with the lowest initial density of 1,000 cells/µL (Fig. S1A), an outward gradient in cell density could be observed in the configurations with higher initial seeding (5,000 and 10,000 cells/µl) (Fig.1B and Fig. S1B). In these latter conditions, we could observe a clear increase in the cell concentration in the periphery of the disk when compared to the core, consistent with our design aiming at generating a gradient of oxygen and nutrients towards the centre of the DoC. Moreover, we noticed nicely elongated cells representative of the infiltrative DMG cells in the DoC periphery, while cells progressively became more rounded as they were closer to the centre, as evidenced after F-actin cytoskeleton staining (Fig.1C). Histological sections from the hydrogel (Fig.S1C) were analysed in the anatomo-pathology department, and similarities were found in terms of nuclei morphology and distribution when compared to DMG biopsy staining. We stained nuclei in the whole DoC to get a first hint on cell density cartography, and wide-field pictures (Fig.1D) allowed us to get a radial quantification of the outward cell density gradient from the edge (considered as the « 0 µm » reference) to the centre (distant almost 4,500 µm from the edge), evidencing a divergent cell density between a periphery about 1 mm wide, and the remaining internal part (Fig.1E).

To know whether this behaviour was specifically restricted to the HSJD-DIPG-007 cell line or could be extended to other DMG cell lines, we repeated experiments with other HSJD cell lines, including

HSJD-DIPG-012 and HSJD-DIPG-013. Interestingly, while these cell lines display distinct molecular alterations and variable growth speeds, the outward cell density gradient and changes in cell phenotypes could be obtained for all of them within two days (Fig.S1D and E), indicating that it reflects a common response shared by DMG cells when faced with depletion in oxygen and/or nutrients. This marked gradient represents an interesting asset for our ultimate goals to assess DMG cell response to therapies and to correlate it with physiopathological heterogeneity.

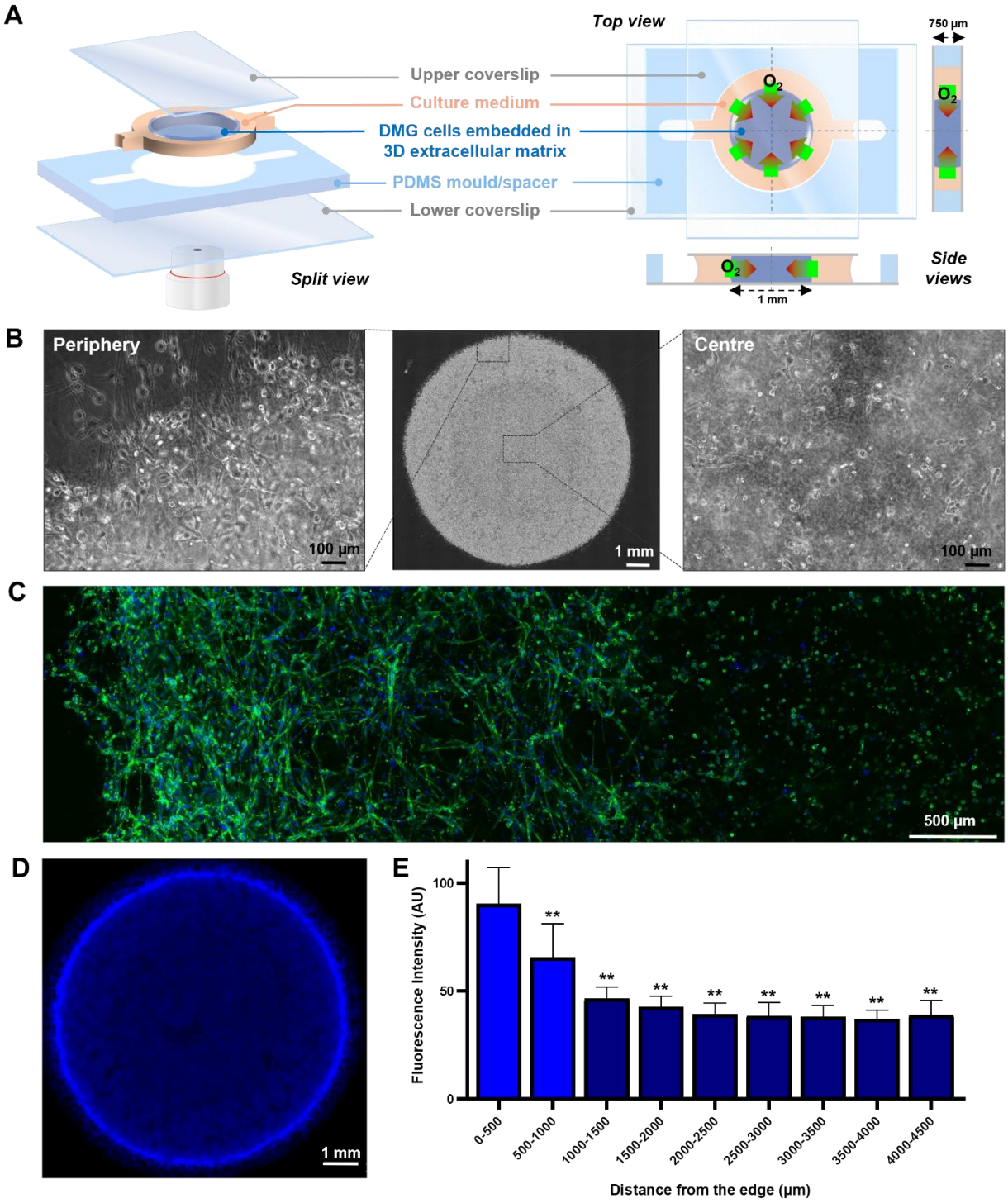



**Figure 1. Cell morphology and density analysis inside the novel DMG-on-Chip (DoC) device.**
A. Schematic representation of the DoC assembly, with a split view on the left. Top view and side views on the right illustrate how the medium ensures the radial oxygen supply in the 3D cellularized matrix. B. Phase contrast pictures of HSJD-DIPG-007 cells cultured in the DoC model 48 hours post-seeding, with magnified views of the periphery and the centre flanking the overview picture. C. Confocal microscopy picture of HSJD-DIPG-007 cells cultured in the DoC model 48 hours post-seeding, with nuclei stained in blue (Hoechst) and the actin cytoskeleton in green (phalloidin-AlexaFluor 488). D. Wide-field fluorescence picture of HSJD-DIPG-007 cells cultured in the DoC model and stained with Hoechst 48 hours post-seeding. E. Quantification of the

fluorescence intensity measurements in the DoC along its radius as a function of the distance from the edge. n=4. ANOVA with the Tukey post-comparison test was applied to evaluate the significance of comparisons with the 0-500 µm region. ** : p<0.01

.

**The DMG-on-chip configuration triggers the quick establishment of a hypoxia gradient.**

To characterize the oxygen levels at work during the DoC establishment, we evaluated whether the Presens® technology, based on a ratiometric fluorescence measurement [27], could provide a sufficient spatial resolution in determining oximetry along the DoC radius. Thanks to an oxygen-sensitive fluorescent compound encaged in the Presens® foil deposited upon the lower coverslip (Fig.2A), we could detect oxygen depletion by the increase in red fluorescence at the level of the DoC (Fig.2B). Since the green fluorophore present in the foil is insensitive to oxygen levels, we could implement a ratiometric analysis, with sodium sulfite used to calibrate the fluorescence-oxygen level relationship. In that manner, we could monitor the evolution of oxygen levels along the DoC life over time, as represented by kymographs (Fig.2C).

When either HSJD-DIPG-007 or HSJD-DIPG-012 cells were seeded at an initial concentration of 1,000 cells per µL, the whole DoC rather remained normoxic, with oxygen levels decreasing down to 16.5 % for HSJD-DIPG-007 cells, and keeping stable above 18 % for HSJD-DIPG-012 cells (Fig.S2A and B). Strikingly, when cells were seeded at 5,000 or 10,000 cells per µL, we noticed that oxygen depletion within the DoC occurred quickly during the first hours following cell seeding, as evidenced by marked slopes in the curves displaying oxygen levels as a function of distance in the chip over time (Fig.2C and D and Fig.S2C and D). We observed inward hypoxic gradients, with oxygen levels reaching respectively 4.2 % and 2.4 % at the core of the Doc seeded with 10,000 HSJD-DIPG-007 or HSJD-DIPG-012 cells per µL, within 8 hours post seeding. This probably reflects a difference in metabolism between the two cell lines that can be visualised in our system. The equilibrium in oxygen levels in the DoC remained stable over 3-day cultures, as attested by the overlap of curves generated at different time points, especially for HSJD-DIPG-012 cells.

As already mentioned, the slopes of the curves were rather pronounced, and progressing just 1,000 µm inside the hydrogel was sufficient to reach 6.6 and 4.1 % oxygen levels after 24 hours for HSJD-DIPG-007 and HSJD-DIPG-012 cells, respectively. Interestingly, oxygen depletion was also observed in the near vicinity outside the cell-loaded hydrogel. This means that in this system, the oxygen consumption rate exceeds the diffusion achieved in the medium.

About the spatial resolution of our measurements, we used a 10X objective yielding a pixel size of 4 µm, and spatiotemporal measurements were smooth, indicating that a potential heterogeneity did not hinder the cartography accuracy in the foil.

Cells facing hypoxia usually adapt their metabolism towards the glycolytic pathway notably, which contributes to the acidification observed in the microenvironment of many solid tumours. To determine whether this was recapitulated in the DoC, we took profit from Presens® sensor foils dedicated to pH measurements [28]. In this case, the green fluorescence decreases with the pH, while the fluorophore in the red channel is insensitive to pH changes (Fig.2E), again allowing a ratiometric measurement. Of note, the fluorescent foil used showed some granular heterogeneity, generating some noise in the measurements. Still, following the calibration of this sensor foil (Fig.S3A and B) with a sigmoid fit, we could evidence that the DoC got progressively acidified along the culture, with a relative decrease of one pH unit at the DoC centre (Fig.2F), thus confirming our initial hypothesis. Moreover, we could observe a progressive decay in pH from the DoC periphery (pH = 7.5) to its centre (pH = 7.2). This decrease in pH may seem minimal at first sight. Still, one must keep in mind that the pH scale is logarithmic and that the medium contains two pH buffering agents (bicarbonate and HEPES), which probably undervalues the extent of acidification. In addition, even the culture medium surrounding the hydrogel got acidified, reflecting the fact that proton production and fast diffusion exceeded the buffering capacity of the medium in the gutter as well, yielding some spatial homogenisation of pH.

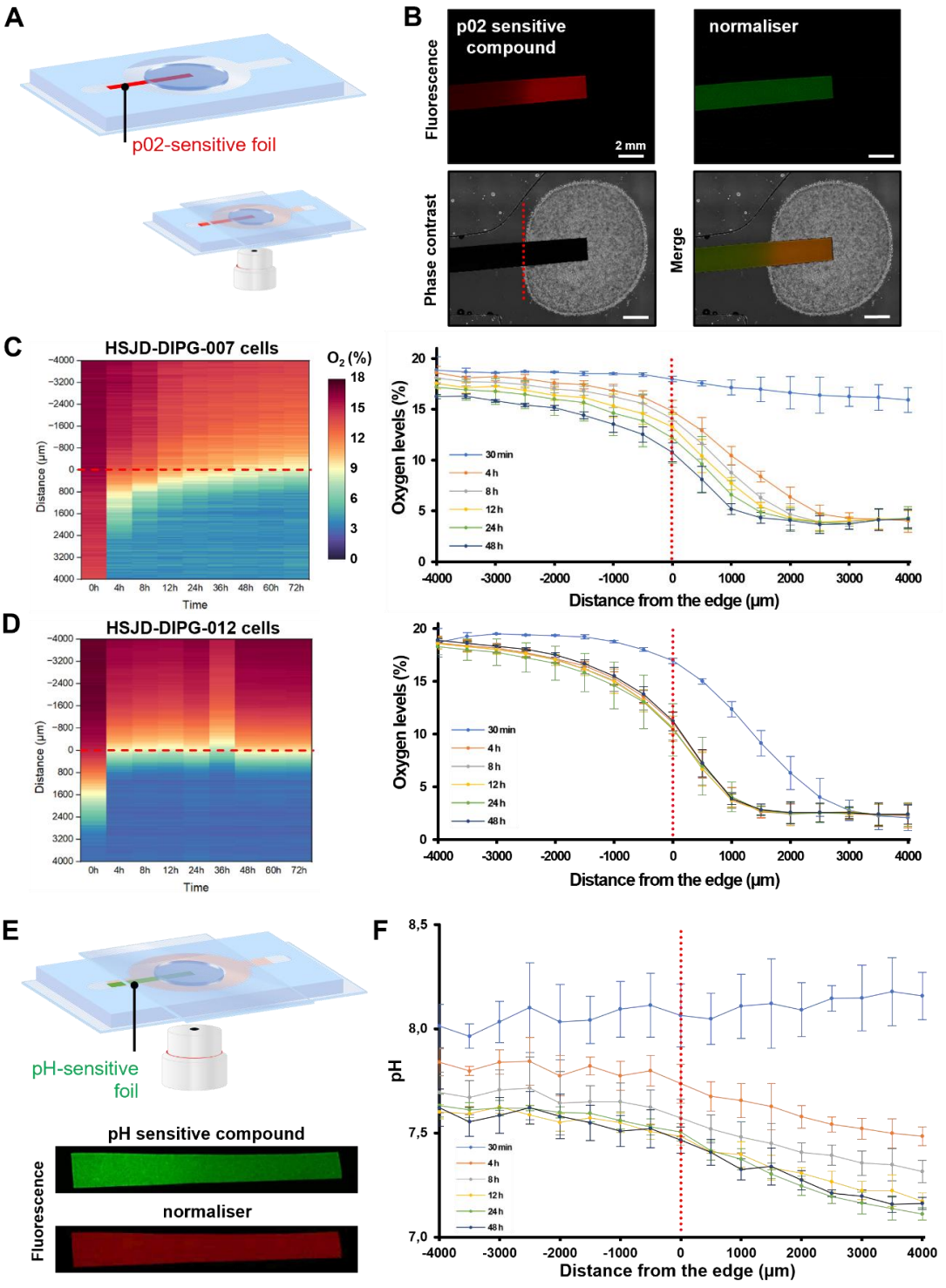



**Figure 2. Physical characterisation of oxygen and pH levels within the DoC.**
A. Schematic representation of the DoC showing the experimental setup with the oxygen-sensitive foil placed between the lower coverslip and the cell-loaded matrix disk. B Wide-field microscopy images displaying the fluorescence signals from the oxygen-sensitive probe and the normalising probe, as well as the merge with the phase contrast picture. C. Heatmap and graph of oxygen level distribution and evolution over time in the DoC seeded with 10,000 HSJD-DIPG-007 cells per µL. The maximal value was set to 18.6 % due to the saturating water vapor and the injection of 5 % carbon dioxyde ($pCO_2$ = 38 mmHg) in the incubation chamber. The distance 0 µm (red dashed lines) corresponds to the edge of the matrix, negative and positive distances respectively correspond to the external gutter and the cell-loaded matrix. n=4. D. Heatmap and graph of oxygen level distribution and evolution over time in the DoC seeded with 10,000 HSJD-DIPG-012 cells per µL. n=4. E. Schematic representation of the DoC showing the experimental setup with the pH-sensitive foil placed between the lower coverslip and the cell-loaded matrix disk. Wide-field microscopy images displaying the fluorescence signals from the pH-sensitive and normalising probes. F. Quantification of pH distribution and evolution over time in the DoC seeded with 10,000 HSJD-DIPG-007 cells per µL. n=4.

**The cell density gradient in the DoC correlates with a gradient in cell proliferation.**

The highest cell density at the DoC periphery may originate from either an increased cell migration towards normoxic conditions and /or an increased proliferation in the peripheral region. To elucidate the first element of the hypothesis, we tracked cell movements thanks to a videomicroscope. Increased cell motility was observed in the DoC periphery compared with its core (Fig.S4A), as expected from the cell shape differences. Yet, no clear outward migration could be evidenced when observing the orientations of cell tracks (Fig.S4B).

In parallel, to assess cell proliferation, we used a fluorescence-based kit to detect the thymidine analogue EdU (5-Ethynyl-2′-deoxyuridine) incorporation by replicating cells. To avoid getting an incomplete cartography due to partial slices, we chose to realise the staining and visualisation steps *in toto* and adequately increased the length of protocol steps.

Strikingly, this allowed us to highlight a clear preponderance of replicating cells in the disk periphery (Fig.3A). To determine the proliferation rate as a function of cell location inside the DoC, we took profit of confocal microscope 3D z-stacks (3D rendering in Fig.3B and Suppl. movie 2) and carried on a segmentation of individual cells based on Hoechst staining (for all cells) and EdU staining (for replicating cells). After a thresholding-based segmentation step to better define cell boundaries within the densest zones, we quantified the proliferation rates as a function of the distance from the ECM gel centroid. We could thus highlight that these proliferation rates were inferior to 5% of replicating cells in a central zone of 2,500 µm radius, and progressively raised in a two mm-wide peripheric ring, to reach 39 % in the most external region (Fig.3C).

Besides, we implemented computational modelling to simulate the evolution of cell growth in the cylindrical geometry of our DoC, thanks to differential equations considering oxygen diffusion and consumption from the lateral supply, with cell displacement restricted to stochastic isotropic steps (at maximum, 10 µm/h). Interestingly, when reproducing the DoC geometry and setting a configuration with quite classical values of 2 mM/min for oxygen consumption, an oxygen diffusion coefficient ranging from 165,000 µm²/min in tissue to 200,000 µm²/min in medium, and a minimal threshold of 5% oxygen for cells to proliferate, compatible with what we retrieved from the literature [29–33], we ended up with spatial patterns of oxygen levels (Fig.3D and E), cell density (Fig.S5A) and proliferative cell distribution (Fig.3F) very similar to what we observed experimentally (Fig.1E, 2C and 3A). Changing the threshold to authorise cell proliferation at 2 % oxygen did not significantly change the outputs of the simulations (Fig.S5B). In contrast, when oxygen consumption was decreased to 1 mM/min, oxygen depletion was slower and the proliferative ring thicker (Fig.S5C). On the opposite, increasing oxygen consumption to 3 mM/min, hypoxia quickly established and led to a thinner proliferative ring (Fig.S5D).

Altogether, these data support the idea that the cell proliferation gradient is sufficient for generating the cell density gradient.

**Transcriptomic analyses reveal a drastic change in gene expression between the DoC core and periphery.**

To get insight into the complexity of molecular expression remodelling driven within the DoC, we decided to implement a global transcriptomic approach in both HSJD-DIPG-007 and HSJD-DIPG-012 cells. Using bulk RNAseq analyses, we compared the genome-wide changes in gene expression between the DoC normoxic periphery and its hypoxic core, focusing on protein-coding RNA. For that purpose, we isolated RNA from a one mm-wide peripheral ring and the remaining central part of the DoC, based on our knowledge of changes in cell phenotype and density, at 24 hours post-seeding, and prepared the libraries to amplify polyadenylated RNA. We got more than 20M reads per condition (Fig.S6A and S7A), which allowed us to harvest more than 13 thousand annotations. After data normalisation, ERCC (External RNA Controls Consortium) Spearman correlation coefficients above 0.95 confirmed the unbiased quality of RNA sequencing (Fig.S6B and S7B).

Unsupervised hierarchical clustering (Fig.S6C and S7C) and PCA (Principal Component Analysis) (Fig.S6D and 7SD) highlighted the proper clustering of quadruplicates between central and peripheral regions. Differential Expression analysis pointed out a high number of genes with gene expression alterations between these regions, as visualised in the heatmaps (Fig.S6E and S7E). Furthermore, volcano plots evidenced an asymmetry in differential gene expression, with more genes down-regulated in the periphery when compared to the centre, especially in HSJD-DIPG-012 samples (Fig.4A).

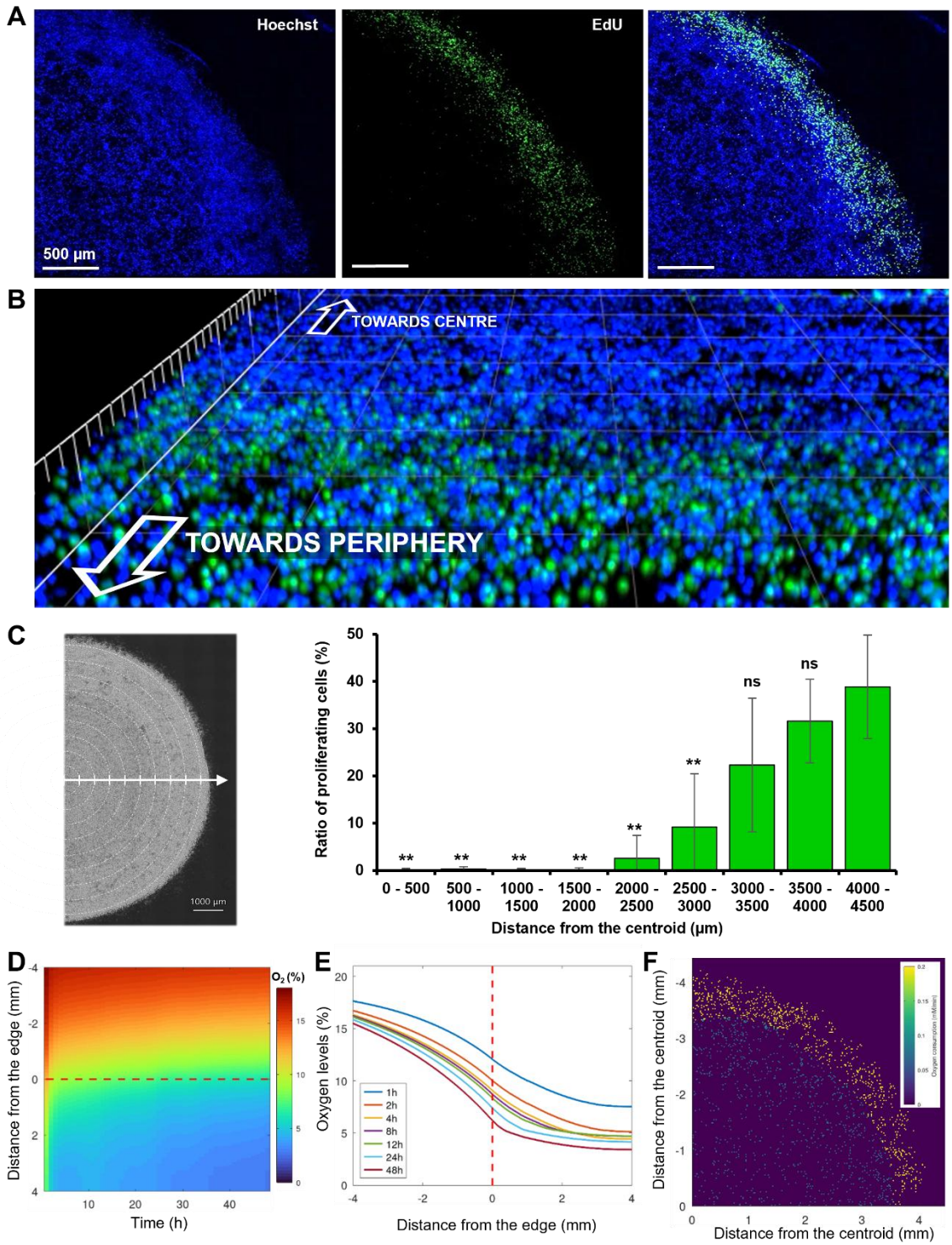



**Figure 3. Analysis of cell proliferation in the DoC model.** A. Fluorescence confocal images of HSJD- DIPG-007 cells 48 hours post-seeding in the DoC, showing all nuclei stained with Hoechst (left panel), and nuclei of proliferating cells stained with EdU/AlexaFluor 488 (middle panel). The merge picture is provided in the right panel. B. 3D rendering of a z-stack acquired to segment nuclei in 3D within the DoC. C. Quantification of the proliferation ratio as a function of the distance from the DoC centroid. n=3. ANOVA with the Tukey post-comparison test was applied to evaluate the significance of comparisons with the 4000-4500 µm region. ns: not significant, ** : p<0.01. D. Heatmap of oxygen level distribution and evolution over time in the DoC computational simulation. Negative and positive distances respectively correspond to the external gutter and the cell-loaded matrix. E. Graph of oxygen level distribution and evolution over time in the DoC computational simulation. F. Map of oxygen consumption by individual cells in the computational simulation, highlighting in yellow the cell state compatible with proliferation. The position (in mm) indicates the distance from the DoC centroid.

A functional analysis of GO (Gene Ontology) signatures emerging from this bulk of data, performed on the MSigDB database, allowed us to identify that the main signature evidenced by these RNAseq experiments was related to hypoxia hallmarks (Fig.4B), both for HSJD-DIPG-007 and HSJD-DIPG-012 cells. Of note, mTORC1 signalling and glycolysis were also highlighted in the top 5 signatures in both cell lines, and translation and metabolic activities were retrieved in many occurrences of the GO molecular function analysis (Fig.S6F and S7F), indicating a strong impact of the location within the DoC on these processes.

To gain further insight into the gene expression rewiring, we performed a Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of molecular mechanisms of interest, and highlighted a strong enrichment in the hypoxia dataset in the center of the DoC, with Normalized Enrichment Scores (NES) of 2.9 and 2.2 for HSJD-DIPG-007 and HSJD-DIPG-012 cells respectively (Fig.4C). Some other enrichments could be evidenced with regard to oxidative phosphorylation, glycolysis, Unfolded Protein Response (UPR), and signalling pathways controlled by mTORC1 and TNF-α in both cell lines (Fig.S8). On the contrary, we found that apoptotic cell death and TP53 (tumor protein 53) pathway were differentially regulated specifically in the HSJD-DIPG--007 DoC but not in the HSJD-DIPG-012 DoC (Fig.S9), consistent with the fact that only HSJD-DIPG-012 cells bear a mutation in the *TP53* gene.

When comparing the two cell lines, we found that 2619 genes were commonly dysregulated in the periphery *vs* the centre in both cell lines, out of 7174 genes in HSJD-DIPG-007 cells and 4902 genes in HSJD-DIPG-012 cells (Fig.4D). This confirms that, besides some cell line specificities, a common ground of transcriptional programs in cells exists in the adaptation to the DoC microenvironment. We performed a novel round of GO analysis in this common gene list, and retrieved the signatures for hypoxia, glycolysis, mTORC1, IL-2 and TNF-α signalling, plus the Unfolded Protein Response (Fig.4E).

Altogether, these molecular characterisations point to drastic reorganisations of cell molecular pathways inside the DoC due to gradients generated by its geometry.

**The cell density gradient in the DoC drives an increase in extracellular mechanical compression forces.**

To complete the biochemical and biophysical characterisation of the DoC, we then aimed to determine the level of mechanical constraints that were associated with the DoC establishment, with the hypothesis that the increased cell density may drive higher microenvironmental pressures.

Direct measurements of the elastic modulus by Atomic Force Microscopy were impossible due to the configuration of the hydrogel between two coverslips, so we had to find an indirect method to evaluate mechanical constraints operating in the DoC. We took profit of fluorescent polyacrylamide beads, which were previously used with success to assess compressive forces in cancer cell spheroids [34], which offered us the possibility to measure mechanical forces on action inside the 3D microenvironment. Thanks to calibrated beads with a nominal elastic modulus of 4.5kPa (Fig.S10A and B), we were able to evidence that compressive forces in this order of magnitude were at play in the DoC (Fig.5A), with compression of beads which reduced their size by 53 % within the first 24 hours of culture (Fig.5B). To rule out the possibility that the gel polymerisation by itself would drive such constraints, we checked that in the absence of cells, the bead size was stable over time, which was the case (Fig.S10C). Besides, we observed no change in compression of beads with a nominal elastic modulus of 2kPa (Fig.S10D), probably reflecting a pressure large enough at day 0 to get the maximal compression of these beads.

Beads' movement in 3D due to the hydrogel reorganisation led to unsatisfactory tracking of changes in individual beads, and we chose to investigate the differences between the DoC core and periphery in terms of cell mechanical sensing. Cells perceive the mechanical properties of their microenvironment through different receptors and mechanotransduction signalling is notably ensured through the upstream activation, *via* its phosphorylation, of FAK (Focal Adhesion Kinase), a key component of a membrane-bound platform involved in this sensing. Consistent with the observation of mechanical constraints occurring within the DoC, we observed FAK phosphorylation, which interestingly was more pronounced in the peripheric zone than in the central zone, in agreement with their differential cell density (Fig.5C and D).

Altogether, our data thus point to a concomitant modulation of biochemical and biophysical properties associated with changes in cell phenotypes.

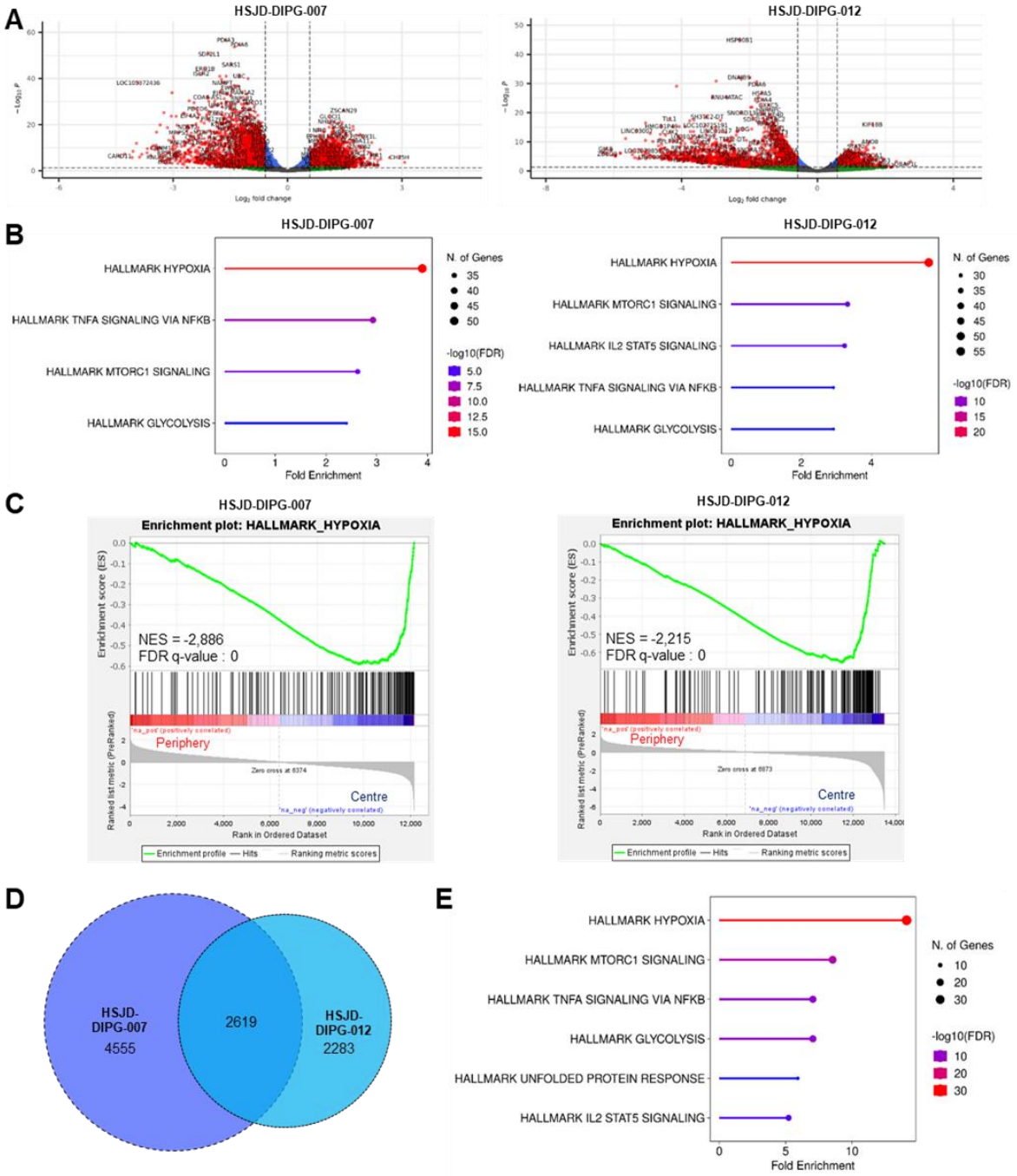



**Figure 4. Transcriptomic analyses of Differentially Expressed genes between the DoC core and periphery, and their associated molecular signatures.** An 8-mm diameter punch was used to isolate the peripheral ring from the remaining central part of the DoC, at 24 hours post-seeding to allow for hypoxia stabilisation in both cell lines. n=4. A. Volcano Plots representing the number of differentially expressed genes between these two regions (periphery/core), in HSJD-DIPG-007 (left panel) and -012 (right panel) cells. DE genes with a |FC| >1.5 are shown in red. B. The Gene Ontology analysis was performed with hallmark.MSigDB on DE genes with a |FC| ≥ 2. The top biological processes and pathways were chosen based on the fold enrichment, and represented in the form of a lollipop plot (size and color correspond to the gene count and -log10FDR, respectively), for HSJD-DIPG-007 (left panel) and -012 (right panel) cells. C. GSEA analysis for the "hallmark hypoxia" signature was performed, and enrichment plots are provided for HSJD-DIPG-007 (left panel) and HSJD-DIPG-012 (right panel) cells. The negative NES (Normalized Enrichment Score) indicates an enrichment of the hypoxic signature in the centre of the DoC, compared to its periphery. D. Venn diagram representation of DE genes with an adjusted p-value 0.05 in HSJD-DIPG-007 and HSJD-DIPG-012 cells and their intersection. E. Gene Ontology analysis was performed with hallmark.MSigDB on DE genes with a |FC| ≥ 2 in both cell lines. The top biological processes and pathways were chosen based on the fold enrichment, and represented in the form of a lollipop plot (size and color correspond to the gene count and -log10FDR, respectively).

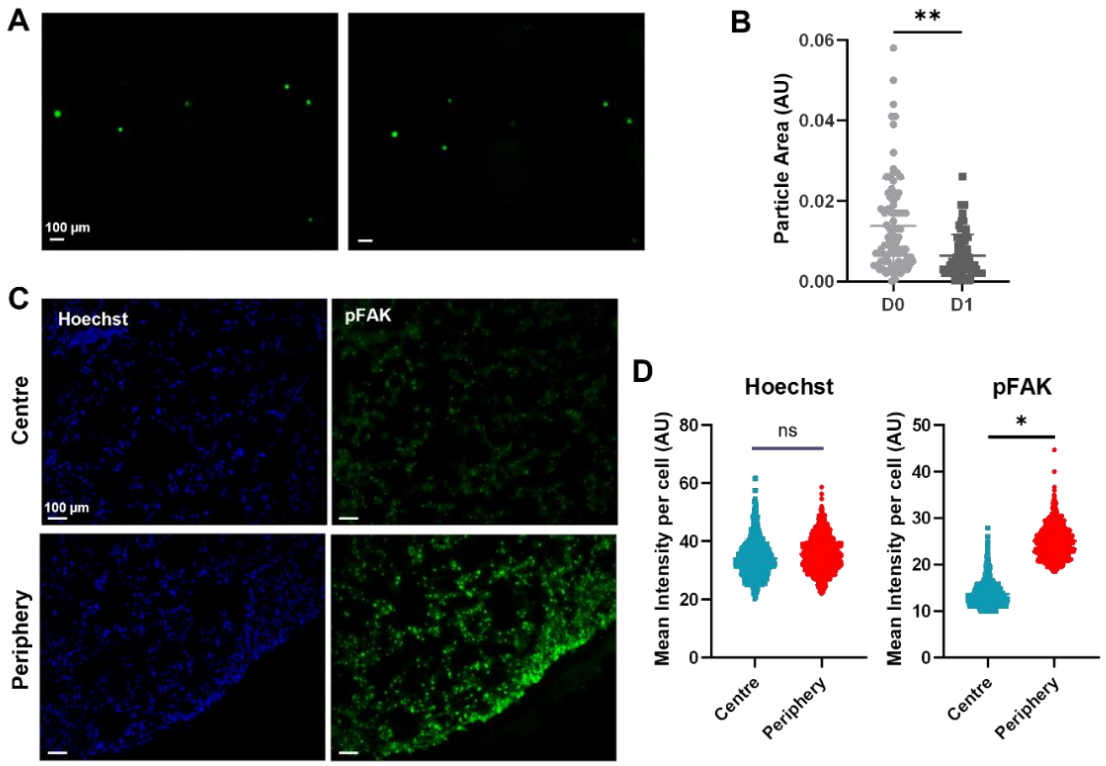



**Figure 5. Assessment of compression forces and mechanotransduction in the DoC.** A. Wide-field fluorescence microscopy images of polyacrylamide beads (with a nominal elastic modulus 4.5 kPa) within the DoC at $D_0$ and $D_1$ post-seeding. B. Plot comparing the polyacrylamide bead size at $D_0$ and $D_1$ post-seeding. n=3. C. Fluorescence microscopy pictures of DoC cryosections stained with Hoechst or through immunolabelling directed against p-FAK. D. Quantification of fluorescence intensity of cells, with respect to Hoechst staining and p-FAK immunolabelling in the peripheral *vs* the central regions of the DoC. Statistical differences between conditions were determined using an unpaired t-test. ns : not significant ; * : p<0.05 ; ** : p<0.01. n=3.

### Pharmacological agents' diffusion through the matrix disk.

The microenvironment of solid tumours sustains a spatial heterogeneity in response to therapies, due to the tumour intrinsic inhomogeneity, but also to extrinsic issues of drug diffusion within it [35].

We reasoned that before evaluating drug response in the DoC, it would be interesting to quantify the kinetics of diffusion of several classes of compounds within the matrix disk, without cells in order not to be biased by possible drug absorption by cells. We first assessed the diffusion of doxorubicin, a chemotherapeutic agent with a molecular weight of 544 Da, within the range of many small pharmacological compounds. Since doxorubicin is autofluorescent, we could monitor its diffusion over time by fluorescence videomicroscopy (Fig.6A), and determined that five hours were required to get equilibrium with equal concentrations in the core as in the gutter surrounding it (Fig.6B and C). The slopes for fluorescence curves over time suggested a non-linear diffusion between the core and the periphery within the first hours, but when considering that treatment efficacy will be assessed over 48-hour treatments, this seems reasonably negligible.

Then, we evaluated the diffusion of 4 kDa FITC-dextran to get some cues on the diffusion of higher molecular weight molecules. Though the diffusion of FITC-dextran was slightly slowed down compared with doxorubicin, the equilibrium in concentration was reached in less than 6 hours, which again seems quite reasonable (Fig.6A and C). This indicates that the matrix achieves a homogeneous drug concentration within a few hours of administration and that the ulterior mapping of small compounds' efficacy should not be affected by gradients in drug concentrations.

Finally, to elucidate how bigger pharmaceutical tools such as antibodies would diffuse in our device, we measured the penetration over time of Alexa Fluor-coupled antibodies. We selected Alexa Fluor Plus F(ab')2 Secondary Antibodies, which consist of IgG modified to remove the Fc portion and display a molecular weight of 110 kDa. In contrast to what was observed with doxorubicin and FITC-dextran, the diffusion of the anti-rabbit antibody revealed a hindered diffusion, with an effective concentration in the hydrogel never reaching the level in the gutter, and a concentration in the centre of roughly half of that level, after 20 hours of incubation (Fig. 6D).

Worse, the anti-mouse antibody accumulated in the gel periphery, possibly due to interactions with antibodies stuck in the mouse-derived matrix, and its concentration in the core hardly reached one-fourth of the delivered concentration (Fig.6E). These imperfect distributions of antibodies should therefore be taken into account if we had planned to assess antibody-based therapies in the DoC system, which is not the case since they don't represent the standard of care for DMG. More globally, this probably reflects a common issue when targeting dense tumours in *ex vivo* / *in vivo* models with such molecular tools.

To return to our goals to assess the therapeutic potential of small molecules, no main issue with unequal diffusion is anticipated.

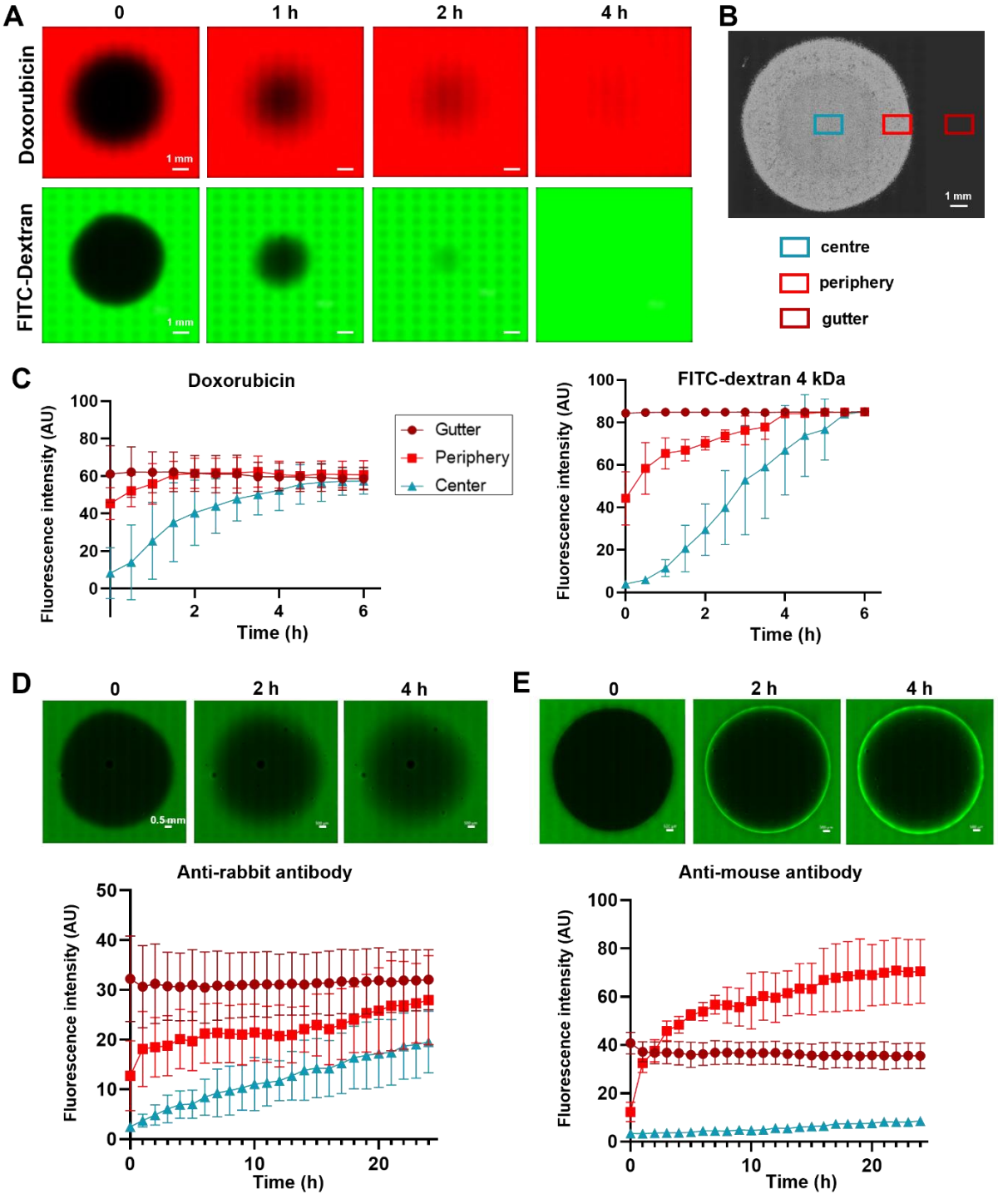



**Figure 6. Study of the spatio-temporal diffusion of pharmacological compounds.**

A. Fluorescence microscopy pictures of the whole acellular DoC at $t_0$, 1 h, 2 h or 4 h post-administration of 0.5 mM doxorubicin (upper row) or 10 µg/mL of 4kDa FITC-dextran (lower row). B. Measurements of fluorescence intensities were performed in the regions highlighted by color rectangles: the centre (blue), the periphery (red), and the gutter (dark red). C. Time-dependent diffusion of doxorubicin (left panel) and FITC-Dextran (right panel) over time. D. Time-dependent diffusion of Alexa Fluor-488 Anti-Rabbit Antibody (1/200) over time. E. Time-dependent diffusion of Alexa Fluor-488 Anti-Mouse Antibody (1/200) over time. n=3 for all compounds

**The DoC highlights a relatively homogenous response to ONC201.**

Among the pharmacological agents assessed to fight DMGs over the last years, ONC201 represents the most efficient one, even though most patients still experience relapse and eventually pass away after a transient response phase.

To understand whether hypoxia could be involved in resistance to ONC201, we compared the response to this drug, administered for 48 hours either at 1 µM or 10 µM, of cells located either in the periphery or in the centre of the DoC. For that purpose, we stained the nuclei of dead cells with propidium iodide and normalised the response by staining the nuclei of all cells using Hoechst (Fig.7A).

In that manner, we could quantify the basal cell death to a value of 7 % in the DoC periphery, while it reached 20 % in its core (Fig.7B). The administration of ONC201 at a dose of 1µM did not significantly alter these proportions, but when delivered at 10µM, it led to an increase of cell death, reaching 25 % in the periphery (+18 % of the total population, compared to untreated cells) and 42 % in the core (+ 22 % of the total population, compared to untreated cells).

Taken together, these data indicate that ONC201 is able to trigger cell death in the whole DoC in a proportion quite similar in the periphery or the core. This proportion of ONC201 sensitive cells sums to the basal cell death that is instead more pronounced in the core, consistently with stress induced by the lack of oxygen and nutrients.

These data thus validate the capacity of our DoC to serve as a pre-clinical model where novel drugs can be assessed to eradicate DMG cells.

**Mapping the response to ionising radiations as a function of oxygen levels.**

Albeit palliative, radiotherapy is nowadays the standard of care for DMG patients, and understanding the reasons for radioresistance therefore remains a critical point if we want to improve the care efficacy. As witnessed for other solid tumours, it is probable that hypoxia, by affecting oxidative stress production and management, modulates the response to ionising radiations in DMG.

We took profit of our system to bring the first answer to this question, by administering X-rays (2 Gy or 4 Gy as a single dose) to HSJD-DIPG-007 and HSJD-DIPG-012 cells, and quantifying cell death thanks to iodide propidium staining. When HSJD-DIPG-007 cells were embedded in the DoC, they displayed some sensitivity to ionising radiations, as illustrated by a dose-dependent increase in the iodide propidium staining 48 hours post-irradiation (Fig.8A). When analysing these pictures acquired on a wide-field microscope, we observed an intermediate ring susceptible to irradiation. To elucidate that and get an accurate quantification of cell death rate as a function of cell location along the hypoxic gradient, we undertook a workflow based on confocal microscopy acquisition with tile stitching, with the intent to optimise cell segmentation thanks to optical sectioning, followed by a semi-automated analysis pipeline allowing to subdivide the whole picture into radial regions of 500 µm dimensions. In that manner, we could evidence a differential response depending on cell distance from the centroid. When investigating the response to irradiation, we could discriminate three different subzones (Fig.8B). First, in the central part of the DoC, up to 2,500 µm from the centroid, we observed a tendency of X-rays to increase cell death, although never reaching statistical significance. When going further towards the periphery, cells became significantly radiosensitive to 2 Gy (3,000-3,500 µm from the centroid) and 4 Gy doses (2,500-3,500 µm from the centroid). Finally, in the most external ring (3,500-4,500 µm from the centroid), the extent of radiosensitivity was again not significant anymore, in parallel with reduced basal cell mortality. This nicely illustrates the advantage of our model in generating progressive gradients, when comparing extreme conditions would not have allowed us to uncover the optimal zone for radiosensitivity.

In parallel, HSJD-DIPG-012 cells embedded in the DoC were also assessed for their sensitivity to ionising radiations, either administered at 2 Gy or 4 Gy (Fig. 8C).

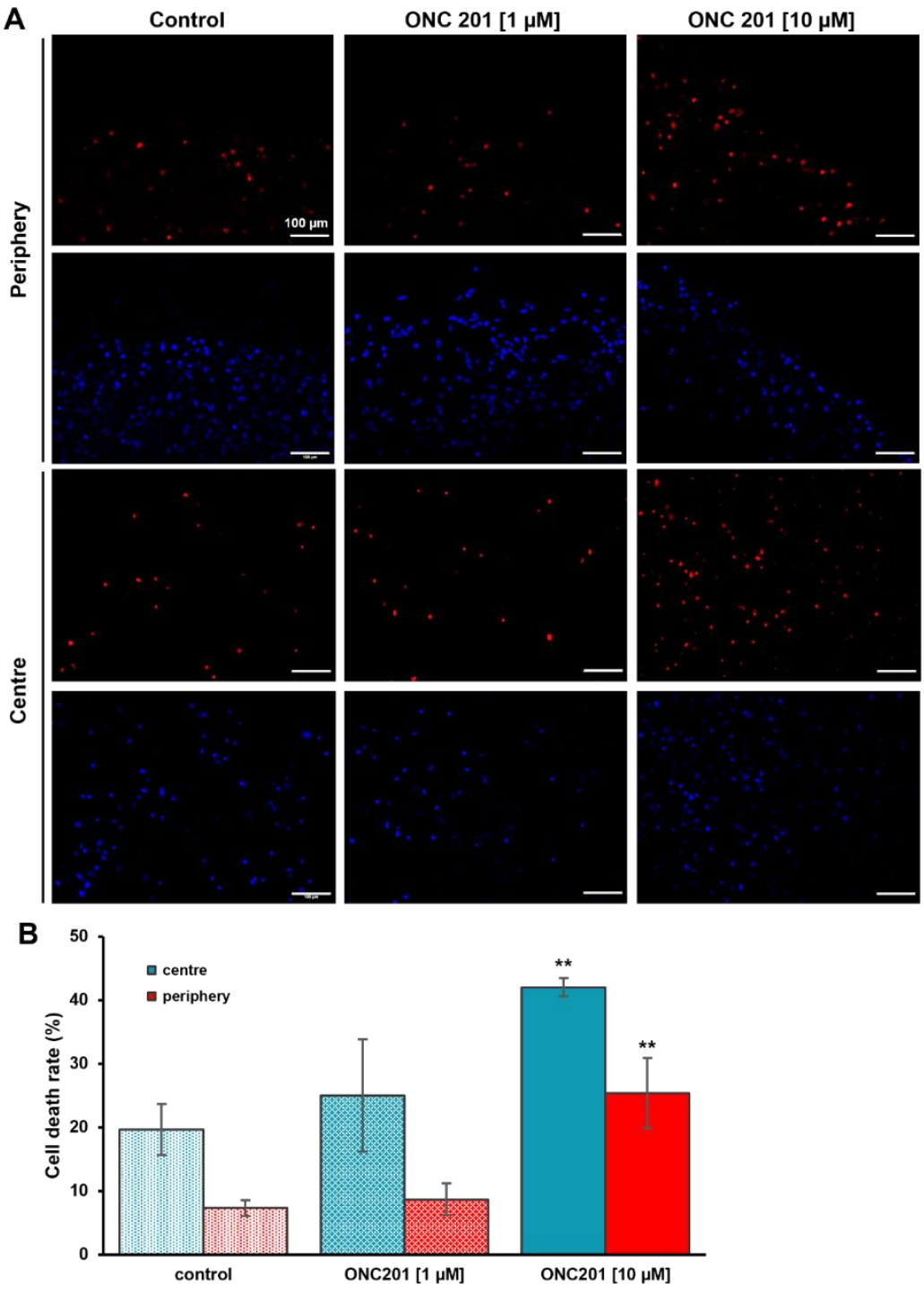



**Figure 7. Evaluation of cell death response to ONC201 in the DoC.** A. Wide-field fluorescence images of HSJD-DIPG-007 cells embedded in the DoC, after a 48-hour incubation with ONC201 at [1 µM] or [10 µM] or no treatment (control). Nuclei of dead cells were stained with propidium iodide (red), while all cell nuclei were stained with Hoechst (blue), B. Quantification of the percentage of dead cells at the centre and periphery. n=3. Statistical differences with respect to the control conditions were determined using a 2-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. ** : $p<0.01$.

Quantification of cell death following the pipeline hereabove described indicated that, in the absence of irradiation, the proportion of dead cells amounted to 6 % for cells at the DoC periphery, to compare with a proportion reaching 22% in the most central part of the DoC (Fig.8D). Strikingly, in contrast with what observed with HSJD-DIPG-007 cells, irradiations did not reinforce the cell death proportions, except for the 3500-4000 µm region where the 2 Gy irradiation led to an additional 5% of the total population dying, still in a non statistically significant manner. Moreover, in all

conditions, the total proportion of dead cells reached a maximum of 22%, and we can therefore conclude that the DoC highlights a clear HSJD-DIPG-012 cell radioresistance, with a vast majority of cells surviving to radiations in all locations of the DoC. To rule out the possibility that propidium iodide staining was less effective in HSJD-DIPG-012 cells, apoptosis was induced thanks to staurosporine, a potent protein kinase inhibitor, and similar results were obtained for both HSJD-DIPG-007 and HSJD-DIPG-012 cell lines, with massive observed cell death (Fig.S11A and B).

Of note, HSJD-DIPG-012 cells bear a mutation in the *TP53* gene, which may underlay their relative radioresistance, as *TP53* mutation was shown to discriminate more or less radioresistant DMG subgroups. It was therefore reasonably expected to observe the radioresistance of this latter cell line. Beyond this validation, what we evidence here is that this radioresistance is inherent to cells and does not depend on additional hypoxic microenvironmental cues.

In brief, these data demonstrate that our system catches the differential sensitivity of cells originating from different tumours, and helps to enlighten whether radioresistance originates from intrinsic or extrinsic factors

**The DMG-on-chip allows for the evaluation of the behaviour of novel patient-derived cells.**

Finally, we had the opportunity to derive DMG cultures from a biopsy of a 5-year-old girl bearing mutations in *HIST1H3B* and *ACVR1* (Activin A receptor, type I) genes, a combination often found in DMG arising in the brainstem (biopsy histological staining provided in Fig.9A). Cells derived from this patient displayed a highly infiltrative phenotype, and remained elongated and isolated when cultured in Matrigel® domes (Fig.9B). When plated, these cells demonstrated great interactivity, with long cellular protrusions connecting them (Fig.9C).

When integrated in the DoC, these patient-derived cells kept their elongated phenotype, even in the central region of the chip (Fig.9D). We wondered whether this more stable phenotype, in comparison with cell lines, was due to a decreased oxygen depletion by cells, and we explored this hypothesis thanks to Presens® p02-sensitive foils, as performed for cell lines at the beginning of this study. Intriguingly, we found that patient-derived cells were generating a strong hypoxic inward gradient in the DoC, with oxygen levels even approaching anoxia, following a seeding at 5,000 cells per µL (Fig.9E). Of note, the establishment of this gradient was slower, when compared to cell lines (Fig.S2D), with a progressive decay from 4 h to 24 h, suggesting an oxygen consumption maybe less pronounced but more sustained. Even at lower cell densities, oxygen gradients were elicited, as illustrated by the progressive decrease in oxygen levels down to 3.6 % in the DoC initially seeded with these cells at a density of 1,000 cells per µL (Fig.S11). The retention of an elongated infiltrative cell phenotype in the DoC core is therefore not attributable to alleviated hypoxia. Rather, it reflects a capacity of these primary cultures to cope with a hypoxic environment, which resembled what they experienced in the patient.

We finally investigated the basal cell death of these primary cells embedded in the DoC and their response to ionising radiations. In agreement with the stable cellular phenotype in the core *vs* the periphery, we did not observe any difference in the basal cell death between these regions, and we furthermore evidenced that this specimen was radioresistant to the administered 2 Gy or 4 Gy doses in a homogenous manner (Fig.9F and G).

This proof-of-concept of a new valuable device for preclinical assessment now calls for ulterior samples to be investigated.

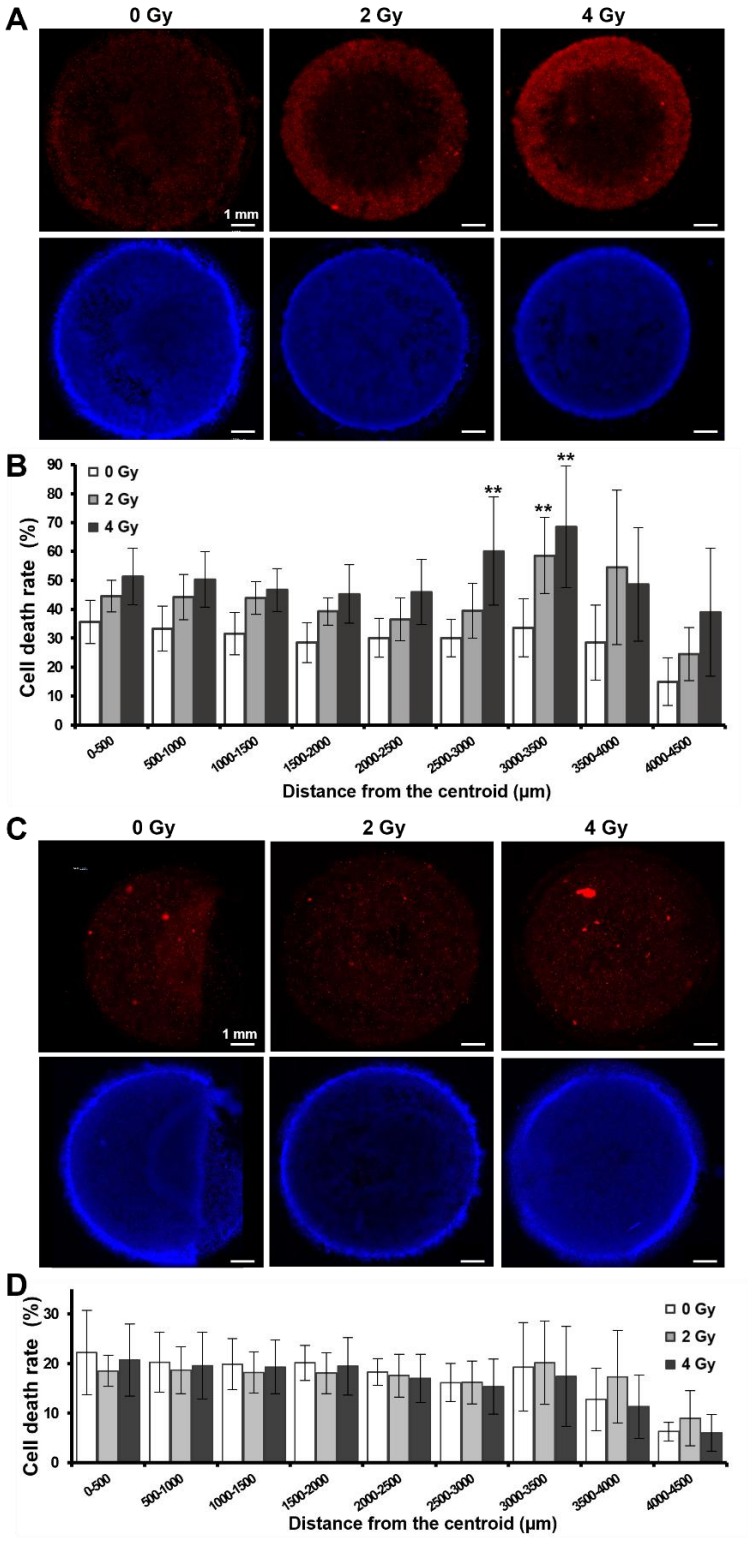



**Figure 8. Evaluation of cell death induced by ionising radiations in the DoC model.**
A. Wide-field fluorescence images of HSJD-DIPG-007 cells embedded in the DoC, 48 hours post-irradiation. Cells received single doses of 2 Gy or 4 Gy, or were left unirradiated as a control. Nuclei of dead cells were stained with propidium iodide (red), while all cell nuclei were stained with Hoechst (blue). B. Quantification of the percentage of dead cells as a function of the distance from the DoC centroid. n=3. Statistical differences compared to the non-irradiated cells were determined using a 2-way ANOVA with Tukey post-comparison test. ** : p<0.01. C. Wide-field fluorescence images of HSJD-DIPG-012 cells embedded in the DoC, 48 hours post-irradiation. Cells received single doses of 2 Gy or 4 Gy, or were left unirradiated as a control. Nuclei of dead cells were stained with propidium iodide (red), while all cell nuclei were stained with Hoechst (blue). D. Quantification of the percentage of dead cells as a function of the distance from the DoC centroid. n=3. Statistical differences with respect to the non-irradiated cells were determined using a 2-way ANOVA with Tukey post-comparison test. ** : p<0.01.

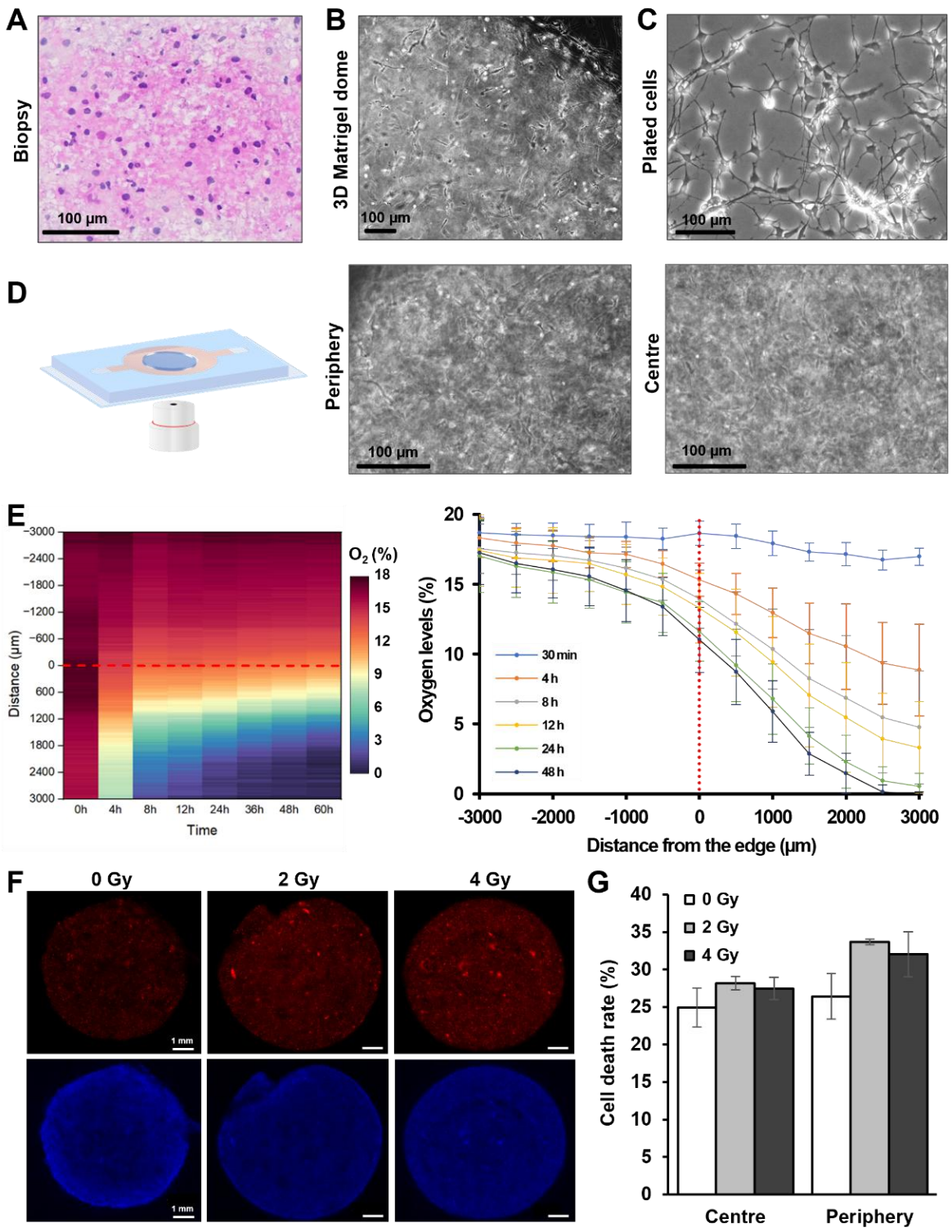



**Figure 9. DMG patient-derived cell cultures and their response to irradiations in the DoC.**
A. Image of a DMG biopsy stained with hematoxylin and eosin. B and C. Phase contrast microscopy images of patient-derived DMG cells cultured in a Matrigel® dome (B), or plated on uncoated plastic (C). D. The DoC was seeded with 5,000 patient-derived DMG cells/µL and imaged 24 hours later. Pictures are provided for the DoC's periphery (left) and centre (right). E. Heatmap and graph of oxygen level distribution and evolution over time in the DoC seeded with 5,000 patient-derived DMG cells/µL. n=3. F. Wide-field fluorescence microscopy images showing radiation-induced cell death in the DoC model 48 hours after irradiation. Cell nuclei are stained with Hoechst (blue), and dead cells are stained with propidium iodide (red). n=2. G. Quantification of the percentage of dead cells at the center and periphery. No statistical differences were evidenced using a two-way ANOVA with the Tukey post-comparison test.

## *Discussion*

Although new strategies recently showed interesting results in improving the survival of some DMG patients [14,36], efforts are still required to understand the reasons for delayed relapse or absence of response for other patients. In that frame, deciphering the determinants of intra- and inter-tumoral heterogeneity in response is crucial to rationalise and improve therapeutic efficacy. Whereas much work has already been achieved to define intrinsic genetic and epigenetic features of DMG tumours [37], as well as the impact of H3K27M driver mutations [38], the extrinsic determinants driven by the local biophysical tumour microenvironment has been somewhat overlooked so far. Yet, the seed and soil analogy for extrinsic and intrinsic drivers applies quite well to DMG [39], and understanding the soil's importance in the pathology should bring valuable information to treat it.

To unveil mechanisms responsible for therapy resistance driven by the DMG microenvironment, we developed a DMG-on-Chip (DoC) in which cells are exposed to hypoxia gradients in a relevant 3D extracellular matrix scaffold. By embedding 3D ECM gels between two coverslips, oxygen consumption by tumour cells led to progressive inward oxygen depletion from the peripheral medium supply. We improved the original design by [26], by sticking the upper coverslip to the gel and perfectly shaping it into a disk to impair oxygen diffusion from the medium above the dome, in contrast to the original design. Furthermore, using PDMS spacers instead of silicon seals allowed us to get a reproducible and precise thickness for the device, and to disassemble it for homogenous incubations with stains, or RNA/protein extraction. Finally, adding 1.5H coverslips on both sides afforded an optimal observation with either inverted or upright microscopes. We thus recapitulate a bigger tumour size than what can be achieved with mice models, while allowing to monitor what occurs in this tumour slice avatar without opacity issues associated with thick samples. Gradients in cell density were generated in twenty four hours and correlated with differences in cell proliferation and mechanotransduction, as well as change in cell phenotype, in agreement with the interlocking of these features [21,40]. Although no stiffness measurements are available for DMGs or other pediatric high-grade gliomas, recent studies based on Magnetic Resonance Elastography computed elastic moduli mostly between 2 and 4 kPa, both in pediatric low-grade gliomas and normal brains [41]. In our opinion, it would be interesting to investigate it in DMGs as well to get hints as to which extent this parameter could be associated with the aggressiveness of this disease.

To quantify the extent of oxygen depletion inside the DMG-on-Chip, we took profit of oxygen-sensitive fluorescent sheets, previously used to monitor hypoxia in head and neck squamous cell carcinoma models [42]. By adapting proper filters to our wide-field microscope, we could improve the spatial resolution to 4 µm. With densities of tumour cells comprised between 5,000 and 10,000 cells per µL, we triggered hypoxic gradients within a few hundred microns, supporting the observation in the literature that hypoxia develops in tissues when the distance from blood vessels exceeds such values [43]. The core of our tumour-on-chip displayed stable levels between 2 and 4 % of oxygen, quite consistent with the levels recently evidenced in DIPG orthotopic xenografts [44]. Interestingly, in contrast to the cell lines, the patient-derived cells triggered a more pronounced hypoxia that did not impact their cell phenotype nor basal cell death. This may suggest that primary cells better tolerate hypoxic parameters that mimic the brain tumour, while cell lines, used to « hyperoxic » conditions encountered in incubators, have evolved their physiology to these latter settings.

HSJD-DIPG-007 and HSJD-DIPG-012 cells adapt their physiology to hypoxia by rewiring their cell metabolism, as evidenced by transcriptomic signatures differentially expressed in the core *vs* the periphery of the DoC. As a functional consequence, we could highlight acidification of the extracellular medium, fitting quite well with data reported for solid tumours' microenvironment in the literature [45], overcoming the two pH-buffering systems contained in our medium. Again, an inward gradient could be quantified, in agreement with a progressive cell adaptation along the DoC radius.

Yet, this adaptation is not sufficient to ensure optimal cell survival for HSJD-DIPG-007 cells, with the triggering of an apoptosis-associated transcriptional program in the DoC centre reflected by an increased mortality rate. Furthermore, thanks to the hypoxia gradient elicited in our device, which spanned a progressive range of oxygen levels, we could evidence that radiosensitivity of these cells occurred in a particular region of the DoC, located 2,500 to 3,500 µm from the centroid, with more internal regions and more external regions not significantly impacted by X-rays in terms of cell mortality rate. In contrast, *TP53*-mutated HSJD-DIPG-012 cells displayed sustained radioresistance in the whole DoC, consistently with a previous report evidencing *TP53* as a main genetic driver of radioresistance in DMG [46]. By

showing this variety of possible responses, including that of patient-derived cells, our microsystem demonstrates that beyond inherent genetic-driven radioresistance, microenvironmental cues can also modulate this response, and it therefore constitutes an interesting tool to unravel intrinsic and extrinsic factors in radioresistance. Since responses appear not generalisable, case-by-case studies will be required to offer a personalised medicine perspective.

Metabolism has emerged over the last years as a potential Achille's heel of DMG [12]. In this context, ONC201 raised some hope [14], and nowadays represents the unique compound able to improve the survival of some DMG patients [47]. Yet, much work is required to fully exploit the potential of metabolic modulators against DMG. We are aware that oxygen is not the only molecular entity consumed by tumour cells, and that many nutrients probably get depleted while getting inside the tumour-on-chip. Metabolites may also accumulate in the DoC core and alter DMG cell physiology. How different carbon sources are employed by cells in the DoC and whether autophagy impacts DMG cell physiology will be the goal of future investigations. In this context, we already optimised mathematical models to predict the behaviour of cells as a function of oxygen and nutrient supply, based on various schemes and data from the literature (manuscript in preparation). More globally, one can postulate that this field of research will also benefit from the development of novel metabolic imaging modalities, including new radiotracers beyond the classical 18 F-fluorodeoxyglucose [48].

Hypoxia was described to regulate in various solid tumours the six Rs of radiotherapy (Radiosensitivity, Repair, Repopulation, Redistribution, Reoxygenation, and Reactivation of anti-tumour immune response) [49]. Concerning this latter aspect, we are particularly convinced that our tumour-on-chip represents an adequate tool to investigate the behaviour of immune cells in a DMG-like environment. Acidity is notably responsible for immunosuppressive mechanisms such as cytokine inactivation [50] or the induction of regulatory T cells [51], and strategies based on overcoming or hijacking tumour acidity to improve anti-tumoral immunity have been elaborated [50,52]. With regard to DMG, the determination of their immune landscape revealed a preponderance of myeloid over lymphoid populations [53,54]. In addition, another recent study demonstrated the microglia-mediated efficacy of TIM-3 (T cell immunoglobulin mucin-3) immune checkpoint inhibitors to target DMG xenografts [55]. In parallel, clinical trials using CAR (Chimeric Antigen Receptor) T lymphocytes displayed auspicious results [36,56], yet with the inconvenient that the level of patient care required to keep neuroinflammation under control is very demanding. We are convinced that our tumour-on-chip could allow to assess and optimise novel immune-based therapies, and notably to determine how a hypoxic and acidic tumour environment impacts the viability and efficacy of immune cells.

The complexification of our microsystem with other cell types constitutes the next step. In that frame, we followed with great interest the development of neuroimmune-competent human brain organoid models encompassing microglia and multiple neuron subtypes [57], as well as the description of synapses between GABAergic neurons and DMG cells [58]. In the frame of brain tumours, and DMG is no exception to the rule, a major hurdle for treatments is represented by the Blood Brain Barrier (BBB), which hinders the diffusion of pharmacological agents [59]. Not only that, a paracrine dialogue was previously highlighted between DMG cells and a human *in vitro* BBB model [60]. Work is ongoing to connect such a model to our DMG-on-Chip thanks to microfluidics, which would allow to integrate an additional relevant component to our preclinical system. Finding the adequate equilibrium in medium formulation to ensure the proper physiology of these various cell partners represents a bold challenge, yet it is undoubtedly helpful to get closer to the pathophysiological reality.

In summary, our results highlight a new facet of microenvironment-driven DMG response to therapies, and pave the way for a better preclinical assessment of innovative therapeutic strategies in the future, taking into account intra- and inter-tumoral heterogeneity.

## *Acknowledgements*

We are much grateful to all members of our labs for helpful discussion. We thank Dr Cagatay Tarhan and Pr Dominique Collard from SMMiL-E project for their enlightened vision on microsystems, and Dr Olivier Devos from LASIRE for his expertise in fluorescence spectroscopy. We are also much grateful to Dr Melodie-Anne Karnoub and Dr Gustavo Touzet for their great help in obtaining patient-derived DMG fragments, Dr Marie Csanyi and the « Tumorothèque du GCS-ALLIANCE CANCER de Lille » for the biological material used for organoid elaboration and its characterisation, the Medical Physics Department of Centre Oscar Lambret for irradiation dosimetry, and Dr Anne-Laure Gagez for her expertise in translational research.
We warmly thank the OrgaLille platform for the patient-derived organoid culture, and members of

PLBS UAR 2014 - US 41: Bicel platform for their helpful expertise in image acquisition and analysis, and GO@L platform for their expertise in transcriptomic analysis.
This work was supported by Institut National du Cancer (INCA_16347 Interpedia DIP2G and INCa-Cancer_18693 Pediacriex EN-HOPE SMART4CBT), la Ligue Nationale contre le Cancer, the SFCE (Société Française de Lutte contre les Cancers et les Leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent), the AREMIG (Association pour la Recherche et les Etudes dans les Maladies Infantiles Graves) association, Oscar Lambret Cancer Comprehensive Center and the Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL). EF was a recipient of GDR Imabio Master fellowship.

**Author contributions**
LT, CH, FS, GC, AB, FC, AT, EL, YR, SM and AF designed research. LT, CH, AL, JB, MA, EF, LB, CAM, AB and YR performed experiments. All authors analyzed and interpreted the data. LT, CH, YR, SM and AF wrote the manuscript. All authors read and accepted the manuscript.

**Competing interests**
None of the authors have competing financial or non-financial interests as defined by Nature Portfolio.

## *Material and methods*

**Cell Culture.**

DIPG cell lines, HSJD-DIPG-007, HSJD-DIPG-012, and HSJD-DIPG-013 were kindly supplied by Angel Montero Carcaboso (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain). DIPG cells were maintained as tumorospheres in the tumour stem medium (TSM), composed of half of Neurobasal™-A medium and half of DMEM/F12 medium, supplemented with 1% GlutaMAX, 1% antibiotic antimycotic, 1% non-essential amino acids, 1% 100 mM sodium pyruvate, and 1% HEPES buffer (all from Life Technologies). This medium was extemporaneously supplemented with 2% B-27 supplement (Life Technologies), 20 ng/mL human EGF (Epidermal Growth Factor), 20 ng/mL human basic-FGF (Fibroblast growth factor),10 ng/mL human PDGF-AA (Platelet-derived growth factor-AA), 10 ng/mL PDGF-BB (Platelet-derived growth factor-BB) and heparin (all from Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA). All cell lines were free of mycoplasma contamination. Cells were incubated in a humid atmosphere at 37 °C with 5% $CO_2$.

**Isolation of patient-derived DMG cells.**

As part of the DEPGO project (registration number CEC-2023-038), the piece of biopsy was preserved in the hibernate medium (Gibco™ A1247501), then mechanically dissociated with scissors and submitted to the m-brain01 GentleMacs program dissociator in Tumour Stem Medium containing R, A, and H enzymes (Miltenyi kit 130-095-929) and 10 µM of Y27632 ROCK Inhibitor, (TargetMol). Finally, the dissociated fragments were incubated for 30 to 60 minutes under rotation at 37°C. The tumour cells were filtrated and rinsed with TSM medium to stop the enzyme activity.

**DMG-on-chip (DoC) assembly process.**

PDMS (Polydimethylsiloxane, Sylgard™ 184 Silicone Elastomer kit, The Dow Chemical Company, USA) was used to generate a mould/spacer to delineate the gutter of the chip. PDMS and its crosslinker were mixed (10:1 ratio) and degassed. The mixture was then cast on a glass plate previously covered with a rigid plastic film and surrounded by Flexdym™ (Eden Tech Microfluidics, Paris, France) strips with a defined thickness of 750 µm. A second glass plate was placed on top to give a homogenous thickness, and curing was performed for 30 min at 70°C.

To create the DMG-on-a-chip, the previously described mould/spacer made of PDMS and cut according to the predefined shape, was placed on a 40 × 60 mm glass coverslip #1 (Menzel Gläser). Then, cells were resuspended in a matrix composed of 25% high molecular weight hyaluronan 5 mg/mL (R&D Systems, GLR002) and 75% Growth Factor Reduced Phenol Red-free Matrigel® (Corning, 356231). This cell suspension was then deposited at the center of the device, and a glass coverslip was placed on top to shape the dome into a regular disk.

To analyse cell density, DoCs were stained with Hoechst (Thermo Fisher, 33342) at 1 µg/mL for one hour, rinsed three times with PBS then imaged with Keyence BZ-X810 microscope with a 10X/0.45 NA objective. Fluorescence excitation was performed at 360/40 nm, and emission collected after a dichroic mirror at 400 nm through a 460/50 nm filter. Image tiles were stitched, and the DoC edge was segmented in Imaris 10.2 using the surface model. The intensity profile inside the surface was then created with the "*Surface-Image Correlation: Image intensity*" function.

**Cell migration.**

Cells were pre-stained with the fluorescent probe Vybrant™ DiO (Invitrogen™) according to the manufacturer's recommendations. DoCs were then prepared as previously described. Twenty-four hours later, to bypass motions due to hydrogel

initial retraction, fluorescence pictures were captured with a CytoSMART LUX 3 (Axion BioSystems, USA) video microscope, with the GFP configuration, every hour over one day. Image analysis was performed in Fiji software. Images were thresholded with the Triangle method and cells were tracked using the TrackMate plugin [61], with the Laplacian of Gaussian (LoG) detector (diameter = 20 µm, quality = 0.5) and the simple Linear Assignment Problem algorithm (LAP) tracker (Linking max distance = 50, gap-closing max distance = 30, gap-closing max frame gap = 2). Centered cell track plots were generated in Python with help from Bio-image Analysis GPT and the BioImageAnalysisNotebooks by [62].

**Cell proliferation assay.**

DoCs were prepared with HSJD-DIPG-007 at 10,000 cells/µL, incorporating 2 µM EdU (Click-iT EdU 488 Imaging Kit, ThermoFisher). Besides, a chip was prepared without EdU as a control for AlexaFluor autofluorescence. After 48 hours of culture, the chips were fixed with paraformaldehyde (PFA) 4% for 30 minutes before disassembly, and 30 additional minutes afterwards. After three rinses with 3% BSA in PBS, the matrices were permeabilised for 72 hours at 4°C with 0.5% Triton X-100 in PBS. The matrices were subsequently rinsed with 3% BSA in PBS three times over 24 hours. EdU detection was performed using the Click-iT reaction buffer as recommended by the supplier, incubated with the matrices for 7 days at 4°C. Matrices were subsequently rinsed with 3% BSA in PBS three times over 24 hours and Hoechst staining (Thermo Fisher, 33342) at 1 µg/mL was carried out for 1 hour at room temperature. The matrices were rinsed with PBS and mounted with Fluoromount-G (Thermo Fisher, 00-4958-02). Samples were imaged using a Zeiss LSM 710 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) with a Plan Apochromat 10X/NA0.45 objective. Samples were excited with lasers at 405 nm and 488 nm and photons were collected through 410-500 nm and 493-630 nm filters, respectively. 1024 × 1024 px images were acquired with a pixel size of 920 nm. For each sample, a Z-stack was acquired over a thickness of about 100 µm with a step size of 1.69 µm.

Confocal images were stitched and denoised with a Gaussian filter (sigma = 1) using ZEN software (Carl Zeiss, Jena, Germany). Then, nuclei segmentation was performed using the spot model in Imaris 10.2 (Oxford Instruments, UK). Nuclei stained with Hoechst and those stained with EdU were separately segmented. After adding an intensity and a distance filter, nuclei stained with both probes were also identified. Afterward, using the surface model, the centroid of the DoC's imaged region was determined, and the distances of segmented nuclei from it were exported to Excel. Finally, the proliferation ratio was quantified according to this formula:

% proliferation ratio = 100 x [number of green nuclei /((number of blue nuclei + number of green nuclei)-number of blue and green nuclei)]

3D rendering and video animation were carried out in Imaris 10.2.

**Oxygen levels and pH measurement.**

For oxygen level measurement, we used foils (SF-RPSu4, PreSens GmbH, Regensburg, Germany), integrating an oxygen-sensitive compound and a normaliser dye. DoCs were prepared on a OneWell Plate™, with foil strips placed under the cellular hydrogel. The DoCs were then filled with phenol red-free culture medium and placed in the inverted Keyence BZ-X810 microscope incubation chamber and images were captured every 4 hours over 72 hours, with a 10X/0.45NA objective. Foils were excited with a metal halide lamp coupled to a 360/40 nm excitation filter, and photons re-emitted by the oxygen-sensitive probe and the normalising probe were collected through 600/11 and 520/10 emission filters, respectively. In parallel, sodium sulfite, an oxygen scavenger, was used to get the reference value corresponding to "0% oxygen." Stitched tiles were then analyzed thanks to a macro created in Fiji, based on a linear regression between fluorescence ratio intensity and oxygen percentage (calibrated with the sodium sulfite value and measurements in the gas-equilibrated medium considered as 18.6 % oxygen). Each pixel's value was thus converted into an oxygen percentage. Measurements were extracted and displayed as oxygen level curves as a function of distance, with 0 µm representing the matrix edge.

For pH measurements, we used pH-sensitive foils (SF-HP5R PreSens GmbH, Regensburg, Germany) and calibrated their fluorescence ratios as a function of pH thanks to 10 phosphate buffers ranging from 4.5 to 9. The calibration curve was fitted with a sigmoidal curve. DoCs were prepared on a OneWell Plate™, with foil strips placed under the cellular hydrogel, and filled with phenol red-free culture medium. We used the incubation chamber of Keyence BZ-X810 microscope with a 10X/0.45NA objective, to capture images every 4 hours over 72 hours. For the normaliser, fluorescence excitation was performed at 440/10 nm, with a 600/10 nm emission filter and a 505 nm dichroic mirror. For the pH-sensitive probe, excitation was performed at 470/40 nm, with a collection of photons with a 525/50 nm emission filter and a dichroic mirror at 495 nm.

**Diffusion experiments.**

Devices were prepared without cells, as previously described. Doxorubicin (Sigma-Aldrich, D1515), FITC-Dextran 4kDa (Sigma-Aldrich 46944), Alexa-Fluor488 anti-rabbit (Thermofisher, 48282) and anti-mouse (Thermofisher, 48286) antibodies were diluted in phenol red-free culture medium and deposited in the gutter of the device. Time-lapse imaging was performed over 24 hours in the incubation chamber of the Keyence BZ-X810 wide-field fluorescence microscope, with a PlanApochromat 10X/0.45NA objective. FITC-Dextran and Alexa-Fluor488 antibodies fluorescence were captured with a GFP filter (OP-87763): excitation at 470/40 nm, dichroic mirror at 495 nm and collection of photons at 525/50 nm. Doxorubicin fluorescence was detected using a Texas Red filter (OP-87765): excitation at 560/40 nm, dichroic mirror at 585 and collection of photons at 630/75 nm. For image analysis, the DoC regions were separated into three distinct areas: centre, periphery, and gutter. Fluorescence intensity measurements in these regions were performed using the measurement function of the Fiji software.

**Immunofluorescence.**

DoCs were first disassembled and transferred into moulds filled with OCT (CellPath, KMA-0100-00A) for 10 minutes in an incubator (37°C, 5% $CO_2$). The mould was then placed into an isopentane bath in the SnapFrost®2 (Excilone, Elancourt, France) to cryogenise the sample, which was stored at -80°C until use. 20 µm sections were obtained with a cryostat, collected on positively charged slides (Labsolute, 7695019), and fixed for 15 minutes with 4% PFA. Sections were then rinsed three times with PBS and permeabilised with 0.5% Triton X-100 in PBS for 10 minutes. After one-hour blocking with 5% Normal Goat Serum (Invitrogen™,10000C) in 0.3% TBS, samples were incubated overnight at 4°C with an anti-pFAK antibody (BD Transduction Laboratories™, 611722). Slides were rinsed three times with PBS and then incubated for 1 hour with the secondary goat anti-mouse IgG Alexa Fluor™ Plus 488 (InvitrogenTM, A48286). A final 15-minute incubation with NucBlue™ Live Cell Stain ReadyProbes™ (Invitrogen™) was performed to counterstain nuclei, followed by three PBS rinses. Slides were mounted in Fluoromount (Invitrogen, 00-495802). The observation was performed using the Keyence BZ-X810 microscope with a Plan Apochromat 10X/0.45NA objective.

**Response to drugs.**

The DoCs were prepared as previously described. The pharmacological agents ONC201 (Selleckhem, S7963), and staurosporine (TargetMol, T6680) were diluted in culture medium and added in the gutter of the DoC immediately upon assembly. Treatments were maintained for 48 hours, with medium refreshed after 24 hours. The compounds were used at the following concentrations: ONC201 at 1 µM and 10 µM, and staurosporine at 1 µM as a positive control. To quantify cell death, the chips were first disassembled to allow a homogeneous staining with probes. The cells were then incubated with 10 µg/mL propidium iodide (Interchim, FP36774A) and 1 µg/mL Hoechst 33342 (InvitrogenTM, H3570) in phenol red-free culture medium at 37°C with 5% $CO_2$. Devices were rinsed three times with PBS, and fluorescence microscopy images were captured using Keyence BZ-X810 with a 20X/0.75NA objective.

**Irradiation of the DMG-On-Chip**

DoCs were irradiated with ionising radiations (X-rays) at single doses of 2 Gy and 4 Gy with a distribution of 1 Gy/1.25 min, thanks to the CellRad+ System (Precision, USA). The culture medium was refreshed every 24 hours. At 48 hours post-irradiation, DoCs were disassembled and labeled with 1 µg/mL Hoechst 33342 (Invitrogen™, H3570) for 40 min at 37°C in phenol-red free culture medium. A second staining step was performed with propidium iodide (PI) (Interchim, FP36774A) at 10 µg/mL and Hoechst 33342 at 1 µg/mL for 20 min. Finally, chips were rinsed three times with PBS and live images were acquired on a Zeiss LSM 980 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) with a Plan Apochromat 10X/0.45NA objective. Samples were excited at 405 nm and 561 nm and photons were collected within the 410-520 nm and 610-723 nm windows, respectively. 1.6 µm-height strips spanning the DoC were acquired with a pixel size of 414 nm over several Z positions with bi-directional scanning.

Images were first stitched and denoised using a Gaussian filter (sigma = 1) in ZEN software (Carl Zeiss, Jena, Germany). The DoC centroid was then determined using the surface model in Imaris 10.2. Subsequently, a custom Fiji macro was used to process the images, by slicing the tile into 500 µm-wide regions of interest (ROIs). The auto-threshold function was applied, then the "*Analyze particles"* function with size and circularity filters allowed to quantify the number of nuclei in each channel. The number of nuclei stained with both markers was also quantified. Finally, the ratio of dead cells was calculated using the following formula:

% dead cells = 100x [number of red nuclei / ((number.of blue nuclei + number of red nuclei) - number.of blue and red nuclei )) ]

**Polyacrylamide microbeads.**

Compressible polyacrylamide microbeads loaded with FITC were prepared as described in [34]. They were first rinsed three times with PBS to remove excess fluorophore, then diluted to 0.5% in PBS before use. Next, 5 µL of this suspension were added to cell/matrix suspension to be poured into the chip. DoCs containing the beads were observed at 30 minutes and 24 hours post-seeding with the Keyence BZ-X810 microscope using a plan Apochromat 10X/0.45NA objective. The "*Analyze Particles*" function in Fiji software was used to quantify the number and area of beads.

**RNA-Seq analysis.**

DoCs were seeded with HSJD-DIPG-007 or HSJD-DIPG-012 cells at 10,000 cells/µL density. Twenty-four hours post-seeding, DoCs were disassembled and matrices cut using a 0.8 cm punch to separately collect their peripheral and central zones, placed in 500 µL of Trizol (Invitrogen, 15596-026). RNAs were extracted through a phenol/chloroform isolation and their quality checked with an RNA NanoChip (Agilent Technologies). Only samples with a RIN (RNA Integrity Number) >8 were kept.

Starting from 4µL of total RNA we added 1µL of ERCC spike-in control. Library generation was then initiated by oligo dT priming, from total RNA (between 100 and 200 ng). The primer contained Illumina-compatible linker sequences (Read 2). After first strand synthesis the RNA was degraded and second strand synthesis was initiated by random priming and a DNA polymerase. The random primer also contained 5' Illumina-compatible linker sequences (Read 1). At this step Unique Molecular Identifiers (UMIs) were introduced allowing the elimination of PCR duplicates during the analysis. After obtaining the double-stranded cDNA library, it was purified with magnetic beads and amplified. During the library amplification, the barcodes and sequences required for cluster generation (index i7 in 3' and index i5 in 5') were introduced thanks to Illumina-compatible linker sequences. The final library was purified and deposited on High sensitivity DNA chip to be controlled on Agilent bioanalyzer 2100. The library concentration and the size distribution was checked. Each library was pooled equimolarly and the final pool was controlled on Agilent bioanalyzer 2100 and sequenced on Nova 6000 (Illumina) with 100 cycles chemistry, to obtain a minimum of 20 M reads by sample.

To eliminate poor quality regions and poly(A) of the reads, we used the *fastp* program. We used quality score threshold of 20 and removed the reads shorter than 25 pb. The read alignments were performed using the *STAR* program with the genome reference human (GRCh38) and the reference gene annotations (*Ensembl*). The UMI (Unique Molecular Index) allowed to reduce errors and quantitative PCR bias using *fastp* and *umi-tools*. Based on read alignments, we counted the number of molecules by gene using *FeatureCount*. Other programs were performed for the quality control of reads and for the workflow was *qualimap*, *fastp*, *FastQC* and *MultiQC*.

Differential Gene Expression of RNA-seq was performed with *R/Bioconductor* package *DESeq2*. The cut-off for differentially expressed genes was p-value adjusted (BH) < 0.05.

A functional analysis of GO (Gene Ontology) signatures was performed on DE genes with a fold change > 2 , with the MSigDB database thanks to ShinyGO 0.80 software [63]. The Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) tool was used to determine enrichment for defined sets of genes [64].

**Statistical analysis.**

Values are presented as the mean ± Standard Deviation. All statistical analyses were performed with GraphPad PRISM software. Student t-tests or 2-way ANOVA with adequate post-comparison tests were applied to evaluate the significance of comparisons as mentioned in each figure legend.

**Hybrid agent-based model.**

The model was an on-lattice hybrid agent-based model coded in C.language. Cells were placed on a 2D square grid following the DoC geometry. Each grid vertex represents a 20x20 µm region potentially housing one cell. Cells are represented by a set of variables, including position, oxygen consumption and cell cycle progression. Cells can divide with the daughter being randomly placed on one of the neighboring sites. Cells can migrate at a velocity of 10 µm/h [65–67]. Following the principle of the agent-based model, whether cells divide, migrate, or how much they consume is determined by a set of rules. In this simplified model, oxygen concentration completely determines the behavior, with thresholds for hypoxia impairing cell proliferation set at either 5 % or 2 % $pO_2$ in agreement with values found in the literature [68]. Oxygen consumption was reduced by 50 % whenever cells stopped proliferating and migrating due to hypoxia [69]. 2860 cells were placed randomly in a 4-mm radius area corresponding to the DoC cellular disk. The oxygen dynamics were modelled by solving the following reaction-diffusion equation with the Hill function term added to model consumption often used in hybrid agent-based models [32,70,71] :

$$\frac{d}{dt}[O] = \nabla(D\nabla \cdot [O]) + k_{max}\frac{[O]}{[O] + [O]_0}$$

The equation was solved using an explicit finite difference algorithm parallelized with OpenMP for faster solving. The model was then left to run for 48 virtual hours. A more detailed description of the model and simulation parameters for the cellular and oxygen dynamics part can be found in supplementary material.

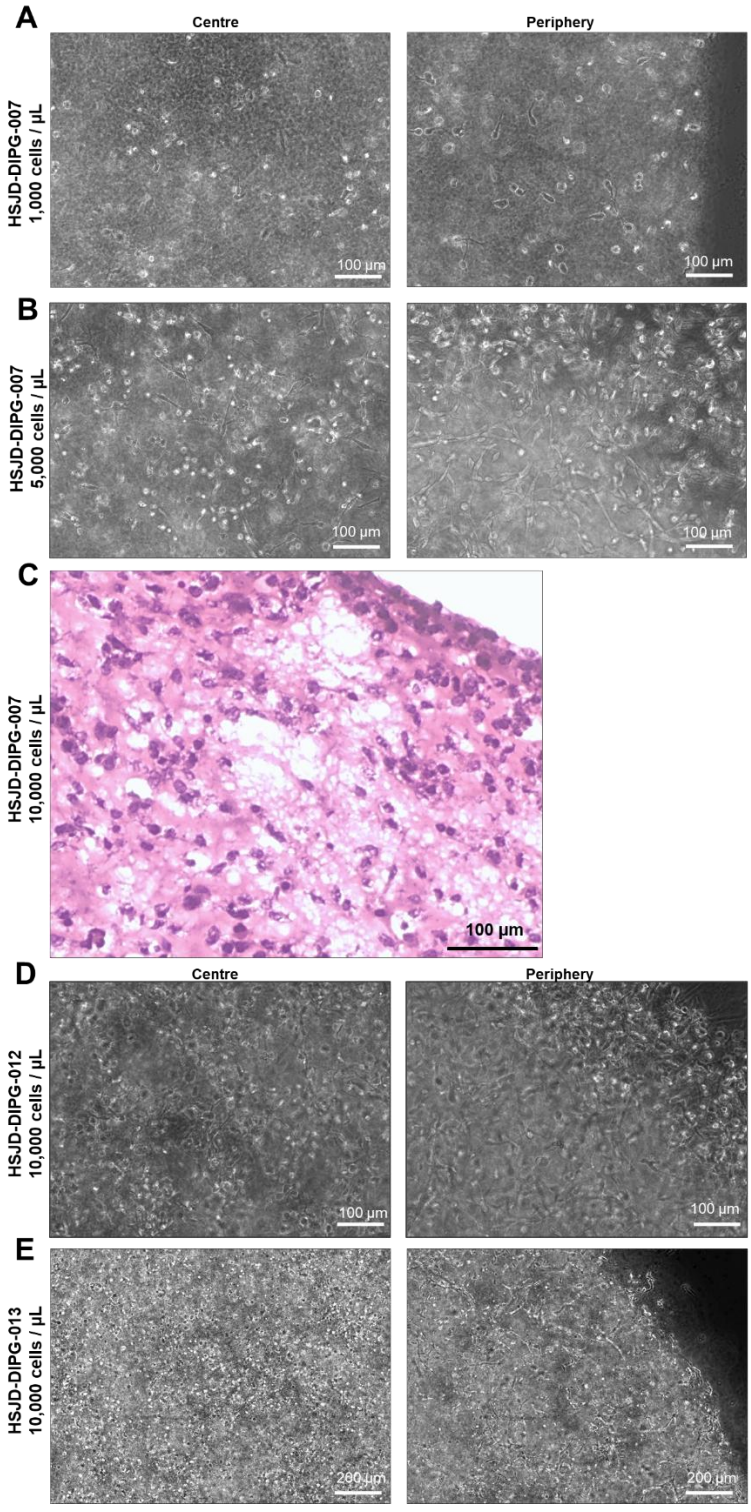
## *Bibliography*


1. Bailleul, Q. *et al.* [The art of war as applied to pediatric gliomas: Know your enemy]. *Med Sci (Paris)* **37**, 159–166 (2021).
2. Schwartzentruber, J. *et al.* Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* **482**, 226–231 (2012).
3. Wu, G. *et al.* Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat. Genet.* **44**, 251–253 (2012).
4. Lewis, P. W. *et al.* Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science* **340**, 857–861 (2013).
5. Grasso, C. S. *et al.* Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Med* **21**, 555–559 (2015).
6. Nagaraja, S. *et al.* Transcriptional Dependencies in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* **31**, 635-652.e6 (2017).
7. Monje, M. *et al.* Phase I trial of panobinostat in children with diffuse intrinsic pontine glioma: A report from the Pediatric Brain Tumor Consortium (PBTC-047). *Neuro Oncol* **25**, 2262–2272 (2023).
8. Beckers, C., Pruschy, M. & Vetrugno, I. Tumor hypoxia and radiotherapy: A major driver of resistance even for novel radiotherapy modalities. *Seminars in Cancer Biology* **98**, 19–30 (2024).
9. Chen, Z., Han, F., Du, Y., Shi, H. & Zhou, W. Hypoxic microenvironment in cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Sig Transduct Target Ther* **8**, 1–23 (2023).
10. Yeom, K. W., Lober, R. M., Nelson, M. D., Panigrahy, A. & Blüml, S. Citrate concentrations increase with hypoperfusion in pediatric diffuse intrinsic pontine glioma. *J. Neurooncol.* **122**, 383–389 (2015).
11. Blandin, A.-F. *et al.* Hypoxic Environment and Paired Hierarchical 3D and 2D Models of Pediatric H3.3-Mutated Gliomas Recreate the Patient Tumor Complexity. *Cancers (Basel)* **11**, (2019).
12. Chung, C. *et al.* Integrated Metabolic and Epigenomic Reprograming by H3K27M Mutations in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas. *Cancer Cell* **38**, 334-349.e9 (2020).
13. Jackson, E. R. *et al.* ONC201 in combination with paxalisib for the treatment of H3K27-altered diffuse midline glioma. *Cancer Res* **83**, 2421–2437 (2023).
14. Venneti, S. *et al.* Clinical Efficacy of ONC201 in H3K27M-Mutant Diffuse Midline Gliomas Is Driven by Disruption of Integrated Metabolic and Epigenetic Pathways. *Cancer Discovery* OF1–OF24 (2023) doi:10.1158/2159-8290.CD-23-0131.
15. Schlaepfer, D. D., Ojalill, M. & Stupack, D. G. Focal adhesion kinase signaling - tumor vulnerabilities and clinical opportunities. *J Cell Sci* **137**, jcs261723 (2024).
16. Paszek, M. J. *et al.* Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* **8**, 241–254 (2005).
17. Belousov, A. *et al.* The Extracellular Matrix and Biocompatible Materials in Glioblastoma Treatment. *Front Bioeng Biotechnol* **7**, 341 (2019).
18. Chen, J.-W. E., Leary, S., Barnhouse, V., Sarkaria, J. N. & Harley, B. A. C. Matrix Hyaluronic Acid and Hypoxia Influence a CD133+ Subset of Patient-Derived Glioblastoma Cells. *Tissue Eng Part A* (2021) doi:10.1089/ten.TEA.2021.0117.
19. Knott, J. C. *et al.* Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells. *Int J Cancer* **75**, 864–872 (1998).
20. Barbosa, L. C., Machado, G. C., Heringer, M. & Ferrer, V. P. Identification of established and novel extracellular matrix components in glioblastoma as targets for angiogenesis and prognosis. *Neurogenetics* **25**, 249–262 (2024).
21. Sinha, S. *et al.* Laminin-associated integrins mediate Diffuse Intrinsic Pontine Glioma infiltration and therapy response within a neural assembloid model. *Acta Neuropathol Commun* **12**, 71 (2024).
22. Gil, J. F., Moura, C. S., Silverio, V., Gonçalves, G. & Santos, H. A. Cancer Models on Chip: Paving the Way to Large-Scale Trial Applications. *Advanced Materials* **35**, 2300692 (2023).
23. Chen, M. *et al.* Mimicking Tumor Metastasis Using a Transwell-Integrated Organoids-On-a-Chip Platform. *Small* **20**, 2308525 (2024).
24. Terrassoux, L., Claux, H., Bacari, S., Meignan, S. & Furlan, A. A Bloody Conspiracy- Blood Vessels and Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)* **14**, 4581 (2022).
25. Kim, M. *et al.* Micro-engineering and nano-engineering approaches to investigate tumour ecosystems. *Nat Rev Cancer* **23**, 581–599 (2023).
26. Yi, H.-G. *et al.* A bioprinted human-glioblastoma-on-a-chip for the identification of patient-specific responses to chemoradiotherapy. *Nat Biomed Eng* **3**, 509–519 (2019).
27. Hofmann, J. *et al.* Ratiometric luminescence 2D in vivo imaging and monitoring of mouse skin oxygenation. *Methods Appl Fluoresc* **1**, 045002 (2013).
28. Schreml, S. *et al.* 2D luminescence imaging of pH in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2432–2437 (2011).
29. Shen, H. *et al.* Targeting reduced mitochondrial DNA quantity as a therapeutic approach in pediatric high-grade gliomas. *Neuro Oncol* **22**, 139–151 (2020).
30. Rodgers, Z. B., Detre, J. A. & Wehrli, F. W. MRI-based methods for quantification of the cerebral metabolic rate of oxygen. *J Cereb Blood Flow Metab* **36**, 1165–1185 (2016).
31. Ruas, J. S., Siqueira-Santos, E. S., Rodrigues-Silva, E. & Castilho, R. F. High glycolytic activity of tumor cells leads to underestimation of electron transport system capacity when mitochondrial ATP synthase is inhibited. *Sci Rep* **8**, 17383 (2018).

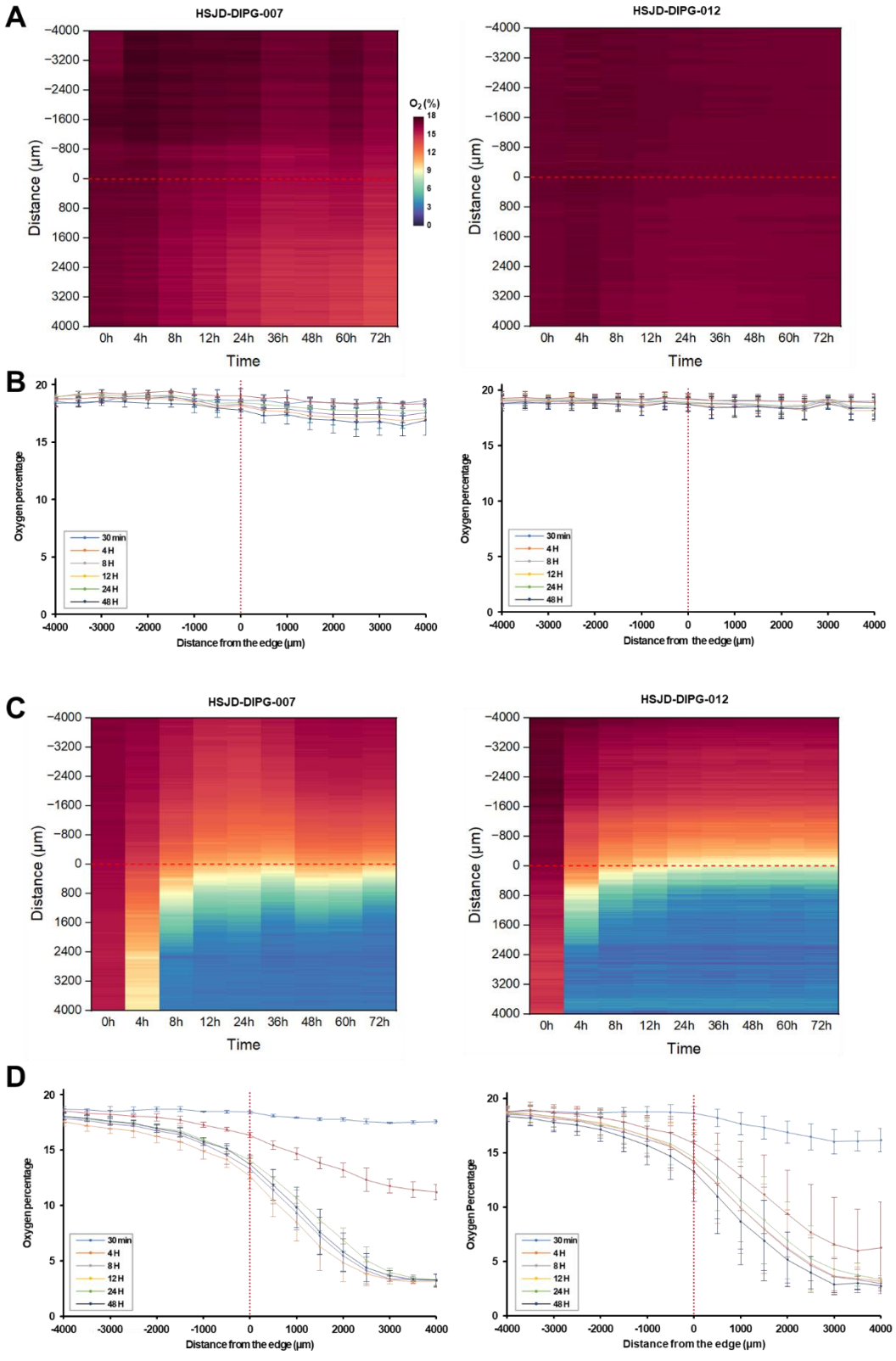
32. Mao, X. *et al.* An agent-based model for drug-radiation interactions in the tumour microenvironment: Hypoxia-activated prodrug SN30000 in multicellular tumour spheroids. *PLOS Computational Biology* **14**, e1006469 (2018).
33. Markov, D. A., Lillie, E. M., Garbett, S. P. & McCawley, L. J. Variation in diffusion of gases through PDMS due to plasma surface treatment and storage conditions. *Biomed Microdevices* **16**, 91–96 (2014).
34. Dolega, M. E. *et al.* Cell-like pressure sensors reveal increase of mechanical stress towards the core of multicellular spheroids under compression. *Nat Commun* **8**, 14056 (2017).
35. Böckelmann, L. *et al.* Detection of doxorubicin, cisplatin and therapeutic antibodies in formalin-fixed paraffin-embedded human cancer cells. *Histochem Cell Biol* **153**, 367–377 (2020).
36. Monje, M. *et al.* Intravenous and intracranial GD2-CAR T cells for H3K27M+ diffuse midline gliomas. *Nature* 1–8 (2024) doi:10.1038/s41586-024-08171-9.
37. Mackay, A. *et al.* Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* **32**, 520-537.e5 (2017).
38. Rakotomalala, A. *et al.* H3.3K27M Mutation Controls Cell Growth and Resistance to Therapies in Pediatric Glioma Cell Lines. *Cancers (Basel)* **13**, 5551 (2021).
39. Andrade, A. F., Chen, C. C. L. & Jabado, N. Oncohistones in brain tumors: the soil and seed. *Trends Cancer* S2405-8033(23)00026–2 (2023) doi:10.1016/j.trecan.2023.02.003.
40. Dolega *et al.* Extracellular matrix in multicellular aggregates acts as a pressure sensor controlling cell proliferation and motility. *Elife* **10**, e63258 (2021).
41. McIlvain, G. *et al.* Mechanical properties of pediatric low-grade gliomas in children with and without neurofibromatosis type 1. *Neuroradiology* **66**, 2301–2311 (2024).
42. Blancke Soares, A. *et al.* High-resolution spatiotemporal pHe and pO2 imaging in head and neck and oesophageal carcinoma cells. *Cancer Metab* **9**, 21 (2021).
43. Wenger, R. H., Kurtcuoglu, V., Scholz, C. C., Marti, H. H. & Hoogewijs, D. Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia (Auckl)* **3**, 35–43 (2015).
44. Shen, H. *et al.* Inhibition of Mitochondrial Bioenergetics and Hypoxia to Radiosensitize Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Neuro-Oncology* noae255 (2024) doi:10.1093/neuonc/noae255.
45. Voskuil, F. J. *et al.* Exploiting metabolic acidosis in solid cancers using a tumor-agnostic pH-activatable nanoprobe for fluorescence-guided surgery. *Nat Commun* **11**, 3257 (2020).
46. Werbrouck, C. *et al.* TP53 Pathway Alterations Drive Radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG). *Clin. Cancer Res.* **25**, 6788–6800 (2019).
47. Di Carlo, D. *et al.* Real life data of ONC201 (dordaviprone) in pediatric and adult H3K27-altered recurrent diffuse midline glioma: Results of an international academia-driven compassionate use program. *Eur J Cancer* **216**, 115165 (2025).
48. Lovibond, S., Gewirtz, A. N., Pasquini, L., Krebs, S. & Graham, M. S. The promise of metabolic imaging in diffuse midline glioma. *Neoplasia* **39**, 100896 (2023).
49. Rakotomalala, A., Escande, A., Furlan, A., Meignan, S. & Lartigau, E. Hypoxia in Solid Tumors: How Low Oxygenation Impacts the “Six Rs” of Radiotherapy. *Frontiers in Endocrinology* **12**, 1084 (2021).
50. Gaggero, S. *et al.* IL-2 is inactivated by the acidic pH environment of tumors enabling engineering of a pH-selective mutein. *Science Immunology* **7**, eade5686 (2022).
51. Rao, D. *et al.* Acidity-mediated induction of FoxP3+ regulatory T cells. *European Journal of Immunology* **53**, 2250258 (2023).
52. Ding, Y. *et al.* Construction of pH-Sensitive Nanovaccines Encapsulating Tumor Cell Lysates and Immune Adjuvants for Breast Cancer Therapy. *Small* **19**, 2301420 (2023).
53. Liu, I. *et al.* The landscape of tumor cell states and spatial organization in H3-K27M mutant diffuse midline glioma across age and location. *Nat Genet* **54**, 1881–1894 (2022).
54. Andrade, A. F. *et al.* Immune landscape of oncohistone-mutant gliomas reveals diverse myeloid populations and tumor-promoting function. *Nat Commun* **15**, 7769 (2024).
55. Ausejo-Mauleon, I. *et al.* TIM-3 blockade in diffuse intrinsic pontine glioma models promotes tumor regression and antitumor immune memory. *Cancer Cell* S1535610823003185 (2023) doi:10.1016/j.ccell.2023.09.001.
56. Majzner, R. G. *et al.* GD2-CAR T cell therapy for H3K27M-mutated diffuse midline gliomas. *Nature* **603**, 934–941 (2022).
57. Sarnow, K. *et al.* Neuroimmune-competent human brain organoid model of Diffuse Midline Glioma. *Neuro-Oncology* noae245 (2024) doi:10.1093/neuonc/noae245.
58. Barron, T. *et al.* GABAergic neuron-to-glioma synapses in diffuse midline gliomas. *Nature* (2025) doi:10.1038/s41586-024-08579-3.
59. Chaves, C. *et al.* Characterization of the Blood–Brain Barrier Integrity and the Brain Transport of SN-38 in an Orthotopic Xenograft Rat Model of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Pharmaceutics* **12**, 399 (2020).
60. Deligne, C. *et al.* Development of a human in vitro blood-brain tumor barrier model of diffuse intrinsic pontine glioma to better understand the chemoresistance. *Fluids Barriers CNS* **17**, 37 (2020).
61. Ershov, D. *et al.* TrackMate 7: integrating state-of-the-art segmentation algorithms into tracking pipelines. *Nat Methods* **19**, 829–832 (2022).
62. Haase, R. *et al.* haesleinhuepf/BioImageAnalysisNotebooks: gpt-2024.1.6. Zenodo https://doi.org/10.5281/zenodo.10465773 (2024).
63. Ge, S. X., Jung, D. & Yao, R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics* **36**, 2628–2629 (2020).
64. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles.

*Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 15545–15550 (2005).
65. Demuth, T. *et al.* Migratory activity of human glioma cell lines in vitro assessed by continuous single cell observation. *Clin Exp Metastasis* **18**, 589–597 (2000).
66. Friedl, P. & Wolf, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**, 362–374 (2003).
67. Sengul, E. & Elitas, M. Long-term migratory velocity measurements of single glioma cells using microfluidics. *Analyst* **146**, 5143–5149 (2021).
68. McKeown, S. R. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response. *British Journal of Radiology* **87**, 20130676 (2014).
69. Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L. & Denko, N. C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* **3**, 187–197 (2006).
70. Bull, J. A., Mech, F., Quaiser, T., Waters, S. L. & Byrne, H. M. Mathematical modelling reveals cellular dynamics within tumour spheroids. *PLOS Computational Biology* **16**, e1007961 (2020).
71. Jagiella, N., Müller, B., Müller, M., Vignon-Clementel, I. E. & Drasdo, D. Inferring Growth Control Mechanisms in Growing Multi-cellular Spheroids of NSCLC Cells from Spatial-Temporal Image Data. *PLOS Computational Biology* **12**, e1004412 (2016).

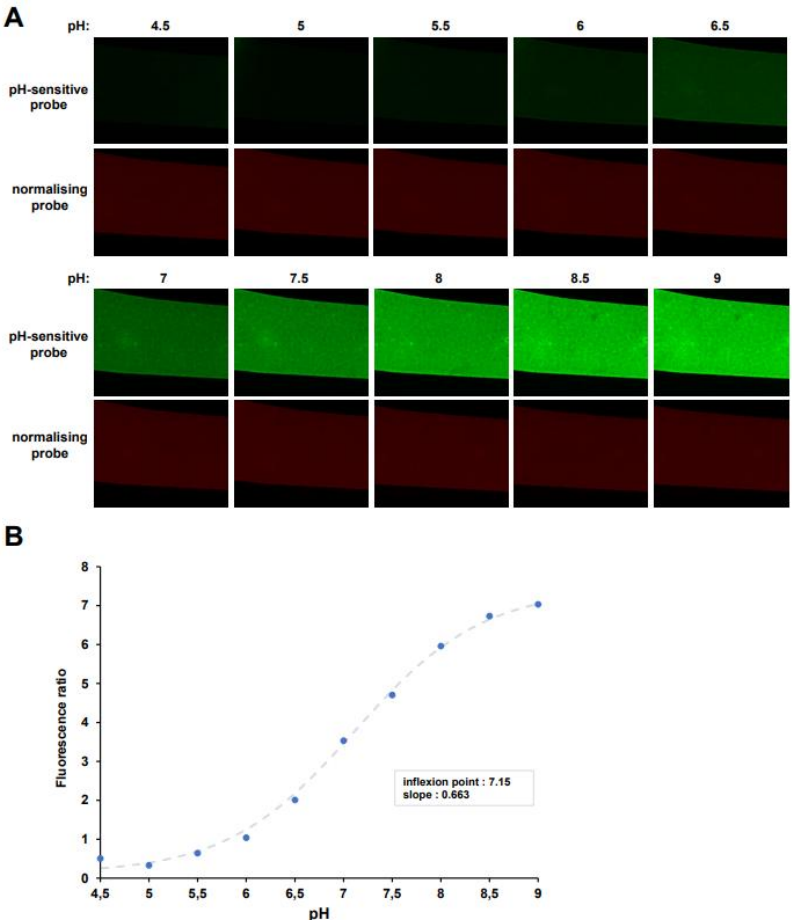
## *Supplemental material*



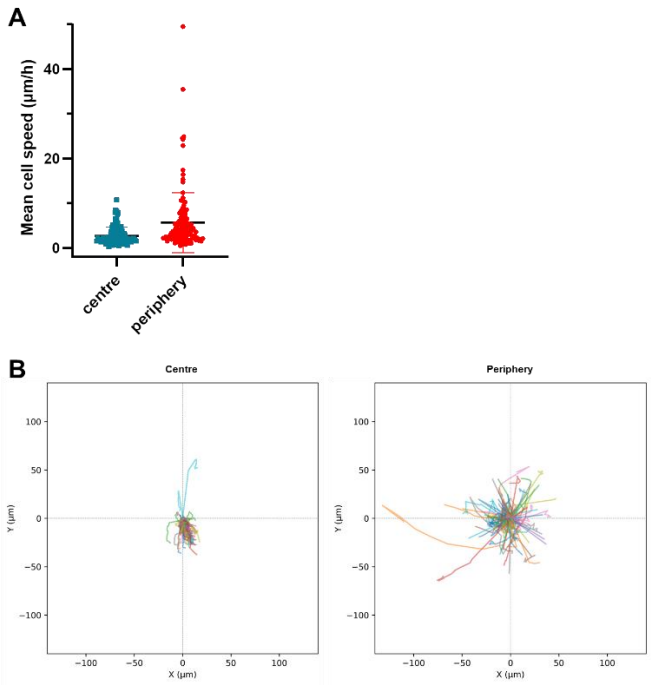

**Suppl. Figure 1. Cell morphology and density analysis**
A. Phase contrast pictures of HSJD-DIPG-007 cells cultured in the DoC model 48 hours post-seeding at a density of 1,000 cells per µL, in the DoC centre (left panel) or the periphery (right panel). B. Phase contrast pictures of HSJD-DIPG-007 cells cultured in the DoC model 48 hours post-seeding at a density of 5,000 cells per µL, in the DoC centre (left panel) or the periphery (right panel). C. Hematoxylin and eosin staining of a DoC cryosection. The DoC was initially seeded with 10,000 HSJD-DIPG-007 cells per µL. D. Phase contrast pictures of HSJD-DIPG-012 cells cultured in the DoC model 48 hours post-seeding at a density of 10,000 cells per µL, in the DoC centre (left panel) or the periphery (right panel). E. Phase contrast pictures of HSJD-DIPG-013 cells cultured in the DoC model 48 hours post-seeding at a density of 10,000 cells per µL, in the DoC centre (left panel) or the periphery (right panel).



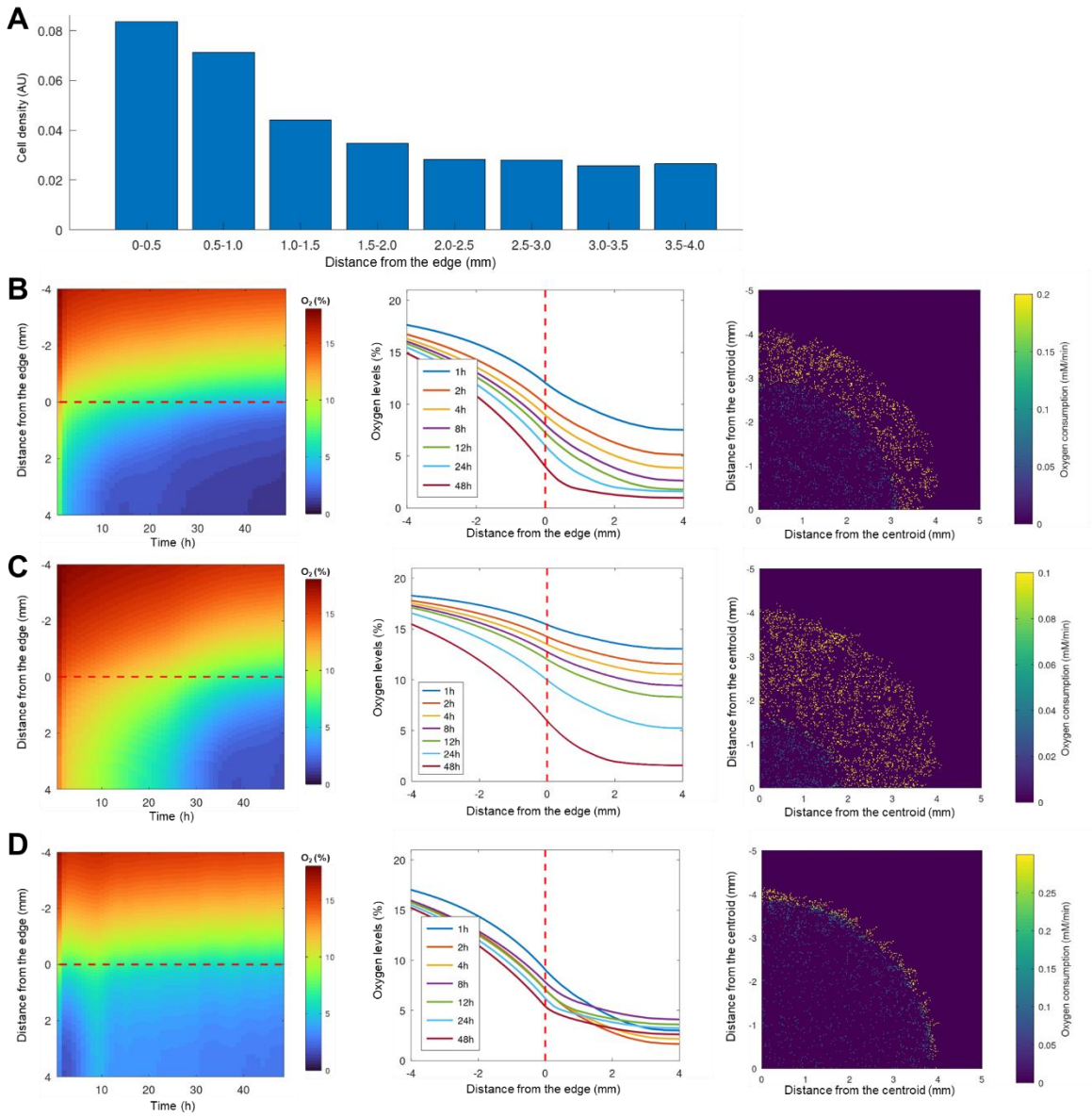

**Suppl. Figure 2. Physical characterisation of oxygen levels within the DoC.**
A. and B. Heatmap (A) and graph (B) of oxygen level distribution and evolution over time in the DoC seeded with 1,000 HSJD-DIPG-007 (left panel) or HSJD-DIPG-012 (right panel) cells per µL. The distance 0 µm (red dashed lines) corresponds to the edge of the matrix, and negative and positive distances, respectively, correspond to the external gutter and the cell-loaded matrix. C. and D. Heatmap (C) and graph (D) of oxygen level distribution and evolution over time in the DoC seeded with 5,000 HSJD-DIPG-007 (left panel) or HSJD-DIPG-012 (right panel) cells per µL. The distance 0 µm (red dashed lines) corresponds to the edge of the matrix, negative and positive distances respectively correspond to the external gutter and the cell-loaded matrix.



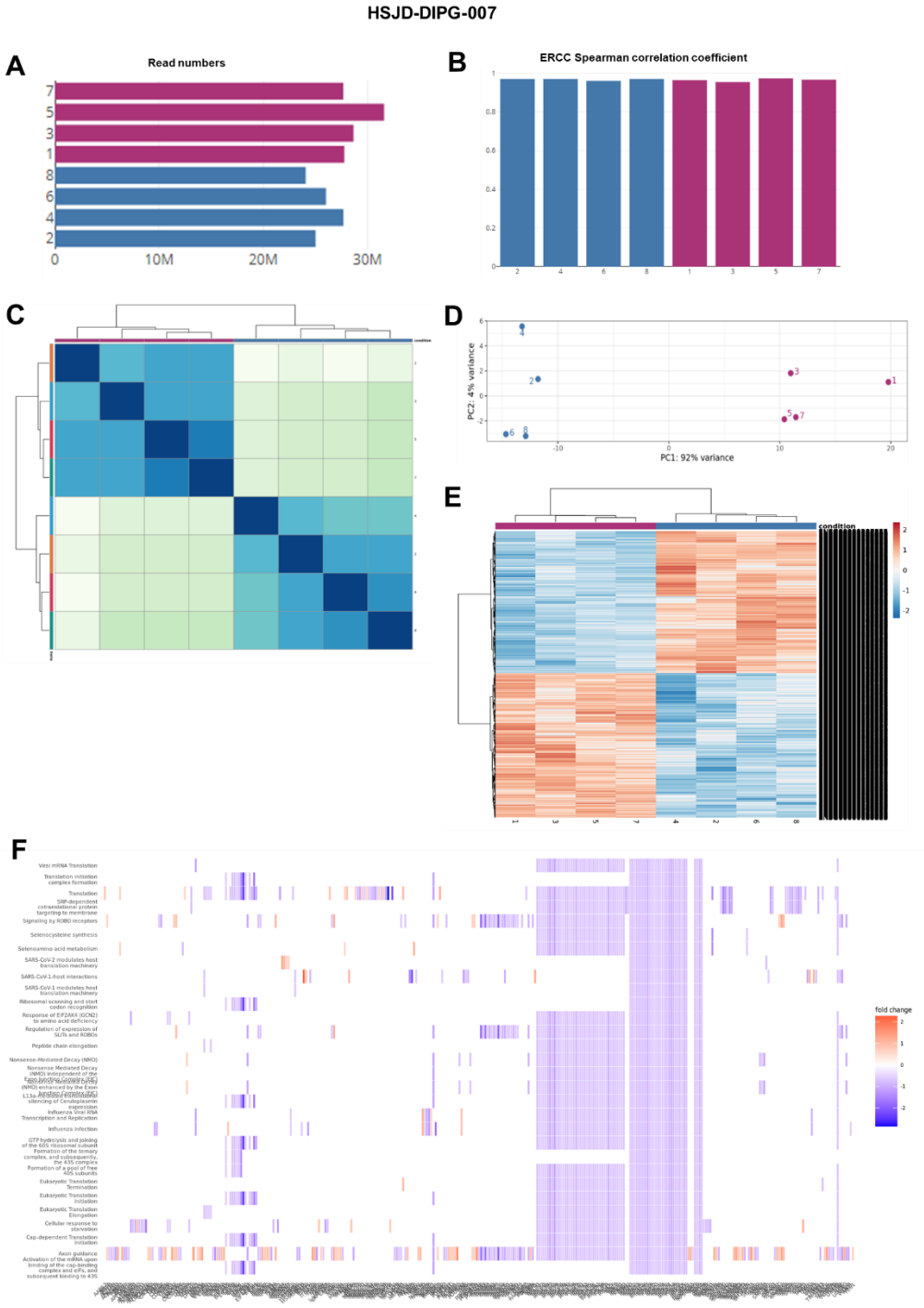

**Suppl. Figure 3. Calibration of Presens pH-sensitive foils.**
A. The sensor foils were imaged in solutions with defined pH, from 4.5 to 9. B. Fluorescence ratios were reported as a function of pH, and the calibration curve was fitted with a sigmoid function.



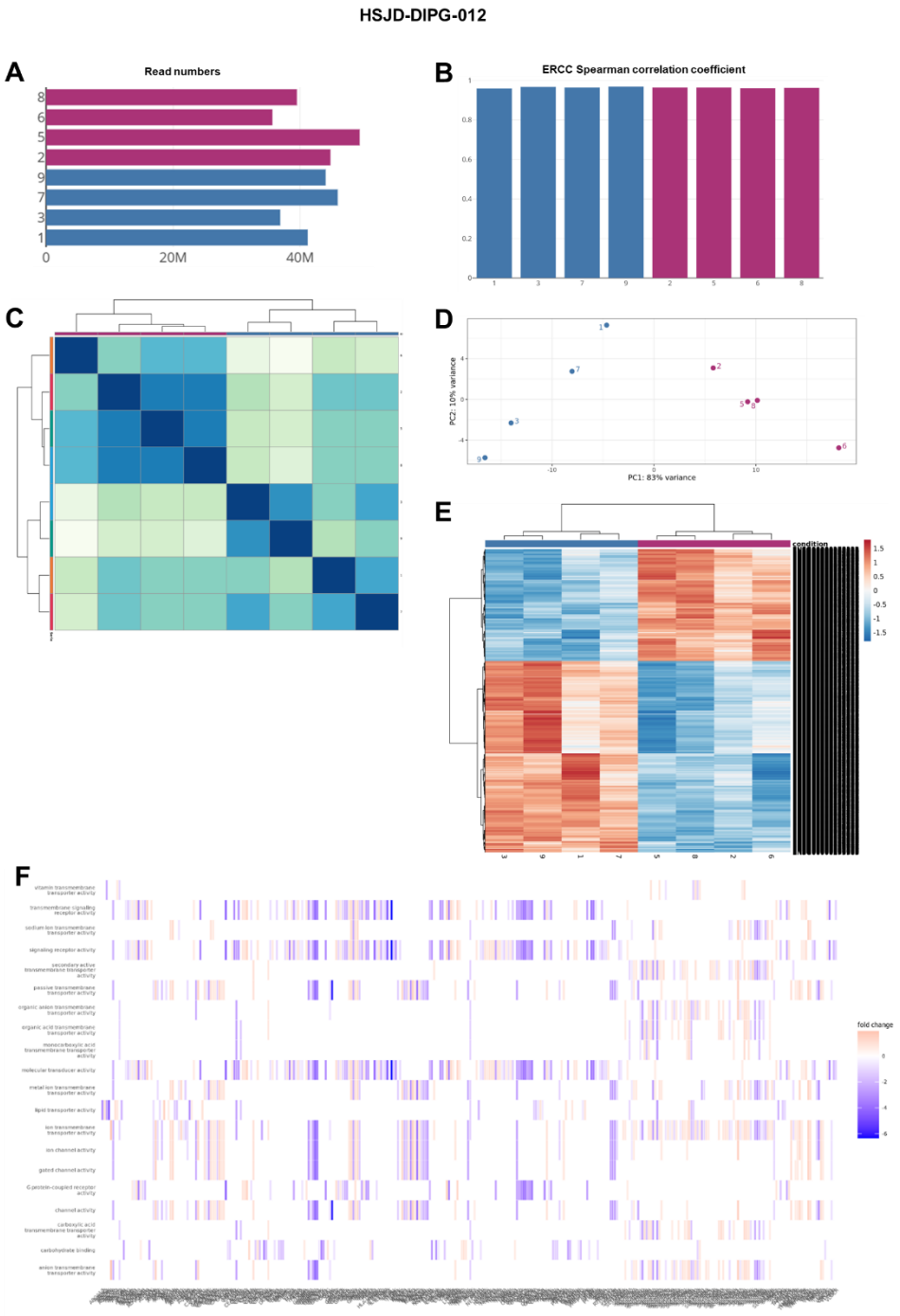

**Suppl. Figure 4. Cell tracking.**
A. The mean speed (in µm/h) of individual cells was monitored over 24 hours after cell tracking. B. Plots representing the individual cell tracks at the DoC centre (left panel) or periphery (right panel).



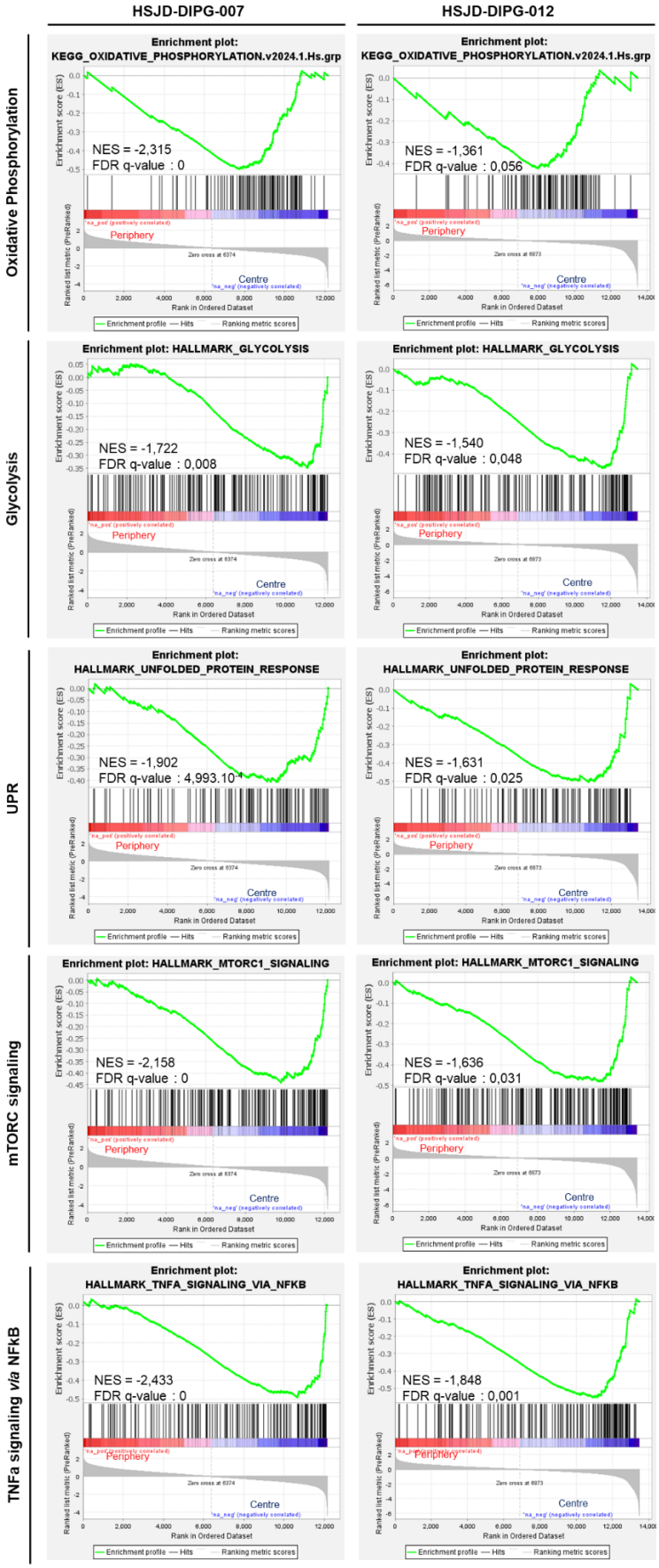

**Suppl. Figure 5. Computational modelling.**
A. Quantification of the cell density in the virtual DoC along its radius as a function of the distance from the border. B, C and D. Heatmaps (left panels) and graphs (middle panels) of oxygen level distribution and evolution over time in the DoC computational simulation. Negative and positive distances respectively correspond to the external gutter and the cell-loaded matrix. Maps (right panels) of oxygen consumption by individual cells in the computational simulation, highlighting in yellow the cell state compatible with proliferation. The position (in mm) indicates the distance from the DoC centroid. B configuration corresponds to $p_{lim}0_2$ =2% and $0_2$ consumption = 2 mM/min. C configuration corresponds to $p_{lim}0_2$ =5% and $0_2$ consumption = 1 mM/min. D configuration corresponds to $p_{lim}0_2$ =5% and $0_2$ consumption = 3 mM/min.



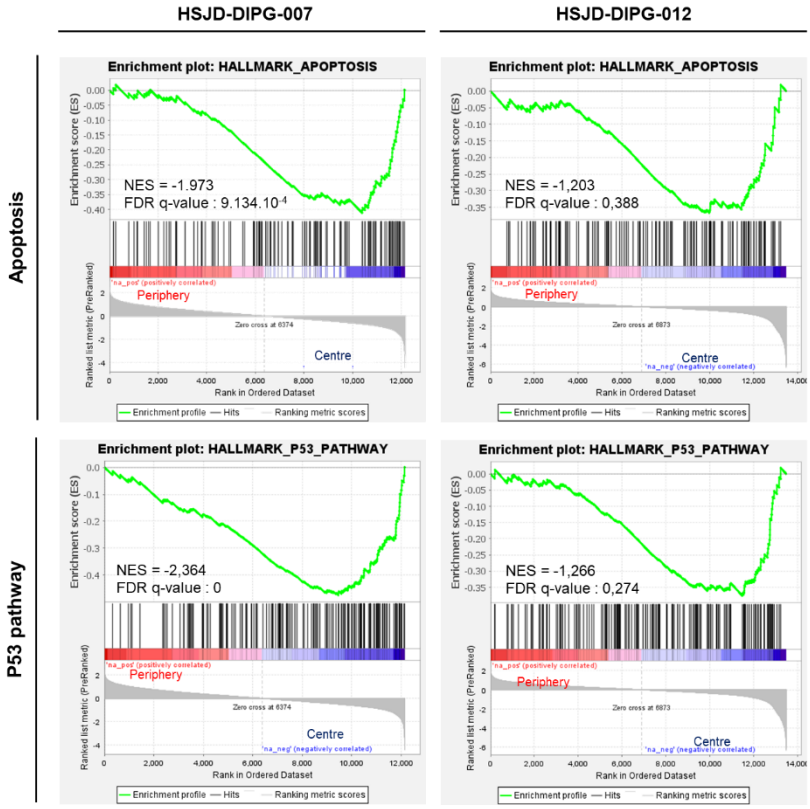

**Suppl. Figure 6. RNA seq analysis of HSJD-DIPG-007 DoC.**
A. Number of reads in individual samples isolated from centres and peripheries of DoCs. B. Spearman correlation coefficients were calculated between theoretical and measured ERCC (External RNA Controls Consortium) counts. C, D and E. Unsupervised hierarchical clustering (C), Principal Component Analysis (D) and Differentially Expressed gene heatmaps (E) all evidence clustering of peripheral and central samples. F. Heatplot of DE genes, displaying the main Gene Ontology molecular functions identified.



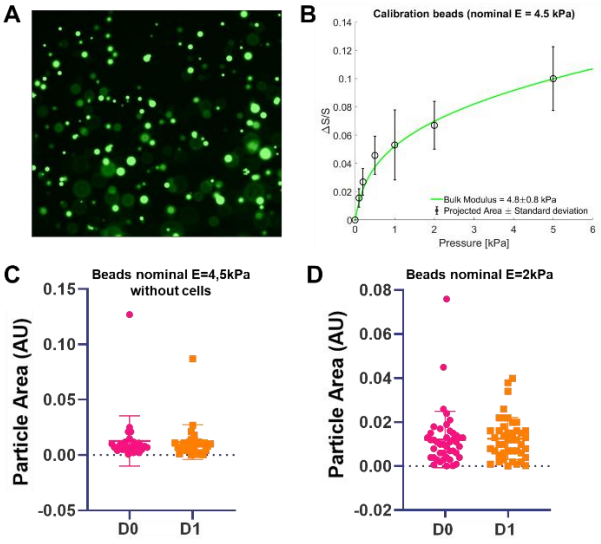

**Suppl. Figure 7. RNA seq analysis of HSJD-DIPG-012 DoC.**
A. Number of reads in individual samples isolated from centres and peripheries of DoCs. B. Spearman correlation coefficients were calculated between theoretical and measured ERCC (External RNA Controls Consortium) counts. C, D and E. Unsupervised hierarchical clustering (C), Principal Component Analysis (D) and Differentially Expressed gene heatmaps (E) all evidence clustering of peripheral and central samples. F. Heatplot of DE genes, displaying the main Gene Ontology molecular functions identified.



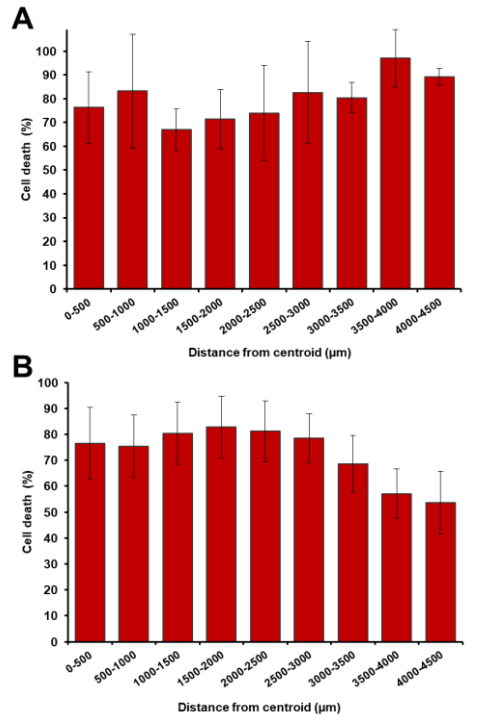

**Suppl. Figure 8. GSEA signatures altered in both HSJD-DIPG-007 and HSJD-DIPG-012 DoCs.**
Enrichment plots are provided, with NES (Normalized Enrichment Scores) and FDR q-values.



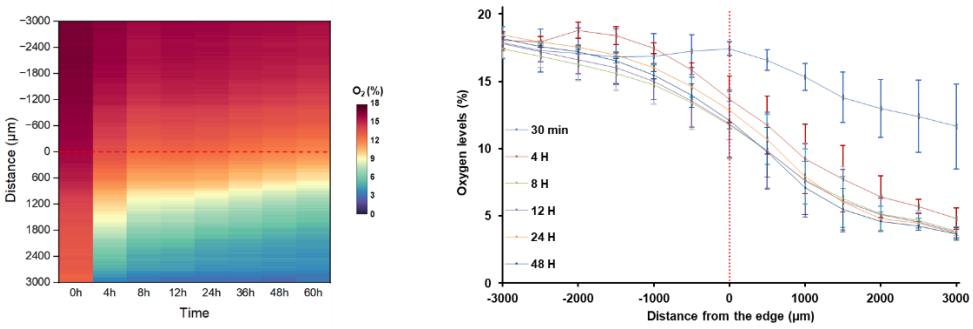

**Suppl. Figure 9. GSEA signatures differentially altered in HSJD-DIPG-007 and HSJD-DIPG-012 DoCs.**
Enrichment plots are provided, with NES (Normalized Enrichment Scores) and FDR q-values.




**Suppl. Figure 10. Assessment of compressive forces**
A. Picture of FITC-loaded polyacrylamide beads in solution. B. Calibration curve of beads with a nominal elastic modulus of 4.5 kPa. C. Evolution of beads ($E_n$=4.5 kPa) surface between D0 and D1, in an acellular DoC. D. Evolution of beads ($E_n$=2 kPa) surface between D0 and D1, in a DoC seeded with 10,000 HSJD-DIPG-007 cells per µL.




**Suppl. Figure 11. Assessment of staurosporine-induced cell death of HSJD-DIPG-007 and HSJD-DIPG-012 DoCs**
A and B. Quantification of the percentage of dead cells as a function of the distance from the centroid of DoCs loaded with HSJD-DIPG-007 (A) or HSJD-DIPG-012 (B) cells, in response to 1 µM staurosporine.




**Suppl. Figure 12. Physical characterisation of oxygen levels within the patient-derived DoC.**
Heatmap and graph of oxygen level distribution and evolution over time in the DoC seeded with 1,000 patient-derived cells per µL. The distance 0 µm (red dashed lines) corresponds to the edge of the matrix, and negative and positive distances, respectively, correspond to the external gutter and the cell-loaded matrix.

**Suppl. Movie 1. DoC assembly.**

Main steps of cell/hydrogel pouring and DoC assembly are displayed.

**Suppl. Movie 2. 3D segmentation of proliferative cells.**

This video illustrates the 3D segmentation performed with Imaris 10.2 on the z-stack acquisition, to identify all cells (Hoechst staining) and proliferative cells (EdU/AlexaFluor488 staining).

# IX. Intégration microfluidique du modèle de BHE

La barrière hémato-encéphalique possédant un rôle majeur dans la protection du SNC des molécules exogènes et étant un obstacle majeur à la diffusion des composés pharmacologiques vers le site tumoral, l'un de nos objectifs initiaux étaient l'intégration d'un modèle de BHE. Ce modèle de BHE pleinement caractérisé et breveté est développé par la Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique de Lens (LBHE) et est composé de cellules endothéliales humaines et de péricytes humains.

Pour son utilisation avec notre DMG-sur-puce, l'un des enjeux majeurs était la mise en place d'un circuit microfluidique permettant leur interconnexion (Figure 31).

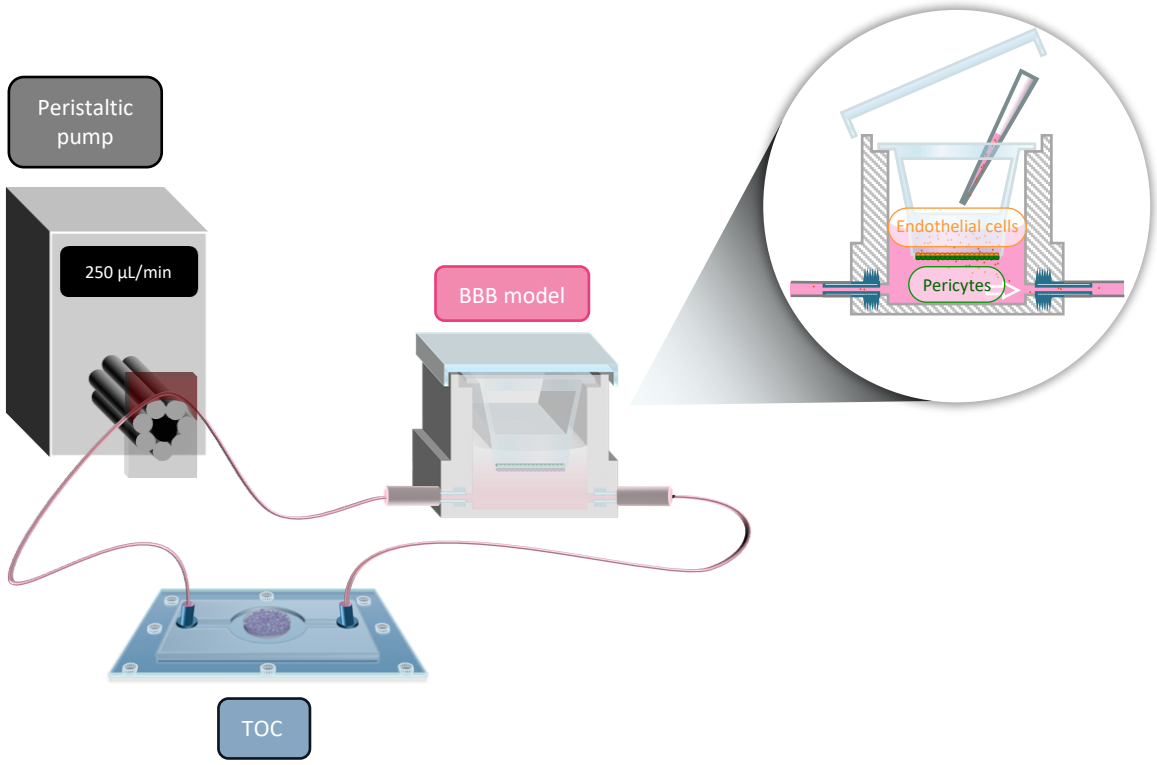



**Figure 31 : Intégration du modèle de BHE au sein du circuit microfluidique.**
Représentation du schéma microfluidique permettant la connexion entre la tumeur-sur-puce et le modèle de BHE développé par le LBHE.

## A. Mise en place du circuit microfluidique

Afin de réaliser la connexion entre le modèle de BHE et la TSP et de permettre un échange paracrine dynamique entre ces deux compartiments, un circuit microfluidique a été mis en place avec le Dr. Anthony TREIZEBRE. Celui-ci est composé d'une pompe péristaltique, couplée à des tubulures en silicone ayant un coating en platinium limitant l'absorption des composants pharmacologiques. Le fonctionnement d'une pompe péristaltique repose sur la présence d'un rotor entouré de galets

exerçant une pression sur les tubulures pour permettre l'avancement du fluide contenu dans ces dernières.

L'objectif de ce circuit microfluidique étant de permettre une communication dynamique entre les 2 compartiments cellulaires, le flux ne devait pas induire de shear-stress, tant au niveau des cellules endothéliales et péricytes, qu'au niveau des cellules de DMG situées en périphérie de la matrice. En ce sens, un flux de 250 µL/min maximal a été retenu puisqu'induisant un shear stress calculé à 3,40 x $10^{-3}$ dyn/cm$^2$ dans le puit de la BHE et à 0,22 dyn/cm$^2$ dans la gouttière de la puce. Comparativement, le shear stress estimé au niveau des capillaires sanguins étant de 0,01 dyn/cm$^2$ à 130 dyn/cm$^2$(Hossain et al., 2023) nous avons estimé cette valeur de flux comme n'induisant pas un shear-stress notable.

Afin de s'assurer de la stabilité du flux au sein du circuit microfluidique au cours du temps, nous avons utilisé un Flow Sensor unit (Fluigent) placé entre la TSP et le modèle de BHE (Figure 32).

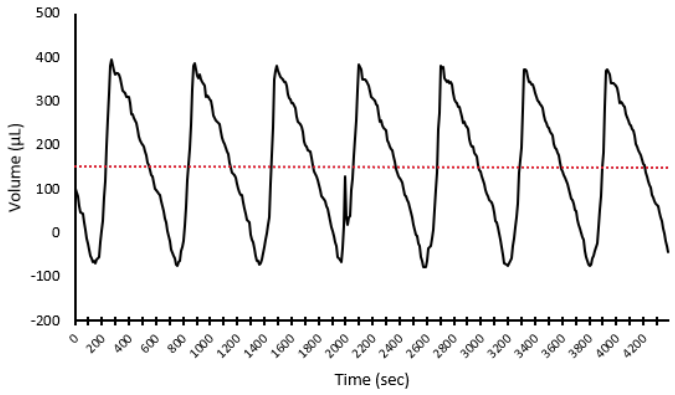



**Figure 32 : Mesure du débit microfluidique.**
Graphique représentant la mesure du débit au sein du circuit microfluidique avec un Flow Sensor. En rouge est représentée une courbe de tendance linéaire.

Le graphique obtenu montre un aspect sinusoïdal qui peut sembler surprenant de par une amplitude importante, avec des valeurs minimales négatives qui indiqueraient un léger reflux, ainsi qu'un débit moyen (ligne rouge en pointillés), certes constant, mais d'une valeur avoisinant 150 µL/min pour une consigne fixée à 250 µL/min.

Ce profil peut s'expliquer par le principe de fonctionnement d'une pompe péristaltique (écrasement intermitent de la tubulure par des galets) ainsi que par un flux hydrodynamique peu résistif inhérent à un faible débit s'ajoutant à un diamètre de tubulures de taille relativement importante.

Finalement, le débit choisi permet d'avoir un rafrîichissement du milieu au sein du circuit microfluidique tout en limitant le shear-stress au niveau des cellules.

## B. Caractérisation préliminaire du taux d'oxygène en condition dite « en flux »

Afin de déterminer si le flux au sein de la tumeur-sur-puce impact la mise en place du gradient d'$O_2$ caractérisé en conditions statiques, les feuillets Presens ont été utilisés de la même façon dans le modèle de TSP en flux. En effet, le renouvellement du milieu au sein de la gouttière pourrait impacter la mise en place du gradient d'oxygène précédemment observé au sein des puces statiques en favorisant l'oxygène au sein de la matrice. Pour ce faire, des matrices ensemencées avec des cellules HSJD-DIPG-007 à 10 000 cellules/µL ont été réalisées et connectées au circuit microfluidique (Figure 33).

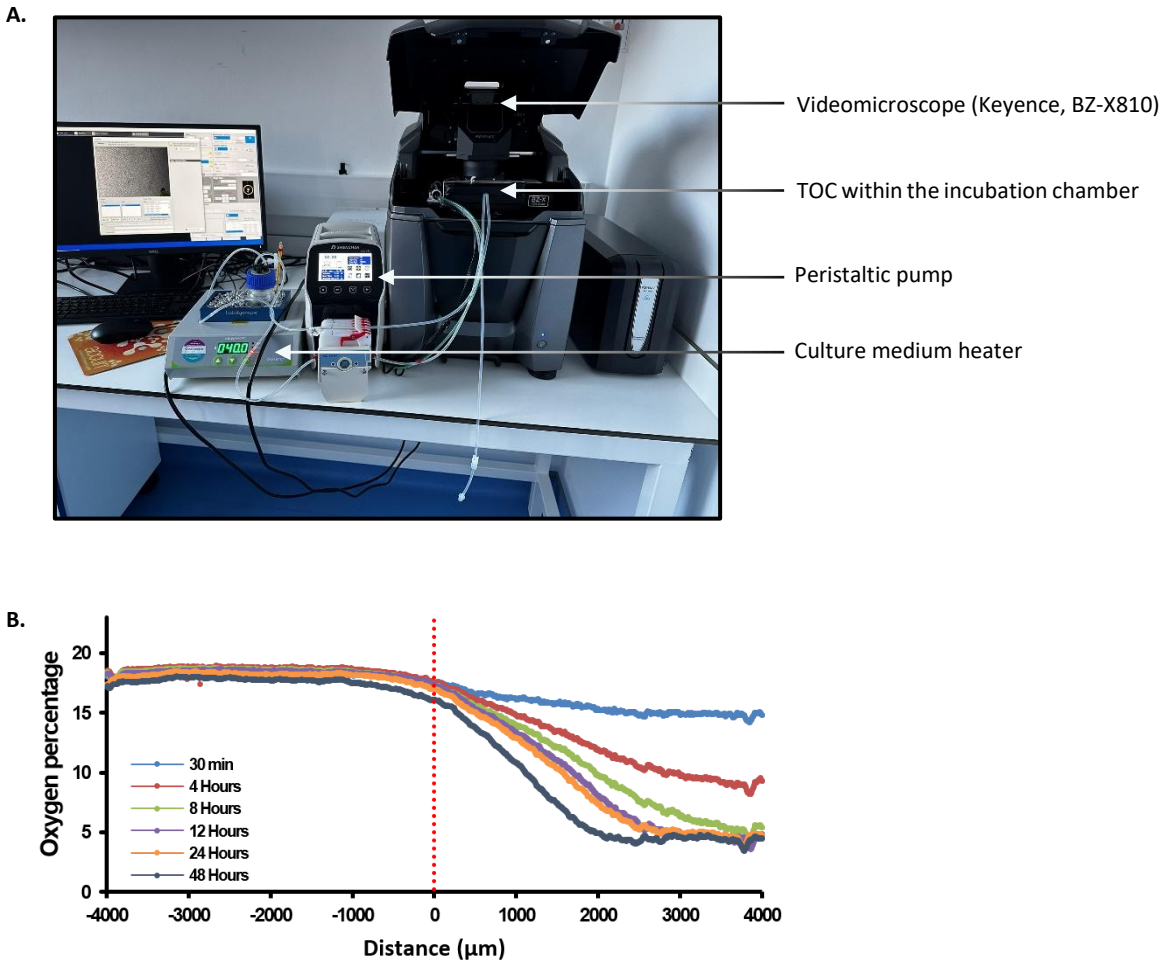



**Figure 33 : Mesure du taux d'oxygène au sein d'une TSP en flux.**
**A.** Photographie du circuit microfluidique. Ce dernier est composé d'une pompe péristaltique assurant la circulation des 10 mL de milieu de culture avec un débit de 150 µL/min. Le milieu de culture est placé dans un bain sec pour assurer sa température à 37°C. La tumeur-sur-puce est placée au sein de la chambre d'incubation du Keyence à 37°C. **B.** Graphique représentant le pourcentage en oxygène en fonction de la distance pour une TSP ensemencée avec les cellules HSJD-DIPG-007 à 10 000 cellules/µL. La distance 0 µm correspond au bord de la matrice, les valeurs négatives représentent les mesures de pourcentage d'$O_2$ dans la gouttière et les valeurs positives dans la matrice.

A titre préliminaire, il semblerait que la présence d'un flux circulant en périphérie de la matrice permet de limiter l'appauvrissement en oxygène dans la gouttière. En effet, le taux d'$O_2$ dans la

gouttière (valeurs de distance < 0) ne descend pas en dessous de 16 %, alors qu'en condition dite « statique » celui-ci était compris dans un intervalle allant de 11 à 19 % pour une matrice cellularisée équivalente (10 000 cellules HSJD-DIPG-007/µL).

Ce flux ne semble toutefois que peu impacter la mise en place du gradient d'oxygène au sein de la matrice. En effet, de manière similaire à la condition statique, le taux d'oxygène au centre de la matrice atteint graduellement une valeur de 4 % 8 heures après ensemencement des cellules au sein de la matrice. Dès 12 heures, ce gradient d'oxygène semble se stabiliser avec 16 % d'oxygène en périphérie de la matrice et approximativement 4 % au centre. Ainsi, la présence du flux permettrait un renouvellement de l'oxygène au sein de la gouttière tout en maintenant le gradient d'oxygène au sein de la puce.

### C. Impact du flux sur la perméabilité de la BHE

Afin de s'assurer de l'intégrité des modèles BHE au sein du circuit microfluidique, des tests de perméabilité ont été réalisés. Ce test au niveau des cellules endothéliales est réalisé par la mesure de la quantité de Lucifer Yellow passant du compartiment supérieur au compartiment inférieur. Cette mesure permet alors de calculer le coefficient de perméabilité des cellules endothéliales. Ces tests ont été effectués sur des BHE en condition dite statique, ou dans les conditions de flux précédemment établies.

Suite à ces mesures préliminaires, il semblerait que le flux n'ait pas un impact critique sur la perméabilité des cellules endothéliales. En flux, la valeur du Pe attient 1,02 cm/min contre 0,69 cm/min en statique, le modèle de BHE étant considéré comme fonctionnel pour un Pe ≤ 1 pour justifier une perméabilité des cellules endothéliales satisfaisante (Cecchelli et al., 1999).

Toutefois, la connexion du modèle de BHE avec notre TSP est encore sujet à mise au point du fait de fuites et de contaminations récurrentes au sein du circuit microfluidique.

# Discussion

Ces cinquante dernières années, le traitement des DMG n'a que peu évolué, et ce, malgré des avancées majeures dans la connaissance de ces tumeurs avec notamment la découverte des mutations H3 K27M par les équipes des Dr. JABADO et BAKER en 2012 (Schwartzentruber et al., 2012; Wu et al., 2012). En effet, bien que de nombreuses stratégies thérapeutiques aient démontré des effets prometteurs en modèles précliniques de DMG *in vitro* et *in vivo*, aucun effet bénéfique notoire n'a été observé chez ces jeunes patients. Cette divergence entre les résultats précliniques et cliniques pourrait notamment s'expliquer par l'absence, au sein des modèles pré-cliniques actuels, d'éléments clefs du microenvironnement influençant la réponse des cellules aux thérapies.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était de développer un nouveau modèle de tumeur-sur-puce propre aux DMG et intégrant certains de ces éléments tumoraux décrits comme pouvant impacter la réponse des cellules aux traitements. Parmi les facteurs modulant la sensibilité des cellules, nous identifions (i) la composition de la matrice extracellulaire, (ii) la présence d'un gradient de densité cellulaire, (iii) d'une hypoxie et (iv) d'une barrière hémato-encéphalique comme primordiales. L'enjeu était donc **d'intégrer l'ensemble de ces composants au sein d'un modèle inédit de « DMG-sur-puce » visant, *in fine,* à évaluer et étudier finement la réponse aux traitements de cellules cancéreuses de DMG dans un contexte tumoral *ex vivo***.

Mon premier objectif était donc de mettre au point un design de TSP conduisant à la mise en place d'un gradient radial d'$O_2$ et de nutriments au sein de la puce, et ce tout en permettant l'observation des cellules en temps réel. A ce titre, le design de notre TSP a été inspiré de celui de YI et collaborateurs qui proposaient un modèle de gliome-sur-puce visant à la mise en place d'un tel gradient d'oxygène (Yi et al., 2019). Si le design de ce modèle était particulièrement intéressant, il nous a fallu apporter un certain nombre de modifications pour répondre pleinement à notre problématique. En effet, nous avons, en premier lieu, prêté une attention toute particulière à ce que l'apport en gaz et en nutriments soit strictement périphérique. En cela, le dépôt d'un dôme de matrice cellularisée, que la lamelle de verre supérieure vient écraser avant polymérisation complète, scellait le dispositif et interdisait l'accès aux gaz et aux nutriments autrement que par la gouttière latérale. D'autre part, il nous semblait aussi primordial d'être en capacité d'accéder aux cellules en fin d'expérience en vue d'analyses diverses (transcriptomique, protéomique, inclusion, marquages…). A cet égard, le scellage au silicone représentait une limite, que nous avons dépassée par l'utilisation d'un cadre en PDMS. Celui-ci présentait en effet une adhérence suffisante pour permettre une étanchéité du système tout en autorisant son démontage sans endommager la lamelle de verre supérieure. De plus, la production

de feuillets de PDMS normés présentait les avantages d'avoir une épaisseur standardisée et une facilité d'utilisation en routine ne nécessitant pas l'accès à une bio-imprimante. Enfin, alors que dans le modèle de YI *et al*., une couronne de cellules endothéliales non jointives bioimprimée faisait office de barrière hémato-encéphalique, nous avons fait le choix d'intégrer un modèle éprouvé et breveté de BHE humaine développé par nos collègues du LBHE de Lens. Celui-ci se compose de cellules endothéliales mais aussi de péricytes humains induisant la mise en place de la fonction de filtration définissant la BHE. Connectable à notre biopuce grâce à un circuit microfluidique, cette BHE présente l'avantage de pouvoir être découplée de notre TSP pour en étudier plus finement l'impact. En effet, ce système permet d'étudier la réponse aux traitements des cellules dans des conditions ne différant que par la présence ou l'absence du modèle de BHE. Il nous sera ainsi possible d'évaluer l'impact d'une part, de cette BHE en tant que « filtre », mais aussi, d'autre part, du dialogue paracrine existant entre BHE et cellules DMG sur la sensibilité de ces dernières à différentes molécules.

Ainsi, *in fine*, notre modèle se composait d'un disque matriciel enchâssé entre deux lamelles de verres et entouré d'une gouttière formée par un cadre en PDMS. La géométrie, ainsi adaptée, permettait un apport en nutriments et en oxygène uniquement *via* cette gouttière vers le disque matriciel cellularisé. Ce design était décliné en deux versions ; une « statique » et une « fluidique » connectable au modèle de BHE.

Le design de la TSP ainsi défini, nous nous sommes attachés à reproduire, au mieux, la composition matricielle des DMG. D'un point de vue pratique, cette matrice se devait toutefois d'être homogène lors de son mélange avec les cellules, de présenter une viscosité suffisante pour limiter la sédimentation des cellules avant gélification, et de résister au démontage du dispositif et au flux inhérent à la configuration « fluidique ». La matrice devait donc être suffisamment fluide pour se mélanger de façon homogène à la suspension cellulaire et polymériser assez rapidement pour limiter la sédimentation des cellules contre la lamelle de verre inférieure. Enfin, au cours du temps, celle-ci devait rester suffisamment intègre, notamment en condition de flux, tout en étant restant dissociable des fragiles lamelles de verre en fin d'expérience. Pour répondre à l'exigence biologique, la MEC des GBM étant composée principalement d'acide hyaluronique régulant différents processus biologiques, c'est l'Hystem™ (Sigma- Aldrich) qui a été, dans un premier temps, utilisé comme composant principal (80 %) du disque matriciel (Belousov et al., 2019). L'Hystem™ est un acide hyaluronique modifié comportant des groupements thiols pour permettre son cross-link, et donc sa polymérisation, *via* l'ajout d'un ExtraLinker™. L'Hystem™ était complété avec 20 % de Matrigel™ assurant l'apport des différents autres composants du microenvironnement des DMG. Ce mix, mélangé aux cellules de DMG, était homogène et permettait un démontage des puces sans altérer le disque matriciel, et résistait au

flux. Une fois la composition de la matrice établie, différentes concentrations cellulaires ont été testées dans l'optique d'obtenir un gradient de densité cellulaire.

Cette première matrice nous a notamment permis de travailler sur le gradient de densité cellulaire, un point clef de notre puce puisqu'affectant la biodisponibilité des nutriments et de l'oxygène, et influençant également la diffusion des composés pharmacologiques (Grantab et al., 2006). En ce sens, 3 concentrations cellulaires ont été testées avec les cellules HSJD-DIPG-007 dans un premier temps, et la concentration de 10 000 cellules/µL a été retenue puisque permettant de recréer un gradient radial de densité cellulaire reproductible, avec plus de cellules en périphérie qu'au centre de la matrice. Par ailleurs, le marquage histologique de notre TSP ensemencée à cette densité révélait une concentration cellulaire comparable à celle retrouvée au niveau des biopsies de DMG.

Néanmoins, cette composition matricielle, bien qu'ayant été précieuse dans la caractérisation de la mise en place d'un gradient de densité cellulaire, ne permettait pas aux cellules d'adopter le phénotype infiltrant attendu pour un modèle de DMG. En effet, cette matrice forme un réseau fortement réticulé pouvant limiter l'étirement et la migration des cellules. En outre, la présence d'un cross-linker chimique n'était probablement pas sans conséquence sur la biologie des cellules. Enfin, l'approvisionnement en Hystem$^{TM}$, aléatoire puis interrompu, nous a confortés quant à la nécessité de changer de matrice.

Dans ce contexte, différents acides hyaluroniques, de divers poids moléculaires, ont été testés. C'est finalement l'acide hyaluronique (AH) à haut poids moléculaire, complété avec 75 % de Matrigel$^{TM}$ réduit en facteurs de croissance, qui a été retenu puisque résistant aux flux, au démontage et autorisant l'adoption par les cellules d'un phénotype fusiforme cohérent avec le caractère invasif des DMG. Le choix de ce ratio AH / Matrigel$^{TM}$ est motivé par le fait que, utilisé seul ou majoritaire au sein du mix matriciel, l'acide hyaluronique à haut PM était trop liquide, et peu résistant au flux et au démontage de la puce. Ainsi, nous avons fait le choix de compléter cette matrice avec un pourcentage substantiel de Matrigel$^{TM}$ GFR (75 %) afin de permettre une polymérisation satisfaisante compatible avec le démontage et la mise en flux de la puce. Au-delà de ces bénéfices techniques, cette plus forte proportion en Matrigel$^{TM}$ pourrait soutenir la capacité des cellules à adopter une morphologie fusiforme et ce, à travers l'apport de diversité de protéines matricielles favorisant l'encrage des cellules (Andrade Mier et al., 2023).

Il est important de prendre en considération qu'en fonction de la lignée cellulaire utilisée, et l'utilisation éventuelle de traitement, le démontage de la puce est plus ou moins aisé, pouvant entraîner des déchirures de la matrice, notamment avec la lignée HSJD-DIPG-012. Cette variabilité

pourrait être liée aux capacités de dégradation de la matrice par les cellules, différentes entre les lignées, ce qui affaiblirait la matrice et *in fine* rendrait le démontage de la puce plus complexe. Notons par ailleurs, qu'au sein des GBM, les acides hyaluroniques de petites tailles (6 kDa – 20 kDa) ont été décrits comme impliqués dans l'induction de l'angiogenèse tandis que les acides hyaluroniques à haut PM (> 5 MDa) posséderaient des effets anti-angiogéniques et immunosuppresseurs (Bayer, 2020; Sieger et al., 2019). Or, la matrice hyaluronane choisie a un PM de l'ordre de 1 300 kDa. Sur la base de ces éléments, il serait intéressant d'envisager l'utilisation d'un mix de différents acides hyaluroniques couvrant davantage le spectre de PM présent dans la tumeur et possiblement mieux adapté à l'ensemble de nos lignées. En effet, si le design de la TSP n'a pas vocation à étudier l'angiogenèse, il est en revanche prévu d'y inclure des cellules immunitaires de types macrophages. Dans ce contexte, une attention particulière devra être portée sur la nature des AH composant la matrice et leur impact sur l'immunité.

Compte tenu de l'adoption de cette nouvelle matrice, nous avons réévalué dans celle-ci la pertinence d'une densité cellulaire de 10 000 cellules/µL et ce, avec 3 lignées cellulaires : HSJD-DIPG-007, -012 et -013. Cette composition matricielle permettait également d'obtenir un gradient de concentration cellulaire à partir de 24 heures pour l'ensemble des lignées testées avec plus de cellules en périphérie de la matrice qu'en son centre. Dans l'optique de rendre notre modèle de TSP toujours plus pertinent, nous avons eu l'opportunité de développer des *primo* cultures de DMG directement issues de biopsies de patients (UTRT-DMG-001 et -002). Nous avons alors testé l'ensemencement de cellules UTRT-DMG-001 au sein de notre dispositif, à raison de 5 000 cellules/µL toutefois pour des raisons de rareté de matériels. De façon très intéressante, et contrairement aux lignées cellulaires, les cellules en périphérie mais aussi au centre de la matrice apparaissaient fusiformes, avec là aussi, la présence d'un anneau périphérique contenant davantage de cellules. La morphologie fusiforme des cellules issues de la biopsie au centre de la TSP peut s'expliquer par une meilleure adaptation de ces cellules aux conditions drastiques au centre de la puce. Cette différence entre les lignées et les cellules primaires peut être expliquée par les conditions « hyperoxiques » dans lesquelles sont cultivées les lignées cellulaires, rendant ces cellules, *in fine*, moins résistantes à l'hypoxie.

Ce gradient de répartition spatiale des cellules au sein de la puce peut résulter de conditions plus favorables, *i.e* accès aux nutriments et à l'oxygène, permettant aux cellules de proliférer en périphérie et/ou d'une migration cellulaire vers ces conditions favorables. Afin de vérifier ces hypothèses, un test de migration a d'abord été effectué et ce dernier a montré une mobilité plus faible

des cellules au centre de la puce qu'en périphérie. Toutefois, nous n'observons pas une migration orientée vers la périphérie, qui ne serait donc pas la cause de la mise en place de ce gradient de densité.

En complément, un test de prolifération cellulaire, par incorporation de l'EdU, a été effectué 48 heures post-ensemencement et a permis de mettre en évidence une prolifération cellulaire plus importante en périphérie qu'au centre de la puce. Ce résultat permet donc de valider que le gradient est, au moins en partie, dû à une prolifération accrue en périphérie, et ce, probablement soutenue par l'accès facilité à l'oxygène et/ou aux nutriments au pourtour de la puce.

L'un des enjeux majeurs de ce modèle étant la mise en place d'un gradient d'hypoxie au sein de la biopuce, une caractérisation spatiale du taux en oxygène a été réalisée à l'aide d'un feuillet sensible au taux d'oxygène (Presens). Pour les deux lignées cellulaires testées, HSJD-DIPG-007 et -012, la résultante de différentes concentrations cellulaires, 1 000 ou 5 000 ou 10 000 cellules/µL, a été évaluée sur la mise en place d'une hypoxie. Pour la concentration cellulaire la plus faible, aucune variation notable du taux d'oxygène n'était mesurée entre la périphérie et le centre de la matrice. En revanche dès 5 000 cellules/µL et aussi à 10 000 cellules/µL, un gradient radial d'$O_2$ se formait dans les deux lignées et ce, dès 4 heures post-ensemencement. Cet appauvrissement était visible à partir du premier millimètre au sein de la matrice et descendait jusqu'à approximativement 3 % d'$O_2$ au centre de la puce. Notons qu'avec les cellules HSJD-DIPG-012, à 10 000 cellules/µL, l'appauvrissement en oxygène était déjà important dès 30 minutes post-ensemencement. De façon plus inattendue, nous observions aussi une baisse du taux d'$O_2$ au sein même de la gouttière à proximité de la matrice, traduisant une consommation d'oxygène supérieure à la capacité de diffusion de l'$O_2$ dans le milieu. Reposant sur le même schéma expérimental, un test préliminaire a été réalisé avec une puce HSJD-DIPG-007 connectée au circuit microfluidique. De manière intéressante, la mise en flux de la puce, et donc le renouvellement du milieu périphérique, a permis de limiter l'appauvrissement en oxygène au sein de la gouttière et en périphérie de la matrice et ce tout en conservant la mise en place du gradient d'hypoxie. Notons toutefois que cette hypoxie s'instaurait de façon plus graduelle dans le temps, possiblement du fait d'un meilleur réapprovisionnement en oxygène depuis la gouttière ainsi drainée. Ce résultat reste néanmoins à reproduire pour plus de robustesse.

La mesure du taux d'$O_2$ a également été effectuée sur une puce ensemencée avec des cellules UTRT-DMG-001 à hauteur de 1 000 et 5 000 cellules/µL. De manière comparable aux lignées cellulaires, un gradient radial d'hypoxie était mesuré dès 4 heures pour la concentration à 5 000 cellules/µL, débutant à l'intérieur même de la gouttière. Toutefois, on observe que la mise en place de ce gradient au cours du temps était plus graduelle mais surtout atteignait des valeurs en $O_2$ proches de l'anoxie au centre de la puce. Ainsi, la *primo* culture issue de patient semble plus résistante à un

environnement très pauvre en $O_2$ comme en témoignerait l'aspect fusiforme conservé par les cellules au centre comme précédemment cité. Ce constat interroge quant à l'adaptation de nos lignées à la culture en incubateur conventionnel, à savoir sous 18,6% d'$O_2$. Or, la physioxie au sein du cerveau est estimée entre à 0,5 et 7 %. Il sera donc intéressant de voir si ces résultats se confirment avec d'autres prélèvements issus de patients. Si des résultats similaires sont obtenus avec de nouvelles *primo* cultures, cela confirmerait l'hypothèse selon laquelle les cellules cultivées au sein d'un incubateur, soit dans un environnement « hyperoxique », s'adaptent à cette haute teneur en oxygène, et par la suite, se retrouvent limitées dans leur capacité pour s'adapter à l'hypoxie.

Il est admis qu'un environnement hypoxique engendre un switch métabolique conduisant à un relargage de protons et de lactate et donc à une acidification du milieu extracellulaire. A ce titre, à l'image des feuillets sensibles à l'$O_2$, un feuillet sensible au pH a été utilisé au sein de la puce pour étudier l'acidification du milieu extracellulaire par les cellules HSJD-DIPG-007. Les résultats montrent une acidification globale du système au cours du temps avec un gradient radial d'acidification vers le centre de la matrice (baisse de 0,5 unité de pH au centre de la matrice par rapport à la périphérie). Ce gradient peut s'expliquer par un renouvellement limité de milieu au sein de la matrice mais également par l'hypoxie accrue mesurée au centre de la puce. En effet, cette acidification serait le fruit du changement métabolique opéré par les cellules privilégiant la glycolyse anaérobie. Ce résultat, pouvant paraitre de faible intensité, est tout de même à nuancer compte tenu du fait que le milieu de culture cellulaire utilisé est doublement tamponné (bicarbonate et HEPES) atténuant certainement l'écart de pH observable. Ce changement de pH au niveau du microenvironnement pourrait influencer la pharmacocinétique des agents thérapeutiques puisque les médicaments peuvent être protonés dans un milieu acide, limitant leur absorption par les cellules tumorales (Luciani et al., 2004).

N'ayant pas réussi à caractériser biologiquement le gradient d'hypoxie par un immunomarquage dirigé contre HIF1α, nous avons conduit une caractérisation par la réalisation d'une analyse en bulk RNAseq de la région centrale vs. périphérique de la puce pour les deux lignées cellulaires HSJD-DIPG-007 et -012, à 24 heures post ensemencement. Cette analyse a premièrement permis de conforter la présence d'un gradient d'hypoxie au sein de la puce à travers l'identification d'une signature hypoxique enrichie au centre de la puce. Il sera intéressant de conforter ces résultats par des immunofluorescences dirigées contre les protéines codées par les gènes DE dans les deux lignées afin de consolider la caractérisation fonctionnelle de ce gradient d'hypoxie.

De manière surprenante, l'analyse transcriptomique a également montré les gènes associés à l'OXPHOS comme étant enrichis au centre de la puce, et ce, de manière significative pour les cellules HSJD-DIPG-007. A noter que cet enrichissement est cependant moins marqué avec les cellules HSJD-

DIPG-012. L'une des hypothèses pouvant expliquer un enrichissement de ce mécanisme au centre par rapport à la périphérie serait la formation de super complexes respiratoires mitochondriaux. En effet, ces derniers se forment à la suite d'un stress du réticulum endoplasmique ou par exemple, à la suite d'un manque de nutriments. En accord avec cette hypothèse, les analyses RNAseq ont aussi montré un enrichissement de la voie UPR au centre de la puce traduisant un stress du RE important. Ce stress permettrait l'activation de la voie PERK qui permet d'augmenter le nombre de replis au niveau de la membrane mitochondriale interne, ceci ayant pour effet de permettre la formation de super complexes respiratoires *via* SCAF-1. Finalement, la formation de ces supers complexes mitochondriaux contribuerait au métabolisme de l'OXPHOS (Balsa et al., 2019). Cette hypothèse pourrait être explorée par microscopie électronique à transmission afin de quantifier les crêtes mitochondriales, reflet d'un stress métabolique. De plus, il serait envisageable, à l'image des travaux de Balsa et collaborateurs, de réaliser un BN-Page (blue native - polyacrylamide gel electrophoresis), technique permettant de séparer dans un premier temps les complexes protéiques tout en conservant les intéractions initiales, puis, de séparer les différentes protéines composant ces complexes. Cette technique nous permettrait ainsi de séparer les supercomplexes mitochondriaux, et d'identifier si ces derniers sont plus ou moins représentés en fonction de leur position au sein de la puce. Pour compléter cette analyse, il serait tout à fait intéressant de s'intéresser, en western blot, à SCAF-1, acteur clef de la formation des supercomplexes.

Ainsi, la diminution du taux d'oxygène observée précédemment engendrerait un stress au niveau du RE, qui lui-même permettrait la formation de super complexes respiratoires mitochondriaux et *in fine* une activation du métabolisme OXPHOS. Ce phénomène supporterait la formation du gradient d'hypoxie au sein de la puce, cette activité OXPHOS des cellules au centre de la matrice tendant à diminuer encore davantage le taux d'oxygène présent dans le microenvironnement matriciel. Il s'agit là toutefois d'une hypothèse participant à un phénomène certainement plurifactoriel comme en témoigne le fait que les cellules HSJD-DIPG-007 n'entrainent pas un niveau d'hypoxie plus sévère que les HSJD-DIPG-012 présentant pourtant une signature OXPHOS moindre.

Il est aussi pertinent de mentionner que cette analyse transcriptomique a mis en exergue un enrichissement de l'apoptose, pour la lignée des HSJD-DIPG-007, au centre de la puce. Il est intéressant de souligner que cette signature apoptotique au centre de la puce est corroborée par la présence d'un marquage IP plus important au centre de la puce. Cependant, cette signature apoptotique ne semble pas être présente, ou tout du moins, de manière moins marquée, avec la lignée de HSJD-DIPG-012. En effet, l'enrichissement de la voie apoptotique pour cette lignée est non significatif. Il est également interessant de soulever que globalement, le taux de mortalité est moins important au sein des HSJD-DIPG-012 que des cellules HSJD-DIPG-007. Cette différence pourrait être liée au profil mutationnel

entre les lignées, avec notamment la présence d'une mutation *TP53* au sein de la lignée HSJD-DIPG-012 qui pourrait conférer un avantage en termes de survie cellulaire.

La finalité première de notre modèle d'étude de DMG étant l'évaluation de la réponse aux stratégies thérapeutiques en fonction du niveau d'hypoxie, différentes modalités de traitement ont été testées au sein de notre puce. La radiothérapie étant le traitement de référence depuis plusieurs dizaines d'années pour les DMG, il nous est apparu primordial de tester cette modalité de traitement avec les deux lignées cellulaires HSJD-DIPG-007 et -012. Pour ce faire, il nous a fallu développer un protocole de révélation de la mort cellulaire radioinduite au sein de notre puce mais surtout une méthodologie de segmentation des noyaux et de quantification robuste. Ainsi, pour la lignée cellulaire HSJD-DIPG-007, après marquage IP des cellules mortes et endommagées 48h post-irradiation, une différence notable est observable entre les conditions traitées à 2 et 4 Gy, et la condition non irradiée. Mais surtout, cette différence de mort cellulaire radioinduite (i.e. entre la condition 0 Gy et les conditions irradiées) était plus importante dans une zone bien identifiable proche de la périphérie (distance de 2500 à 3500 µm du centre) par rapport aux cellules du centre du dispositif. Initialement, dans la condition contrôle, le pourcentage de mort cellulaire était plus important au centre de la puce qu'en périphérie (constat par ailleurs en accord avec nos données de RNAseq indiquant une signature apoptotique au centre de la puce). Cette tendance à une augmentation de la mort cellulaire radioinduite proche de la périphérie pourrait en partie s'expliquer par la présence de l'hypoxie au cœur de la matrice induisant une radiorésistance sans toutefois observer la corrélation entre niveau d'oxygène et radiosensibilité initialement attendue. En effet, l'hypoxie est décrite comme capable d'induire un remaniement de certaines voies de signalisation liées à la détoxification des ROS (acteurs cruciaux de l'action de la radiothérapie) ainsi qu'à la mort cellulaire (Horsman and Overgaard, 2016). En outre, le faible taux d'oxygène au centre de la puce limiterait les dommages à l'ADN induits par les radiations ionisantes (Begg and Tavassoli, 2020; Horsman and Overgaard, 2016). En effet, un faible taux d'oxygène limiterait l'induction de ROS, acteurs majeurs dans l'induction des dommages à l'ADN radioinduits. Concernant les HSJD-DIPG-012 cependant, aucune différence significative n'a été observée entre la condition contrôle (0Gy) et les conditions irradiées (2 et 4 Gy).

Cette différence de sensibilité à la radiothérapie entre les deux lignées pourrait trouver explication notamment dans le profil mutationnel de ces dernières. En effet, les cellules HSJD-DIPG-007 ne possèdent pas de mutation sur le gène *TP53*, à l'inverse des HSJD-DIPG-012 qui présentent cette altération génétique. Or, il a été montré que cette mutation joue un rôle prépondérant dans la radiorésistance des DMG (Werbrouck et al., 2019). Pour aborder de façon plus exhaustive la question

de la radiorésistance entre ces deux modèles, une analyse des niveaux de ROS au sein des biopuces serait particulièrement intéressante. La visualisation en cinétique des foyers de dommages à l'ADN, suite à l'irradiation, par IF dirigée contre ϒ- H2AX serait également informative pour évaluer la mise en place et l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN au sein de ces deux lignées cellulaires.

Au sein des puces réalisées avec les cellules issues d'une primo-culture de DMG récemment établie en collaboration avec le CHU de Lille, nommées UTRT-DMG-001, aucune différence significative n'est observable entre le centre et la périphérie en termes de pourcentage de mort cellulaire avec approximativement 25% de mortalité au centre et en périphérie, en condition non irradiée là où nous observions approximativement entre 15 et 7 % de mortalité en périphérie et 35 et 21 % de mortalité au centre dans les HSJD-DIPG-007 et -012 respectivement. Par ailleurs, il semblerait que ce prélèvement soit plus radiorésistant que les cellules HSJD-DIPG-007 puisqu'aucune différence significative en termes de marquage IP n'est observable entre la condition contrôle (0 Gy) et les conditions irradiées (2 et 4 Gy). L'hétérogénéité de réponses observées suite aux radiations ionisantes entre les différents modèles utilisés peut être expliquée par le fait que les cellules HSJD-DIPG-007 ne sont pas naïves de traitement puisqu'issues d'une nécropsie, à l'inverse les UTRT-DMG-001 et les HSJD-DIPG-012 sont des cellules de DMG naïves de thérapie. De surcroit, comme déjà évoqué, il existe, au sein des modèles ici étudiés, des différences mutationnelles importantes concernant *TP53* et les altérations de l'histone H3. Les lignées HSJD-DIPG-007 et -012 possèdent en effet une altération au niveau du variant de l'histone H3.3 alors que le prélèvement de patient est porteur d'une mutation de type H3.1K27M. Comme généralement observé dans les DMG, cette mutation H3.1K27M s'accompagnait dans le cas présent d'une mutation ACVR1 au détriment d'une altération de *TP53* généralement davantage associée à la forme H3.3K27M. Ici, la lignée HSJD-DIPG-007 présente cependant un profil atypique puisque mutée H3.3K27M mais pas *TP53*, ce qui pourrait participer à sa radiosensibilité relative observée dans nos expériences. Il serait donc important de diversifier les modèles cellulaires utilisés et notamment, d'introduire des prélèvements de patients pour avoir des cohortes plus importantes et déterminer comment les profils mutationnels modulent la réponse aux traitements. En ce sens, la création du Centre d'Excellence EN-HOPE-SMART4CBT conjointement avec Strasbourg et Nancy devrait faciliter l'accès à un nombre plus important de prélèvements de patients.

Compte tenu de la récidive quasi systématique observée chez les jeunes patients suite à leur traitement de radiothérapie, décrite comme palliative de fait, d'autres traitements sont à l'étude parmi lesquels, l'ONC201, une imipridone ayant montré des résultats prometteurs, notamment chez une patiente de 22 ans atteinte d'un gliome thalamique H3.3 K27M qui a observé une régression quasiment complète de ses lésions (Arrillaga-Romany et al., 2017). Cette imipridone est un antagoniste

des récepteurs dopaminergiques DRD2 et DRD3 et est également un agoniste allostérique de la protéase mitochondriale ClpP (Venneti et al., 2023). A ce titre, nous avons testé cette molécule à 1 et 10 µM au sein de notre puce sur les cellules HSJD-DIPG-007. Les résultats ont montré une induction de mort cellulaire relativement similaire entre le centre et la périphérie de la puce.

Le paxalisib, inhibiteur de PI3K/mTOR, a montré des effets prometteurs en association avec l'ONC201, au sein de modèles murins ayant conduit à une amélioration de la survie globale de plusieurs jours, mais également seul (Duchatel et al., 2024; Jackson et al., 2023). Cette molécule a donc été testée sur des puces HSJD-DIPG-007. Les résultats préliminaires obtenus permettaient de préjuger d'une efficacité supérieure du paxalisib à induire la mort cellulaire en périphérie de la puce comparativement à son centre hypoxique. Une étude réalisée dans le cancer du rein avec un inhibiteur de mTOR a montré que la dégradation de HIF permettait de sensibiliser les cellules à cet inhibiteur (Thomas et al., 2006). Nos résultats préliminaires semblent indiquer, que l'hypoxie contribuerait, de manière similaire, à l'instauration d'une résistance des cellules de DMG au paxalisib.

Globalement, il serait intéressant de tester l'ONC201 et le paxalisib indépendamment sur les HSJD-DIPG-012 et également en concomitance dans les deux lignées cellulaires. De plus, la réalisation d'un contrôle en station hypoxique serait tout à fait indiquée pour déterminer si les différences observées entre le centre et la périphérie sont liées au gradient radial d'oxygène présent au sein de la puce. Si tel est le cas, une réponse similaire entre le centre et la périphérie de la puce cultivée en station d'hypoxie serait attendue.

Pour rendre notre modèle toujours plus pertinent, un modèle de BHE humaine breveté, développé par le LBHE de Lens, a été intégré à notre modèle grâce à un circuit microfluidique autorisant une communication paracrine entre la BHE et les cellules de DMG. En effet, les capacités de filtration de la BHE sont un véritable enjeu pour le traitement des tumeurs cérébrales puisque limitant fortement l'accès des composés anti-tumoraux vers le site tumoral. Dans le GBM, il a notamment été démontré que le bevacizumab, un anticorps visant à limiter l'angiogenèse, voyait son accès à la tumeur fortement limité par la BHE. Dans cette étude son efficacité se voyait renforcée par un système de vectorisation sur nanoparticule lui permettant de franchir de nouveau ce filtre naturel. Cependant, en clinique, cet anticorps n'a pas su améliorer le pronostic des patients et ce, probablement en raison de la présence de la BHE, limitant fortement l'accès du bevacizumab à la tumeur (Sousa et al., 2019). Egalement, des expériences de co-culture entre des cellules de DMG et le modèle de BHE menées par nos laboratoires ont montré qu'une communication s'établissait entre ces partenaires cellulaires aboutissant à une surexpression d'enzymes de détoxification par des cellules de la BHE (Deligne et al., 2020). En ce sens, il serait tout à fait intéressant de tester les thérapies précédemment utilisées au sein

de notre modèle de TSP, complété par la BHE, pour étudier l'impact de la présence de cette dernière sur l'efficacité de ces molécules sur les cellules de DMG.

La mise en place de ce circuit microfluidique est cependant encore à parfaire en raison de fuites et de contaminations survenant au niveau du dispositif de la TSP ou au niveau des inserts de BHE. Pour pallier aux problématiques de contaminations, nous avons testé plusieurs modalités de stérilisation dont celle utilisant l'oxyde d'éthylène gazeux sans pour autant totalement résoudre notre problématique contaminations. En effet, ces contaminations sont probablement largement liées à la survenue de fuites dans le circuit et rompant de fait sa stérilité. Pour solutionner cet écueil, une approche par hot embossing du FlexDym$^{TM}$ est à l'étude. En effet, si la chambre contenant le disque matriciel, est actuellement délimitée par 1/ la lamelle inférieure, 2/ le FlexDym$^{TM}$ latéral et 3/ le capot supérieur en plexiglass, grâce à ce procédé, l'enceinte serait désormais formée par 1/ la lamelle inférieure et 2/ une unique pièce de FlexDym$^{TM}$ servant à la fois de spacer latéral et de membrane d'étanchéité supérieure. Ainsi, les interfaces, sources de fuites et de contaminations possibles, seraient réduites de moitié et le milieu de culture ne serait plus en contact direct avec le capot supérieur réutilisable en plexiglass.

Si cette option solutionne la problématique de fuites/contaminations, l'incrémentation de la BHE à notre modèle de TSP nous permettra de tester divers composés, dont les imipridones, en prenant en compte les caractéristiques de cet obstacle majeur.

A l'avenir, en perspectives pour notre projet, il serait également intéressant de complexifier notre modèle, notamment en implémentant notre dispositif avec des modèles d'organoïdes immuno-compétents qui apporteraient la composante microgliale ainsi qu'une diversité de sous-types neuronaux à la puce (Sarnow et al., 2024).

# Conclusion générale

L'objectif principal de ma thèse était de développer et de caractériser un modèle de DMG, incorporant les différents éléments natifs du microenvironnement de ces tumeurs influençant la réponse des cellules aux thérapies et ce, afin de disposer d'un outil thérapeutique pertinent pour les DMG. Les éléments que nous avons identifiés comme primordiaux étaient une matrice extracellulaire pertinente, notamment composée d'acide hyaluronique puisque présent au sein des GBM. Mais surtout, nous avons travaillé à établir un différentiel de densité cellulaire, celle-ci, chez le patient, étant d'une part limitante pour la biodisponibilité des molécules et d'autre part, responsable de l'apparition de zone hypoxique critique pour le métabolisme cellulaire et l'efficacité des traitements. Enfin, la présence de la BHE est un enjeu important à considérer dans l'évaluation des thérapies car restreignant l'accès des molécules antitumorales vers le site de la tumeur.

A ce titre, le modèle pré-clinique de DMG-sur-puce que nous avons développé intègre une matrice extracellulaire composée, en partie, d'acide hyaluronique qui est un polysaccharide ayant un rôle crucial dans la signalisation cellulaire des GBM. De surcroit, notre modèle comprend un gradient de densité cellulaire qui était corrélé à un gradient de prolifération cellulaire, entraînant une concentration cellulaire plus importante en périphérie qu'au centre de la puce. La géométrie de notre dispositif autorise l'instauration d'un gradient radial d'hypoxie, ainsi qu'un léger gradient d'acidification, inhérent aux tumeurs solides et impactant la réponse des cellules aux thérapies. Ce modèle innovant de DMG-sur-puce nous a notamment permis d'évaluer la réponse des DMG à la radiothérapie, ainsi qu'à l'ONC201, et a rendu possible la modélisation de l'hétérogénéité de réponses observées en clinique. L'incorporation de la BHE à notre modèle, *via* un circuit microfluidique, est un enjeu encore en cours d'élaboration, nécessitant encore quelques optimisations techniques pour rendre ce modèle opérationnel.

Forts de ce constat, notre modèle de DMG-sur-puce permet donc d'évaluer de manière spatiale la réponse aux thérapies dans un contexte biologique pertinent, et notamment, en fonction du gradient d'hypoxie, acteur clef dans la résistance aux thérapies. Ce modèle réduit l'écart entre les modèles précliniques actuels et la réalité clinique grâce à l'incorporation da paramètres biologiques impactant la réponse des cellules aux thérapies et possède l'avantage d'être adaptable à différents types de tumeurs solides.

# Références Bibliographiques


Abbott, N.J., 2013. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. J. Inherit. Metab. Dis. 36, 437–449. https://doi.org/10.1007/s10545-013-9608-0

Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nat. Rev. Neurosci. 7, 41–53. https://doi.org/10.1038/nrn1824

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

Agúndez, J.A.G., Jiménez-Jiménez, F.J., Alonso-Navarro, H., García-Martín, E., 2014. Drug and xenobiotic biotransformation in the blood-brain barrier: a neglected issue. Front. Cell. Neurosci. 8, 335. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00335

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-Oncol. 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

Al-Majdoub, Z.M., Al Feteisi, H., Achour, B., Warwood, S., Neuhoff, S., Rostami-Hodjegan, A., Barber, J., 2019. Proteomic Quantification of Human Blood-Brain Barrier SLC and ABC Transporters in Healthy Individuals and Dementia Patients. Mol. Pharm. 16, 1220–1233. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01189

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

Andrade Mier, M.S., Bakirci, E., Stahlhut, P., Blum, R., Dalton, P.D., Villmann, C., 2023. Primary Glial Cell and Glioblastoma Morphology in Cocultures Depends on Scaffold Design and Hydrogel Composition. Adv. Biol. 7, 2300029. https://doi.org/10.1002/adbi.202300029

Anguiano, M., Morales, X., Castilla, C., Pena, A.R., Ederra, C., Martínez, M., Ariz, M., Esparza, M., Amaveda, H., Mora, M., Movilla, N., Aznar, J.M.G., Cortés-Domínguez, I., Ortiz-de-Solorzano, C., 2020. The use of mixed collagen-Matrigel matrices of increasing complexity recapitulates the biphasic role of cell adhesion in cancer cell migration: ECM sensing, remodeling and forces at the leading edge of cancer invasion. PLOS ONE 15, e0220019. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220019

Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M.H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B.R., Betsholtz, C., 2010. Pericytes regulate the blood-brain barrier. Nature 468, 557–561. https://doi.org/10.1038/nature09522

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

Ast, T., Mootha, V.K., 2019. Oxygen and mammalian cell culture: are we repeating the experiment of Dr. Ox? Nat. Metab. 1, 858–860. https://doi.org/10.1038/s42255-019-0105-0

Aumailley, M., 2013. The laminin family. Cell Adhes. Migr. 7, 48–55. https://doi.org/10.4161/cam.22826

Ausejo-Mauleon, I., Labiano, S., de la Nava, D., Laspidea, V., Zalacain, M., Marrodán, L., García-Moure, M., González-Huarriz, M., Hervás-Corpión, I., Dhandapani, L., Vicent, S., Collantes, M., Peñuelas, I., Becher, O.J., Filbin, M.G., Jiang, L., Labelle, J., de Biagi-Junior, C.A.O., Nazarian, J., Laternser, S., Phoenix, T.N., van der Lugt, J., Kranendonk, M., Hoogendijk, R., Mueller, S., De Andrea, C., Anderson, A.C., Guruceaga, E., Koschmann, C., Yadav, V.N., Gállego Pérez-Larraya, J., Patiño-García, A., Pastor, F., Alonso, M.M., 2023. TIM-3 blockade in diffuse intrinsic pontine glioma models promotes tumor regression and antitumor immune memory. Cancer Cell 41, 1911-1926.e8. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.09.001

Ayloo, S., Gu, C., 2019. Transcytosis at the Blood-Brain Barrier. Curr. Opin. Neurobiol. 57, 32–38. https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.12.014

Balsa, E., Soustek, M.S., Thomas, A., Cogliati, S., García-Poyatos, C., Martín-García, E., Jedrychowski, M., Gygi, S.P., Enriquez, J.A., Puigserver, P., 2019. ER and Nutrient Stress Promote Assembly of Respiratory Chain Supercomplexes through the PERK-eIF2α Axis. Mol. Cell 74, 877-890.e6. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.031

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

Bayer, I.S., 2020. Hyaluronic Acid and Controlled Release: A Review. Molecules 25, 2649. https://doi.org/10.3390/molecules25112649

Begg, K., Tavassoli, M., 2020. Inside the hypoxic tumour: reprogramming of the DDR and radioresistance. Cell Death Discov. 6, 77. https://doi.org/10.1038/s41420-020-00311-0

Belousov, A., Titov, S., Shved, N., Garbuz, M., Malykin, G., Gulaia, V., Kagansky, A., Kumeiko, V., 2019. The Extracellular Matrix and Biocompatible Materials in Glioblastoma Treatment. Front. Bioeng. Biotechnol. 7, 341. https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00341

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., Seker-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

Bhatia, S.N., Ingber, D.E., 2014. Microfluidic organs-on-chips. Nat. Biotechnol. 32, 760–772. https://doi.org/10.1038/nbt.2989

Bian, S., Repic, M., Guo, Z., Kavirayani, A., Burkard, T., Bagley, J.A., Krauditsch, C., Knoblich, J.A., 2018. Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation. Nat. Methods 15, 631–639. https://doi.org/10.1038/s41592-018-0070-7

Bonner, E.R., Waszak, S.M., Grotzer, M.A., Mueller, S., Nazarian, J., 2020. Mechanisms of imipridones in targeting mitochondrial metabolism in cancer cells. Neuro-Oncol. 23, 542–556. https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa283

Bouquerel, C., César, W., Barthod, L., Arrak, S., Battistella, A., Gropplero, G., Mechta-Grigoriou, F., Zalcman, G., Parrini, M.C., Verhulsel, M., Descroix, S., 2022. Precise and fast control of the dissolved oxygen level for tumor-on-chip. Lab. Chip 22, 4443–4455. https://doi.org/10.1039/d2lc00696k

Boustani, J., Grapin, M., Laurent, P.-A., Apetoh, L., Mirjolet, C., 2019. The 6th R of Radiobiology: Reactivation of Anti-Tumor Immune Response. Cancers 11, 860. https://doi.org/10.3390/cancers11060860

Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., Beroukhim, R., Bernard, B., Wu, C.-J., Genovese, G., Shmulevich, I., Barnholtz-Sloan, J., Zou, L., Vegesna, R., Shukla, S.A., Ciriello, G., Yung, W.K., Zhang, W., Sougnez, C., Mikkelsen, T., Aldape, K., Bigner, D.D., Van Meir, E.G., Prados, M., Sloan, A., Black, K.L., Eschbacher, J., Finocchiaro, G., Friedman, W., Andrews, D.W., Guha, A., Iacocca, M., O'Neill, B.P., Foltz, G., Myers, J., Weisenberger, D.J., Penny, R., Kucherlapati, R.,

Perou, C.M., Hayes, D.N., Gibbs, R., Marra, M., Mills, G.B., Lander, E., Spellman, P., Wilson, R., Sander, C., Weinstein, J., Meyerson, M., Gabriel, S., Laird, P.W., Haussler, D., Getz, G., Chin, L., TCGA Research Network, 2013. The somatic genomic landscape of glioblastoma. Cell 155, 462–477. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034

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

Brown, L.S., Foster, C.G., Courtney, J.-M., King, N.E., Howells, D.W., Sutherland, B.A., 2019. Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain. Front. Cell. Neurosci. 13, 282. https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00282

Bruschi, M., Midjek, L., Ajlil, Y., Vairy, S., Lancien, M., Ghermaoui, S., Kergrohen, T., Verreault, M., Idbaih, A., de Biagi, C.A.O., Liu, I., Filbin, M.G., Beccaria, K., Blauwblomme, T., Puget, S., Tauziede-Espariat, A., Varlet, P., Dangouloff-Ros, V., Boddaert, N., Le Teuff, G., Grill, J., Montagnac, G., Elkhatib, N., Debily, M.-A., Castel, D., 2023. Diffuse midline glioma invasion and metastasis rely on cell-autonomous signaling. Neuro-Oncol. 26, 553–568. https://doi.org/10.1093/neuonc/noad161

Burckel, H., Josset, E., Denis, J.-M., Gueulette, J., Slabbert, J., Noël, G., Bischoff, P., 2015. Combination of the mTOR inhibitor RAD001 with temozolomide and radiation effectively inhibits the growth of glioblastoma cells in culture. Oncol. Rep. 33, 471–477. https://doi.org/10.3892/or.2014.3590

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

Cecchelli, R., Dehouck, B., Descamps, L., Fenart, L., Buée-Scherrer, V., Duhem, C., Lundquist, S., Rentfel, M., Torpier, G., Dehouck, M.P., 1999. In vitro model for evaluating drug transport across the blood–brain barrier. Adv. Drug Deliv. Rev., Blood-brain Barrier as a Dynamic Interface for Drug Delivery to Brain?Blood-brain Barrier as a Dynamic Interface for Drug Delivery to Brain 36, 165–178. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00083-0

Cescon, M., Rampazzo, E., Bresolin, S., Ros, F.D., Manfreda, L., Cani, A., Puppa, A.D., Braghetta, P., Bonaldo, P., Persano, L., 2023. Collagen VI sustains cell stemness and chemotherapy resistance in glioblastoma. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 80, 233. https://doi.org/10.1007/s00018-023-04887-5

Champsaur, M., Lanier, L.L., 2010. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. Immunol. Rev. 235, 267–285. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00893.x

Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., Schumacker, P.T., 2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. J. Biol. Chem. 275, 25130–25138. https://doi.org/10.1074/jbc.M001914200

Chaves, C., Declèves, X., Taghi, M., Menet, M.-C., Lacombe, J., Varlet, P., Olaciregui, N.G., Carcaboso, A.M., Cisternino, S., 2020. Characterization of the Blood-Brain Barrier Integrity and the Brain Transport of SN-38 in an Orthotopic Xenograft Rat Model of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. Pharmaceutics 12, 399. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050399

Chen, J., Li, Y., Yu, T.-S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G., Parada, L.F., 2012. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. Nature 488, 522–526. https://doi.org/10.1038/nature11287

Chen, Z., Han, F., Du, Y., Shi, H., Zhou, W., 2023. Hypoxic microenvironment in cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions. Signal Transduct. Target. Ther. 8, 1–23. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01332-8

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

Chinwalla, A.T., Cook, L.L., Delehaunty, K.D., Fewell, G.A., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Graves, T.A., Hillier, L.W., Mardis, E.R., McPherson, J.D., Miner, T.L., Nash, W.E., Nelson, J.O., Nhan, M.N., Pepin, K.H., Pohl, C.S., Ponce, T.C., Schultz, B., Thompson, J., Trevaskis, E., Waterston, R.H., Wendl, M.C., Wilson, R.K., Yang, S.-P., An, P., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Brown, D.G., Butler, J., Daly, M., David, R., Deri, J., Dodge, S., Foley, K., Gage, D., Gnerre, S., Holzer, T., Jaffe, D.B., Kamal, M., Karlsson, E.K., Kells, C., Kirby, A., Kulbokas, E.J., Lander, E.S., Landers, T., Leger, J.P., Levine, R., Lindblad-Toh, K., Mauceli, E., Mayer, J.H., McCarthy, M., Meldrim, J., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Nicol, R., Nusbaum, C., Seaman, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Singer, J.B., Santos, R., Spencer, B., Stange-Thomann, N., Vinson, J.P., Wade, C.M., Wierzbowski, J., Wyman, D., Zody, M.C., Birney, E., Goldman, N., Kasprzyk, A., Mongin, E., Rust, A.G., Slater, G., Stabenau, A., Ureta-Vidal, A., Whelan, S., Ainscough, R., Attwood, J., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Burton, J., Clamp, M., Clee, C., Coulson, A., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Davies, J., Eyras, E., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Hunt, A., Jones, M., Joy, A., Leonard, S., Lloyd, C., Matthews, L., McLaren, S., McLay, K., Meredith, B., Mullikin, J.C., Ning, Z., Oliver, K., Overton-Larty, E., Plumb, R., Potter, S., Quail, M., Rogers, J., Scott, C., Searle, S., Shownkeen, R., Sims, S., Wall, M., West, A.P., Willey, D., Williams, S., Abril, J.F., Guigó, R., Parra, G., Agarwal, P., Agarwala, R., Church, D.M., Hlavina, W., Maglott, D.R., Sapojnikov, V., Alexandersson, M., Pachter, L., Antonarakis, S.E., Dermitzakis, E.T., Reymond, A., Ucla, C., Baertsch, R., Diekhans, M., Furey, T.S., Hinrichs, A., Hsu, F., Karolchik, D., Kent, W.J., Roskin, K.M., Schwartz, M.S., Sugnet, C., Weber, R.J., Bork, P., Letunic, I., Suyama, M., Torrents, D., Zdobnov, E.M., Botcherby, M., Brown, S.D., Campbell, R.D., Jackson, I., Bray, N., Couronne, O., Dubchak, I., Poliakov, A., Rubin, E.M., Brent, M.R., Flicek, P., Keibler, E., Korf, I., Batalov, S., Bult, C., Frankel, W.N., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Kawai, J., Okazaki, Y., Cawley, S., Kulp, D., Wheeler, R., Chiaromonte, F., Collins, F.S., Felsenfeld, A., Guyer, M., Peterson, J., Wetterstrand, K., Copley, R.R., Mott, R., Dewey, C., Dickens, N.J., Emes, R.D., Goodstadt, L., Ponting, C.P., Winter, E., Dunn, D.M., von Niederhausern, A.C., Weiss, R.B., Eddy, S.R., Johnson, L.S., Jones, T.A., Elnitski, L., Kolbe, D.L., Eswara, P., Miller, W., O'Connor, M.J., Schwartz, S., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Glusman, G., Smit, A., Green, E.D., Hardison, R.C., Yang, S., Haussler, D., Hua, A., Roe, B.A., Kucherlapati, R.S., Montgomery, K.T., Li, J., Li, M., Lucas, S., Ma, B., McCombie, W.R., Morgan, M., Pevzner, P., Tesler, G., Schultz, J., Smith, D.R., Tromp, J., Worley, K.C., Lander, E.S., Abril, J.F., Agarwal, P., Alexandersson, M., Antonarakis, S.E., Baertsch, R., Berry, E., Birney, E., Bork, P., Bray, N., Brent, M.R., Brown, D.G., Butler, J., Bult, C., Chiaromonte, F., Chinwalla, A.T., Church, D.M., Clamp, M., Collins, F.S., Copley, R.R., Couronne, O., Cawley, S., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., Dermitzakis, E.T., Dewey, C., Mouse Genome Sequencing Consortium, Genome Sequencing Center:, Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research:, European Bioinformatics Institute:, Wellcome Trust Sanger Institute, Research Group in Biomedical Informatics, Bioinformatics, National Center for Biotechnology Information, Department of Mathematics, Division of Medical Genetics, Center for Biomolecular Science and Engineering, EMBL, UK MRC Mouse Sequencing Consortium, Lawrence Berkeley National Laboratory, Department of Computer Science, School of Computer Science, The Jackson Laboratory, Laboratory for Genome Exploration, Affymetrix Inc., Departments of Statistics and Health Evaluation Sciences, National Human Genome Research Institute, Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Department of Electrical Engineering, Department of Human Anatomy and Genetics, Department of Human Genetics, Howard Hughes Medical Institute and Department of Genetics, Departments of Biochemistry and Molecular Biology and Computer Science and Engineering, Department of

Computer Science and Engineering, Baylor College of Medicine, The Institute for Systems Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Howard Hughes Medical Institute, Department of Chemistry and Biochemistry, Departments of Genetics and Medicine and Harvard-Partners Center for Genetics and Genomics, Department of Statistics, US DOE Joint Genome Institute, Cold Spring Harbor Laboratory, Wellcome Trust, Max Planck Institute for Molecular Genetics, Genome Therapeutics Corporation, Bioinformatics Solutions Inc., Department of Molecular and Human Genetics, Department of Biology, Members of the Mouse Genome Analysis Group, 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature 420, 520–562. https://doi.org/10.1038/nature01262

Chu, C., Li, J.Y., Boado, R.J., Pardridge, W.M., 2008. Blood-brain barrier genomics and cloning of a novel organic anion transporter. J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab. 28, 291–301. https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600538

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

Clark, C.A., Gupta, H.B., Sareddy, G., Pandeswara, S., Lao, S., Yuan, B., Drerup, J.M., Padron, A., Conejo-Garcia, J., Murthy, K., Liu, Y., Turk, M.J., Thedieck, K., Hurez, V., Li, R., Vadlamudi, R., Curiel, T.J., 2016. Tumor-Intrinsic PD-L1 Signals Regulate Cell Growth, Pathogenesis, and Autophagy in Ovarian Cancer and Melanoma. Cancer Res. 76, 6964–6974. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0258

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-Oncol. 19, 1025–1034. https://doi.org/10.1093/neuonc/nox021

Colegio, O.R., Chu, N.-Q., Szabo, A.L., Chu, T., Rhebergen, A.M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C.E., Eisenbarth, S.C., Phillips, G.M., Cline, G.W., Phillips, A.J., Medzhitov, R., 2014. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. Nature 513, 559–563. https://doi.org/10.1038/nature13490

Collins, M.K., 1989. Species specificity of interleukin 2 binding to individual receptor components. Eur. J. Immunol. 19, 1517–1520. https://doi.org/10.1002/eji.1830190828

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. Mol. Cancer Res. MCR 15, 1243–1254. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0389

Cowman, S.J., Koh, M.Y., 2022. Revisiting the HIF switch in the tumor and its immune microenvironment. Trends Cancer 8, 28–42. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.10.004

Csoka, A.B., Frost, G.I., Stern, R., 2001. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol. 20, 499–508. https://doi.org/10.1016/s0945-053x(01)00172-x

Cui, X., Tan Morales, R.-T., Qian, W., Wang, H., Gagner, J.-P., Dolgalev, I., Placantonakis, D., Zagzag, D., Cimmino, L., Snuderl, M., Lam, R.H.W., Chen, W., 2018. Hacking Macrophage-associated Immunosuppression for Regulating Glioblastoma Angiogenesis. Biomaterials 161, 164–178. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.053

Cutter, A.R., Hayes, J.J., 2015. A brief review of nucleosome structure. FEBS Lett. 589, 2914–2922. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.016

Da Silva, J., Lameiras, P., Beljebbar, A., Berquand, A., Villemin, M., Ramont, L., Dukic, S., Nuzillard, J.-M., Molinari, M., Gautier, M., Brassart-Pasco, S., Brassart, B., 2018. Structural characterization and in vivo pro-tumor properties of a highly conserved matrikine. Oncotarget 9, 17839–17857. https://doi.org/10.18632/oncotarget.24894

Dalkara, T., Gursoy-Ozdemir, Y., Yemisci, M., 2011. Brain microvascular pericytes in health and disease. Acta Neuropathol. (Berl.) 122, 1–9. https://doi.org/10.1007/s00401-011-0847-6

Daly, A.C., Prendergast, M.E., Hughes, A.J., Burdick, J.A., 2021. Bioprinting for the Biologist. Cell 184, 18–32. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.002

Daneman, R., Prat, A., 2015. The Blood–Brain Barrier. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 7, a020412. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412

Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A.A., Barres, B.A., 2010. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. Nature 468, 562–566. https://doi.org/10.1038/nature09513

Dang, H.X., Krasnick, B.A., White, B.S., Grossman, J.G., Strand, M.S., Zhang, J., Cabanski, C.R., Miller, C.A., Fulton, R.S., Goedegebuure, S.P., Fronick, C.C., Griffith, M., Larson, D.E., Goetz, B.D., Walker, J.R., Hawkins, W.G., Strasberg, S.M., Linehan, D.C., Lim, K.H., Lockhart, A.C., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Ley, T.J., Maher, C.A., Fields, R.C., 2020. The clonal evolution of metastatic colorectal cancer. Sci. Adv. 6, eaay9691. https://doi.org/10.1126/sciadv.aay9691

Deligne, C., Hachani, J., Duban-Deweer, S., Meignan, S., Leblond, P., Carcaboso, A.M., Sano, Y., Shimizu, F., Kanda, T., Gosselet, F., Dehouck, M.-P., Mysiorek, C., 2020. Development of a human in vitro blood-brain tumor barrier model of diffuse intrinsic pontine glioma to better understand the chemoresistance. Fluids Barriers CNS 17, 37. https://doi.org/10.1186/s12987-020-00198-0

Demeule, M., Régina, A., Jodoin, J., Laplante, A., Dagenais, C., Berthelet, F., Moghrabi, A., Béliveau, R., 2002. Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. Vascul. Pharmacol. 38, 339–348. https://doi.org/10.1016/s1537-1891(02)00201-x

Devoy, A., Bunton-Stasyshyn, R.K.A., Tybulewicz, V.L.J., Smith, A.J.H., Fisher, E.M.C., 2012. Genomically humanized mice: technologies and promises. Nat. Rev. Genet. 13, 14–20. https://doi.org/10.1038/nrg3116

DeWaal, D., Nogueira, V., Terry, A.R., Patra, K.C., Jeon, S.-M., Guzman, G., Au, J., Long, C.P., Antoniewicz, M.R., Hay, N., 2018. Hexokinase-2 depletion inhibits glycolysis and induces oxidative phosphorylation in hepatocellular carcinoma and sensitizes to metformin. Nat. Commun. 9, 446. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02733-4

Dienel, G.A., 2019. Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function. Physiol. Rev. 99, 949–1045. https://doi.org/10.1152/physrev.00062.2017

Doktorova, H., Hrabeta, J., Khalil, M.A., Eckschlager, T., 2015. Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: The role of not only HIF-1. Biomed. Pap. 159, 166–177. https://doi.org/10.5507/bp.2015.025

Dolega, M.E., Delarue, M., Ingremeau, F., Prost, J., Delon, A., Cappello, G., 2017. Cell-like pressure sensors reveal increase of mechanical stress towards the core of multicellular spheroids under compression. Nat. Commun. 8, 14056. https://doi.org/10.1038/ncomms14056

Du, R., Lu, K.V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passegué, E., Song, H., Vandenberg, S., Johnson, R.S., Werb, Z., Bergers, G., 2008. HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. Cancer Cell 13, 206–220. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.01.034

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, e1800479. https://doi.org/10.1002/pmic.201800479

Duchatel, R.J., Jackson, E.R., Parackal, S.G., Kiltschewskij, D., Findlay, I.J., Mannan, A., Staudt, D.E., Thomas, B.C., Germon, Z.P., Laternser, S., Kearney, P.S., Jamaluddin, M.F.B., Douglas, A.M., Beitaki, T., McEwen, H.P., Persson, M.L., Hocke, E.A., Jain, V., Aksu, M., Manning, E.E., Murray, H.C., Verrills, N.M., Sun, C.X., Daniel, P., Vilain, R.E., Skerrett-Byrne, D.A., Nixon, B., Hua, S., de Bock, C.E., Colino-Sanguino, Y., Valdes-Mora, F., Tsoli, M., Ziegler, D.S., Cairns, M.J., Raabe, E.H., Vitanza, N.A., Hulleman, E., Phoenix, T.N., Koschmann, C., Alvaro, F., Dayas, C.V., Tinkle, C.L., Wheeler, H., Whittle, J.R., Eisenstat, D.D., Firestein, R., Mueller, S., Valvi, S., Hansford, J.R., Ashley, D.M., Gregory, S.G., Kilburn, L.B., Nazarian, J., Cain, J.E., Dun, M.D., 2024. PI3K/mTOR

is a therapeutically targetable genetic dependency in diffuse intrinsic pontine glioma. J. Clin. Invest. 134, e170329. https://doi.org/10.1172/JCI170329

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-Oncol. Adv. 3, vdab169. https://doi.org/10.1093/noajnl/vdab169

Ehrlich, P., 1885. Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus: eine farbenanalytische Studie. A. Hirschwald.

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 Rep. 35, 108994. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108994

El-Khouly, F.E., van Vuurden, D.G., Stroink, T., Hulleman, E., Kaspers, G.J.L., Hendrikse, N.H., Veldhuijzen van Zanten, S.E.M., 2017. Effective Drug Delivery in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: A Theoretical Model to Identify Potential Candidates. Front. Oncol. 7, 254. https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00254

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

Emami Nejad, A., Najafgholian, S., Rostami, A., Sistani, A., Shojaeifar, S., Esparvarinha, M., Nedaeinia, R., Haghjooy Javanmard, S., Taherian, M., Ahmadlou, M., Salehi, R., Sadeghi, B., Manian, M., 2021. The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. Cancer Cell Int. 21, 62. https://doi.org/10.1186/s12935-020-01719-5

Erler, J.T., Cawthorne, C.J., Williams, K.J., Koritzinsky, M., Wouters, B.G., Wilson, C., Miller, C., Demonacos, C., Stratford, I.J., Dive, C., 2004. 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. 24, 2875–2889. https://doi.org/10.1128/MCB.24.7.2875-2889.2004

Fan, T., Zhang, M., Yang, J., Zhu, Z., Cao, W., Dong, C., 2023. Therapeutic cancer vaccines: advancements, challenges and prospects. Signal Transduct. Target. Ther. 8, 1–23. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01674-3

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. Mol. Cell 53, 49–62. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.030

Foss, A., Pathania, M., 2023. Pediatric Glioma Models Provide Insights into Tumor Development and Future Therapeutic Strategies. Dev. Neurosci. 46, 22–43. https://doi.org/10.1159/000531040

Fu, Q., Xu, L., Wang, Y., Jiang, Q., Liu, Z., Zhang, J., Zhou, Q., Zeng, H., Tong, S., Wang, T., Qi, Y., Hu, B., Fu, H., Xie, H., Zhou, L., Chang, Y., Zhu, Y., Dai, B., Zhang, W., Xu, J., 2019. Tumor-associated Macrophage-derived Interleukin-23 Interlinks Kidney Cancer Glutamine Addiction with Immune Evasion. Eur. Urol. 75, 752–763. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.09.030

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

Furman, R.R., Sharman, J.P., Coutre, S.E., Cheson, B.D., Pagel, J.M., Hillmen, P., Barrientos, J.C., Zelenetz, A.D., Kipps, T.J., Flinn, I., Ghia, P., Eradat, H., Ervin, T., Lamanna, N., Coiffier, B., Pettitt, A.R., Ma, S., Stilgenbauer, S., Cramer, P., Aiello, M., Johnson, D.M., Miller, L.L., Li, D., Jahn, T.M., Dansey, R.D., Hallek, M., O'Brien, S.M., 2014. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. N. Engl. J. Med. 370, 997–1007. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1315226

Gao, X., Lin, S.-H., Ren, F., Li, J.-T., Chen, J.-J., Yao, C.-B., Yang, H.-B., Jiang, S.-X., Yan, G.-Q., Wang, D., Wang, Y., Liu, Y., Cai, Z., Xu, Y.-Y., Chen, J., Yu, W., Yang, P.-Y., Lei, Q.-Y., 2016. Acetate functions as an epigenetic metabolite to promote lipid synthesis under hypoxia. Nat. Commun. 7, 11960. https://doi.org/10.1038/ncomms11960

Ghosh, C., Hossain, M., Solanki, J., Dadas, A., Marchi, N., Janigro, D., 2016. Pathophysiological implications of neurovascular P450 in brain disorders. Drug Discov. Today 21, 1609–1619. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.06.004

Goldmann, K.B.A. der W.M.-P., 1913. Abhandlungen der Königlich Bayerischen Akademie der Wissenschaften, Mathematisch-Physikalische Klasse. Verlag der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in Kommission bei der C.H. Beck'schen Verlagsbuchhandlung.

Gomez-Zepeda, D., Taghi, M., Scherrmann, J.-M., Decleves, X., Menet, M.-C., 2019. ABC Transporters at the Blood-Brain Interfaces, Their Study Models, and Drug Delivery Implications in Gliomas. Pharmaceutics 12. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010020

Gould, I.G., Tsai, P., Kleinfeld, D., Linninger, A., 2017. The capillary bed offers the largest hemodynamic resistance to the cortical blood supply. J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab. 37, 52–68. https://doi.org/10.1177/0271678X16671146

Grantab, R., Sivananthan, S., Tannock, I.F., 2006. minchint. Cancer Res. 66, 1033–1039. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3077

Grassl, N., Sahm, K., Süße, H., Poschke, I., Bunse, L., Bunse, T., Boschert, T., Mildenberger, I., Rupp, A.-K., Ewinger, M.P., Lanz, L.-M., Denk, M., Tabatabai, G., Ronellenfitsch, M.W., Herrlinger, U., Glas, M., Krex, D., Vajkoczy, P., Wick, A., Harting, I., Sahm, F., Deimling, A. von, Bendszus, M., Wick, W., Platten, M., 2023. INTERCEPT H3: a multicenter phase I peptide vaccine trial for the treatment of H3-mutated diffuse midline gliomas. Neurol. Res. Pract. 5, 55. https://doi.org/10.1186/s42466-023-00282-4

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

Gustafsson, J., Robinson, J.L., Zetterberg, H., Nielsen, J., 2024. Brain energy metabolism is optimized to minimize the cost of enzyme synthesis and transport. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 121, e2305035121. https://doi.org/10.1073/pnas.2305035121

Guzy, R.D., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K.D., Simon, M.C., Hammerling, U., Schumacker, P.T., 2005. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. Cell Metab. 1, 401–408. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.001

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

Hall, P.E., Lathia, J.D., Caldwell, M.A., Ffrench-Constant, C., 2008. Laminin enhances the growth of human neural stem cells in defined culture media. BMC Neurosci. 9, 71. https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-71

Hanahan, D., 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discov. 12, 31–46. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059

Harada, H., Itasaka, S., Kizaka-Kondoh, S., Shibuya, K., Morinibu, A., Shinomiya, K., Hiraoka, M., 2009. The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1alpha protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors. J. Biol. Chem. 284, 5332–5342. https://doi.org/10.1074/jbc.M806653200

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 Rep. 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. 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

Hayden, E., Holliday, H., Lehmann, R., Khan, A., Tsoli, M., Rayner, B.S., Ziegler, D.S., 2021. Therapeutic Targets in Diffuse Midline Gliomas—An Emerging Landscape. Cancers 13, 6251. https://doi.org/10.3390/cancers13246251

Hayward, R.M., Patronas, N., Baker, E.H., Vézina, G., Albert, P.S., Warren, K.E., 2008. Inter-observer variability in the measurement of diffuse intrinsic pontine gliomas. J. Neurooncol. 90, 57–61. https://doi.org/10.1007/s11060-008-9631-4

Herland, A., Maoz, B.M., Das, D., Somayaji, M.R., Prantil-Baun, R., Novak, R., Cronce, M., Huffstater, T., Jeanty, S.S.F., Ingram, M., Chalkiadaki, A., Benson Chou, D., Marquez, S., Delahanty, A., Jalili-Firoozinezhad, S., Milton, Y., Sontheimer-Phelps, A., Swenor, B., Levy, O., Parker, K.K., Przekwas, A., Ingber, D.E., 2020. Quantitative prediction of human pharmacokinetic responses to drugs via fluidically coupled vascularized organ chips. Nat. Biomed. Eng. 4, 421–436. https://doi.org/10.1038/s41551-019-0498-9

Hess, G., Herbrecht, R., Romaguera, J., Verhoef, G., Crump, M., Gisselbrecht, C., Laurell, A., Offner, F., Strahs, A., Berkenblit, A., Hanushevsky, O., Clancy, J., Hewes, B., Moore, L., Coiffier, B., 2009. Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 27, 3822–3829. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.7977

Hlouschek, J., Hansel, C., Jendrossek, V., Matschke, J., 2018a. The Mitochondrial Citrate Carrier (SLC25A1) Sustains Redox Homeostasis and Mitochondrial Metabolism Supporting Radioresistance of Cancer Cells With Tolerance to Cycling Severe Hypoxia. Front. Oncol. 8, 170. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00170

Hlouschek, J., Ritter, V., Wirsdörfer, F., Klein, D., Jendrossek, V., Matschke, J., 2018b. Targeting SLC25A10 alleviates improved antioxidant capacity and associated radioresistance of cancer cells induced by chronic-cycling hypoxia. Cancer Lett. 439, 24–38. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.09.002

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

Horsman, M.R., Overgaard, J., 2016. The impact of hypoxia and its modification of the outcome of radiotherapy. J. Radiat. Res. (Tokyo) 57 Suppl 1, i90–i98. https://doi.org/10.1093/jrr/rrw007

Hosoya, K., Ohtsuki, S., Terasaki, T., 2002. Recent advances in the brain-to-blood efflux transport across the blood-brain barrier. Int. J. Pharm. 248, 15–29. https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00457-x

Hossain, M.M.N., Hu, N.-W., Abdelhamid, M., Singh, S., Murfee, W.L., Balogh, P., 2023. Angiogenic Microvascular Wall Shear Stress Patterns Revealed Through Three-dimensional Red Blood Cell Resolved Modeling. Function 4, zqad046. https://doi.org/10.1093/function/zqad046

Huang, R.-X., Zhou, P.-K., 2020. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. Signal Transduct. Target. Ther. 5, 1–27. https://doi.org/10.1038/s41392-020-0150-x

Huh, D., Matthews, B.D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H.Y., Ingber, D.E., 2010. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. Science 328, 1662–1668. https://doi.org/10.1126/science.1188302

Huntington, N.D., Legrand, N., Alves, N.L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H., Di Santo, J.P., 2009. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. J. Exp. Med. 206, 25–34. https://doi.org/10.1084/jem.20082013

Iadecola, C., 2004. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. Nat. Rev. Neurosci. 5, 347–360. https://doi.org/10.1038/nrn1387

Intlekofer, A.M., Wang, B., Liu, H., Shah, H., Carmona-Fontaine, C., Rustenburg, A.S., Salah, S., Gunner, M.R., Chodera, J.D., Cross, J.R., Thompson, C.B., 2017. L-2-Hydroxyglutarate production arises from noncanonical enzyme function at acidic pH. Nat. Chem. Biol. 13, 494–500. https://doi.org/10.1038/nchembio.2307

Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hamaguchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki, Y., Miyauchi, S., Spicer, A.P., McDonald, J.A., Kimata, K., 1999. Three Isoforms of Mammalian Hyaluronan Synthases Have Distinct Enzymatic Properties*. J. Biol. Chem. 274, 25085–25092. https://doi.org/10.1074/jbc.274.35.25085

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 Res. OF1–OF17. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-23-0186

Jackson, M., Hassiotou, F., Nowak, A., 2015. Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target. Carcinogenesis 36, 177–185. https://doi.org/10.1093/carcin/bgu243

Jeong, H., Kim, Sehui, Hong, B.-J., Lee, C.-J., Kim, Y.-E., Bok, S., Oh, J.-M., Gwak, S.-H., Yoo, M.Y., Lee, M.S., Chung, S.-J., Defrêne, J., Tessier, P., Pelletier, M., Jeon, H., Roh, T.-Y., Kim, B., Kim, K.H., Ju, J.H., Kim, Sungjee, Lee, Y.-J., Kim, D.-W., Kim, I.H., Kim, H.J., Park, J.-W., Lee, Y.-S., Lee, J.S., Cheon, G.J., Weissman, I.L., Chung, D.H., Jeon, Y.K., Ahn, G.-O., 2019. Tumor-Associated Macrophages Enhance Tumor Hypoxia and Aerobic Glycolysis. Cancer Res. 79, 795–806. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2545

Jhanwar-Uniyal, M., Dominguez, J.F., Mohan, A.L., Tobias, M.E., Gandhi, C.D., 2022. Disentangling the signaling pathways of mTOR complexes, mTORC1 and mTORC2, as a therapeutic target in glioblastoma. Adv. Biol. Regul. 83, 100854. https://doi.org/10.1016/j.jbior.2021.100854

Jones, C., Baker, S.J., 2014. Unique genetic and epigenetic mechanisms driving paediatric diffuse high-grade glioma. Nat. Rev. Cancer 14. 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., 2017. Pediatric high-grade glioma: biologically and clinically in need of new thinking. Neuro-Oncol. 19, 153–161. https://doi.org/10.1093/neuonc/now101

Jones, C., 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

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. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 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-Oncol. 22, 1785–1796. https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa128

Keith, B., Johnson, R.S., Simon, M.C., 2011. HIF1α and HIF2α: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. Nat. Rev. Cancer 12, 9–22. https://doi.org/10.1038/nrc3183

Kim, H.J., Suh, C.-O., 2023. Radiotherapy for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: Insufficient but Indispensable. Brain Tumor Res. Treat. 11, 79–85. https://doi.org/10.14791/btrt.2022.0041

Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., Dang, C.V., 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. Cell Metab. 3, 177–185. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002

Kim, Y., Kumar, S., 2014. CD44-Mediated Adhesion to Hyaluronic Acid Contributes to Mechanosensing and Invasive Motility. Mol. Cancer Res. 12, 1416–1429. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0629

Koncar, R.F., Dey, B.R., Stanton, A.-C.J., Agrawal, N., Wassell, M.L., McCarl, L.H., Locke, A.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 Res. 79, 4026–4041. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3521

Kowalski-Chauvel, A., Modesto, A., Gouaze-andersson, V., Baricault, L., Gilhodes, J., Delmas, C., Lemarie, A., Toulas, C., Cohen-Jonathan-Moyal, E., Seva, C., 2018. Alpha-6 integrin promotes radioresistance of glioblastoma by modulating DNA damage response and the transcription factor Zeb1. Cell Death Dis. 9, 1–12. https://doi.org/10.1038/s41419-018-0853-x

Koyasu, S., Kobayashi, M., Goto, Y., Hiraoka, M., Harada, H., 2018. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. Cancer Sci. 109, 560–571. https://doi.org/10.1111/cas.13483

Kuczek, D.E., Larsen, A.M.H., Thorseth, M.-L., Carretta, M., Kalvisa, A., Siersbæk, M.S., Simões, A.M.C., Roslind, A., Engelholm, L.H., Noessner, E., Donia, M., Svane, I.M., Straten, P.T., Grøntved, L., Madsen, D.H., 2019. Collagen density regulates the activity of tumor-infiltrating T cells. J. Immunother. Cancer 7, 68. https://doi.org/10.1186/s40425-019-0556-6

Kugler, E.C., Greenwood, J., MacDonald, R.B., 2021. The “Neuro-Glial-Vascular” Unit: The Role of Glia in Neurovascular Unit Formation and Dysfunction. Front. Cell Dev. Biol. 9, 732820. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.732820

Kutuzov, N., Flyvbjerg, H., Lauritzen, M., 2018. Contributions of the glycocalyx, endothelium, and extravascular compartment to the blood-brain barrier. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 115, E9429–E9438. https://doi.org/10.1073/pnas.1802155115

Laoui, D., Van Overmeire, E., Di Conza, G., Aldeni, C., Keirsse, J., Morias, Y., Movahedi, K., Houbracken, I., Schouppe, E., Elkrim, Y., Karroum, O., Jordan, B., Carmeliet, P., Gysemans, C., De Baetselier, P., Mazzone, M., Van Ginderachter, J.A., 2014. Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. Cancer Res. 74, 24–30. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1196

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

Lathia, J.D., Gallagher, J., Heddleston, J.M., Wang, J., Eyler, C.E., MacSwords, J., Wu, Q., Vasanji, A., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., Rich, J.N., 2010. Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. Cell Stem Cell 6, 421–432. https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.02.018

Lau, M.-T., Klausen, C., Leung, P.C.K., 2011. E-cadherin inhibits tumor cell growth by suppressing PI3K/Akt signaling via β-catenin-Egr1-mediated PTEN expression. Oncogene 30, 2753–2766. https://doi.org/10.1038/onc.2011.6

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, G., Won, H.-S., Lee, Y.-M., Choi, J.-W., Oh, T.-I., Jang, J.-H., Choi, D.-K., Lim, B.-O., Kim, Y.J., Park, J.-W., Puigserver, P., Lim, J.-H., 2016. Oxidative Dimerization of PHD2 is Responsible for its Inactivation and Contributes to Metabolic Reprogramming via HIF-1α Activation. Sci. Rep. 6, 18928. https://doi.org/10.1038/srep18928

Lee, P., Chandel, N.S., Simon, M.C., 2020. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 21, 268–283. https://doi.org/10.1038/s41580-020-0227-y

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

LeSavage, B.L., Suhar, R.A., Broguiere, N., Lutolf, M.P., Heilshorn, S.C., 2022. Next-generation cancer organoids. Nat. Mater. 21, 143–159. https://doi.org/10.1038/s41563-021-01057-5

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

Leung, C.M., de Haan, P., Ronaldson-Bouchard, K., Kim, G.-A., Ko, J., Rho, H.S., Chen, Z., Habibovic, P., Jeon, N.L., Takayama, S., Shuler, M.L., Vunjak-Novakovic, G., Frey, O., Verpoorte, E., Toh, Y.-C., 2022. A guide to the organ-on-a-chip. Nat. Rev. Methods Primer 2, 1–29. https://doi.org/10.1038/s43586-022-00118-6

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, L.-C., Zhang, M., Feng, Y.-K., Wang, X.-J., 2020. IDH1-R132H Suppresses Glioblastoma Malignancy through FAT1-ROS-HIF-1α Signaling. Neurol. India 68, 1050–1058. https://doi.org/10.4103/0028-3886.294557

Li, Y., Xu, Y., Wang, R., Li, W., He, W., Luo, X., Ye, Y., 2020. Expression of Notch-Hif-1α signaling pathway in liver regeneration of rats. J. Int. Med. Res. 48, 300060520943790. https://doi.org/10.1177/0300060520943790

Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., Rich, J.N., 2009. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. Cancer Cell 15, 501–513. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.018

Lin, C., Lin, L., Mao, S., Yang, L., Yi, L., Lin, X., Wang, J., Lin, Z.-X., Lin, J.-M., 2018. Reconstituting Glioma Perivascular Niches on a Chip for Insights into Chemoresistance of Glioma. Anal. Chem. 90, 10326–10333. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02133

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, S., Wan, S., Sun, L., Hu, J., Fang, D., Zhao, R., Yuan, S., Zhang, L., 2012. Chemokine C-C motif receptor 5 and C-C motif ligand 5 promote cancer cell migration under hypoxia. Cancer Sci. 103, 904–912. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02259.x

Lingineni, K., Belekar, V., Tangadpalliwar, S.R., Garg, P., 2017. The role of multidrug resistance protein (MRP-1) as an active efflux transporter on blood-brain barrier (BBB) permeability. Mol. Divers. 21, 355–365. https://doi.org/10.1007/s11030-016-9715-6

Liu, I., Jiang, L., Samuelsson, E.R., Marco Salas, S., Beck, A., Hack, O.A., Jeong, D., Shaw, M.L., Englinger, B., LaBelle, J., Mire, H.M., Madlener, S., Mayr, L., Quezada, M.A., Trissal, M., Panditharatna, E., Ernst, K.J., Vogelzang, J., Gatesman, T.A., Halbert, M.E., Palova, H., Pokorna, P., Sterba, J., Slaby, O., Geyeregger, R., Diaz, A., Findlay, I.J., Dun, M.D., Resnick, A., Suvà, M.L., Jones, D.T.W., Agnihotri, S., Svedlund, J., Koschmann, C., Haberler, C., Czech, T., Slavc, I., Cotter, J.A., Ligon, K.L., Alexandrescu, S., Yung, W.K.A., Arrillaga-Romany, I., Gojo, J., Monje, M., Nilsson, M., Filbin, M.G., 2022. The landscape of tumor cell states and spatial organization in H3-K27M mutant diffuse midline glioma across age and location. Nat. Genet. 54, 1881–1894. https://doi.org/10.1038/s41588-022-01236-3

Liu, M., Tolg, C., Turley, E., 2019. Dissecting the Dual Nature of Hyaluronan in the Tumor Microenvironment. Front. Immunol. 10, 947. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00947

Liu, Y., Hashizume, K., Chen, Z., Samoto, K., Ningaraj, N., Asotra, K., Black, K.L., 2001. Correlation between bradykinin-induced blood-tumor barrier permeability and B2 receptor expression in experimental brain tumors. Neurol. Res. 23, 379–387. https://doi.org/10.1179/016164101101198596

Liu, Y., Wu, W., Cai, C., Zhang, H., Shen, H., Han, Y., 2023. Patient-derived xenograft models in cancer therapy: technologies and applications. Signal Transduct. Target. Ther. 8, 1–24. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01419-2

Liu, Y., Yang, M., Luo, J., Zhou, H., 2020. Radiotherapy targeting cancer stem cells “awakens” them to induce tumour relapse and metastasis in oral cancer. Int. J. Oral Sci. 12, 19. https://doi.org/10.1038/s41368-020-00087-0

Liu, Z.-L., Chen, H.-H., Zheng, L.-L., Sun, L.-P., Shi, L., 2023. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. Signal Transduct. Target. Ther. 8, 1–39. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01460-1

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. (Berl.) 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. (Berl.) 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-Oncol. 23, 1231–1251. https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106

Low, L.A., Mummery, C., Berridge, B.R., Austin, C.P., Tagle, D.A., 2021. Organs-on-chips: into the next decade. Nat. Rev. Drug Discov. 20, 345–361. https://doi.org/10.1038/s41573-020-0079-3

Luciani, F., Spada, M., De Milito, A., Molinari, A., Rivoltini, L., Montinaro, A., Marra, M., Lugini, L., Logozzi, M., Lozupone, F., Federici, C., Iessi, E., Parmiani, G., Arancia, G., Belardelli, F., Fais, S., 2004. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. J. Natl. Cancer Inst. 96, 1702–1713. https://doi.org/10.1093/jnci/djh305

Luo, X., Cheng, C., Tan, Z., Li, N., Tang, M., Yang, L., Cao, Y., 2017. Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis. Mol. Cancer 16, 76. https://doi.org/10.1186/s12943-017-0646-3

Luo, Y., Li, M., Zuo, X., Basourakos, S.P., Zhang, J., Zhao, J., Han, Y., Lin, Y., Wang, Y., Jiang, Y., Lan, L., 2018. β-catenin nuclear translocation induced by HIF-1α overexpression leads to the radioresistance of prostate cancer. Int. J. Oncol. 52, 1827–1840. https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4368

Lyle, L.T., Lockman, P.R., Adkins, C.E., Mohammad, A.S., Sechrest, E., Hua, E., Palmieri, D., Liewehr, D.J., Steinberg, S.M., Kloc, W., Izycka-Swieszewska, E., Duchnowska, R., Nayyar, N., Brastianos, P.K., Steeg, P.S., Gril, B., 2016. Alterations in Pericyte Subpopulations Are Associated with Elevated Blood-Tumor Barrier Permeability in Experimental Brain Metastasis of Breast Cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 22, 5287–5299. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1836

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

Majzner, R.G., Ramakrishna, S., Yeom, K.W., Patel, S., Chinnasamy, H., Schultz, L.M., Richards, R.M., Jiang, L., Barsan, V., Mancusi, R., Geraghty, A.C., Good, Z., Mochizuki, A.Y., Gillespie, S.M., Toland, A.M.S., Mahdi, J., Reschke, A., Nie, E.H., Chau, I.J., Rotiroti, M.C., Mount, C.W., Baggott, C., Mavroukakis, S., Egeler, E., Moon, J., Erickson, C., Green, S., Kunicki, M., Fujimoto, M., Ehlinger, Z., Reynolds, W., Kurra, S., Warren, K.E., Prabhu, S., Vogel, H., Rasmussen, L., Cornell, T.T., Partap, S., Fisher, P.G., Campen, C.J., Filbin, M.G., Grant, G., Sahaf, B., Davis, K.L., Feldman, S.A., Mackall, C.L., Monje, M., 2022. GD2-CAR T cell therapy for H3K27M-mutated diffuse midline gliomas. Nature 603, 934–941. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04489-4

Masters, J.R.W., 2000. Human cancer cell lines: fact and fantasy. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1, 233–236. https://doi.org/10.1038/35043102

McKeown, S.R., 2014. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response. Br. J. Radiol. 87, 20130676. https://doi.org/10.1259/bjr.20130676

Menaceur, C., Gosselet, F., Fenart, L., Saint-Pol, J., 2021. The Blood-Brain Barrier, an Evolving Concept Based on Technological Advances and Cell-Cell Communications. Cells 11, 133. https://doi.org/10.3390/cells11010133

Meyer, J., Mischeck, U., Veyhl, M., Henzel, K., Galla, H.J., 1990. Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. Brain Res. 514, 305–309. https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91425-g

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, J.S., Stevens, K.R., Yang, M.T., Baker, B.M., Nguyen, D.-H.T., Cohen, D.M., Toro, E., Chen, A.A., Galie, P.A., Yu, X., Chaturvedi, R., Bhatia, S.N., Chen, C.S., 2012. Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues. Nat. Mater. 11, 768–774. https://doi.org/10.1038/nmat3357

Mills, W.A., Woo, A.M., Jiang, S., Martin, J., Surendran, D., Bergstresser, M., Kimbrough, I.F., Eyo, U.B., Sofroniew, M.V., Sontheimer, H., 2022. Astrocyte plasticity in mice ensures continued endfoot coverage of cerebral blood vessels following injury and declines with age. Nat. Commun. 13, 1794. https://doi.org/10.1038/s41467-022-29475-2

Minchinton, A.I., Tannock, I.F., 2006. Drug penetration in solid tumours. Nat. Rev. Cancer 6, 583–592. https://doi.org/10.1038/nrc1893

Misra, S., Hascall, V.C., Markwald, R.R., Ghatak, S., 2015. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. Front. Immunol. 6, 201. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00201

Mitra, S.K., Schlaepfer, D.D., 2006. Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells. Curr. Opin. Cell Biol., Cell-to-cell contact and extracellular matrix 18, 516–523. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.08.011

Moeller, B.J., Cao, Y., Li, C.Y., Dewhirst, M.W., 2004. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. Cancer Cell 5, 429–441. https://doi.org/10.1016/s1535-6108(04)00115-1

Mohsin, N. ul A., Farrukh, M., Shahzadi, S., Irfan, M., Mohsin, N. ul A., Farrukh, M., Shahzadi, S., Irfan, M., 2024. Drug Metabolism: Phase I and Phase II Metabolic Pathways, in: Drug Metabolism and Pharmacokinetics. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.112854

Monje, M., Mahdi, J., Majzner, R., Yeom, K.W., Schultz, L.M., Richards, R.M., Barsan, V., Song, K.-W., Kamens, J., Baggott, C., Kunicki, M., Rietberg, S.P., Lim, A.S., Reschke, A., Mavroukakis, S., Egeler, E., Moon, J., Patel, S., Chinnasamy, H., Erickson, C., Jacobs, A., Duh, A.K., Tunuguntla, R., Klysz, D.D., Fowler, C., Green, S., Beebe, B., Carr, C., Fujimoto, M., Brown, A.K., Petersen, A.-L.G., McIntyre, C., Siddiqui, A., Lepori-Bui, N., Villar, K., Pham, K., Bove, R., Musa, E., Reynolds, W.D., Kuo, A., Prabhu, S., Rasmussen, L., Cornell, T.T., Partap, S., Fisher, P.G., Campen, C.J., Grant, G., Prolo, L., Ye, X., Sahaf, B., Davis, K.L., Feldman, S.A., Ramakrishna, S., Mackall, C., 2025. Intravenous and intracranial GD2-CAR T cells for H3K27M+ diffuse midline gliomas. Nature 637, 708–715. https://doi.org/10.1038/s41586-024-08171-9

Montana, V., Sontheimer, H., 2011. Bradykinin promotes the chemotactic invasion of primary brain tumors. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 31, 4858–4867. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3825-10.2011

Moroni, L., Burdick, J.A., Highley, C., Lee, S.J., Morimoto, Y., Takeuchi, S., Yoo, J.J., 2018. Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine. Nat. Rev. Mater. 3, 21–37. https://doi.org/10.1038/s41578-018-0006-y

Morris, M.E., Rodriguez-Cruz, V., Felmlee, M.A., 2017. SLC and ABC Transporters: Expression, Localization, and Species Differences at the Blood-Brain and the Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers. AAPS J. 19, 1317–1331. https://doi.org/10.1208/s12248-017-0110-8

Motz, G.T., Coukos, G., 2011. The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. Nat. Rev. Immunol. 11, 702–711. https://doi.org/10.1038/nri3064

Mount, C.W., Majzner, R.G., Sundaresh, S., Arnold, E.P., Kadapakkam, M., Haile, S., Labanieh, L., Hulleman, E., Woo, P.J., Rietberg, S.P., Vogel, H., Monje, M., Mackall, C.L., 2018. Potent antitumor efficacy of anti-GD2 CAR T-cells in H3K27M+ diffuse midline gliomas. Nat. Med. 24, 572–579. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0006-x

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

Mukherjee, B., McEllin, B., Camacho, C.V., Tomimatsu, N., Sirasanagandala, S., Nannepaga, S., Hatanpaa, K.J., Mickey, B., Madden, C., Maher, E., Boothman, D.A., Furnari, F., Cavenee, W.K., Bachoo, R.M., Burma, S., 2009. EGFRvIII and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism for radioresistance in glioblastoma. Cancer Res. 69, 4252–4259. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4853

Nagao, A., Kobayashi, M., Koyasu, S., Chow, C.C.T., Harada, H., 2019. HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. Int. J. Mol. Sci. 20, 238. https://doi.org/10.3390/ijms20020238

Novak, R., Ingram, M., Marquez, S., Das, D., Delahanty, A., Herland, A., Maoz, B.M., Jeanty, S.S.F., Somayaji, M.R., Burt, M., Calamari, E., Chalkiadaki, A., Cho, A., Choe, Y., Chou, D.B., Cronce, M., Dauth, S., Divic, T., Fernandez-Alcon, J., Ferrante, T., Ferrier, J., FitzGerald, E.A., Fleming, R., Jalili-Firoozinezhad, S., Grevesse, T., Goss, J.A., Hamkins-Indik, T., Henry, O., Hinojosa, C., Huffstater, T., Jang, K.-J., Kujala, V., Leng, L., Mannix, R., Milton, Y., Nawroth, J., Nestor, B.A., Ng, C.F., O'Connor, B., Park, T.-E., Sanchez, H., Sliz, J., Sontheimer-Phelps, A., Swenor, B., Thompson, G., Touloumes, G.J., Tranchemontagne, Z., Wen, N., Yadid, M., Bahinski, A., Hamilton, G.A., Levner, D., Levy, O., Przekwas, A., Prantil-Baun, R., Parker, K.K., Ingber, D.E., 2020. Robotic fluidic coupling and interrogation of multiple vascularized organ chips. Nat. Biomed. Eng. 4, 407–420. https://doi.org/10.1038/s41551-019-0497-x

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

O'Kane, R.L., Hawkins, R.A., 2003. Na+-dependent transport of large neutral amino acids occurs at the abluminal membrane of the blood-brain barrier. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 285, E1167-1173. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00193.2003

O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., Folkman, J., 1997. Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. Cell 88, 277–285. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81848-6

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-Oncol. 21, v1–v100. https://doi.org/10.1093/neuonc/noz150

Ostrom, Q.T., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J.S., 2021. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. Neuro-Oncol. 23, iii1–iii105. https://doi.org/10.1093/neuonc/noab200

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

Pardridge, W.M., Boado, R.J., Farrell, C.R., 1990. Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. J. Biol. Chem. 265, 18035–18040. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)38267-X

Parodi, M., Raggi, F., Cangelosi, D., Manzini, C., Balsamo, M., Blengio, F., Eva, A., Varesio, L., Pietra, G., Moretta, L., Mingari, M.C., Vitale, M., Bosco, M.C., 2018. Hypoxia Modifies the Transcriptome of Human NK Cells, Modulates Their Immunoregulatory Profile, and Influences NK Cell Subset Migration. Front. Immunol. 9, 2358. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02358

Patel, A.P., Tirosh, I., Trombetta, J.J., Shalek, A.K., Gillespie, S.M., Wakimoto, H., Cahill, D.P., Nahed, B.V., Curry, W.T., Martuza, R.L., Louis, D.N., Rozenblatt-Rosen, O., Suvà, M.L., Regev, A.,

Bernstein, B.E., 2014. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. Science 344, 1396–1401. https://doi.org/10.1126/science.1254257

Patel, S.K., Hartley, R.M., Wei, X., Furnish, R., Escobar-Riquelme, F., Bear, H., Choi, K., Fuller, C., Phoenix, T.N., 2020. Generation of diffuse intrinsic pontine glioma mouse models by brainstem-targeted in utero electroporation. Neuro-Oncol. 22, 381–392. 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

Pavel, M.E., Hainsworth, J.D., Baudin, E., Peeters, M., Hörsch, D., Winkler, R.E., Klimovsky, J., Lebwohl, D., Jehl, V., Wolin, E.M., Öberg, K., Van Cutsem, E., Yao, J.C., RADIANT-2 Study Group, 2011. Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. Lancet Lond. Engl. 378, 2005–2012. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61742-X

Pekny, M., Nilsson, M., 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. Glia 50, 427–434. https://doi.org/10.1002/glia.20207

Peñaranda Fajardo, N.M., Meijer, C., Kruyt, F.A.E., 2016. The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma. Biochem. Pharmacol. 118, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.04.008

Peñaranda-Fajardo, N.M., Meijer, C., Liang, Y., Dijkstra, B.M., Aguirre-Gamboa, R., den Dunnen, W.F.A., Kruyt, F.A.E., 2019. ER stress and UPR activation in glioblastoma: identification of a noncanonical PERK mechanism regulating GBM stem cells through SOX2 modulation. Cell Death Dis. 10, 1–16. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1934-1

Pinzón-Daza, M.L., Cuellar-Saenz, Y., Nualart, F., Ondo-Mendez, A., Del Riesgo, L., Castillo-Rivera, F., Garzón, R., 2017. Oxidative Stress Promotes Doxorubicin-Induced Pgp and BCRP Expression in Colon Cancer Cells Under Hypoxic Conditions. J. Cell. Biochem. 118, 1868–1878. https://doi.org/10.1002/jcb.25890

Plessier, A., Le Dret, L., Varlet, P., Beccaria, K., Lacombe, J., Mériaux, S., Geffroy, F., Fiette, L., Flamant, P., Chrétien, F., Blauwblomme, T., Puget, S., Grill, J., Debily, M.-A., Castel, D., 2017. New in vivo avatars of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) from stereotactic biopsies performed at diagnosis. Oncotarget 8, 52543–52559. https://doi.org/10.18632/oncotarget.15002

Pollack, I.F., Agnihotri, S., Broniscer, A., 2019. Childhood brain tumors: current management, biological insights, and future directions. J. Neurosurg. Pediatr. 23, 261–273. https://doi.org/10.3171/2018.10.PEDS18377

Pollard, P.J., Brière, J.J., Alam, N.A., Barwell, J., Barclay, E., Wortham, N.C., Hunt, T., Mitchell, M., Olpin, S., Moat, S.J., Hargreaves, I.P., Heales, S.J., Chung, Y.L., Griffiths, J.R., Dalgleish, A., McGrath, J.A., Gleeson, M.J., Hodgson, S.V., Poulsom, R., Rustin, P., Tomlinson, I.P.M., 2005. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. Hum. Mol. Genet. 14, 2231–2239. https://doi.org/10.1093/hmg/ddi227

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-Oncol. 24, 1438–1451. https://doi.org/10.1093/neuonc/noac041

Rakotomalala, A., Escande, A., Furlan, A., Meignan, S., Lartigau, E., 2021. 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

Raval, R.R., Lau, K.W., Tran, M.G.B., Sowter, H.M., Mandriota, S.J., Li, J.-L., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L., Ratcliffe, P.J., 2005. Contrasting Properties of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-Associated Renal Cell Carcinoma. Mol. Cell. Biol. 25, 5675–5686. https://doi.org/10.1128/MCB.25.13.5675-5686.2005

Reese, T.S., Karnovsky, M.J., 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. J. Cell Biol. 34, 207–217. https://doi.org/10.1083/jcb.34.1.207

Rehn, M., Olsson, A., Reckzeh, K., Diffner, E., Carmeliet, P., Landberg, G., Cammenga, J., 2011. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor regulates murine hematopoietic stem cell function in the low-oxygenic niche. Blood 118, 1534–1543. https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-332890

Ricard-Blum, S., 2011. The collagen family. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3, a004978. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978

Richardson, R.B., Harper, M.-E., 2016. Mitochondrial stress controls the radiosensitivity of the oxygen effect: Implications for radiotherapy. Oncotarget 7, 21469–21483. https://doi.org/10.18632/oncotarget.7412

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

Robison, N.J., Kieran, M.W., 2014. Diffuse intrinsic pontine glioma: a reassessment. J. Neurooncol. 119, 7–15. https://doi.org/10.1007/s11060-014-1448-8

Rössler, K., Neuchrist, C., Kitz, K., Scheiner, O., Kraft, D., Lassmann, H., 1992. Expression of leucocyte adhesion molecules at the human blood-brain barrier (BBB). J. Neurosci. Res. 31, 365–374. https://doi.org/10.1002/jnr.490310219

Santa-Maria, A.R., Walter, F.R., Figueiredo, R., Kincses, A., Vigh, J.P., Heymans, M., Culot, M., Winter, P., Gosselet, F., Dér, A., Deli, M.A., 2021. Flow induces barrier and glycocalyx-related genes and negative surface charge in a lab-on-a-chip human blood-brain barrier model. J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab. 41, 2201–2215. https://doi.org/10.1177/0271678X21992638

Sarnow, K., Majercak, E., Qurbonov, Q., Cruzeiro, G.A.V., Jeong, D., Harque, I.A., Khalil, A., Baird, L.C., Filbin, M.G., Tang, X., 2024. Neuroimmune-competent human brain organoid model of Diffuse Midline Glioma. Neuro-Oncol. noae245. https://doi.org/10.1093/neuonc/noae245

Saw, S., Aiken, A., Fang, H., McKee, T.D., Bregant, S., Sanchez, O., Chen, Y., Weiss, A., Dickson, B.C., Czarny, B., Sinha, A., Fosang, A., Dive, V., Waterhouse, P.D., Kislinger, T., Khokha, R., 2019. Metalloprotease inhibitor TIMP proteins control FGF-2 bioavailability and regulate skeletal growth. J. Cell Biol. 218, 3134–3152. https://doi.org/10.1083/jcb.201906059

Schaff, L.R., Mellinghoff, I.K., 2023. Glioblastoma and other Primary Brain Malignancies in Adults. A Review. JAMA 329, 574–587. https://doi.org/10.1001/jama.2023.0023

Schumacher, M., Schulte-Mönting, J., Stoeter, P., Warmuth-Metz, M., Solymosi, L., 2007. Magnetic resonance imaging compared with biopsy in the diagnosis of brainstem diseases of childhood: a multicenter review. J. Neurosurg. 106, 111–119. https://doi.org/10.3171/ped.2007.106.2.111

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

Sharifzad, F., Ghavami, S., Verdi, J., Mardpour, S., Mollapour Sisakht, M., Azizi, Z., Taghikhani, A., Łos, M.J., Fakharian, E., Ebrahimi, M., Hamidieh, A.A., 2019. Glioblastoma cancer stem cell biology: Potential theranostic targets. Drug Resist. Updat. 42, 35–45. https://doi.org/10.1016/j.drup.2018.03.003

Sharma, P., Aaroe, A., Liang, J., Puduvalli, V.K., 2023. Tumor microenvironment in glioblastoma: Current and emerging concepts. Neuro-Oncol. Adv. 5, vdad009. https://doi.org/10.1093/noajnl/vdad009

Shawahna, R., Decleves, X., Scherrmann, J.-M., 2013. Hurdles with using in vitro models to predict human blood-brain barrier drug permeability: a special focus on transporters and metabolizing enzymes. Curr. Drug Metab. 14, 120–136.

Shawahna, R., Uchida, Y., Declèves, X., Ohtsuki, S., Yousif, S., Dauchy, S., Jacob, A., Chassoux, F., Daumas-Duport, C., Couraud, P.-O., Terasaki, T., Scherrmann, J.-M., 2011. Transcriptomic and Quantitative Proteomic Analysis of Transporters and Drug Metabolizing Enzymes in Freshly Isolated Human Brain Microvessels. Mol. Pharm. 8, 1332–1341. https://doi.org/10.1021/mp200129p

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

Sieger, D., Korzinskas, T., Jung, O., Stojanovic, S., Wenisch, S., Smeets, R., Gosau, M., Schnettler, R., Najman, S., Barbeck, M., 2019. The Addition of High Doses of Hyaluronic Acid to a Biphasic Bone Substitute Decreases the Proinflammatory Tissue Response. Int. J. Mol. Sci. 20, 1969. https://doi.org/10.3390/ijms20081969

Sinha, S., Huang, M.S., Mikos, G., Bedi, Y., Soto, L., Lensch, S., Ayushman, M., Bintu, L., Bhutani, N., Heilshorn, S.C., Yang, F., 2024. Laminin-associated integrins mediate Diffuse Intrinsic Pontine Glioma infiltration and therapy response within a neural assembloid model. Acta Neuropathol. Commun. 12, 1–13. https://doi.org/10.1186/s40478-024-01765-4

Soeda, A., Park, M., Lee, D., Mintz, A., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R.D., Engh, J., Iwama, T., Kunisada, T., Kassam, A.B., Pollack, I.F., Park, D.M., 2009. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. Oncogene 28, 3949–3959. https://doi.org/10.1038/onc.2009.252

Soubannier, V., Stifani, S., 2017. NF-κB Signalling in Glioblastoma. Biomedicines 5, 29. https://doi.org/10.3390/biomedicines5020029

Sousa, F., Dhaliwal, H.K., Gattacceca, F., Sarmento, B., Amiji, M.M., 2019. Enhanced anti-angiogenic effects of bevacizumab in glioblastoma treatment upon intranasal administration in polymeric nanoparticles. J. Controlled Release 309, 37–47. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.033

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. Sci. Adv. 4, eaau5935. https://doi.org/10.1126/sciadv.aau5935

Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Mirimanoff, R.-O., 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Lancet Oncol. 10, 459–466. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., 2005. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. N. Engl. J. Med. 352, 987–996. https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330

Sun, Z., Gao, C., Gao, D., Sun, R., Li, W., Wang, F., Wang, Y., Cao, H., Zhou, G., Zhang, J., Shang, J., 2021. Reduction in pericyte coverage leads to blood-brain barrier dysfunction via endothelial transcytosis following chronic cerebral hypoperfusion. Fluids Barriers CNS 18, 21. https://doi.org/10.1186/s12987-021-00255-2

Suwa, T., Kobayashi, M., Shirai, Y., Nam, J.-M., Tabuchi, Y., Takeda, N., Akamatsu, S., Ogawa, O., Mizowaki, T., Hammond, E.M., Harada, H., 2021. SPINK1 as a plasma marker for tumor hypoxia and a therapeutic target for radiosensitization. JCI Insight 6, e148135. https://doi.org/10.1172/jci.insight.148135

Sweeney, M.D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A.R., Zlokovic, B.V., 2019. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. Physiol. Rev. 99, 21–78. https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131, 861–872. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019

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

Thomas, B.C., Staudt, D.E., Douglas, A.M., Monje, M., Vitanza, N.A., Dun, M.D., 2023. CAR T cell therapies for diffuse midline glioma. Trends Cancer 9, 791–804. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2023.07.007

Thomas, G.V., Tran, C., Mellinghoff, I.K., Welsbie, D.S., Chan, E., Fueger, B., Czernin, J., Sawyers, C.L., 2006. Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. Nat. Med. 12, 122–127. https://doi.org/10.1038/nm1337

Thomlinson, R.H., Gray, L.H., 1955. The Histological Structure of Some Human Lung Cancers and the Possible Implications for Radiotherapy. Br. J. Cancer 9, 539–549. https://doi.org/10.1038/bjc.1955.55

Trost, A., Lange, S., Schroedl, F., Bruckner, D., Motloch, K.A., Bogner, B., Kaser-Eichberger, A., Strohmaier, C., Runge, C., Aigner, L., Rivera, F.J., Reitsamer, H.A., 2016. Brain and Retinal Pericytes: Origin, Function and Role. Front. Cell. Neurosci. 10, 20. https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00020

Tsai, H.-F., Chang, Y.-C., Li, C.-H., Chan, M.-H., Chen, C.-L., Tsai, W.-C., Hsiao, M., 2021. Type V collagen alpha 1 chain promotes the malignancy of glioblastoma through PPRC1-ESM1 axis activation

and extracellular matrix remodeling. Cell Death Discov. 7, 1–12. https://doi.org/10.1038/s41420-021-00661-3

Turner, N.C., Oliveira, M., Howell, S.J., Dalenc, F., Cortes, J., Gomez Moreno, H.L., Hu, X., Jhaveri, K., Krivorotko, P., Loibl, S., Morales Murillo, S., Okera, M., Park, Y.H., Sohn, J., Toi, M., Tokunaga, E., Yousef, S., Zhukova, L., de Bruin, E.C., Grinsted, L., Schiavon, G., Foxley, A., Rugo, H.S., CAPItello-291 Study Group, 2023. Capivasertib in Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. N. Engl. J. Med. 388, 2058–2070. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2214131

Vandenhaute, E., Dehouck, L., Boucau, M.-C., Sevin, E., Uzbekov, R., Tardivel, M., Gosselet, F., Fenart, L., Cecchelli, R., Dehouck, M.-P., 2011. Modelling the neurovascular unit and the blood-brain barrier with the unique function of pericytes. Curr. Neurovasc. Res. 8, 258–269. https://doi.org/10.2174/156720211798121016

Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Darvill, A.G., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. (Eds.), 2015. Essentials of Glycobiology, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

Velpula, K.K., Tsung, A.J., 2014. PDK1: a new therapeutic target for glioblastoma? CNS Oncol. 3, 177–179. https://doi.org/10.2217/cns.14.13

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 Discov. 13, 2370–2393. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-23-0131

Viguier, M., Lemaître, F., Verola, O., Cho, M.-S., Gorochov, G., Dubertret, L., Bachelez, H., Kourilsky, P., Ferradini, L., 2004. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 173, 1444–1453. https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.1444

Warren, K.E., 2018. Beyond the Blood:Brain Barrier: The Importance of Central Nervous System (CNS) Pharmacokinetics for the Treatment of CNS Tumors, Including Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. Front. Oncol. 8, 239. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00239

Watkins, S., Robel, S., Kimbrough, I.F., Robert, S.M., Ellis-Davies, G., Sontheimer, H., 2014. Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells. Nat. Commun. 5, 4196. https://doi.org/10.1038/ncomms5196

Wei, J., Zhu, K., Yang, Z., Zhou, Y., Xia, Z., Ren, J., Zhao, Y., Wu, G., Liu, C., 2023. Hypoxia-Induced Autophagy Is Involved in Radioresistance via HIF1A-Associated Beclin-1 in Glioblastoma Multiforme. Heliyon 9, e12820. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e12820

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). Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 25, 6788–6800. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0126

Wigfield, S.M., Winter, S.C., Giatromanolaki, A., Taylor, J., Koukourakis, M.L., Harris, A.L., 2008. PDK-1 regulates lactate production in hypoxia and is associated with poor prognosis in head and neck squamous cancer. Br. J. Cancer 98, 1975–1984. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604356

Winkler, J., Abisoye-Ogunniyan, A., Metcalf, K.J., Werb, Z., 2020. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. Nat. Commun. 11, 5120. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18794-x

Wirthner, R., Wrann, S., Balamurugan, K., Wenger, R.H., Stiehl, D.P., 2008. Impaired DNA double-strand break repair contributes to chemoresistance in HIF-1α-deficient mouse embryonic fibroblasts. Carcinogenesis 29, 2306–2316. https://doi.org/10.1093/carcin/bgn231

Wong, B.S., Shah, S.R., Yankaskas, C.L., Bajpai, V.K., Wu, P.-H., Chin, D., Ifemembi, B., ReFaey, K., Schiapparelli, P., Zheng, X., Martin, S.S., Fan, C.-M., Quiñones-Hinojosa, A., Konstantopoulos, K., 2021. A microfluidic cell-migration assay for the prediction of progression-free survival and recurrence time of patients with glioblastoma. Nat. Biomed. Eng. 5, 26–40. https://doi.org/10.1038/s41551-020-00621-9

Wouters, B.G., Koritzinsky, M., 2008. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. Nat. Rev. Cancer 8, 851–864. https://doi.org/10.1038/nrc2501

Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z., Wang, Y., 2023. The blood–brain barrier: Structure, regulation and drug delivery. Signal Transduct. Target. Ther. 8, 1–27. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01481-w

Wu, G., Broniscer, A., McEachron, T.A., Lu, C., Paugh, B.S., Becksfort, J., Qu, C., Ding, L., Huether, R., Parker, M., Zhang, Junyuan, Gajjar, A., Dyer, M.A., Mullighan, C.G., Gilbertson, R.J., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Downing, J.R., Ellison, D.W., Zhang, Jinghui, Baker, S.J., 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

Xie, Z., Chen, M., Lian, J., Wang, H., Ma, J., 2023. Glioblastoma-on-a-chip construction and therapeutic applications. Front. Oncol. 13, 1183059. https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1183059

Xu, S., Xu, H., Wang, W., Li, S., Li, H., Li, T., Zhang, W., Yu, X., Liu, L., 2019. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. J. Transl. Med. 17, 309. https://doi.org/10.1186/s12967-019-2058-1

Yan, M., Jene, N., Byrne, D., Millar, E.K.A., O'Toole, S.A., McNeil, C.M., Bates, G.J., Harris, A.L., Banham, A.H., Sutherland, R.L., Fox, S.B., 2011. Recruitment of regulatory T cells is correlated with hypoxia-induced CXCR4 expression, and is associated with poor prognosis in basal-like breast cancers. Breast Cancer Res. BCR 13, R47. https://doi.org/10.1186/bcr2869

Yang, J., Nie, J., Ma, X., Wei, Y., Peng, Y., Wei, X., 2019. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. Mol. Cancer 18, 26. https://doi.org/10.1186/s12943-019-0954-x

Yankaskas, C.L., Thompson, K.N., Paul, C.D., Vitolo, M.I., Mistriotis, P., Mahendra, A., Bajpai, V.K., Shea, D.J., Manto, K.M., Chai, A.C., Varadarajan, N., Kontrogianni-Konstantopoulos, A., Martin, S.S., Konstantopoulos, K., 2019. A microfluidic assay for the quantification of the metastatic propensity of breast cancer specimens. Nat. Biomed. Eng. 3, 452–465. https://doi.org/10.1038/s41551-019-0400-9

Yeo, A.T., Rawal, S., Delcuze, B., Christofides, A., Atayde, A., Strauss, L., Balaj, L., Rogers, V.A., Uhlmann, E.J., Varma, H., Carter, B.S., Boussiotis, V.A., Charest, A., 2022. Single-cell RNA sequencing reveals evolution of immune landscape during glioblastoma progression. Nat. Immunol. 23, 971–984. https://doi.org/10.1038/s41590-022-01215-0

Yi, H.-G., Jeong, Y.H., Kim, Y., Choi, Y.-J., Moon, H.E., Park, S.H., Kang, K.S., Bae, M., Jang, J., Youn, H., Paek, S.H., Cho, D.-W., 2019. A bioprinted human-glioblastoma-on-a-chip for the identification of patient-specific responses to chemoradiotherapy. Nat. Biomed. Eng. 3, 509–519. https://doi.org/10.1038/s41551-019-0363-x

Zhang, N., Fu, Z., Linke, S., Chicher, J., Gorman, J.J., Visk, D., Haddad, G.G., Poellinger, L., Peet, D.J., Powell, F., Johnson, R.S., 2010. The Asparaginyl Hydroxylase Factor Inhibiting HIF-1α Is an Essential Regulator of Metabolism. Cell Metab. 11, 364–378. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.001

Zheng, F., Chen, Jianing, Zhang, X., Wang, Z., Chen, Jiewen, Lin, X., Huang, H., Fu, W., Liang, J., Wu, W., Li, B., Yao, H., Hu, H., Song, E., 2021. The HIF-1α antisense long non-coding RNA drives a

positive feedback loop of HIF-1α mediated transactivation and glycolysis. Nat. Commun. 12, 1341. https://doi.org/10.1038/s41467-021-21535-3

Zheng, X., Qian, Y., Fu, B., Jiao, D., Jiang, Y., Chen, P., Shen, Y., Zhang, H., Sun, R., Tian, Z., Wei, H., 2019. Mitochondrial fragmentation limits NK cell-based tumor immunosurveillance. Nat. Immunol. 20, 1656–1667. https://doi.org/10.1038/s41590-019-0511-1

Zuo, P., Li, Y., He, C., Wang, T., Zheng, X., Liu, H., Wu, Z., Zhang, J., Liao, X., Zhang, L., 2023. Anti-tumor efficacy of anti-GD2 CAR NK-92 cells in diffuse intrinsic pontine gliomas. Front. Immunol. 14, 1145706. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1145706

cancers

MDPI

*Review*

# A Bloody Conspiracy—Blood Vessels and Immune Cells in the Tumor Microenvironment

**Lisa Terrassoux [1,2], Hugo Claux [1,2], Salimata Bacari [1,2], Samuel Meignan [1,2] and Alessandro Furlan [1,2,*]**

[1] Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277-CANTHER-Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France
[2] Tumorigenesis and Resistance to Treatment Unit, Centre Oscar Lambret, F-59000 Lille, France
* Correspondence: alessandro.furlan@univ-lille.fr

**Simple Summary:** The tumor microenvironment has risen over the last years as a significant contributor to the failure of antitumoral strategies due to its numerous pro-tumorigenic activities. In this review, we focused on two features of this microenvironment, namely angiogenesis and immunity, which have been the targets of therapies to tackle tumors via its microenvironmental part over the last decade. Increasing our knowledge of the complex interactions within this ecosystem is mandatory to optimize these therapeutic approaches. The development of innovative experimental models is of great help in reaching this goal.

**Abstract:** Cancer progression occurs in concomitance with a profound remodeling of the cellular microenvironment. Far from being a mere passive event, the re-orchestration of interactions between the various cell types surrounding tumors highly contributes to the progression of the latter. Tumors notably recruit and stimulate the sprouting of new blood vessels through a process called neo-angiogenesis. Beyond helping the tumor cope with an increased metabolic demand associated with rapid growth, this also controls the metastatic dissemination of cancer cells and the infiltration of immune cells in the tumor microenvironment. To decipher this critical interplay for the clinical progression of tumors, the research community has developed several valuable models in the last decades. This review offers an overview of the various instrumental solutions currently available, including microfluidic chips, co-culture models, and the recent rise of organoids. We highlight the advantages of each technique and the specific questions they can address to better understand the tumor immuno-angiogenic ecosystem. Finally, we discuss this development field's fundamental and applied perspectives.

**Keywords:** tumor; angiogenesis; immunity; infiltration; paracrine; microenvironment; chips; microfluidics; organoids

check for updates

**Citation:** Terrassoux, L.; Claux, H.; Bacari, S.; Meignan, S.; Furlan, A. A Bloody Conspiracy—Blood Vessels and Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Cancers* **2022**, *14*, 4581. https://doi.org/10.3390/cancers14194581

Academic Editor: Enrico Giraudos

Received: 18 August 2022
Accepted: 15 September 2022
Published: 21 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## 1. The Tumor Microenvironment: The Octopus Spreading Its Tentacles

### *1.1. The Tumor Vascularization, a Key Partner in the Malignant Progression*

Cancers represent a major health issue, accounting for nearly 10 million deaths in 2020, according to the World Health Organization [1]. Concomitantly with the identification of the intrinsic genetic drivers of tumorigenesis, the research community has evidenced over the last decades the critical importance of the tumor microenvironment in the evolution of the pathology.

Tumors progress in concert with their neighbors and orchestrate a kind of conspiracy to promote their malignant development [2]. Among these "partners in crime", the vasculature plays a key role, notably by providing the tumors with nutrients and oxygen required for their sustained growth, and an angiogenic switch is typical during malignant progression. Almost half a century ago, Judah Folkman introduced this concept of tumor angiogenesis, namely the fact that solid tumors induce the development of neo-vessels

for their profit [3]. Both tumor and vascular cells cooperate in this ecosystem to foster the growth of each other. Since then, many studies have investigated and elucidated the complex interactions between tumors and blood vessels, leading to the elaboration of anti-angiogenic therapeutic strategies in clinics [4–6]. Unfortunately, so far, the success of such strategies has been mitigated due to the high plasticity of cancer cells and the heterogeneity and variability of abnormal tumor vessels that allow this ecosystem to bypass the attempts to block it [7].

Blood vessels physiologically consist of an inner layer of epithelial cells called endothelial cells, laid on a basal lamina. Perivascular cells encompass smooth muscle cells, which are essential for arterial contractility, and pericytes in the case of capillaries, the small blood vessels responsible for most exchanges with tissues. Tumor vascular networks are highly anarchic, with uncontrolled sprouting leading to excessive branching and blind ends. Tumor-associated endothelial cells display abnormal morphology, resulting in disorganized monolayers and imperfect coverage by pericytes. Tumoral blood vessels are, therefore, often functionally defective in terms of perfusion but also permeability, suggesting that one of their critical roles would reside in the facilitation of cancer cell dissemination in the systemic circulation through the metastatic process, beyond the trophic supply that they provide [8]. In contrast with these permeable vessels, when it comes to thinking about brain tumors, one also has to take into account the very particular organization of the brain capillary endothelial cells which, together with pericytes and astrocytes, contribute to the impermeability of the Blood–Brain Barrier (BBB) [9]. Consequently, the BBB impairs most compounds from diffusing from the luminal compartment of blood vessels towards the brain parenchyma and brain tumors. We will discuss this point later in this review since brain tumors in this particular context require specific study models.

### *1.2. The Cocktail Driving Tumor Angiogenesis*

Tumor neo-angiogenesis relies on a cocktail of soluble factors secreted in the tumor microenvironment: cytokines, growth factors, extracellular matrix (ECM) proteases, etc. [10]. They can be produced both by cancer cells and stromal cells, including fibroblasts, immune cells, and endothelial cells as well, leading to reciprocal dialogs between the different partners modulating both angiogenesis and immune responses.

Among the first identified molecules within this pro-angiogenic array, the VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) family has been the topic of interest in many studies. VEGF-A binding on its receptors at the cell membrane of endothelial tip cells will guide vessel sprouting, by promoting the local degradation of the extracellular matrix required for cells to invade it. Gradients of VEGF-A thus induce the motility of these tip cells, while additional molecules such as delta ligand-like 4 (DLL4) will inhibit the sprouting of the following stalk cells, with the concomitant orchestration of ECM deposition and remodeling [11].

One of the main biophysical drivers of neo-angiogenesis in tumors resides in the decrease in tissue oxygen partial pressure, ultimately leading to the secretion of pro-angiogenic factors. Hypoxia leads to a loss of HIF1α (Hypoxia-Inducible Factor) hydroxylation, which induces its stabilization (when hydroxylated, under normoxia, HIF1α is degraded by the VHL (Von Hippel Lindau) Ubiquitin ligase). This will trigger a transcriptional program allowing the expression of genes aimed at counterbalancing hypoxia. These include pro-angiogenic factors, such as VEGF-A, CXCL12 aka SDF-1 (Stromal Derived Factor), ANGPT2 (Angiopoietin 2), and PDGF-B (Platelet-Derived Growth Factor) notably [12] (Figure 1A). In that manner, the subsequent formation of neo-vessels should improve the oxygen supply and restore a new equilibrium.

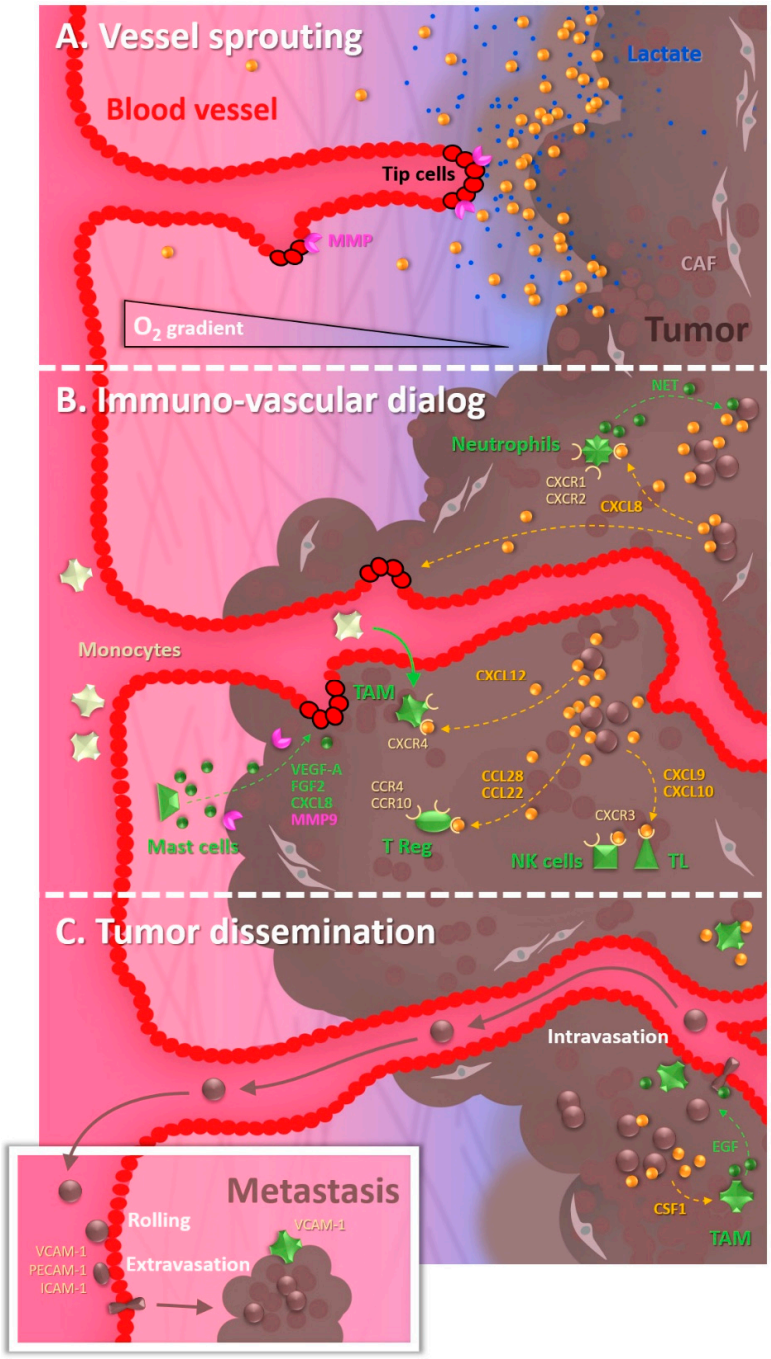



**Figure 1.** The tumor microenvironment octopus. (**A**) Tumors secrete a wide array of pro-angiogenic molecules. Hypoxia is a primary driver of angiogenesis, promoting these molecules' expression. Moreover, lactate production by hypoxia-associated glycolysis also stimulates the invasion of endothelial tip cells. (**B**) Immune cells are recruited via the chemokines secreted by tumor cells. Although initially aimed at inhibiting tumor growth, immune cells also display several pro-tumorigenic actions. Mast cells, M2-like macrophages, and T-reg lymphocytes stimulate angiogenesis. These last two cell types also generate an immunosuppressive environment. Moreover, Neutrophil Extracellular Traps (NETs) can wrap tumor cells and form a protective shield around them. (**C**) The metastatic cascade initiates with the intravasation of tumor cells, which is promoted by the presence of macrophages. Circulating tumor cells then extravasate and colonize a distant site, in which macrophages can again help them by favoring their survival.

Positive and negative feedbacks occur within this dialog, which renders the results of anti-angiogenic therapies upon tumor progression more complex to decipher than initially thought. For example, VEGF can repress Epithelial-to-Mesenchymal Transition and invasion of cancer cells via forming a MET/VEGFR2 complex [13]. In the same vein, antiangiogenic therapy was shown to promote malignant tumor progression in some contexts [14]. Nevertheless, tumor invasion and angiogenesis also share common molecular mechanisms that make them two birds of a feather. For example, HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor) favors both cancer cell and endothelial cell invasion (for review, see [15]). This also applies to extracellular matrix proteases, notably the MMPs that can be secreted by tumor cells and recruited at the plasma membrane of endothelial cells to favor angiogenesis in a paracrine manner [16]. Interestingly, immune cells also express MMPs and contribute to creating a pro-invasive local environment [10], which can be efficiently targeted to impair tumor progression in cervical cancer models [17]. More globally, it was shown that several soluble factors secreted when cancer cells undergo Epithelial-to-Mesenchymal Transition, including InterLeukins IL-6 and IL-8, and GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), stimulate angiogenesis and the recruitment of myeloid cells [18].

### *1.3. The Recruitment of Undercover Agents*

Altogether, the aforementioned factors classically lead to a pro-inflammatory environment in which the migration of cancer cells is increased, together with that of angiogenic endothelial cells and immune cells. Let us focus now on the recruitment and the impact of these latter in the tumor microenvironment.

Tumors recruit many cell types present in their neighborhood to help their progression, and immune cells definitely fall into this category [19] (Figure 1B). Once recruited, immune cells can play various roles, and the global immune landscape in tumors evolves along their progression [20]. While their primary purpose is to suppress tumor growth, immune cells may become beneficial to the tumor rather than detrimental. In that frame, a recent study evidenced that targeting macrophages could improve the survival of glioma-bearing mice [21]. It has to be noted that inflammation can even precede and promote tumorigenesis, as exemplified by *Helicobacter pylori*-driven gastritis or inflammatory bowel diseases [22].

Each immune cell type will express some chemokine receptors to respond to particular signals. Macrophages represent the first type of immune cells frequently detected in the tumor microenvironment and classically derive from circulating monocytes attracted by chemokines such as CCL2, CXCL5, and CXCL12 secreted by tumors [23]. CXCL12 notably contributes to the recruitment of Tumor-Associated Macrophages (TAM) in hypoxic regions, as evidenced in murine astrocytoma models [24]. Effector T lymphocytes and NK (Natural Killer) cells express CXCR3 and migrate into tumors in response to CXCL9 and 10, while immunosuppressive T reg lymphocytes express CCR4 and CCR10 that make them sensitive to the presence of CCL22 and CCL28. Interestingly, hypoxia induces the expression of CCL28 within tumors, which contributes to cancer immune tolerance [25]. Though less under the spotlight, eosinophils are also recruited in the tumor microenvironment, preferentially in hypoxic zones, thanks to CCL11 [26]. Concerning neutrophils, chemotaxis is ensured by CXCR1 and CXCR2 agonists, which favor at the same time the release of neutrophil extracellular traps (NETs) that can wrap tumor cells and protect them from T cells and NK cells [27]. These examples (recapitulated in Table 1) are only a few among the plethora of cytokine signaling mechanisms leading to immune cell recruitment within tumors.

While tumors favor the recruitment from the blood circulation of immune cells, it is also interesting to observe that immune cells reciprocally favor tumor angiogenesis, thus engendering a vicious circle. To do that, the various immune cells release pro-angiogenic factors. Mast cells, for example, secrete VEGF-A, FGF2 (Fibroblast Growth Factor), CXCL8, and MMPs [28]. The production of VEGF by myeloid cells also contributes to tumor angiogenesis, as illustrated by the delay in the angiogenic switch in a mouse tumor model when the *vegfa* gene is conditionally depleted in the myeloid lineage [29]. Moreover,

infiltrating cell-derived MMP9 contributes to such a tumor angiogenic switch, possibly through the MMP-mediated release of VEGF trapped in the extracellular matrix (ECM) [30]. Finally, immunosuppressive T reg lymphocytes also promote angiogenesis [25], although they globally tend to decrease the pro-inflammatory responses around tumors [31].

**Table 1.** An overview of cytokines in the immuno-vascular tumor microenvironment.

| Cytokines | Effects | References |
|---|---|---|
| IL-6/IL-8 | Angiogenesis promotion/inflammation | [18] |
| GM-CSF | Angiogenesis promotion | [18] |
| CCL2 | Monocyte recruitment | [23] |
| CXCL5 | Monocyte recruitment | [23] |
| CXCL12 (also called SDF1) | TAM recruitment/ | [23,24] |
| CXCL12 (also called SDF1) | Dendritic cell migration | [32] |
| CXCL9/CXCL10 | TL and NK recruitment | [23] |
| CCL22/CCL28 | T-reg recruitment | [25] |
| IL-1/TNFα | Inflammation/Haptotaxis | [33] |
| CCL11 | Eosinophil recruitment | [26] |
| CXCL1/CXCL2/CXCL8 | Neutrophil recruitment | [27] |

Many other cell types in the tumor microenvironment also play instrumental roles in regulating tumor progression. Notably, Cancer-Associated Fibroblasts (CAF) produce and remodel the extracellular matrix in the vicinity of tumors, and establish critical signaling interactions with tumor cells, which will promote their growth and resistance to treatments [34], but they also dialog with immune cells infiltrating the tumors [35] and influence angiogenesis [36].

### *1.4. The Underground Environment: Of Hypoxia and Its Malignant Consequences*

As illustrated hereinabove, hypoxia plays a crucial role in malignant progression by triggering the secretion of pro-angiogenic and chemoattractant molecules. Still, this is not the only mechanism through which hypoxia will deeply impact the tumor microenvironment. Indeed, even if it is long known that hypoxia rewires metabolic signaling in cancer cells, recent studies put it back in a more extensive context including cancer cell neighbors. Exacerbated glycolysis in hypoxic zones leads tumor cells to secrete high amounts of lactate in the tumor parenchyma. Far from being a mere final by-product, lactate can influence the cellular physiology in these regions. A symbiosis was evidenced between hypoxic cancer cells and normoxic cells in the vicinity that can internalize and metabolize lactate [37]. Endothelial cells can also import this lactate through the monocarboxylate transporter 1 (MCT1), and this process was shown to promote angiogenesis [38]. Interestingly, endothelial cells from tumor vessels display increased glycolysis, which was efficiently used to normalize these vessels and reduce metastasis in a melanoma xenograft model [39]. Other strategies aimed at impairing angiogenesis and metastasis by tackling the endothelial cell metabolism with a cholesterol anabolism enzyme inhibitor also displayed promising results [40].

To come back to hypoxia and lactate, tumor-derived lactate also impacts immune cells, as demonstrated by its induction of Tumor-Associated Macrophage polarization in an M2-like state [41]. Moreover, glycolysis-driven lactate secretion is most often associated with an acidification of the extracellular compartment, which was shown to disrupt extracellular vesicles containing pro-angiogenic molecules such as VEGF-A and MMPs [42]. The global impact of lactate and acidic pH on the modulation of immune functions is reviewed in more detail in [43]. Since immune cells within the tumors must face harsh nutritional conditions, it is also essential for them to adapt to this metabolic stress, and autophagy can be activated both in the tumoral and immune cells and is involved in tumor immune control [44].

### *1.5. The Remote Expansion of Activities*

Most cancer-associated deaths are due to metastasis, namely the growth of secondary tumors at distance. This phenomenon occurs through a multi-step process called the metastatic cascade (Figure 1C), initiating with intravasation of cancer cells, their survival in the systemic circulation, their extravasation at distant organs, and their final growth from cryptic to overt metastatic foci. Interactions of cancer cells with endothelial cells are obviously crucial during the transendothelial migration steps, and the creation of a pro-invasive inflammatory microenvironment represents a facilitating parameter as well. Consistently, angiogenesis and inflammation are associated with metastasis in various tumors, notably breast cancers [45].

Among immune cells, macrophages are among the first to be recruited in primary tumor sites. Breast cancer mice models allowed it to be demonstrated that paracrine loops established between tumoral cells and macrophages led to a synergistic EGF (Epidermal Growth Factor) and CSF1 (Colony Stimulating Factor) mediated stimulation of the invasive potential of both cell types [46]. Moreover, multiphoton microscopy demonstrated that perivascular macrophages assisted tumor cell intravasation in these models [47].

Globally, various immune cell types are involved in the different steps of the metastatic cascade, by protecting cancer cells and/or by favoring their transmigration [48]. Besides the previously mentioned case of neutrophils forming a shield around tumor cells [27], macrophages can be tethered to breast cancer cells via VCAM-1 and favor their survival during the development of lung metastases [49].

In addition, tumors also send signals that generate premetastatic niches, i.e., distant regions in which VEGF-R1 positive bone marrow-derived cells cluster before the arrival of metastatic cancer cells [50]. Such places display immuno-suppressive signatures driven by myeloid cells, and immunomodulatory strategies were able to efficiently reduce metastatic growth in these settings [51]. In melanoma as well, tumor cells can reprogram bone marrow progenitors and prepare pre-metastatic sites through the release of exosomes [52]. Strikingly, immune cells also use exosomes for remote immune surveillance tasks, as illustrated by the cytotoxic potential of NK cell-derived exosomes [53].

Taken together, these data highlight the intricate links between tumoral and immune cells along the different steps of metastasis, and the potential of immune therapies to fight this dismal trait of tumors [54].

Clinical trials aimed at fighting cancers via anti-angiogenic and anti-immune approaches were developed over the last decades, and combining these strategies provided encouraging results in recent years (Figure 2).

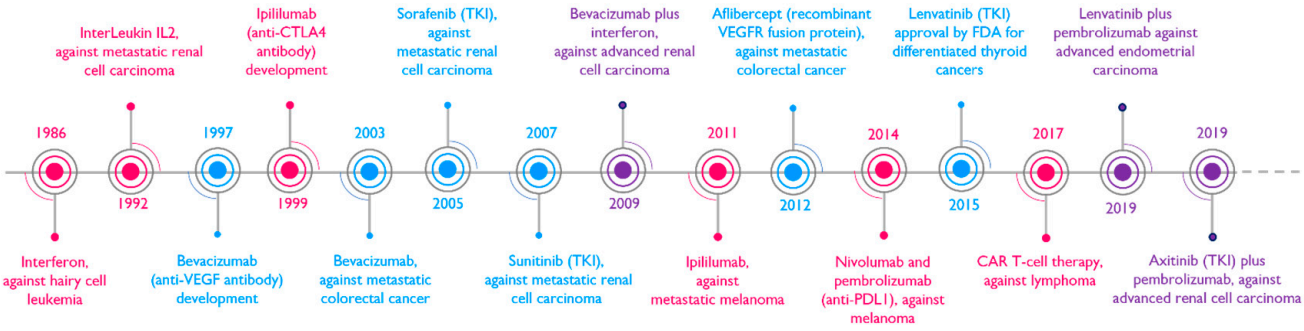



**Figure 2.** Some milestones in clinical trials against cancers based on anti-angiogenic and/or immunomodulatory strategies. This timeline integrates information about the development of anti-angiogenic (in blue) and immunotherapy (in pink) anti-cancer strategies, or the combination of both approaches (in purple), with the dates of their approval by the FDA for the treatment of specific cancers.

## 2. Chips, Patrolling to Catch Specific Scenes of the Bloody Conspiracy

After this overview of the tumor immuno-angiogenic phenotype, let us focus on the ex vivo tools developed by the research community to help unravel its different aspects. Historical models based on the transplantation of sections of animal blood vessels, such as the aortic ring assay, and more recent microvascular networks from rat mesentery, proved useful to study angiogenesis [55]. Still, their use tends to be restrained due to ethical issues associated with animal experimentation and alternative ex vivo models were developed, which greatly facilitated the real-time visualization of cellular events.

### *2.1. Tumor Angiogenesis under the Spotlight Thanks to VoC, Vessels-on-Chip*

In this chapter, we will describe the different categories of chips implemented to mimic tumor vessels and their neighbors. Herein, we will use the term "chip" to refer to a microfluidic device with a pattern of microchannels that process tiny amounts of cells and liquids. Vessels-on-Chip (VoC) can display different configurations (single channels, parallelized channels, or networks) depending on the question researchers want to address. Their constitution is based on different methods that have evolved over the last few years.

The oldest and most straightforward method, in principle, to create a channel within an extracellular matrix gel was to insert a needle into these materials and then remove it (Figure 3A). However, the removal of the needle might not always be straightforward and often resulted in an alteration of the overall structure. In addition, this method was limited to forming a single channel, narrowing its potential applications. Using polymers such as silicone or PDMS (PolyDiMethylSiloxane) to fill molds designed on purpose allowed the generation of a wider variety of geometries, depending on the vascular aspect under investigation. Yet, such models required coating these synthetic polymers with appropriate extracellular matrix components [56], adding to the protocol a tricky step that was frequently troublesome, with the final obtention of inhomogeneous coating and subsequently ill-controlled discontinuous vessels.

To bypass this issue, an original method was proposed and developed: the VFP (Viscous Finger Patterning), which relies on the principle that within a lumen, a less viscous fluid displaces a more viscous fluid. Thanks to the passive pumping of cell culture medium through an ECM hydrogel under polymerization, researchers succeeded in generating a continuous ECM layer within channels of different shapes (straight, curved, Y-shaped) [33,57]. This method was recently adapted to create endothelial vessels covered by perivascular cells with each cell type sequentially seeded by VFP [58].

These VoCs are very helpful in deciphering the molecular determinants of vessel physiology. When an ECM layer surrounds the channel, the VoC can, for example, be used to investigate vessel sprouting thanks to pharmacological and/or genetic approaches [59]. Of note, one can also use VoCs to quantify vascular permeability by monitoring over time the diffusion across the vascular wall of compounds coupled with fluorophores [60]. In this context, the presence of perivascular cells decreases the permeability of the VoC by increasing the tightness of the endothelial barrier [58].

Implementing microfluidics within VoCs permits recapitulating molecular gradients and showed that VEGF and angiopoietin 1 gradients orchestrate the migration of tip and stalk cells during sprouting angiogenesis [59]. Moreover, the integration of tumor cells within the VoC can drive sprouting and allows the study more specifically of tumor angiogenesis, as illustrated by the co-culture of ccRCC (clear cell Renal Cell Carcinoma) clusters around HUVEC channels [60]. In parallel, microvascular branched networks were also generated within tissue chambers and co-cultured with tumor cell clusters, to investigate the response to therapies of tumor clusters and/or their vasculature [61]. More recently, a chip was developed to generate a hypoxic tumor and observe how it can induce angiogenic sprouting from an adjacent endothelial channel [62] (Figure 3C).

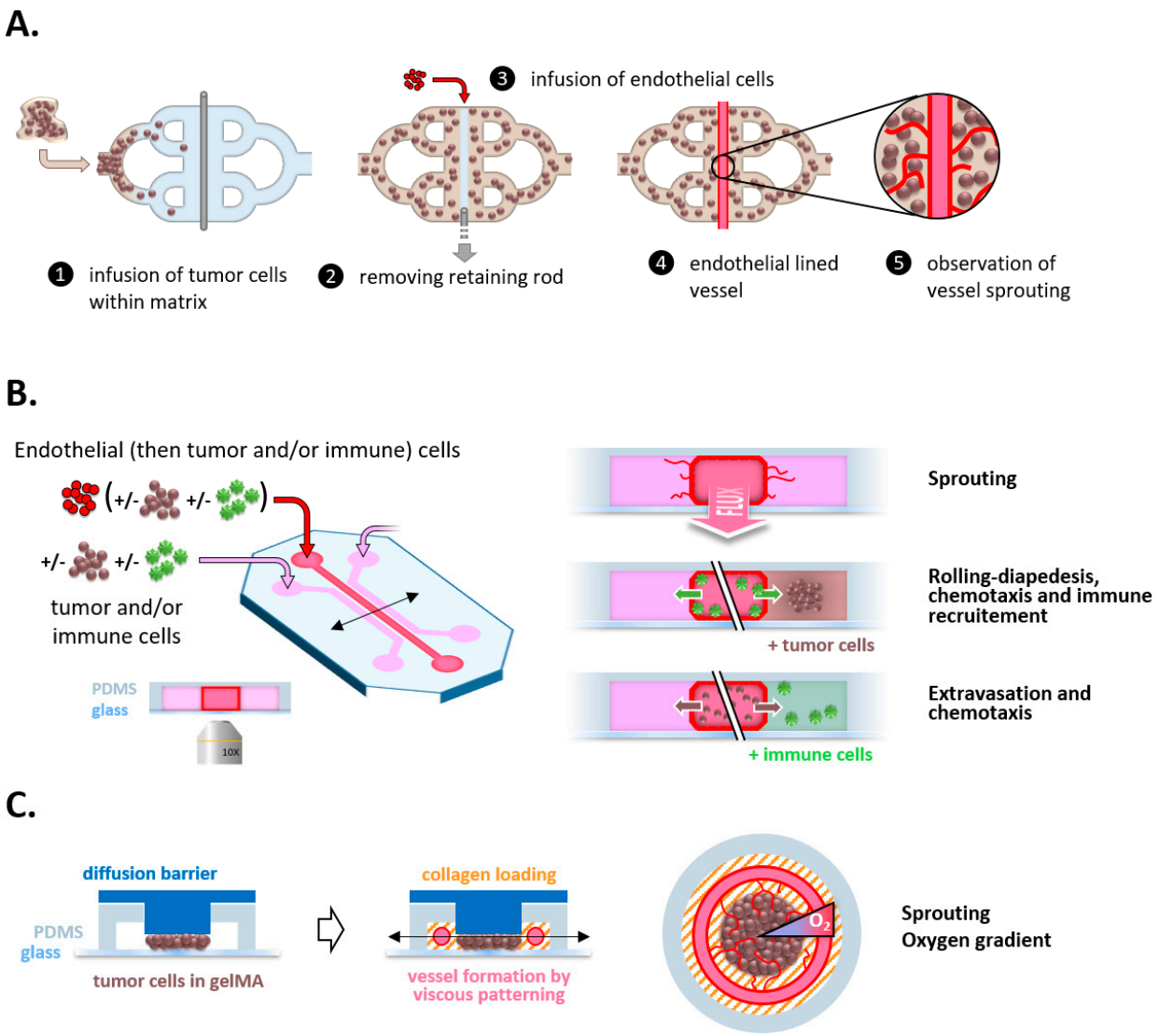



**Figure 3.** Chips shed light on the multiple facets of tumor angiogenesis and immunity. (**A**) Vascular channels can be generated by removing a needle from an ECM hydrogel. (**B**) PDMS molds classically permit generation of parallelized channels with their own reservoirs. This geometry allows investigation by microscopy of the impact upon angiogenesis of shear stress, paracrine interactions, chemotaxis, and extravasation events. (**C**) The generation of a radial oxygen gradient in a tumor disk permits deciphering of the interactions of a hypoxic tumor-on-chip with surrounding vessels and the recruitment of immune cells.

### *2.2. A Successful Business Requires a Steady Cash Flow*

In endogenous vessels, the shear stress induced by blood flow represents a key regulator of blood vessel physiology, and shear stress notably drives the reorientation and reinforcement of cytoskeletal fibers within endothelial cells [61]. The integration of microfluidics into chips allows recapitulation of this critical process in experimental models (Figure 3B), and researchers could thus demonstrate that shear stress dampened vascular sprouting via nitric oxide signaling [62]. Moreover, in the same study, thanks to the use of a second channel to generate VEGF gradients, the authors evidenced that positive and negative VEGF gradients respectively triggered sprouting or dilation of vessels. Interestingly, another study completed these works and showed that flow stagnation at bifurcation branching points blocked the sprouting as well, while a transvascular flow, controlled by modulating interstitial fluid pressure in an adjacent column, favored, in contrast, the vascular sprouting [63]. Besides this shear stress issue, the blood flow is responsible for the

delivery of drugs to tumors, and VoCs can be used to follow the growth and intravasation of tumor cells in response to treatments [64]. Strikingly, human gut, liver, and kidney-on-chips developed around endothelial channels recently allowed recapitulation of the pharmacokinetics (PK) of cisplatin in patients, thus opening unique perspectives for the pre-clinical assessment of antitumoral drugs [65].

### 2.3. What about Particular Supply Routes?

Let us now focus on two particular physiological conditions faced by tumor vessels, in the lung and the brain. The lung capillaries constitute a network tightly associated with epithelial alveoli. Recently, a smart design aimed at mimicking the breath of epithelial alveoli coupled with an endothelial channel allowed recapitulation of lung cancer growth and evidenced the impact of breathing on cancer cell intravasation and response to treatments [66]. This paves the way for a better ex vivo assessment of treatments to target lung tumors. Concerning brain tumors, they interact with the highly impermeable vessels of the Blood–Brain Barrier. The canonical models to recreate the BBB are based on the co-culture of cells upon inserts containing microporated membranes. Over the years, the choice of cells that can efficiently trigger the formation of tight junctions by endothelial cells and ensure proper filtration of compounds as expected with the BBB has been improved and adapted for the specific study of tumors [67]. Ultimately, BBB models constituted exclusively of human cells were used to investigate interactions between the BBB and pediatric glioma cells [68]. The development of PDMS-based microfluidic chips led to the development of additional models, and recently a study, based on the rationale that the embryogenic BBB during its genesis faces hypoxia, showed that hypoxia could improve the functionality of such BBB models [69]. The same research group also proposed a BBB channel implemented thanks to the VFP process that allowed the study of the importance of pericytes and astrocytes for the permeability of the endothelial channel [70], which could be very useful in studying the interactions between the BBB and brain tumor cells. Finally, 3D bioprinting was also implemented to set up geometries of tumor-BBB interactions within chips [70,71], although quantifying the proper barrier function in such models has been quite tricky so far.

### 2.4. The Choreography of Immune Cells as Undercover Agents among Gangsters

Chips also constitute precious tools for understanding the complexity of the cancer immune environment and how it assembles.

Before being able to take action on-site, immune cells need to reach and infiltrate the said site. For that purpose, circulating immune cells need to recognize where they should exit the bloodstream to reach the nearby tissue. Haptotaxis, i.e., the guidance via a gradient of adhesive cues, constitutes the first step in this process. The adhesion of immune cells to the endothelial surface can be quantified in VoC, and the use of pro-inflammatory cytokines such as TNFα or IL-1 increases this adhesion, in correlation with the overexpression of ICAM-1 or VCAM-1 adhesion molecules [58]. In addition, thanks to a microfluidic system under flow, Arts et al. shed light on the existence of "hotspots" with enrichment in PECAM-1 and ICAM-1 adhesive molecules at junctional membrane protrusions between endothelial cells, where neutrophils preferentially undergo diapedesis after crawling along the junction up to these specific sites [72]. Moreover, a study based on an inflammation-on-a-chip model revealed that the ECM composition modulated the capacity of neutrophils to undergo diapedesis in response to TNFα, with an exacerbated transmigration occurring in vessels grown in basement membrane extract gels [73].

Physiologically, immune cells sense and respond to gradients of chemokines, according to so-called chemotaxis (see Section 1.3), which can be efficiently reproduced and investigated in chips. An exciting system to study immune chemotaxis was developed by Um et al. in the form of microfluidic mazes, highlighting the increased chemotactic potential of cancer cells, when compared to normal cells, towards immature dendritic cells [74]. To step further into mimicking in vivo conditions, the idea of adding a "bar-

rier" between the tumoral and immune channels to represent the tissular and circular compartments, respectively, was implemented. By adding tiny connecting channels that limit the exchanges between compartments, Parlato et al. were able to understand that the migration process of dendritic cells within a tumor environment was guided by the CXCR4/CXCL12 couple [32]. The recruitment of neutrophils towards tumors could be recapitulated thanks to another device, with a microfluidic flow over a porous membrane located upon a collagen gel encompassing 3D tumor clusters [75]. Interestingly, the authors demonstrated that while they were being recruited by ovarian cancer cells, neutrophils promoted the collective invasion of cancer cells within the surrounding ECM, notably by releasing neutrophil extracellular traps (NETs). Using a chip with a central tumor compartment surrounded by a vascular channel and an immune compartment allowed Cui et al. to investigate the interplay between glioblastoma (GBM) and immune cells. They evidenced that mesenchymal subtypes attracted many Tumor-Associated Macrophages (TAM), but few cytotoxic T-cells [76]. This system also demonstrated that GBM cells triggered an M2-like polarization in TAM, contributing to immunosuppression and angiogenesis [77].

Chips also allow studying immune-mediated antitumoral cytotoxicity. Hence, a microfluidic device was generated to recapitulate a hypoxic 3D tumor surrounded by channels through which CAR (Chimeric Antigen Receptor) T cells are delivered [78] (Figure 3C). Thanks to this model, Ando et al. were able to evaluate the infiltration of CAR-T cells and their propensity to induce the cell death of ovarian cancer cells as a function of hypoxia generated within the chip. Although not investigated in this study, it would be interesting to study the hypoxia-driven expression of chemokines that could attract CAR-T cells and other immune cells in this model (see Section 1.3). In the same vein, another tumor-on-chip based on the depletion of nutrients along an axis perpendicular to the feeding channel highlighted that such a depletion induced by nutrient consumption by tumor cells led to an exhaustion of NK cells that persisted over time [79]. Interestingly, administering checkpoint inhibitors could dampen this exhaustion, which illustrates one of the many beneficial facets of such drugs. Such immunocompetent cancer-on-chip models are therefore much helpful in evaluating the potential of antitumoral immune-based therapies [80].

### *2.5. Crossing the Legal Line*

Transendothelial migration is not exclusively done by immune cells since cancer cells also cross the endothelial barrier during the early and late phases of the metastatic process, via intravasation and extravasation mechanisms, respectively. Microfluidic chips also offer interesting designs to control fluid pressures within or between compartments and were efficiently used to highlight the impact of luminal and trans-endothelial flows upon the extravasation of cancer cells from microvascular networks [81]. They nicely evidenced that a luminal flow in the same range as that of blood flow within capillaries favored the extravasation of breast cancer cells. Moreover, by applying differential pressures, the authors could recreate intramural flow to mimic the interstitial fluid pressure and demonstrated that it increased the tumor cell transmigration speed and their subsequent migration in the perivascular matrix.

Another biophysical parameter of the tumor microenvironment that affects the extravasation process is hypoxia, which can favor the extravasation of cancer cells through a VoC in a HIF-1$\alpha$-dependent manner [82]. In the framework of the interplay between cancer, endothelial, and immune cells, the same research group also demonstrated that the presence of human neutrophils within the vascular networks significantly enhanced the proportion of extravasated cancer cells [83], and reported that neutrophils were entrapped by tumor cells via chemotactic confinement driven by autocrine and paracrine mechanisms [84]. In the same vein, but in distinct devices based on two adjacent channels, macrophages were shown to favor breast cancer cell invasion [85] and intravasation [86], thus highlighting how important immune cells are in the regulation of cancer cell transendothelial migration. Vertical systems with microfluidic channels and porous membranes were also developed to study the intravasation process and allowed one to visualize that different cancer cell

lines can use either transcellular or paracellular paths to cross the endothelium (for review, see [87]).

## 3. Future Is Coming, Giving a New Dimension to the Trade

### *3.1. Spying on the Double Game of Endothelial Cells within Tumors*

Blood vessels can be mimicked in chips, with appropriate luminal and abluminal compartments, yielding a precious amount of knowledge on vessel biology. Yet, these tools remain basic representations of the original 3D vessel geometry, which is usually much less straight. Besides the aforementioned chips, complementary development tracks were therefore pioneered over the last years to obtain further insight into the 3D interplay between tumoral, endothelial, and immune cells. In that frame, 3D gel-based models have emerged, especially with the rise of organoids [88]. Such models better recapitulate the tissular geometry and proper cellular interactions, thus ensuring a better reproduction of endogenous physiology [89]. In oncology, 3D models proved to be efficient for high-throughput drug screening in the context of personalized medicine [90,91]. That's why, although they classically represent more constraining models from an experimental point of view, many efforts are made nowadays to study cancer processes in 3D ECM gels. This is especially relevant when one wants to investigate heterotypic interactions and study migration and chemotaxis events. Indeed, co-culture models in 3D hydrogels allow mimicking heterotypic dialogs occurring between different cell types that can be spatially precisely organized, especially now that bioprinting has become widespread.

It has to be noted that the mechanical properties of ECM components deeply influence the phenotype of cells cultured within and should be taken into account when designing the experiments and choosing the most relevant scaffold [92]. Biomaterials used in the field of oncology display a wide variety of properties [93]. Collagens are a major component of ECM and can represent as much as 30% of the total protein mass in mammals. Fibrillar collagens such as type I collagen, widely used in bioassays, allow tensile strength to be exerted by cells, and can be easily remodeled by tumor cells. In addition, collagen concentrations can be varied to enable a range of ECM stiffness with elastic moduli from 150 to 1200 Pa, which was used to mimic matrix stiffening classically associated with tumor progression and to highlight the change in signaling and phenotype of mammary cells as a function of tissue stiffness [94]. In the field of epithelial organoids, the gold standard ECM is reconstituted basement membrane, mainly consisting of laminin and type IV collagen, which controls structure polarization. Hyaluronic acid is another highly abundant matrix, especially important to reproduce a relevant microenvironment for glioblastoma cells since the brain and its tumoral counterpart are rich in this component. It retains water and, when properly cross-linked, is amenable to deformations, which represents an interesting asset for manipulating hydrogels without destroying them. Finally, though not present in animal tissues, alginate displays several assets for cancer cell 3D culture, including its fast gelation and its thermal stability, and can allow encapsulated cells to produce their own matrix.

The first in vitro 3D models for blood vessels used suspensions of endothelial cells seeded upon, or embedded within, type I collagen or basement membrane extracts. In these conditions, endothelial cells self-organized to give rise to rudimentary capillary-like structures (Figure 4A). Interestingly, the incorporation of other cell types within these models highly improved the complexity of the vascular structures that formed, highlighting how endothelial cells are tightly dependent on their neighbors to express their complete phenotype. For example, HUVEC cells grown in fibrin gels require the presence of fibroblasts above the gels to develop 3D sprouting vessels [95]. The impact of tumor cells upon endothelial vessels is obviously important, and the development of tumoroids including a vascular network will be helpful to understand this network's plasticity and its response to anti-angiogenic drugs [96].

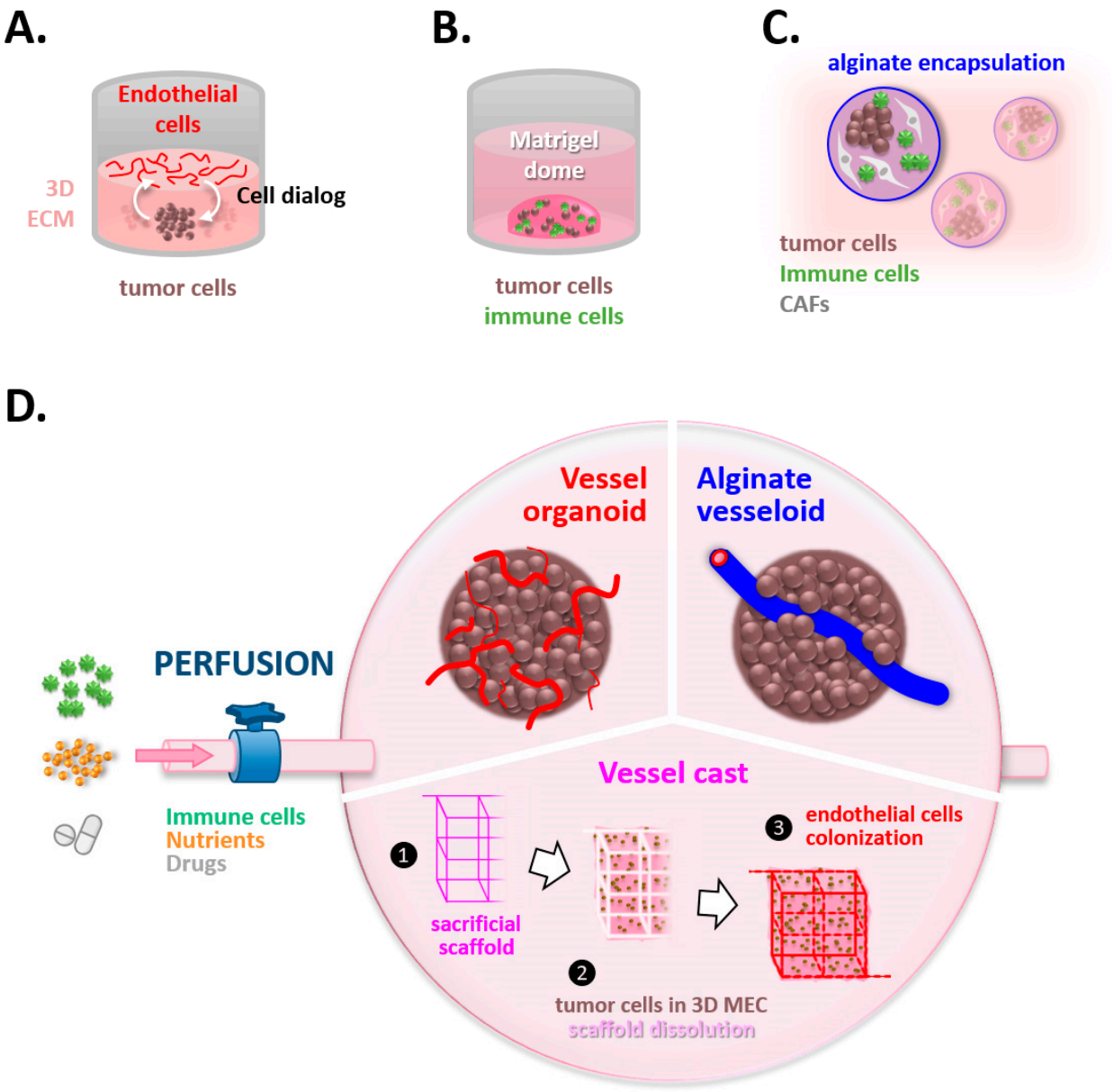



**Figure 4.** Welcome to the 3rd dimension. 3D models display a variety of opportunities to generate organized paracrine interactions. (**A**) ECM hydrogels can separate cell types to understand their paracrine interactions or migration. (**B**) Organoids preserve the tumor traits and their heterogeneity. (**C**) Alginate shells encapsulate cells and recreate a microenvironment in which cells produce their own ECM and self-organize. (**D**) In all these settings, the introduction of a vascular network represents a great challenge and allows integration of angiocrine effects and the perfusion and delivery of nutrients, cells, and drugs.

Moreover, 3D models have allowed highlighting reciprocal interactions between cancer cells and endothelial cells [97,98]. Interestingly, these in vitro 3D models evidenced that endothelial cells could exert an angiocrine influence upon cancer cells without any metabolic supply. This can be paralleled with the observations of endothelial cells emitting inductive signals to their neighbors during embryogenesis, before forming functional blood vessels [99,100]. Of note, this further widened the impact of blood vessels in the tumor ecosystem and was also observed in in vivo models. Thus, a recent study with a zebrafish xenograft model highlighted that tumor growth was stimulated by the presence of endothelial cords before any vascular function [101]. In the same vein, it was shown

that endothelial cells present in the tumor microenvironment could alter the response to therapies, beyond their function of blood supply [102].

### 3.2. Unmasking the Interplay between Tumoral Thugs and Undercover Immune Agents

Such 3D models are also useful for deciphering the dialog between immune and tumor cells occurring via paracrine interactions [102]. Strikingly, the 3D context is mandatory for the expression of some phenotypic traits and notably favors the expression by cancer cells of pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines, such as IL-8, which promotes the invasion of endothelial cells [103]. Interestingly, organoids derived from liver carcinoma and co-cultured with endothelial cells equally generated an angiocrine dialog, resulting in a pro-inflammatory environment, which polarized macrophages added to the co-culture towards a pro-angiogenic and pro-inflammatory state, sustaining a vicious circle [104].

Immune cells grown in 3D are also directly impacted in their gene expression, and CD4+ cells notably overexpress PD1 in 3D ECM when compared to 2D cultures [105]. Moreover, the ECM stiffness was shown to modulate the phenotype of CD4+ and CD8+ cells in the same study. In parallel, 3D collagen gels evidenced that increased collagen concentrations promoted the infiltration of regulatory T cells, in agreement with the altered ECM signaling correlated with T reg content in breast cancers [106].

Three-dimensional co-cultures also helped unravel specific interactions between cancer cells and NK cells (Figure 4B). For that purpose, breast tumor organoids derived from murine breast tumors were co-cultured with NK cells originating from the spleen [107]. Although NK cells initially repress the tumor growth and invasion, by inducing the apoptosis of invading cancer cells, NK cells exposed to tumors in vivo promoted the colony formation by tumor cells in these 3D models, which was paralleled by an increased metastatic potential in in vivo experiments. Complementarily, some models merged the microfluidic supply with an underlying 3D system to decipher the interactions between circulating neutrophils and tumor cells, as previously described in Section 2.2 [75]. Another smart system was developed, which can reversibly assemble 3D microchambers to sequentially study paracrine interactions between tumor cells and macrophages [108]. This tool notably allowed the authors to evidence that macrophages activated by distinct prostate cancer cells differentially impacted the branching of endothelial cells grown in the underlying 3D gel.

Co-culture models in matrix gels were also used to assess the efficacy of antitumoral immunotherapies. Indeed, Djikstra et al. demonstrated the feasibility of using autologous peripheral blood cells to target tumor organoids from the same patient [109]. This 3D co-culture induced tumor-specific T cell reactions that killed tumor organoids while sparing healthy organoids. The same approaches were carried out with cholangiocarcinoma organoids, with similar results [110]. Moreover, patient-derived organoids grown with an air–liquid interface, demonstrated preservation of the native infiltrated immune cells, as evidenced by the remarkable similarity in the T-cell receptor repertoire between the original tumors and their paired organoids [111]. Such tools will be instrumental in understanding which are the determinants of tumor cell sensitivity to T cells and how to improve this sensitivity in the frame of personalized medicine.

Another interesting strategy for 3D cell culture relies on the encapsulation of cells within alginate shells (Figure 4C). In that manner, cells grow as 3D clusters in which they produce their own ECM. Thanks to this kind of system, Rebelo et al. set up a co-culture of tumor cells with CAFs and monocytes [112]. In this 3D model, they recreated a pro-invasive microenvironment accumulating cytokines, matrix fibrils, and MMPs, which induced the differentiation of monocytes into M2-like activated macrophages. Finally, an acoustic-driven method was set up to generate patient-derived cell clusters made of both tumoral and immune cells, characterized by an increased secretion of IFN-$\gamma$ and TNF$\alpha$ when compared to 2D cultures [113].

Altogether, these different 3D models should prove to be very useful to obtain a better insight into the complexity of interactions between tumors and immune cells.

### *3.3. Fueling the System, a Vital Issue*

In parallel with these efforts to recreate the pro-inflammatory tumor microenvironment in 3D models, many researchers have aimed at proposing to the community perfusable models to integrate the concept of flow in 3D branched structures (Figure 4D). So far, researchers have had to use either microfluidic chips (as described in Section 2.1) or animal models to investigate this critical component in vessel physiology. In this latter case, they had to find adjustments to visualize vascular events by using translucent samples, such as a sponge in the ear of mice [114] or the zebrafish model [101]. Since institutional guidelines now strongly encourage the replacement of animal models, in agreement with the 3R rules (Replace, Refine, Reduce) of animal experimentation ethics, alternative ex vivo 3D models have been developed.

A few studies have succeeded in the proper vascularization and perfusion of organoids. In fact, vessel organoids were successfully obtained from induced Pluripotent Stem (iPS) cells, with an appropriate organization of endothelial cells, pericytes, and basement membrane, which were efficiently connected after grafting in mice and perfused [115]. Remarkably, a 3D model of neural stem cell spheroids could also be efficiently colonized by endothelial vessels, and its proper perfusion was illustrated by the diffusion of microbeads within the whole network [116]. Interestingly, the presence of vessels improved the maturation of neural stem cells and alleviated their apoptosis rate, thus reinforcing the concept of angiocriny. In the context of brain diseases, a key element of the tumor microenvironment is the BBB, which limits the access of therapies to the tumor site. Of note, in the aforementioned models, molecular markers of the BBB are expressed by the vascular structures [117], evidencing a promising potential to study how brain tumors affect the BBB, which remains a matter of debate in the community and probably depends on the brain tumor subtypes. We are convinced that such models will therefore greatly interest the neuro-oncology field.

Another approach to allow the perfusion of 3D cultures was using sacrificial carbohydrate glass to cast networks filled with endothelial cells [118]. These networks tolerated pulsatile flow and demonstrated physiological support for cells embedded in the surrounding 3D matrix, in agreement with proper tissue perfusion. In parallel, thanks to a 3D stamping method, a vascular channel was generated, which stably supported perfusion and could connect several compartments thus allowing the supply of organoids into an organ-on-a-chip system [119].

Moreover, a smart solution to generate perfusable vascular 3D models was proposed by Andrique et al. profiting from a combination of knowledge from the fields of physics and biology [120]. They used microfluidic devices to generate a triple coextrusion flow to generate so-called vesseloids, i.e., vessels covered by a soft alginate shell. Inside this shell, endothelial cells and perivascular cells self-assemble and reproduce quiescent functional vessels that can be perfused and behave as normal vessels in terms of permeability and contraction. Such a strategy offers exciting perspectives for the vascularization and perfusion of organoids. Although most of these developments were aimed at regenerative medicine, as illustrated with the graft of liver buds [121] or pancreatic islets [122], we are convinced that oncology will also benefit from the vascularization of organoids to recapitulate more relevant ecosystems. Indeed, by using "genetically reset" endothelial cells, Palikuqi et al. demonstrated that these cells could vascularize healthy or tumoral colon organoids and sustained the proliferation and arborization of these organoids [123].

Finally, to end this section on tumor vessel perfusion, it seems important to us to say a few words about vasculogenic mimicry. Based on the formation of hybrid vessels made in part by endothelial cells and in another part by tumor cells, this process was notably described in melanomas, breast cancers, and gliomas [124]. It is still a matter of debate since anatomo-pathologists hardly observe it in tumor sections. Yet, one can argue that, by its nature, this event that probably relies on progressive dedifferentiation and redifferentiation steps is difficult to detect and therefore to characterize. Interestingly, a 3D model with an endothelial channel surrounded by tumor organoids recently captured the integration of

tumor cells within the pre-existing channel [125]. Such models will be helpful in shedding light on this peculiar phenomenon that may play a critical role in the interplay between the tumor and its vascular–immune microenvironment.

## 4. Discussion/Perspectives

To end this review on tumor angiogenesis and immunity models, it is time to discuss the different perspectives that the field presently offers.

From an experimental point of view, new designs are constantly generated to refine specific aspects of interest. Several limitations actually exist and restrict the potential of chips and 3D models: the choice and relevance of cells, the long-term viability of the culture, their access to high-resolution microscopy, the costs and availability of specific ECM components, etc.

Although HUVECs are still the most widespread endothelial cells used in the vessels-on-chip, iPS-derived endothelial cells are increasingly used. We hope that additional endothelial models will allow covering the variety of endothelial cell specificities associated with their tissue of origin. For instance, liver sinusoid discontinuous capillaries and impermeable brain capillaries should be made from endothelial cells with adequate permeability properties that reproduce their opposite physiology. When talking about tumor immunity, a breakthrough could also come from the integration in the experimental models of lymphatic vessels, which play a key role in immune cell homing. In that sense, lymphatic microvascular networks have been recently proposed, which could pave the way for a novel field of tumor microenvironment understanding [126]. Determining the right culture conditions, and especially the media composition allowing preservation of the differentiation state and health of many cell types together, probably represents the most significant challenge.

From a translational point of view, the proper vascularization of multicellular systems remains a bottleneck in many fields, both in oncology to mimic the physiology of tumors and in regenerative medicine to ensure the survival of tissue grafts. Both areas should therefore benefit from the efforts of both communities to improve vessel engineering and refine functional and perfusable capillaries ex vivo. Some precious knowledge may also derive from the vast number of studies on COVID-19 since endothelial activation and associated immunothrombosis have been shown to participate in the COVID-19 disease after SARS-CoV2 infection [127,128]. Incidentally, thrombosis constitutes with inflammation and angiogenesis the third partner of Virchow's triad, which is dysregulated in different pathologies including cancers [129], and platelets are also involved in metastasis, as illustrated by the famous Trousseau syndrome. Interestingly, platelets enclose many growth factors modulating angiogenesis and immunity and can coordinate intravascular immune responses to infections and cancers [130]. The control of their degranulation is tightly orchestrated by many parameters in the organism, and is hard to reproduce in ex vivo models so far, but would represent an interesting long-term track of development.

Most models for tumor vasculature focus on neo-angiogenic mechanisms, yet alternative processes also contribute to the development of the tumoral vascular network. Indeed, tumor vessels can split after the initial formation of an endothelial pillar within the vessel lumen, in a so-called intussusception process. Interestingly, this event also seems to be associated with immune regulation since the infiltration of macrophages and T cells could be observed in the vicinity of such pillars in metastatic melanoma [131]. Moreover, tumors can also grow by hijacking pre-existing blood vessels within the surrounding tissue, and this vessel co-option was shown to be controlled by macrophage subpopulations [132]. Last, but not least, macrophages also seem to be critical for the recurrence of tumors after radiotherapy, by the recruitment of endothelial precursor cells to elicit vasculogenesis [133]. Developing new tools and models is required to elucidate how such mechanisms can modulate the vascular network and grant it a higher degree of plasticity.

Finally, immunotherapy has gained much attention over the last few years and holds great promise in oncology. For example, immune checkpoint blockade has appeared as a

promising novel strategy in recent years, but its adverse effects still restrict its full clinical potential [134]. Moreover, CAR (Chimeric Antigen Receptors) T cells have revolutionized the antitumoral immunotherapy field. Yet, their immunogenicity might dampen their efficacy and/or induce anti-CAR immune responses that must be better understood to reach their full potential [135]. Much knowledge can therefore still be acquired to improve the efficiency of immunotherapy. Among the improvement tracks, the understanding of long-term maintenance of immune activity is surely a key issue, and methods to increase the longevity of NK cells in the organism are under study [136].

## 5. Conclusions

To summarize, increased knowledge of the complex interplay between tumoral, endothelial, and immune cells within the tumor microenvironment is a crucial asset for envisioning an all-out battle against tumors. Targeting multiple hits within this context could improve the overall efficacy of therapies. In that framework, the combination of VEGFR2 and PDL1 inhibitors against breast and pancreatic cancer murine models led to the generation of High Endothelial Venules and favored the infiltration and activation of lymphocytes [137]. Let us hope that this is only the first of many microenvironment-based efficient strategies in our quest toward the eradication of tumors.

**Author Contributions:** L.T., H.C., S.B., S.M. and A.F. gathered the relevant literature and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work has been supported by the Institut National du Cancer (INCA_16347).

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

## References

1. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D.M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Cancer Statistics for the Year 2020: An Overview. *Int. J. Cancer* **2021**, *149*, 778–789. [CrossRef]
2. Marx, J. Cancer Biology. All in the Stroma: Cancer's Cosa Nostra. *Science* **2008**, *320*, 38–41. [CrossRef]
3. Folkman, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182–1186. [CrossRef]
4. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Molecular Mechanisms and Clinical Applications of Angiogenesis. *Nature* **2011**, *473*, 298–307. [CrossRef]
5. Eelen, G.; Treps, L.; Li, X.; Carmeliet, P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circ. Res.* **2020**, *127*, 310–329. [CrossRef]
6. Bear, H.D.; Tang, G.; Rastogi, P.; Geyer, C.E.; Robidoux, A.; Atkins, J.N.; Baez-Diaz, L.; Brufsky, A.M.; Mehta, R.S.; Fehrenbacher, L.; et al. Bevacizumab Added to Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 310–320. [CrossRef]
7. Aalders, K.C.; Tryfonidis, K.; Senkus, E.; Cardoso, F. Anti-Angiogenic Treatment in Breast Cancer: Facts, Successes, Failures and Future Perspectives. *Cancer Treat. Rev.* **2017**, *53*, 98–110. [CrossRef]
8. Sivridis, E.; Giatromanolaki, A.; Koukourakis, M.I. The Vascular Network of Tumours–What Is It Not for? *J. Pathol.* **2003**, *201*, 173–180. [CrossRef]
9. Quail, D.F.; Joyce, J.A. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell* **2017**, *31*, 326–341. [CrossRef] [PubMed]
10. De Palma, M.; Biziato, D.; Petrova, T.V. Microenvironmental Regulation of Tumour Angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 457–474. [CrossRef]
11. Germain, S.; Monnot, C.; Muller, L.; Eichmann, A. Hypoxia-Driven Angiogenesis: Role of Tip Cells and Extracellular Matrix Scaffolding. *Curr. Opin. Hematol.* **2010**, *17*, 245–251. [CrossRef]
12. Schito, L.; Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer* **2016**, *2*, 758–770. [CrossRef]
13. Lu, K.V.; Chang, J.P.; Parachoniak, C.A.; Pandika, M.M.; Aghi, M.K.; Meyronet, D.; Isachenko, N.; Fouse, S.D.; Phillips, J.J.; Cheresh, D.A.; et al. VEGF Inhibits Tumor Cell Invasion and Mesenchymal Transition through a MET/VEGFR2 Complex. *Cancer Cell* **2012**, *22*, 21–35. [CrossRef]
14. Pàez-Ribes, M.; Allen, E.; Hudock, J.; Takeda, T.; Okuyama, H.; Viñals, F.; Inoue, M.; Bergers, G.; Hanahan, D.; Casanovas, O. Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 220–231. [CrossRef]
15. Furlan, A.; Kherrouche, Z.; Montagne, R.; Copin, M.-C.; Tulasne, D. Thirty Years of Research on Met Receptor to Move a Biomarker from Bench to Bedside. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 6737–6744. [CrossRef]

16. Mira, E.; Lacalle, R.A.; Buesa, J.M.; de Buitrago, G.G.; Jiménez-Baranda, S.; Gómez-Moutón, C.; Martínez-A, C.; Mañes, S. Secreted MMP9 Promotes Angiogenesis More Efficiently than Constitutive Active MMP9 Bound to the Tumor Cell Surface. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 1847–1857. [CrossRef]
17. Giraudo, E.; Inoue, M.; Hanahan, D. An Amino-Bisphosphonate Targets MMP-9-Expressing Macrophages and Angiogenesis to Impair Cervical Carcinogenesis. *J. Clin. Investig.* **2004**, *114*, 623–633. [CrossRef]
18. Suarez-Carmona, M.; Bourcy, M.; Lesage, J.; Leroi, N.; Syne, L.; Blacher, S.; Hubert, P.; Erpicum, C.; Foidart, J.-M.; Delvenne, P.; et al. Soluble Factors Regulated by Epithelial-Mesenchymal Transition Mediate Tumour Angiogenesis and Myeloid Cell Recruitment. *J. Pathol.* **2015**, *236*, 491–504. [CrossRef]
19. Greten, F.R.; Grivennikov, S.I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* **2019**, *51*, 27–41. [CrossRef]
20. de Visser, K.E.; Eichten, A.; Coussens, L.M. Paradoxical Roles of the Immune System during Cancer Development. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 24–37. [CrossRef]
21. Akkari, L.; Bowman, R.L.; Tessier, J.; Klemm, F.; Handgraaf, S.M.; de Groot, M.; Quail, D.F.; Tillard, L.; Gadiot, J.; Huse, J.T.; et al. Dynamic Changes in Glioma Macrophage Populations after Radiotherapy Reveal CSF-1R Inhibition as a Strategy to Overcome Resistance. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, eaaw7843. [CrossRef] [PubMed]
22. Trinchieri, G. Cancer and Inflammation: An Old Intuition with Rapidly Evolving New Concepts. *Annu. Rev. Immunol.* **2012**, *30*, 677–706. [CrossRef]
23. Nagarsheth, N.; Wicha, M.S.; Zou, W. Chemokines in the Cancer Microenvironment and Their Relevance in Cancer Immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17*, 559–572. [CrossRef]
24. Wang, S.-C.; Hong, J.-H.; Hsueh, C.; Chiang, C.-S. Tumor-Secreted SDF-1 Promotes Glioma Invasiveness and TAM Tropism toward Hypoxia in a Murine Astrocytoma Model. *Lab. Investig.* **2012**, *92*, 151–162. [CrossRef]
25. Facciabene, A.; Peng, X.; Hagemann, I.S.; Balint, K.; Barchetti, A.; Wang, L.-P.; Gimotty, P.A.; Gilks, C.B.; Lal, P.; Zhang, L.; et al. Tumour Hypoxia Promotes Tolerance and Angiogenesis via CCL28 and T(Reg) Cells. *Nature* **2011**, *475*, 226–230. [CrossRef]
26. Cormier, S.A.; Taranova, A.G.; Bedient, C.; Nguyen, T.; Protheroe, C.; Pero, R.; Dimina, D.; Ochkur, S.I.; O'Neill, K.; Colbert, D.; et al. Pivotal Advance: Eosinophil Infiltration of Solid Tumors Is an Early and Persistent Inflammatory Host Response. *J. Leukoc. Biol.* **2006**, *79*, 1131–1139. [CrossRef]
27. Teijeira, Á.; Garasa, S.; Gato, M.; Alfaro, C.; Migueliz, I.; Cirella, A.; de Andrea, C.; Ochoa, M.C.; Otano, I.; Etxeberria, I.; et al. CXCR1 and CXCR2 Chemokine Receptor Agonists Produced by Tumors Induce Neutrophil Extracellular Traps That Interfere with Immune Cytotoxicity. *Immunity* **2020**, *52*, 856–871.e8. [CrossRef]
28. Coussens, L.M.; Raymond, W.W.; Bergers, G.; Laig-Webster, M.; Behrendtsen, O.; Werb, Z.; Caughey, G.H.; Hanahan, D. Inflammatory Mast Cells Up-Regulate Angiogenesis during Squamous Epithelial Carcinogenesis. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 1382–1397. [CrossRef]
29. Stockmann, C.; Doedens, A.; Weidemann, A.; Zhang, N.; Takeda, N.; Greenberg, J.I.; Cheresh, D.A.; Johnson, R.S. Deletion of Vascular Endothelial Growth Factor in Myeloid Cells Accelerates Tumorigenesis. *Nature* **2008**, *456*, 814–818. [CrossRef]
30. Bergers, G.; Brekken, R.; McMahon, G.; Vu, T.H.; Itoh, T.; Tamaki, K.; Tanzawa, K.; Thorpe, P.; Itohara, S.; Werb, Z.; et al. Matrix Metalloproteinase-9 Triggers the Angiogenic Switch during Carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 737–744. [CrossRef]
31. Scott, E.N.; Gocher, A.M.; Workman, C.J.; Vignali, D.A.A. Regulatory T Cells: Barriers of Immune Infiltration Into the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 702726. [CrossRef]
32. Parlato, S.; De Ninno, A.; Molfetta, R.; Toschi, E.; Salerno, D.; Mencattini, A.; Romagnoli, G.; Fragale, A.; Roccazzello, L.; Buoncervello, M.; et al. 3D Microfluidic Model for Evaluating Immunotherapy Efficacy by Tracking Dendritic Cell Behaviour toward Tumor Cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1093. [CrossRef]
33. de Graaf, M.N.S.; Cochrane, A.; van den Hil, F.E.; Buijsman, W.; van der Meer, A.D.; van den Berg, A.; Mummery, C.L.; Orlova, V.V. Scalable Microphysiological System to Model Three-Dimensional Blood Vessels. *APL Bioeng.* **2019**, *3*, 026105. [CrossRef]
34. Sahai, E.; Astsaturov, I.; Cukierman, E.; DeNardo, D.G.; Egeblad, M.; Evans, R.M.; Fearon, D.; Greten, F.R.; Hingorani, S.R.; Hunter, T.; et al. A Framework for Advancing Our Understanding of Cancer-Associated Fibroblasts. *Nat. Rev. Cancer* **2020**, *20*, 174–186. [CrossRef]
35. Barrett, R.L.; Puré, E. Cancer-Associated Fibroblasts and Their Influence on Tumor Immunity and Immunotherapy. *eLife* **2020**, *9*, e57243. [CrossRef]
36. Sewell-Loftin, M.K.; Bayer, S.V.H.; Crist, E.; Hughes, T.; Joison, S.M.; Longmore, G.D.; George, S.C. Cancer-Associated Fibroblasts Support Vascular Growth through Mechanical Force. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12574. [CrossRef]
37. Allen, E.; Miéville, P.; Warren, C.M.; Saghafinia, S.; Li, L.; Peng, M.-W.; Hanahan, D. Metabolic Symbiosis Enables Adaptive Resistance to Anti-Angiogenic Therapy That Is Dependent on MTOR Signaling. *Cell Rep.* **2016**, *15*, 1144–1160. [CrossRef]
38. Végran, F.; Boidot, R.; Michiels, C.; Sonveaux, P.; Feron, O. Lactate Influx through the Endothelial Cell Monocarboxylate Transporter MCT1 Supports an NF-KB/IL-8 Pathway That Drives Tumor Angiogenesis. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 2550–2560. [CrossRef]
39. Cantelmo, A.R.; Conradi, L.-C.; Brajic, A.; Goveia, J.; Kalucka, J.; Pircher, A.; Chaturvedi, P.; Hol, J.; Thienpont, B.; Teuwen, L.-A.; et al. Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 968–985. [CrossRef]

40. Maione, F.; Oliaro-Bosso, S.; Meda, C.; Di Nicolantonio, F.; Bussolino, F.; Balliano, G.; Viola, F.; Giraudo, E. The Cholesterol Biosynthesis Enzyme Oxidosqualene Cyclase Is a New Target to Impair Tumour Angiogenesis and Metastasis Dissemination. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9054. [CrossRef]
41. Colegio, O.R.; Chu, N.-Q.; Szabo, A.L.; Chu, T.; Rhebergen, A.M.; Jairam, V.; Cyrus, N.; Brokowski, C.E.; Eisenbarth, S.C.; Phillips, G.M.; et al. Functional Polarization of Tumour-Associated Macrophages by Tumour-Derived Lactic Acid. *Nature* **2014**, *513*, 559–563. [CrossRef] [PubMed]
42. Taraboletti, G.; D'Ascenzo, S.; Giusti, I.; Marchetti, D.; Borsotti, P.; Millimaggi, D.; Giavazzi, R.; Pavan, A.; Dolo, V. Bioavailability of VEGF in Tumor-Shed Vesicles Depends on Vesicle Burst Induced by Acidic PH. *Neoplasia* **2006**, *8*, 96–103. [CrossRef]
43. Caslin, H.L.; Abebayehu, D.; Pinette, J.A.; Ryan, J.J. Lactate Is a Metabolic Mediator That Shapes Immune Cell Fate and Function. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 688485. [CrossRef]
44. Xia, H.; Green, D.R.; Zou, W. Autophagy in Tumour Immunity and Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2021**, *21*, 281–297. [CrossRef]
45. Oshi, M.; Newman, S.; Tokumaru, Y.; Yan, L.; Matsuyama, R.; Endo, I.; Nagahashi, M.; Takabe, K. Intra-Tumoral Angiogenesis Is Associated with Inflammation, Immune Reaction and Metastatic Recurrence in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6708. [CrossRef]
46. Wyckoff, J.; Wang, W.; Lin, E.Y.; Wang, Y.; Pixley, F.; Stanley, E.R.; Graf, T.; Pollard, J.W.; Segall, J.; Condeelis, J. A Paracrine Loop between Tumor Cells and Macrophages Is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7022–7029. [CrossRef]
47. Wyckoff, J.B.; Wang, Y.; Lin, E.Y.; Li, J.; Goswami, S.; Stanley, E.R.; Segall, J.E.; Pollard, J.W.; Condeelis, J. Direct Visualization of Macrophage-Assisted Tumor Cell Intravasation in Mammary Tumors. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 2649–2656. [CrossRef]
48. Quail, D.F.; Joyce, J.A. Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Metastasis. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1423–1437. [CrossRef]
49. Chen, Q.; Zhang, X.H.-F.; Massagué, J. Macrophage Binding to Receptor VCAM-1 Transmits Survival Signals in Breast Cancer Cells That Invade the Lungs. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 538–549. [CrossRef]
50. Kaplan, R.N.; Riba, R.D.; Zacharoulis, S.; Bramley, A.H.; Vincent, L.; Costa, C.; MacDonald, D.D.; Jin, D.K.; Shido, K.; Kerns, S.A.; et al. VEGFR1-Positive Haematopoietic Bone Marrow Progenitors Initiate the Pre-Metastatic Niche. *Nature* **2005**, *438*, 820–827. [CrossRef]
51. Kaczanowska, S.; Beury, D.W.; Gopalan, V.; Tycko, A.K.; Qin, H.; Clements, M.E.; Drake, J.; Nwanze, C.; Murgai, M.; Rae, Z.; et al. Genetically Engineered Myeloid Cells Rebalance the Core Immune Suppression Program in Metastasis. *Cell* **2021**, *184*, 2033–2052.e21. [CrossRef]
52. Peinado, H.; Alečković, M.; Lavotshkin, S.; Matei, I.; Costa-Silva, B.; Moreno-Bueno, G.; Hergueta-Redondo, M.; Williams, C.; García-Santos, G.; Ghajar, C.M.; et al. Melanoma Exosomes Educate Bone Marrow Progenitor Cells toward a Pro-Metastatic Phenotype through MET. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 883–891. [CrossRef]
53. Lugini, L.; Cecchetti, S.; Huber, V.; Luciani, F.; Macchia, G.; Spadaro, F.; Paris, L.; Abalsamo, L.; Colone, M.; Molinari, A.; et al. Immune Surveillance Properties of Human NK Cell-Derived Exosomes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2012**, *189*, 2833–2842. [CrossRef]
54. Ganesh, K.; Massagué, J. Targeting Metastatic Cancer. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 34–44. [CrossRef]
55. Azimi, M.S.; Lacey, M.; Mondal, D.; Murfee, W.L. An Ex Vivo Tissue Culture Model for Anti-Angiogenic Drug Testing. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2016**, *1464*, 85–95. [CrossRef]
56. Chrobak, K.M.; Potter, D.R.; Tien, J. Formation of Perfused, Functional Microvascular Tubes in Vitro. *Microvasc. Res.* **2006**, *71*, 185–196. [CrossRef]
57. Bischel, L.L.; Lee, S.-H.; Beebe, D.J. A Practical Method for Patterning Lumens through ECM Hydrogels via Viscous Finger Patterning. *J. Lab. Autom.* **2012**, *17*, 96–103. [CrossRef]
58. Delannoy, E.; Tellier, G.; Cholet, J.; Leroy, A.M.; Treizebré, A.; Soncin, F. Multi-Layered Human Blood Vessels-on-Chip Design Using Double Viscous Finger Patterning. *Biomedicines* **2022**, *10*, 797. [CrossRef]
59. Pauty, J.; Usuba, R.; Cheng, I.G.; Hespel, L.; Takahashi, H.; Kato, K.; Kobayashi, M.; Nakajima, H.; Lee, E.; Yger, F.; et al. A Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Sprouting Angiogenesis Assay Based on an In Vitro Human Blood Vessel Model for the Study of Anti-Angiogenic Drugs. *EBioMedicine* **2018**, *27*, 225–236. [CrossRef]
60. Usuba, R.; Pauty, J.; Soncin, F.; Matsunaga, Y.T. EGFL7 Regulates Sprouting Angiogenesis and Endothelial Integrity in a Human Blood Vessel Model. *Biomaterials* **2019**, *197*, 305–316. [CrossRef] [PubMed]
61. Yoshigi, M.; Hoffman, L.M.; Jensen, C.C.; Yost, H.J.; Beckerle, M.C. Mechanical Force Mobilizes Zyxin from Focal Adhesions to Actin Filaments and Regulates Cytoskeletal Reinforcement. *J. Cell Biol.* **2005**, *171*, 209–215. [CrossRef]
62. Song, J.W.; Munn, L.L. Fluid Forces Control Endothelial Sprouting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 15342–15347. [CrossRef]
63. Akbari, E.; Spychalski, G.B.; Rangharajan, K.K.; Prakash, S.; Song, J.W. Competing Fluid Forces Control Endothelial Sprouting in a 3-D Microfluidic Vessel Bifurcation Model. *Micromachines* **2019**, *10*, 451. [CrossRef]
64. Shirure, V.S.; Bi, Y.; Curtis, M.B.; Lezia, A.; Goedegebuure, M.M.; Goedegebuure, S.P.; Aft, R.; Fields, R.C.; George, S.C. Tumor-on-a-Chip Platform to Investigate Progression and Drug Sensitivity in Cell Lines and Patient-Derived Organoids. *Lab. Chip* **2018**, *18*, 3687–3702. [CrossRef]

65. Herland, A.; Maoz, B.M.; Das, D.; Somayaji, M.R.; Prantil-Baun, R.; Novak, R.; Cronce, M.; Huffstater, T.; Jeanty, S.S.F.; Ingram, M.; et al. Quantitative Prediction of Human Pharmacokinetic Responses to Drugs via Fluidically Coupled Vascularized Organ Chips. *Nat. Biomed. Eng.* **2020**, *4*, 421–436. [CrossRef]
66. Hassell, B.A.; Goyal, G.; Lee, E.; Sontheimer-Phelps, A.; Levy, O.; Chen, C.S.; Ingber, D.E. Human Organ Chip Models Recapitulate Orthotopic Lung Cancer Growth, Therapeutic Responses, and Tumor Dormancy In Vitro. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 508–516. [CrossRef]
67. Vandenhaute, E.; Drolez, A.; Sevin, E.; Gosselet, F.; Mysiorek, C.; Dehouck, M.-P. Adapting Coculture in Vitro Models of the Blood-Brain Barrier for Use in Cancer Research: Maintaining an Appropriate Endothelial Monolayer for the Assessment of Transendothelial Migration. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **2016**, *96*, 588–598. [CrossRef]
68. Deligne, C.; Hachani, J.; Duban-Deweer, S.; Meignan, S.; Leblond, P.; Carcaboso, A.M.; Sano, Y.; Shimizu, F.; Kanda, T.; Gosselet, F.; et al. Development of a Human in Vitro Blood-Brain Tumor Barrier Model of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma to Better Understand the Chemoresistance. *Fluids Barriers CNS* **2020**, *17*, 37. [CrossRef]
69. Park, T.-E.; Mustafaoglu, N.; Herland, A.; Hasselkus, R.; Mannix, R.; FitzGerald, E.A.; Prantil-Baun, R.; Watters, A.; Henry, O.; Benz, M.; et al. Hypoxia-Enhanced Blood-Brain Barrier Chip Recapitulates Human Barrier Function and Shuttling of Drugs and Antibodies. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2621. [CrossRef]
70. Herland, A.; van der Meer, A.D.; FitzGerald, E.A.; Park, T.-E.; Sleeboom, J.J.F.; Ingber, D.E. Distinct Contributions of Astrocytes and Pericytes to Neuroinflammation Identified in a 3D Human Blood-Brain Barrier on a Chip. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0150360. [CrossRef]
71. Yi, H.-G.; Jeong, Y.H.; Kim, Y.; Choi, Y.-J.; Moon, H.E.; Park, S.H.; Kang, K.S.; Bae, M.; Jang, J.; Youn, H.; et al. A Bioprinted Human-Glioblastoma-on-a-Chip for the Identification of Patient-Specific Responses to Chemoradiotherapy. *Nat. Biomed. Eng.* **2019**, *3*, 509–519. [CrossRef]
72. Arts, J.J.; Mahlandt, E.K.; Grönloh, M.L.; Schimmel, L.; Noordstra, I.; Gordon, E.; van Steen, A.C.; Tol, S.; Walzog, B.; van Rijssel, J.; et al. Endothelial Junctional Membrane Protrusions Serve as Hotspots for Neutrophil Transmigration. *eLife* **2021**, *10*, e66074. [CrossRef]
73. Riddle, R.B.; Jennbacken, K.; Hansson, K.M.; Harper, M.T. Endothelial Inflammation and Neutrophil Transmigration Are Modulated by Extracellular Matrix Composition in an Inflammation-on-a-Chip Model. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 6855. [CrossRef]
74. Um, E.; Oh, J.M.; Park, J.; Song, T.; Kim, T.-E.; Choi, Y.; Shin, C.; Kolygina, D.; Jeon, J.-H.; Grzybowski, B.A.; et al. Immature Dendritic Cells Navigate Microscopic Mazes to Find Tumor Cells. *Lab. Chip* **2019**, *19*, 1665–1675. [CrossRef] [PubMed]
75. Surendran, V.; Rutledge, D.; Colmon, R.; Chandrasekaran, A. A Novel Tumor-Immune Microenvironment (TIME)-on-Chip Mimics Three Dimensional Neutrophil-Tumor Dynamics and Neutrophil Extracellalar Traps (NETs)- Mediated Collective Tumor Invasion. *Biofabrication* **2021**, *13*, 035029. [CrossRef]
76. Cui, X.; Ma, C.; Vasudevaraja, V.; Serrano, J.; Tong, J.; Peng, Y.; Delorenzo, M.; Shen, G.; Frenster, J.; Morales, R.-T.T.; et al. Dissecting the Immunosuppressive Tumor Microenvironments in Glioblastoma-on-a-Chip for Optimized PD-1 Immunotherapy. *eLife* **2020**, *9*, e52253. [CrossRef]
77. Cui, X.; Morales, R.-T.T.; Qian, W.; Wang, H.; Gagner, J.-P.; Dolgalev, I.; Placantonakis, D.; Zagzag, D.; Cimmino, L.; Snuderl, M.; et al. Hacking Macrophage-Associated Immunosuppression for Regulating Glioblastoma Angiogenesis. *Biomaterials* **2018**, *161*, 164–178. [CrossRef]
78. Ando, Y.; Siegler, E.L.; Ta, H.P.; Cinay, G.E.; Zhou, H.; Gorrell, K.A.; Au, H.; Jarvis, B.M.; Wang, P.; Shen, K. Evaluating CAR-T Cell Therapy in a Hypoxic 3D Tumor Model. *Adv. Healthc. Mater.* **2019**, *8*, 1900001. [CrossRef]
79. Ayuso, J.M.; Rehman, S.; Virumbrales-Munoz, M.; McMinn, P.H.; Geiger, P.; Fitzgerald, C.; Heaster, T.; Skala, M.C.; Beebe, D.J. Microfluidic Tumor-on-a-Chip Model to Evaluate the Role of Tumor Environmental Stress on NK Cell Exhaustion. *Sci. Adv.* **2021**, *7*, eabc2331. [CrossRef] [PubMed]
80. Maulana, T.I.; Kromidas, E.; Wallstabe, L.; Cipriano, M.; Alb, M.; Zaupa, C.; Hudecek, M.; Fogal, B.; Loskill, P. Immunocompetent Cancer-on-Chip Models to Assess Immuno-Oncology Therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *173*, 281–305. [CrossRef]
81. Hajal, C.; Ibrahim, L.; Serrano, J.C.; Offeddu, G.S.; Kamm, R.D. The Effects of Luminal and Trans-Endothelial Fluid Flows on the Extravasation and Tissue Invasion of Tumor Cells in a 3D in Vitro Microvascular Platform. *Biomaterials* **2021**, *265*, 120470. [CrossRef]
82. Song, J.; Miermont, A.; Lim, C.T.; Kamm, R.D. A 3D Microvascular Network Model to Study the Impact of Hypoxia on the Extravasation Potential of Breast Cell Lines. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 17949. [CrossRef] [PubMed]
83. Chen, M.B.; Whisler, J.A.; Fröse, J.; Yu, C.; Shin, Y.; Kamm, R.D. On-Chip Human Microvasculature Assay for Visualization and Quantitation of Tumor Cell Extravasation Dynamics. *Nat. Protoc.* **2017**, *12*, 865–880. [CrossRef]
84. Chen, M.B.; Hajal, C.; Benjamin, D.C.; Yu, C.; Azizgolshani, H.; Hynes, R.O.; Kamm, R.D. Inflamed Neutrophils Sequestered at Entrapped Tumor Cells via Chemotactic Confinement Promote Tumor Cell Extravasation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 7022–7027. [CrossRef]
85. Mi, S.; Liu, Z.; Du, Z.; Yi, X.; Sun, W. Three-Dimensional Microfluidic Tumor-Macrophage System for Breast Cancer Cell Invasion. *Biotechnol. Bioeng.* **2019**, *116*, 1731–1741. [CrossRef]
86. Zervantonakis, I.K.; Hughes-Alford, S.K.; Charest, J.L.; Condeelis, J.S.; Gertler, F.B.; Kamm, R.D. Three-Dimensional Microfluidic Model for Tumor Cell Intravasation and Endothelial Barrier Function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 13515–13520. [CrossRef]

87. Zhang, X.; Karim, M.; Hasan, M.M.; Hooper, J.; Wahab, R.; Roy, S.; Al-Hilal, T.A. Cancer-on-a-Chip: Models for Studying Metastasis. *Cancers* **2022**, *14*, 648. [CrossRef]
88. Method of the Year 2017: Organoids. *Nat. Methods* **2018**, *15*, 1. [CrossRef]
89. Kim, J.; Koo, B.-K.; Knoblich, J.A. Human Organoids: Model Systems for Human Biology and Medicine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 571–584. [CrossRef]
90. van de Wetering, M.; Francies, H.E.; Francis, J.M.; Bounova, G.; Iorio, F.; Pronk, A.; van Houdt, W.; van Gorp, J.; Taylor-Weiner, A.; Kester, L.; et al. Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients. *Cell* **2015**, *161*, 933–945. [CrossRef]
91. Burdett, E.; Kasper, F.K.; Mikos, A.G.; Ludwig, J.A. Engineering Tumors: A Tissue Engineering Perspective in Cancer Biology. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2010**, *16*, 351–359. [CrossRef]
92. Young, J.L.; Holle, A.W.; Spatz, J.P. Nanoscale and Mechanical Properties of the Physiological Cell-ECM Microenvironment. *Exp. Cell Res.* **2016**, *343*, 3–6. [CrossRef]
93. Nii, T.; Makino, K.; Tabata, Y. Three-Dimensional Culture System of Cancer Cells Combined with Biomaterials for Drug Screening. *Cancers* **2020**, *12*, 2754. [CrossRef]
94. Paszek, M.J.; Zahir, N.; Johnson, K.R.; Lakins, J.N.; Rozenberg, G.I.; Gefen, A.; Reinhart-King, C.A.; Margulies, S.S.; Dembo, M.; Boettiger, D.; et al. Tensional Homeostasis and the Malignant Phenotype. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 241–254. [CrossRef]
95. Anderson, S.M.; Siegman, S.N.; Segura, T. The Effect of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Presentation within Fibrin Matrices on Endothelial Cell Branching. *Biomaterials* **2011**, *32*, 7432–7443. [CrossRef]
96. Wörsdörfer, P.; Dalda, N.; Kern, A.; Krüger, S.; Wagner, N.; Kwok, C.K.; Henke, E.; Ergün, S. Generation of Complex Human Organoid Models Including Vascular Networks by Incorporation of Mesodermal Progenitor Cells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 15663. [CrossRef]
97. Barrett, J.M.; Mangold, K.A.; Jilling, T.; Kaul, K.L. Bi-Directional Interactions of Prostate Cancer Cells and Bone Marrow Endothelial Cells in Three-Dimensional Culture. *Prostate* **2005**, *64*, 75–82. [CrossRef]
98. Furlan, A.; Vercamer, C.; Heliot, L.; Wernert, N.; Desbiens, X.; Pourtier, A. Ets-1 Drives Breast Cancer Cell Angiogenic Potential and Interactions between Breast Cancer and Endothelial Cells. *Int. J. Oncol.* **2018**, *54*, 29–40. [CrossRef]
99. Bahary, N.; Zon, L.I. Development. Endothelium–Chicken Soup for the Endoderm. *Science* **2001**, *294*, 530–531. [CrossRef]
100. Lammert, E.; Cleaver, O.; Melton, D. Induction of Pancreatic Differentiation by Signals from Blood Vessels. *Science* **2001**, *294*, 564–567. [CrossRef]
101. Zhao, C.; Zhang, W.; Zhao, Y.; Yang, Y.; Luo, H.; Ji, G.; Dong, E.; Deng, H.; Lin, S.; Wei, Y.; et al. Endothelial Cords Promote Tumor Initial Growth Prior to Vascular Function through a Paracrine Mechanism. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19404. [CrossRef] [PubMed]
102. Augustine, T.N. Analysis of Immune-Tumor Cell Interactions Using a 3D Co-Culture Model. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2020**, *2184*, 103–110. [CrossRef]
103. DelNero, P.; Lane, M.; Verbridge, S.S.; Kwee, B.; Kermani, P.; Hempstead, B.; Stroock, A.; Fischbach, C. 3D Culture Broadly Regulates Tumor Cell Hypoxia Response and Angiogenesis via Pro-Inflammatory Pathways. *Biomaterials* **2015**, *55*, 110–118. [CrossRef]
104. Lim, J.T.C.; Kwang, L.G.; Ho, N.C.W.; Toh, C.C.M.; Too, N.S.H.; Hooi, L.; Benoukraf, T.; Chow, P.K.-H.; Dan, Y.Y.; Chow, E.K.-H.; et al. Hepatocellular Carcinoma Organoid Co-Cultures Mimic Angiocrine Crosstalk to Generate Inflammatory Tumor Microenvironment. *Biomaterials* **2022**, *284*, 121527. [CrossRef]
105. Chirivì, M.; Maiullari, F.; Milan, M.; Presutti, D.; Cordiglieri, C.; Crosti, M.; Sarnicola, M.L.; Soluri, A.; Volpi, M.; Święszkowski, W.; et al. Tumor Extracellular Matrix Stiffness Promptly Modulates the Phenotype and Gene Expression of Infiltrating T Lymphocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5862. [CrossRef] [PubMed]
106. Gao, H.; Tian, Q.; Zhou, Y.; Zhu, L.; Lu, Y.; Ma, Y.; Feng, J.; Jiang, Y.; Wang, B. 3D Collagen Fiber Concentration Regulates Treg Cell Infiltration in Triple Negative Breast Cancer. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 904418. [CrossRef] [PubMed]
107. Chan, I.S.; Knútsdóttir, H.; Ramakrishnan, G.; Padmanaban, V.; Warrier, M.; Ramirez, J.C.; Dunworth, M.; Zhang, H.; Jaffee, E.M.; Bader, J.S.; et al. Cancer Cells Educate Natural Killer Cells to a Metastasis-Promoting Cell State. *J. Cell Biol.* **2020**, *219*, e202001134. [CrossRef] [PubMed]
108. Yu, J.; Berthier, E.; Craig, A.; de Groot, T.E.; Sparks, S.; Ingram, P.N.; Jarrard, D.F.; Huang, W.; Beebe, D.J.; Theberge, A.B. Reconfigurable Open Microfluidics for Studying the Spatiotemporal Dynamics of Paracrine Signalling. *Nat. Biomed. Eng.* **2019**, *3*, 830–841. [CrossRef]
109. Dijkstra, K.K.; Cattaneo, C.M.; Weeber, F.; Chalabi, M.; van de Haar, J.; Fanchi, L.F.; Slagter, M.; van der Velden, D.L.; Kaing, S.; Kelderman, S.; et al. Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-Culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell* **2018**, *174*, 1586–1598.e12. [CrossRef]
110. Zhou, G.; Lieshout, R.; van Tienderen, G.S.; de Ruiter, V.; van Royen, M.E.; Boor, P.P.C.; Magré, L.; Desai, J.; Köten, K.; Kan, Y.Y.; et al. Modelling Immune Cytotoxicity for Cholangiocarcinoma with Tumour-Derived Organoids and Effector T Cells. *Br. J. Cancer* **2022**, *127*, 649–660. [CrossRef]
111. Neal, J.T.; Li, X.; Zhu, J.; Giangarra, V.; Grzeskowiak, C.L.; Ju, J.; Liu, I.H.; Chiou, S.-H.; Salahudeen, A.A.; Smith, A.R.; et al. Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell* **2018**, *175*, 1972–1988.e16. [CrossRef] [PubMed]

112. Rebelo, S.P.; Pinto, C.; Martins, T.R.; Harrer, N.; Estrada, M.F.; Loza-Alvarez, P.; Cabeçadas, J.; Alves, P.M.; Gualda, E.J.; Sommergruber, W.; et al. 3D-3-Culture: A Tool to Unveil Macrophage Plasticity in the Tumour Microenvironment. *Biomaterials* **2018**, *163*, 185–197. [CrossRef] [PubMed]
113. Ao, Z.; Wu, Z.; Cai, H.; Hu, L.; Li, X.; Kaurich, C.; Chang, J.; Gu, M.; Liang, C.; Lu, X.; et al. Rapid Profiling of Tumor-Immune Interaction Using Acoustically Assembled Patient-Derived Cell Clusters. *Adv. Sci. Weinh. Baden-Wurtt. Ger.* **2022**, *9*, e2201478. [CrossRef] [PubMed]
114. Pourtier-Manzanedo, A.; Vercamer, C.; Van Belle, E.; Mattot, V.; Mouquet, F.; Vandenbunder, B. Expression of an Ets-1 Dominant-Negative Mutant Perturbs Normal and Tumor Angiogenesis in a Mouse Ear Model. *Oncogene* **2003**, *22*, 1795–1806. [CrossRef]
115. Wimmer, R.A.; Leopoldi, A.; Aichinger, M.; Kerjaschki, D.; Penninger, J.M. Generation of Blood Vessel Organoids from Human Pluripotent Stem Cells. *Nat. Protoc.* **2019**, *14*, 3082–3100. [CrossRef]
116. Shin, N.; Kim, Y.; Ko, J.; Choi, S.W.; Hyung, S.; Lee, S.-E.; Park, S.; Song, J.; Jeon, N.L.; Kang, K.-S. Vascularization of INSC Spheroid in a 3D Spheroid-on-a-Chip Platform Enhances Neural Maturation. *Biotechnol. Bioeng.* **2021**, *119*, 566–574. [CrossRef]
117. Ahn, Y.; An, J.-H.; Yang, H.-J.; Lee, D.G.; Kim, J.; Koh, H.; Park, Y.-H.; Song, B.-S.; Sim, B.-W.; Lee, H.J.; et al. Human Blood Vessel Organoids Penetrate Human Cerebral Organoids and Form a Vessel-Like System. *Cells* **2021**, *10*, 2036. [CrossRef]
118. Miller, J.S.; Stevens, K.R.; Yang, M.T.; Baker, B.M.; Nguyen, D.-H.T.; Cohen, D.M.; Toro, E.; Chen, A.A.; Galie, P.A.; Yu, X.; et al. Rapid Casting of Patterned Vascular Networks for Perfusable Engineered Three-Dimensional Tissues. *Nat. Mater.* **2012**, *11*, 768–774. [CrossRef]
119. Lai, B.F.L.; Lu, R.X.Z.; Davenport Huyer, L.; Kakinoki, S.; Yazbeck, J.; Wang, E.Y.; Wu, Q.; Zhang, B.; Radisic, M. A Well Plate-Based Multiplexed Platform for Incorporation of Organoids into an Organ-on-a-Chip System with a Perfusable Vasculature. *Nat. Protoc.* **2021**, *16*, 2158–2189. [CrossRef]
120. Andrique, L.; Recher, G.; Alessandri, K.; Pujol, N.; Feyeux, M.; Bon, P.; Cognet, L.; Nassoy, P.; Bikfalvi, A. A Model of Guided Cell Self-Organization for Rapid and Spontaneous Formation of Functional Vessels. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaau6562. [CrossRef]
121. Takebe, T.; Sekine, K.; Kimura, M.; Yoshizawa, E.; Ayano, S.; Koido, M.; Funayama, S.; Nakanishi, N.; Hisai, T.; Kobayashi, T.; et al. Massive and Reproducible Production of Liver Buds Entirely from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 2661–2670. [CrossRef] [PubMed]
122. Takahashi, Y.; Sekine, K.; Kin, T.; Takebe, T.; Taniguchi, H. Self-Condensation Culture Enables Vascularization of Tissue Fragments for Efficient Therapeutic Transplantation. *Cell Rep.* **2018**, *23*, 1620–1629. [CrossRef]
123. Palikuqi, B.; Nguyen, D.-H.T.; Li, G.; Schreiner, R.; Pellegata, A.F.; Liu, Y.; Redmond, D.; Geng, F.; Lin, Y.; Gómez-Salinero, J.M.; et al. Adaptable Haemodynamic Endothelial Cells for Organogenesis and Tumorigenesis. *Nature* **2020**, *585*, 426–432. [CrossRef] [PubMed]
124. Leslie, M. Tumors' Do-It-Yourself Blood Vessels. *Science* **2016**, *352*, 1381–1383. [CrossRef] [PubMed]
125. Silvestri, V.L.; Henriet, E.; Linville, R.M.; Wong, A.D.; Searson, P.C.; Ewald, A.J. A Tissue-Engineered 3D Microvessel Model Reveals the Dynamics of Mosaic Vessel Formation in Breast Cancer. *Cancer Res.* **2020**, *80*, 4288–4301. [CrossRef]
126. Landau, S.; Newman, A.; Edri, S.; Michael, I.; Ben-Shaul, S.; Shandalov, Y.; Ben-Arye, T.; Kaur, P.; Zheng, M.H.; Levenberg, S. Investigating Lymphangiogenesis in Vitro and in Vivo Using Engineered Human Lymphatic Vessel Networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2101931118. [CrossRef]
127. Jin, Y.; Ji, W.; Yang, H.; Chen, S.; Zhang, W.; Duan, G. Endothelial Activation and Dysfunction in COVID-19: From Basic Mechanisms to Potential Therapeutic Approaches. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 293. [CrossRef]
128. Bonaventura, A.; Vecchié, A.; Dagna, L.; Martinod, K.; Dixon, D.L.; Van Tassell, B.W.; Dentali, F.; Montecucco, F.; Massberg, S.; Levi, M.; et al. Endothelial Dysfunction and Immunothrombosis as Key Pathogenic Mechanisms in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* **2021**, *21*, 319–329. [CrossRef]
129. Leiva, O.; Newcomb, R.; Connors, J.M.; Al-Samkari, H. Cancer and Thrombosis: New Insights to an Old Problem. *J. Med. Vasc.* **2020**, *45*, 6S8–6S16. [CrossRef]
130. Gaertner, F.; Massberg, S. Patrolling the Vascular Borders: Platelets in Immunity to Infection and Cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **2019**, *19*, 747–760. [CrossRef]
131. Pandita, A.; Ekstrand, M.; Bjursten, S.; Zhao, Z.; Fogelstrand, P.; Le Gal, K.; Ny, L.; Bergo, M.O.; Karlsson, J.; Nilsson, J.A.; et al. Intussusceptive Angiogenesis in Human Metastatic Malignant Melanoma. *Am. J. Pathol.* **2021**, *191*, 2023–2038. [CrossRef]
132. Teuwen, L.-A.; De Rooij, L.P.M.H.; Cuypers, A.; Rohlenova, K.; Dumas, S.J.; García-Caballero, M.; Meta, E.; Amersfoort, J.; Taverna, F.; Becker, L.M.; et al. Tumor Vessel Co-Option Probed by Single-Cell Analysis. *Cell Rep.* **2021**, *35*, 109253. [CrossRef]
133. Brown, J.M. Vasculogenesis: A Crucial Player in the Resistance of Solid Tumours to Radiotherapy. *Br. J. Radiol.* **2014**, *87*, 20130686. [CrossRef] [PubMed]
134. Poto, R.; Troiani, T.; Criscuolo, G.; Marone, G.; Ciardiello, F.; Tocchetti, C.G.; Varricchi, G. Holistic Approach to Immune Checkpoint Inhibitor-Related Adverse Events. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 804597. [CrossRef]
135. Wagner, D.L.; Fritsche, E.; Pulsipher, M.A.; Ahmed, N.; Hamieh, M.; Hegde, M.; Ruella, M.; Savoldo, B.; Shah, N.N.; Turtle, C.J.; et al. Immunogenicity of CAR T Cells in Cancer Therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2021**, *18*, 379–393. [CrossRef]

136. Myers, J.A.; Miller, J.S. Exploring the NK Cell Platform for Cancer Immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2021**, *18*, 85–100. [CrossRef]
137. Allen, E.; Jabouille, A.; Rivera, L.B.; Lodewijckx, I.; Missiaen, R.; Steri, V.; Feyen, K.; Tawney, J.; Hanahan, D.; Michael, I.P.; et al. Combined Antiangiogenic and Anti-PD-L1 Therapy Stimulates Tumor Immunity through HEV Formation. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, eaak9679. [CrossRef]