



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale  
- Pas de Modification 4.0 France (CC BY-NC-ND 4.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1  
FACULTE DE PHARMACIE  
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

THESE n° 13

## THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 22 janvier 2024 par

**Charlène ROUSSEL**

Née le 07 octobre 2000 à Mont Saint Aignan (76)

\*\*\*\*\*

# **Etude de la synergie oncogénique entre la mutation K27M et les protéines morphogénétiques osseuses (BMP) dans le gliome infiltrant du tronc cérébral (DIPG) : impact sur la migration et le métabolisme**

\*\*\*\*\*

JURY

Président du jury : M. MEURETTE Olivier, Maitre de conférences  
Directrice de thèse : Mme CASTETS Marie, Docteur en biologie  
Tuteur pédagogique : M. LINCET Hubert, Maitre de conférences  
Autres membres du jury :

Mme DOLEANS-JORDHEIM Anne, Maitre de conférences – Praticien hospitalier  
Mme HAMADOU Maud, Docteur en pharmacie

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

• Président de l'Université	Frédéric FLEURY
• Présidence du Conseil Académique	Hamda BEN HADID
• Vice-Président du Conseil d'Administration	Didier REVEL
• Vice-Président de la Commission Recherche	Jean François MORNEX
• Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire	Philippe CHEVALIER

### Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

#### SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : Gilles RODE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directrice : Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Christine VINCIGUERRA
UFR d'Odontologie	Directrice : Dominique SEUX
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation (ISTR)	Directeur : Xavier PERROT
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directrice : Anne-Marie SCHOTT

#### SCIENCES ET TECHNOLOGIES

UFR Fédération Sciences (Chimie, Mathématique, Physique)	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département composante Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département composante Génie Electrique et des procédés (GEP)	Directrice Mme Rosaria FERRIGNO
Département composante Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Polytech Lyon	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (IFSA)	Directeur : M. Nicolas LEBOIS

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**  
**ISPB - Faculté de Pharmacie Lyon**

**LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES**

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE**

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

- Monsieur Raphaël TERREUX (PR)
- Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
- Madame Anne DENUZIERE (MCU)
- Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
- Madame Christelle MACHON (MCU-PH)
- Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

- Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)
- Madame Stéphanie BRIANCON (PR)
- Monsieur Fabrice PIROT (PU-PH)
- Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
- Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
- Madame Danielle CAMPIOL ARRUDA (MCU)
- Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)
- Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
- Madame Giovanna LOLLO (MCU)
- Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)
- Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)
- Madame Eloïse THOMAS (MCU)

- **BIOPHYSIQUE**

- Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (PR)
- Madame Laurence HEINRICH (MCU)
- Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)
- Madame Sophie LANCELOT (MCU-PH)
- Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE**

- **DROIT DE LA SANTE**

- Madame Valérie SIRANYAN (PR)
- Madame Maud CINTRAT (MCU)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

- Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU-HDR)
- Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU-HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

- Monsieur Pascal BADOR (MCU-HDR)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**  
Monsieur Xavier ARMOIRY (PU-PH)  
Madame Claire GAILLARD (MCU)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**  
Madame Alexandra CLAYER-MONTEBAULT (MCU)  
Monsieur Vincent GROS (MCU-enseignant contractuel temps partiel)  
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)  
Madame Pascale PREYNAT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**  
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)  
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)  
Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU-HDR)
- **SANTE PUBLIQUE**  
Monsieur Claude DUSSART (PU-PH)  
Madame Delphine HOEGY (AHU)

#### **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT**

- **CHIMIE ORGANIQUE**  
Monsieur Pascal NEBOIS (PR)  
Madame Nadia WALCHSHOFER (PR)  
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU-HDR)  
Madame Christelle MARMINON (MCU)  
Madame Sylvie RADIX (MCU-HDR)  
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU-HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**  
Monsieur Marc LEBORGNE (PR)  
Monsieur Thierry LOMBERGET (PR)  
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU-HDR)  
Monsieur François HALLE (MCU)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**  
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (PR)  
Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)  
Madame Isabelle KERZAON (MCU)  
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**  
Madame Roselyne BOULIEU (PU-PH)  
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (PU-PH)  
Madame Catherine RIOUFOL (PU-PH)  
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU-PH)  
Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)  
Madame Florence RANCHON (MCU-PH)  
Monsieur Teddy NOVAIS (AHU)

Madame Camille LEONCE (ATER)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE**

- **TOXICOLOGIE**
  - Monsieur Jérôme GUITTON (PU-PH)
  - Madame Léa PAYEN (PU-PH)
  - Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
  
- **PHYSIOLOGIE**
  - Monsieur Christian BARRES (PR)
  - Madame Kiao Ling LIU (MCU)
  - Monsieur Ming LO (MCU-HDR)
  
- **PHARMACOLOGIE**
  - Monsieur Sylvain GOUTELLE (PU-PH)
  - Monsieur Michel TOD (PU-PH)
  - Monsieur Luc ZIMMER (PU-PH)
  - Monsieur Roger BESANCON (MCU)
  - Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
  - Madame Evelyne CHANUT (MCU)
  - Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
  - Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)
  
- **COMMUNICATION**
  - Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)
  
- **ENSEIGNANTS CONTRACTUELS TEMPS PARTIEL**
  - Madame Aline INIGO PILLET (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
  - Madame Pauline LOUBERT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A**

- **IMMUNOLOGIE**
  - Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
  - Monsieur Sébastien VIEL (MCU-PH)
  - Madame Morgane GOSSEZ (AHU)
  
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
  - Madame Christine VINCIGUERRA (PU-PH)
  - Madame Sarah HUET (MCU-PH)
  - Monsieur Yohann JOURDY (MCU-PH)
  
- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**
  - Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH)
  - Madame Florence MORFIN (PU-PH)
  - Madame Veronica RODRIGUEZ-NAVA (PR)
  - Monsieur Didier BLAHA (MCU-HDR)

Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)  
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH-HDR)  
Madame Emilie FROBERT (MCU-PH)  
Monsieur Jérôme JOSSE (MCU)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (PR)  
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)  
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU-HDR)  
Madame Amy DERICQUEBOURG (AHU)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B**

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (PR)  
Madame Caroline MOYRET-LALLE (PR)  
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)  
Monsieur Karim CHIKH (MCU-PH)  
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU-PH-HDR)  
Monsieur Anthony FOURIER (MCU-PH)  
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)  
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)  
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU-HDR)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)  
Monsieur David GONCALVES (AHU)  
Monsieur Alexandre JANIN (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)  
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU-HDR)

## **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)  
Monsieur Philippe LAWTON (PR)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)  
Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU-enseignant contractuel temps partiel)  
Madame Valérie VOIRON (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

PR : Professeur des Universités  
PU-PH : Professeur des Universités-Praticien Hospitalier  
MCU : Maître de Conférences des Universités  
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier  
HDR : Habilitation à Diriger des Recherches  
AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

## Remerciements

### Un très grand merci

Au Dr Olivier Meurette pour me faire l'honneur de présider ce jury. Vous avez été présent dès mes premières années d'étude et vous avez pu m'offrir un stage au sein de votre équipe afin de découvrir le monde de la recherche. C'était très important pour moi de vous avoir en tant que président afin de vous remercier pour votre présence tout au long de ces années.

Au Dr Anne Doléans-Jordheim pour avoir accepté de participer à ce jury même si le sujet ne vous est pas familier. C'était une façon pour moi de vous remercier pour votre accompagnement au sein de la filière recherche de l'ISPB. Vous avez su me guider et me permettre de trouver ma voie et je vous en remercie.

Au Dr Hubert Lincet d'avoir pris le rôle de tuteur pédagogique pour ce travail sans hésiter.

A ma directrice de thèse, Dr Marie Castets, pour ton accueil au sein de ton équipe de recherche et de m'avoir permis d'avoir mon propre projet. Je n'oublierai jamais notre premier appel lorsque tu m'as annoncé ne plus avoir de place mais que finalement tu apprécies les gens qui « s'engagent dans l'associatif », me permettant de trouver une petite place pour ces 4 mois. Mes sincères remerciements pour cette thèse et ce sujet qui m'a suivi tout au long de mon stage et m'a permis de m'épanouir au sein de ton équipe !

Au Dr Maud Hamadou, mon encadrante, ma big boss. Cette thèse est aussi la tienne. Ces 4 mois ont été incroyables à tes côtés. Tu m'as guidée dans mes premiers pas au sein de ce monde de la recherche fondamentale. Tu as été un véritable modèle et je t'en remercie infiniment. Je retiendrai toutes nos heures de discussion au vidéo microscope mais aussi nos déceptions lorsqu'on se rend compte que nos cellules « sont toutes pareilles ». J'espère avoir été une bonne stagiaire, à l'écoute de tous tes merveilleux conseils, en tout cas tu as été une encadrante exceptionnelle. Merci pour tout et n'oublie jamais que tu es à ta place et totalement légitime, je n'en doute pas un seul instant !

## **Un immense merci**

A mes parents

J'aimerais remercier mes parents sans qui tout ça n'existerait pas. Merci pour votre soutien sans faille depuis ces nombreuses années ! Vous avez été là lors de mes premiers échecs musicaux et grâce à cette fameuse phrase « reculer pour mieux sauter » j'ai réussi à rebondir. Me voilà enfin entrée au conservatoire d'Annecy au lycée et puis finalement je décide de poursuivre mes études en santé avec ce fameux concours terrible qu'est la « PACES ». Année de doutes mais que j'ai réussi haut la main grâce à votre soutien. Alors ces quelques mots ne suffisent pas pour vous dire à quel point je suis reconnaissante de la vie que vous m'avez offerte, je vous aime <3

A ma sœur

Ma PETITE sœur Perrine, ma partenaire, ma meilleure amie, ma confidente. Merci pour tout ! Tu es une sœur incroyable avec qui je peux tout partager. Que ce soit en France ou à l'étranger on arrive toujours à ne pas être loin l'une de l'autre. Je suis très fière de toi et de la jeune femme que tu es devenue. Ecrire quelques mots pour toi dans cette thèse me permet de te remercier pour le soutien que tu m'as apporté, je n'oublierai jamais tes allers retours dans mon petit studio lors de la PACES pour m'aider au quotidien.

A mes grands parents

Une chère et tendre pensée pour ma grand-mère qui m'a offert cette passion pour la musique et les sciences. Apparemment il semblerait que je sois ta miniature ! J'espère te rendre fière, c'est ce qui compte le plus pour moi. Jamais je n'oublierai toutes nos heures de discussion au téléphone. Et je n'oublie pas mon petit papy qui nous a quittés il y a peu de temps mais qui m'apporte toujours un grand soutien ! Un immense merci à tous les deux et à tous nos souvenirs partagés ensemble qui resteront gravés <3

A ma meilleure amie Oriane

Merci d'être toujours là, tout simplement. Tu es d'un soutien sans faille même à des centaines de kilomètres. J'aime tous nos vocaux sans fin à raconter nos vies mais surtout partager nos doutes. Cette thèse t'est aussi dédiée pour te remercier d'être entrée dans ma vie et de ne plus en sortir.

A mon amour

Pour ton soutien inconditionnel. Tu étais au cœur de l'écriture de cette thèse. J'ai une pensée pour toutes nos discussions nocturnes post-travail, et surtout pour ton réconfort tellement important lors de mes terribles doutes (beaucoup trop de doutes). Si j'en suis là, c'est grâce à toi. Je t'aime !

### **A mes ami(e)s**

Apolline, comment ne pas t'oublier. A notre rencontre dans une classe de maternelle, puis à tous ces souvenirs depuis 20 ans. Ta nouvelle ville en Angleterre me rend tellement fière de toi et de tout ce chemin parcouru. T'offrir ces quelques mots dans ma thèse était important pour moi afin de te remercier d'être cette personne merveilleuse, avec ce pouvoir de me faire rire et pleurer en même temps <3

Léa, mon rayon de soleil. On s'est rencontrées dans cette terrible année de PACES et tu as été la personne la plus positive que je connaisse. Je garde en tête tous ces souvenirs et surtout notre année en tant que « prof » au tutorat (les meilleures profs je dirais même). Tu me comble toujours de bonheur et je te souhaite plein de réussite dans ta future vie de médecin.

Marine, rencontrée dans un couloir par hasard, c'est ce qu'on appelle le « coup de foudre » amical. Grace à toi ces années d'étude ont été incroyables. Je n'oublierai jamais la semaine ski, toutes les soirées pharma, notre expérience associative mais surtout ta disponibilité sans faille au moindre problème. Tu as été mon pilier afin de surmonter ces années parfois difficiles. Notre amitié ne fait que grandir et j'ai déjà hâte de découvrir ce que l'avenir nous réserve.

Lisa, Inès, Syrine, notre quatuor insolite rempli de diversité. Grace à vous ces années d'étude ont été géniales. Je retiendrai surtout ce soutien mutuel que nous nous sommes apportés surtout pendant les différents confinements... Ces quelques lignes ne suffisent pas pour raconter tous nos souvenirs mais je vous souhaite plein de réussites professionnelles mais aussi personnelles.

Ket, Aishat, Coco, les meilleures colocs ! Mes années lycée ont été exceptionnelles à vos côtés. Promis ce qui se passe à l'internat reste à l'internat ! Mais j'ai des milliers de souvenirs en tête qui me suivent encore aujourd'hui et me font toujours rire. Vous m'avez aussi beaucoup soutenu et permis de prendre confiance en moi. J'espère avoir de vos nouvelles encore

longtemps ! Coralie nos carrières professionnelles se suivent et j'ai hâte de croiser ta route dans un labo (ou NOTRE labo si on peut rêver un peu).

J'aimerais aussi avoir une pensée pour Sophie, Killian, Solène, Mouna, Adeline, ... et toutes ces personnes que j'ai pu rencontrer. J'en oublie certainement et je m'en excuse mais sachez que vous avez tous une place spéciale pour moi et je vous remercie infiniment pour tout ce que vous avez pu m'apporter.

### **Une énorme pensée**

Pour l'AMPC – Association des médecins et pharmaciens du cœur qui intervient auprès des enfants hospitalisés à l'Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique du Centre Léon Bérard.

Comment ne pas penser à cette merveilleuse association qui a rythmé toutes ces années d'études. De la découverte en 2<sup>ème</sup> année à la vice-présidence en 3<sup>ème</sup> puis la présidence en 4<sup>ème</sup> année, cette association a été un véritable coup de cœur et, comme vous pouvez l'imaginer, est au cœur de ce sujet de thèse. J'ai une énorme pensée pour tous ces enfants et adolescents que j'ai pu rencontrer, certains nous ont malheureusement quittés mais ils restent toujours dans ma pensée et deviennent de véritable moteur, et un exemple de courage immense. Mais aussi pour toutes ces personnes qui font vivre l'association et plus spécialement à ces 14 personnes qui ont constitué mon bureau lors de ma présidence. Cette année n'a pas été facile mais nous avons accompli tellement de choses. Le sourire sur le visage de ces enfants si courageux a été notre moteur et nous pouvons être fiers de nous. Découvrir le monde associatif m'a fait grandir. Cette association restera dans mon cœur à tout jamais.

### **Et enfin,**

Un très grand MERCI à toute les C3 team pour votre accueil, vos conseils, votre bienveillance. Vous êtes tous aussi incroyables les uns que les autres ! Vous m'avez montré ce qu'est le «travail d'équipe» et je n'avais envie que d'une chose : rester ! J'espère pouvoir de nouveau partager des moments studieux et festifs à vos côtés. Une pensée particulière pour Justine et Charlotte, mes deux acolytes, sans qui ce stage aurait peut-être été plus studieux mais bien moins fun !

## *Serment des Pharmaciens Au moment d'être reçu Docteur en Pharmacie,*



*En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :*

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances*
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement*
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité*
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession*
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens*
- De coopérer avec les autres professionnels de santé.*

*Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.*

*Date :*

*Signatures de l'étudiant et du Président du jury*

# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations, sigles et acronymes</b> .....	<b>14</b>
<b>Liste des Tableaux</b> .....	<b>16</b>
<b>Liste des Figures</b> .....	<b>16</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>18</b>
<b>Partie 1 : Rappels bibliographiques</b> .....	<b>20</b>
1. Le DIPG, une tumeur gliale pédiatrique .....	21
1.1 Cancers pédiatriques du système nerveux central. ....	21
1.1.1. Gliomes de bas grade.....	26
1.1.2. Gliomes de haut grade.....	27
1.2 Physiopathologie, Epidémiologie, Symptômes et Traitements des DIPG .....	29
2. Altérations oncogéniques impliquées dans les DIPG .....	31
2.1 Caractéristiques génétiques des DIPG .....	31
2.2 Conséquences épigénétiques des mutations H3 des DIPG .....	36
2.3 Métabolisme et DIPG : un levier de dépendance à explorer .....	37
2.3.1. Altération du métabolisme dans les cancers : état des connaissances... ..	37
2.3.2. Altération du métabolisme dans les DIPG : état des connaissances .....	43
2.3.3 Hétérogénéité métabolique des DIPG .....	45
2.3.4 Potentiel du ciblage des voies métaboliques dans les DIPG .....	45
3. Synergie oncogénique entre BMP et K27M dans les DIPG .....	46
3.1 Description de la voie des BMP .....	46
3.2 Implication de la voie dans le développement et l'homéostasie tissulaire.....	48
3.3 Implication de la voie BMP dans les cancers .....	50
3.3.1. Rôle des BMP dans la régulation de la quiescence et de la différenciation des cellules tumorales.....	50
3.4 BMP et DIPG : mise en évidence d'une synergie oncogénique dans les DIPG .	59
<b>Partie 2 : Projet</b> .....	<b>61</b>
1. Introduction .....	62
2. Cibler le métabolisme OXPHOS dans les DIPG : un potentiel thérapeutique ? .....	63
2.1 Matériels et Méthodes.....	63

2.1.1	Culture cellulaire .....	63
2.1.2	Conditions expérimentales .....	63
2.1.3	Test de viabilité cellulaire - Celltiter fluor™ .....	64
2.1.4	Test de viabilité cellulaire à la Calcéine .....	65
2.1.5	Test de cytotoxicité – CellTox Green .....	66
2.2	Résultats .....	68
2.3	Discussion .....	75
3.	Impact de l’activation de la voie des BMP sur l’état métabolique des DIPG .....	76
3.1	Matériels et Méthodes.....	76
3.1.1.	Culture cellulaire.....	76
3.1.2	Seahorse ou test de stress mitochondrial .....	76
3.1.3	Test de viabilité cellulaire au CellTiter-Fluor™ .....	78
3.1.4	Objectif .....	78
3.2	Quel est l’impact de la voie BMP sur le métabolisme OXPHOS ?.....	80
3.3	Quel est l’impact de la voie BMP sur le ciblage thérapeutique de la chaîne respiratoire? .....	82
4.	Impact de la mutation K27M et des BMP sur le remodelage du cytosquelette d’actine .....	86
4.1	Matériels et Méthodes.....	86
4.1.1	Culture cellulaire .....	86
4.1.2	Analyse du remodelage du cytosquelette par marquage à la phalloïdine .....	86
4.1.3	Conditions expérimentales .....	88
4.2	Résultats .....	88
4.3	Discussion .....	90
	<b>Conclusions générales .....</b>	<b>91</b>
	<b>Bibliographie .....</b>	<b>93</b>

## Liste des abréviations, sigles et acronymes

**AC** : Précurseurs astrocytaires

**Actine G** : Actine globulaire

**Actine F** : Actine filamenteuse

**ACVR1** : Récepteur de type 1 de l'Activine

A

**ADN** : Acide DéoxyriboNucléique

**ADP** : Adénosine di-phosphate

**ARN** : Acide RiboNucléique

**ATP** : Adénosine tri-phosphate

**ATPRX** : *Alpha-thalassemia/mental retardation X-linked*

**BHE** : Barrière hémato-encéphalique

**BMP** : Protéine morphogénétique osseuse

**BMPR-I** : Récepteurs BMP de type I

**BMPR-II** : Récepteurs BMP de type II

**CS** : Cellules souches

**CSC** : Cellules souches cancéreuses

**CSN** : Cellules souches neurales

**DHODH** : Dihydroorotate déshydrogénase

**DIPG** : *Diffuse Intrinsic Pontine Glioma*

**DMG** : Gliome diffus de la ligne médiane, H3K27-mutés

**ECAR** : Taux d'acidification extracellulaire

**EGF** : Facteur de croissance épidermique

**EMT** : Transition épithélio-mésenchymateuse

**ERK** : *Extracellular signal-regulated kinases*

**EZH2** : *Enhancer of zeste homolog 2*

**FCCP** : Cyanure de carbonyle-4 (trifluorométhoxy) phénylhydrazone

**FGF** : Facteur de croissance des fibroblastes

**GTP** : Guanosine triposphate

**H3.1** : Variant 1 de l'histone 3

**H3.2** : Variant 2 de l'histone 3

**H3 G34R/V** : Remplacement du résidu Glycine 34 en Arginine ou en Valine

**HGF** : Facteur de croissance des hépatocytes

**HGG** : Gliomes de haut grade

**HIF** : Facteur inductible par l'hypoxie

**IRM** : Imagerie par résonance magnétique

**K27M** : Remplacement de la lysine 27 par la méthionine

**LGG** : Gliomes de bas grade

**LIMK1** : LIM Kinase 1

**MAPK** : *Mitogen activated protein kinases*

**MEC** : Matrice extracellulaire

**MTA** : Agent chimiothérapeutique multi-cible anti-folate

**NADH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

**OCR** : Taux de consommation d'oxygène

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**OPC** : Précurseurs d'oligodendrocytes

**OXPHOS** : Phosphorylation oxydative

**PDGFRA** : *Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha*

**pGBM** : Glioblastomes pédiatriques

**PRC2** : Complexe multiprotéique répressif polycomb 2

**RT** : Température ambiante

**scRNA-seq** : Séquençage en cellules uniques

**SeaH1** : Expérience Seahorse numéro 1

**SeaH2** : Expérience Seahorse numéro 2

**SGZ** : Zone sous-granulaire

**SMAD** : *Small mothers against decapentaplegic homolog*

**SNC** : Système nerveux central

**SVF** : Sérum de veau fœtal

**SVZ** : Zone sous-ventriculaire

**TCA** : Acide tricarboxylique

**TEP** : Tomographie à Emission de Positons

**TGF-beta** : *Transforming Growth Factor-beta*

**TGT** : Facteur de croissance transformant

**WT** : *Wild Type*

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1 – Description des lignées cellulaires utilisées.....</b>	<b>75</b>
---	-----------

## Liste des Figures

<b>Figure 1 - Classification OMS 2016 versus classification OMS 2021. (1).....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 2 - Diagramme représentant la réponse à la radiothérapie en fonction du statut de mutation H3.1 et H3.3. (18).....</b>	<b>31</b>
<b>Figure 3 - Estimations de Kaplan-Meier de la survie en fonction des mutations H3.1- ou H3.3-K27M. (18).....</b>	<b>32</b>
<b>Figure 4 - Profil mutationnel des DIPG (David Castel, 2021).....</b>	<b>33</b>
<b>Figure 5 - Aperçu du paysage génétique des DIPG (25).....</b>	<b>33</b>
<b>Figure 6 - The Hallmarks of cancer (34).....</b>	<b>37</b>
<b>Figure 7 - Métabolisme énergétique cellulaire. (35).....</b>	<b>38</b>
<b>Figure 8 - Résumé des voies métaboliques altérées dans les DIPG (41).....</b>	<b>43</b>
<b>Figure 9 - Voie de signalisation des BMP (Huchede Paul, 2023).....</b>	<b>47</b>
<b>Figure 10 - Schéma illustrant les différentes étapes de la locomotion cellulaire.(54).....</b>	<b>51</b>
<b>Figure 11 - Schéma de l'organisation et de l'orientation des fibres d'actine dans le cytoplasme d'une cellule (58).....</b>	<b>53</b>
<b>Figure 12 - Le traitement par BMP4 entraîne une augmentation de l'activation de la Rho GTPase. (67).....</b>	<b>57</b>
<b>Figure 13 - Plan de plaque représentant les différents traitements appliqués 24h ou 48h après ensemencement des lignées Res259 H3.3WT et H3.3K27M dans deux milieux différents.....</b>	<b>63</b>
<b>Figure 14 - Schéma du test de viabilité cellulaire CellTiter-Fluor™ (74).....</b>	<b>64</b>
<b>Figure 15 - Le colorant vert CellTox™ se lie à l'ADN des cellules dont l'intégrité membranaire est altérée. (75).....</b>	<b>65</b>
<b>Figure 16 - Schéma des méthodes d'administration du colorant vert CellTox™ (75).....</b>	<b>66</b>
<b>Figure 17 - Image de microscopie représentant la confluence et la forme des cellules Res259-H3.3WT et Res259-H3.3K27M en fonction du milieu.....</b>	<b>67</b>
<b>Figure 18 – Résultats du test de viabilité cellulaire Celltiter Fluor™ après 48h de traitement sur la lignée Res259-H3.3WT cultivée en deux dimensions.....</b>	<b>69</b>
<b>Figure 19 – Résultats du test de viabilité cellulaire Celltiter Fluor™ après 48h de traitement sur la lignée Res259-H3.3K27M cultivée en deux dimensions.....</b>	<b>69</b>
<b>Figure 20 – Résultats du test de viabilité cellulaire à la calcéine. La fluorescence verte est un marqueur des cellules vivantes.....</b>	<b>70</b>
<b>Figure 21 – Résultats du Green Cytotoxicity Assay™ après 72h de traitement sur la lignée Res259-H3.3WT cultivée en trois dimensions.....</b>	<b>72</b>
<b>Figure 22 – Résultats du Green Cytotoxicity Assay™ après 72h de traitement sur la lignée Res259-H3.3K27M cultivée en trois dimensions.....</b>	<b>72</b>
<b>Figure 23 - Photos des sphères placées dans un système d'imagerie Cellcyte X™, 96h après le traitement.....</b>	<b>73</b>
<b>Figure 24 - Cibles de chacun des composés utilisés dans la chaîne de transport d'électrons.(77).....</b>	<b>76</b>

<b>Figure 25</b> - Illustration des niveaux d'OCR (axe y) par rapport au temps (axe x). L'injection des trois composés oligomycine, FCCP et antimycine A/roténone délimite quatre intervalles de temps à l'intérieur desquels l'OCR est à peu près constant. (77).....	<b>77</b>
<b>Figure 26</b> - Plan de plaque représentant les différents traitements appliqués 24h après incubation des lignées Res259 H3.3WT et H3.3K27M.....	<b>79</b>
<b>Figure 27</b> – Résultats des tests de stress mitochondrial (SeaH1 et SeaH2).....	<b>80</b>
<b>Figure 28</b> – Résultats du test de viabilité cellulaire Celltiter Fluor™ après 48h de traitement sur la lignée Res259-H3.3WT cultivée en deux dimensions dans un milieu DMEM seul ou DMEM+BMP7.....	<b>82</b>
<b>Figure 29</b> – Résultats du test de viabilité cellulaire Celltiter Fluor™ après 48h de traitement sur la lignée Res259-H3.3K27M cultivée en deux dimensions dans un milieu DMEM seul ou DMEM+BMP7.....	<b>82</b>
<b>Figure 30</b> - Représentation UMAP de données scRNA-seq d'un modèle de DIPG.....	<b>84</b>
<b>Figure 31</b> - Image de microscopie représentant la confluence et la forme des cellules Res259-H3.3K27M.....	<b>86</b>
<b>Figure 32</b> - Schéma représentant les différentes étapes du marquage à la phalloïdine.....	<b>86</b>
<b>Figure 33</b> - Images de microscopie à fluorescence des cellules Res259, coloration DAPI/phalloïdine hypoxie.....	<b>88</b>

## Introduction

Les cancers pédiatriques touchent chaque année, en France, 2500 enfants de moins de 15 ans et 3500 jeunes entre 15 et 19 ans. Leur taux de guérison est de l'ordre de 60-70% à 10 ans, et 2/3 des survivants présentent des séquelles de la maladie et des traitements. Il y a donc deux enjeux majeurs en cancérologie pédiatrique : soigner plus et mieux. Si les progrès thérapeutiques dans la prise en charge des cancers pédiatriques ont été importants entre les années 70 et 90, avec l'avènement notamment des premières chimiothérapies, les taux de survie ne s'améliorent plus depuis une vingtaine d'années malgré des essais cliniques internationaux. Ceci s'explique notamment par une stratégie d'essais cliniques longtemps basée sur la transposition des données adultes chez les enfants et les jeunes. Or, on sait aujourd'hui que les cancers pédiatriques diffèrent de ceux de l'adulte, notamment de part trois critères majeurs : 1) des types de cancers différents, avec une prédominance de leucémies, de sarcomes et de tumeurs cérébrales par rapport aux carcinomes observés chez l'adulte ; 2) une faible corrélation au style de vie, contrairement à ceux de l'adulte, résultant souvent d'habitudes individuelles (e.g. tabac, alcool, UV,...) ; et 3) une biologie différente, avec une plus faible charge mutationnelle et une forte composante épigénétique.

Les gliomes diffus de la ligne médiane, H3K27-mutés (DMG) désignent des tumeurs agressives qui se développent tout le long de la ligne médiane dans le cerveau. Les DMG représentent la principale cause de décès liés aux tumeurs cérébrales dans la population pédiatrique. Sa forme la plus sévère, le DIPG (Diffuse Intrinsic Pontine Glioma) se développe dans le tronc cérébral, dans une zone appelée pont. Ce cancer se déclare principalement chez les enfants âgés de 5 à 10 ans, et la survie médiane au diagnostic est de neuf mois. Le pont est responsable du contrôle des fonctions vitales, notamment de la respiration, de la fréquence cardiaque, de la tension artérielle ou encore du contrôle de la vessie. Les nerfs qui contrôlent la vision, l'audition, l'équilibre et le mouvement traversent également cette région du cerveau. Il s'agit d'une tumeur très difficile à traiter, chirurgicalement, du fait de son caractère diffus dans une zone anatomiquement importante, mais également sur le plan moléculaire, le maintien d'une barrière hémato-encéphalique intacte limitant la délivrance locale des thérapies. Les avancées liées aux séquençages des tumeurs ont néanmoins permis de renforcer les connaissances

concernant l'origine développementale, l'hétérogénéité et les caractéristiques propres des gliomes pédiatriques, identifiant ainsi des cibles thérapeutiques plus spécifiques, en cours d'évaluation clinique. Les DMG, et les DIPG en particulier, restent cependant à l'heure actuelle un défi en matière de recherche fondamentale et nombre de ses spécificités restent à décrire et interpréter dans une perspective thérapeutique.

L'objectif de cette thèse est, premièrement, de faire un état des lieux des travaux de caractérisation des DMG réalisés au cours des dernières années, notamment grâce à l'essor du séquençage. Nous définirons les caractéristiques des gliomes pédiatriques avant de nous focaliser sur les DIPG, en incluant la description des aspects épidémiologique, symptomatique, clinique mais aussi biologique, ce qui nous amènera à discuter de leur étiologie moléculaire. Puis nous nous intéresserons plus particulièrement à la découverte récente de l'implication de la voie des BMP (bone morphogenetic proteins) dans l'étiologie moléculaire de ces cancers. Enfin, dans une deuxième partie, je présenterai mes travaux de recherche portant sur l'existence d'une synergie oncogénique entre la mutation K27M et les BMP dans les DIPG, ainsi que de leur impact sur la migration et le métabolisme.

# **Partie 1 : Rappels bibliographiques**

## 1. Le DIPG, une tumeur gliale pédiatrique

### 1.1 Cancers pédiatriques du système nerveux central.

Les tumeurs gliales font partie de la grande famille des tumeurs du système nerveux central (SNC). Ce sont les tumeurs solides les plus fréquentes chez les enfants, avec environ 5,4 à 5,6 diagnostics pour 100 000. Parmi les personnes diagnostiquées, 0,7 pour 100 000 succomberont à leur maladie, faisant des tumeurs du SNC la principale cause de décès liés au cancer chez les enfants.

La première classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) concernant les tumeurs du SNC a été publiée en 1979. La seconde édition date de 1993, soit 14 ans plus tard, suivie en 2000 de la troisième édition nommée « *Pathology and Genetics* ». Jusque-là, seules les analyses histologiques venaient étayer les connaissances anatomiques des différents types de cancers, associés à quelques tests tissulaires auxiliaires. La troisième version (2007), forte des découvertes génomiques des années 2000, intègre pour la première fois la description des gènes impliqués, ouvrant la voie à l'oncologie moléculaire qui s'impose progressivement (1).

Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis d'actualiser la classification de nombreux cancers. Le séquençage de l'ADN à haut débit, des ARN totaux (« RNAseq ») et plus récemment le méthylome ont permis de changer la façon de prendre en charge les tumeurs. Ainsi, l'incorporation d'altérations moléculaires dans les critères de diagnostic ont permis la mise en place de la quatrième édition de la classification des tumeurs du SNC de l'OMS en 2016. Cette dernière incorpore des caractéristiques moléculaires avec un classement histologique, révolutionnant la façon dont les oncologues conceptualisent les tumeurs primitives du cerveau et de la moelle épinière en fournissant de nouvelles informations sur leur pronostic et leur prise en charge (2).

Dernière en date, la cinquième édition de la classification OMS des tumeurs du SNC, publiée en 2021, est la sixième version de la norme internationale de classification des tumeurs du cerveau et de la moelle épinière. Cette classification a été mise à jour pour mieux refléter les avancées dans la compréhension des tumeurs du SNC et pour aider les professionnels de santé à établir des diagnostics plus précis et à fournir des traitements appropriés, à partir des données relatives à leur étiologie moléculaire. Elle intègre davantage les altérations moléculaires pour la catégorisation des tumeurs du SNC, mettant

à jour la compréhension actuelle de la physiopathologie de bon nombre de ces entités pathologiques. Certaines entités sont supprimées et de nouveaux types et sous-types de tumeurs sont introduits, certaines basées sur de nouvelles technologies de diagnostic telles que le profilage du méthylome d'ADN, notamment pour les gliomes diffus (3). De plus, la place des anomalies génétiques et épigénétiques dans le diagnostic intégré des tumeurs est plus importante par rapport à l'édition de 2016 (4). Par ailleurs, la nomenclature a aussi été simplifiée et harmonisée avec d'autres pathologies (*Figure 1*).

## OMS 2016

Tumeurs astocytaires et oligodendrogiales diffuses
<b>Astrocytome diffus, IDH-muté</b>
Astrocytome diffus, IDH-non-muté
Astrocytome diffus, NOS
Astrocytome anaplasique, IDH-muté
Astrocytome anaplasique, IDH-non-muté
Astrocytome anaplasique, NOS
<b>Glioblastome, IDH-non-muté</b>
<b>Gliome diffus de la ligne médiane, H3 K27M-muté</b>
<b>Oligodendrogliome, IDH-muté et 1p/19q-codéléte</b>
Oligodendrogliome, NOS
<b>Oligodendrogliome anaplasique, IDH-muté et 1p/19q-codéléte</b>
Oligodendrogliome anaplasique, NOS
Oligoastrocytome, NOS
Oligoastrocytome anaplasique, NOS
<b>Autres tumeurs astrocytaires</b>
<b>Astrocytome pilocytique</b>
Astrocytome pilomyxoïde
<b>Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaire</b>
<b>Xantho-astrocytome pléomorphe</b>
Xantho-astrocytome pléomorphe anaplasique
<b>Autres gliomes</b>
<b>Gliome choroïde du 3<sup>ème</sup> ventricule</b>
<b>Gliome angiocentrique</b>
<b>Astroblastome</b>
<b>Tumeurs neuronales et glioneurales</b>
<b>Tumeur neuro-épithéliale dysembryoplasique</b>
<b>Gangliocytome</b>
<b>Gangliogliome</b>
Gangliogliome anaplasique
<b>Gangliocytome dysplasique du cervelet (Maladie de Lhermitte-Duclos)</b>
<b>Tumeur glioneuronale papillaire</b>
<b>Tumeur glioneuronale à rosettes (RGNT)</b>
<b>Tumeur glioneuronale leptoméningée diffuse (DLGNT)</b>
<b>Neurocytome central</b>
<b>Neurocytome extra-ventriculaire</b>
<b>Liponeurocytome du cervelet</b>
Parangliome
<b>Tumeurs épendymaires</b>
<b>Subépendymome</b>
<b>Ependymome myxopapillaire</b>
Ependymome
Ependymome papillaire
Ependymome à cellules claires
Ependymome tancytique
Ependymome avec fusion RELA
Ependymome anaplasique
<b>Tumeurs des plexus choroïdes</b>
<b>Papillome des plexus choroïdes</b>
<b>Papillome atypique des plexus choroïdes</b>
<b>Carcinome des plexus choroïdes</b>
<b>Tumeurs embryonnaires</b>
<b>Médulloblastome, WNT-activé</b>
<b>Médulloblastome, SHH-activé et TP53-non-muté</b>
<b>Médulloblastome, SHH-activé et TP53-muté</b>
<b>Médulloblastome, non-WNT/non-SHH</b>
Médulloblastome, groupe 3
Médulloblastome, groupe 4
Médulloblastome, classique
Médulloblastome, desmoplasique/nodulaire
Médulloblastome avec nodularité extensive
Médulloblastome, anaplasique / à cellules géantes
Médulloblastome, NOS
<b>Tumeur embryonnaire avec rosettes multistratifiées C19MC-altered</b>
<b>Tumeur embryonnaire avec rosettes multistratifiées, NOS</b>
Médulloépithéliome
<b>Neuroblastome du SNC</b>
Ganglioneuroblastome du SNC
<b>Tumeur embryonnaire du SNC, NOS</b>
<b>Tumeur rhabdoïde térotoïde atypique (ATRT)</b>
Tumeur embryonnaire du SNC avec aspects rhabdoïdes
<b>Tumeurs de la région pinéale</b>
<b>Pinéocytome</b>
<b>Tumeur du parenchyme pinéal de différenciation intermédiaire</b>
<b>Pinéoblastome</b>
Tumeur papillaire de la région pinéale

## OMS 2021

<b>Gliomes, tumeurs glioneurales et neuronales</b>
• <b>Gliomes diffus de l'adulte</b>
Astrocytome, IDH-muté
Oligodendrogliome, IDH-muté et 1p/19q-codéléte
<b>Glioblastome, IDH-non-muté</b>
• <b>Gliomes diffus pédiatriques de bas grade</b>
<b>Astrocytome diffus, avec altération de MYB ou MYBL1</b>
<b>Gliome angiocentrique</b>
<b>Tumeur neuro-épithéliale polymorphe de bas grade du sujet jeune (PLNTY)</b>
<b>Gliome diffus de bas grade avec altération de la voie des MAP Kinases</b>
• <b>Gliomes diffus pédiatriques de haut grade</b>
<b>Gliome diffus de la ligne médiane, H3 K27-altéré</b>
<b>Gliome diffus hémisphérique, H3 G34-muté</b>
<b>Gliome diffus pédiatrique de haut grade H3- et IDH-non-muté</b>
<b>Gliome hémisphérique infantile</b>
• <b>Gliomes astrocytaires circonscrits</b>
Astrocytome pilocytique
<b>Astrocytome anaplasique avec aspects piloides</b>
Xantho-astrocytome pléomorphe
Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaire
Gliome choroïde
<b>Astroblastome, avec altération de MN1</b>
• <b>Tumeurs glioneurales et neuronales</b>
Gangliogliome
Gangliocytome
Gangliogliome desmoplasique infantile/astrocytome desmoplasique infantile (DIG/DIA)
<b>Tumeur neuro-épithéliale dysembryoplasique</b>
<b>Tumeur glioneuronale avec des aspects oligo-like et des clusters de noyaux (DGONC)</b>
Tumeur glioneuronale papillaire
Tumeur glioneuronale à rosettes (RGNT)
Tumeur glioneuronale myxoïde
Tumeur glioneuronale leptoméningée diffuse (DLGNT)
<b>Tumeur neuronale multinodulaire et vacuolisée (MVNT)</b>
Gangliocytome dysplasique du cervelet (Maladie de Lhermitte-Duclos)
Neurocytome central
Neurocytome extra-ventriculaire
Liponeurocytome du cervelet
• <b>Tumeurs épendymaires</b>
Ependymome <b>supra-tentoriel</b>
Ependymoma supra-tentoriel, <b>avec fusion ZFTA</b>
Ependymoma supra-tentoriel, <b>avec fusion YAP1</b>
Ependymome de la <b>fosse postérieure</b>
Ependymome de la fosse postérieure <b>groupe A (PFA)</b>
Ependymome de la fosse postérieure <b>groupe B (PFB)</b>
Ependymome spinal
Ependymoma spinal <b>avec amplification de MYCN</b>
Ependymome myxopapillaire
Subépendymome
<b>Tumeurs des plexus choroïdes</b>
Papillome des plexus choroïdes
Papillome atypique des plexus choroïdes
Carcinome des plexus choroïdes
<b>Tumeurs embryonnaires</b>
• <b>Médulloblastomes</b>
Médulloblastome, WNT-activé
Médulloblastome, SHH-activé et TP53-non-muté
Médulloblastome, SHH-activé et TP53-muté
Médulloblastome, non-WNT/non-SHH
Médulloblastome défini histologiquement
• <b>Autres tumeurs embryonnaires du SNC</b>
Tumeur rhabdoïde térotoïde atypique (ATRT)
Tumeur neuro-épithéliale cribiforme (CRINET)
Tumeur embryonnaire avec rosettes multistratifiées (ETMR)
Neuroblastome du SNC <b>FOXR2-activé</b>
<b>Tumeur embryonnaire du SNC avec BCOR ITD</b>
Tumeur embryonnaire du SNC
<b>Tumeurs du parenchyme pinéal</b>
Pinéocytome
Tumeur du parenchyme pinéal de différenciation intermédiaire
Pinéoblastome
Tumeur papillaire de la région pinéale
<b>Tumeur myxoïde desmoplasique de la région pinéale SMARCB1-muté</b>

**Figure 1 - Classification OMS 2016 versus classification OMS 2021 : les changements. Les termes conservés sont en noir, ceux abandonnés sont en gris et les nouveaux sont en rouge. (1)**

Cette nouvelle classification des tumeurs du SNC a permis une amélioration de la prise en charge des patients. En effet, les évolutions des classifications de l'OMS sont prises en compte dans la conception, la mise en œuvre et l'interprétation des essais cliniques, permettant ainsi des critères d'inclusion plus précis mais également dans les choix thérapeutiques, permettant une prise en charge plus adaptée aux besoins de chaque patient.

En outre, bien que les précédentes versions distinguaient déjà les tumeurs embryonnaires des autres tumeurs, celle de 2021 est la première à identifier clairement trois groupes de gliomes diffus selon l'âge des patients, deux « pédiatriques » et un « de l'adulte ». Cette réorganisation illustre bien les changements de paradigmes en oncopédiatrie, notamment pour les gliomes, où l'étude des altérations génétiques communément retrouvées a permis cette distinction. Les gliomes de l'enfant sont donc bien différents de ceux retrouvés chez les adultes, notamment au niveau moléculaire, et nécessitent de ce fait une prise en charge élaborée par le prisme de leurs spécificités.

Ces tumeurs cérébrales pédiatriques sont ainsi classées en fonction de leur origine cellulaire, de leur localisation dans le SNC, de leur comportement clinique ou encore de leur sous-type moléculaire, comme décrit ci-après :

#### 1. Classification basée sur l'origine cellulaire :

- Gliomes : Tumeurs dérivées des cellules gliales dont la fonction est d'entourer, de soutenir et d'isoler les cellules nerveuses, ou neurones, du SNC.
- Épendymomes : Tumeurs dérivées des cellules épendymaires qui tapissent les ventricules cérébraux et le canal central de la moelle épinière.
- Médulloblastomes : Tumeurs embryonnaires qui se développent dans le cervelet.
- Neuroblastomes : Tumeurs dérivées des cellules du système nerveux sympathique.

## 2. Classification basée sur la localisation :

- Tumeurs cérébrales : Situées dans différentes régions du cerveau, telles que les hémisphères cérébraux, le cervelet, le tronc cérébral, etc.
- Tumeurs de la moelle épinière.

## 3. Classification basée sur le comportement clinique :

- Tumeurs bénignes : Tumeurs à croissance lente et généralement bien délimitées.
- Tumeurs malignes : Tumeurs à croissance rapide, envahissantes et pouvant se disséminer.

## 4. Classification basée sur le sous-typage moléculaire :

Les gliomes pédiatriques comprennent divers sous-types, chacun caractérisé par des altérations génétiques spécifiques et des caractéristiques moléculaires distinctes. Voici quelques-uns des principaux sous-types de gliomes pédiatriques basés sur le sous-typage moléculaire :

- Gliomes diffus de la ligne médiane (DMG) :

Souvent caractérisés par la mutation H3K27M dans les gènes HIST1H3B ou H3F3A.

Hautement agressifs et généralement associés à un pronostic défavorable.

Touchant les structures médianes du cerveau, comme le thalamus ou le tronc cérébral (DIPG).

- Gliomes astrocytaires pilocytiques :

Souvent associés à des mutations du gène BRAF V600E (5).

Généralement de meilleur pronostic par rapport à d'autres gliomes pédiatriques.

- Gliomes oligodendrocytaires :

Caractérisés par des altérations moléculaires spécifiques touchant les gènes IDH1 (l'enzyme Isocitrate Dehydrogenase 1) et IDH2

- Glioblastomes pédiatriques (pGBM) (6) :

Partagent certaines caractéristiques moléculaires avec les glioblastomes adultes, y compris des mutations dans le gène IDH (7).

Très mauvais pronostic.

Les gliomes pédiatriques sont des tumeurs du SNC pouvant être malignes ou bénignes, historiquement organisés selon leur grade histologique : les gliomes de bas grade et ceux de haut grade. Ces deux groupes s'organisent désormais selon les sous-groupes décrits par la classification de 2021, prenant ainsi en compte le type de cellule tumorale (gliale ou astrocytaire), le caractère invasif (diffus ou circonscrit), la localisation et/ou la présence, ou l'absence, d'altération moléculaire spécifique, en plus du statut histologique.

### 1.1.1. Gliomes de bas grade

La majorité des gliomes pédiatriques se présente comme des lésions bénignes à croissance lente classées en grade I ou II, les gliomes de bas grade (*Low grade glioma*, LGG). Ces gliomes peuvent survenir à différents endroits, dont le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral. La médiane de survie est comprise entre 4,7 et 9,8 ans. Sont caractérisés comme gliomes de bas grade (8):

- Dans la section gliomes astrocytaires circonscrits :
  - *L'astrocytome pilocytique*
  - *L'astrocytome sous-épendymaire à cellules géantes*
  - *Le xantho-astrocytome pléomorphe (de grade II)*
- L'entièreté de la section gliomes diffus pédiatriques de bas-grade : exemple : *l'astrocytome diffus, avec altération de MYB ou MYBL1*

Les symptômes des LGG peuvent varier en fonction de leur taille et de leur emplacement dans le cerveau. On observe dans plus de 90% des cas la survenue de crises d'épilepsies avec ou sans perte de connaissance, pouvant s'accompagner d'un déficit neurologique. Les symptômes fréquents d'un gliome de bas grade comprennent également des céphalées, des vomissements et une diplopie, variables selon l'emplacement de la tumeur. Cependant, aucun symptôme n'est spécifique d'un sous-type de tumeur ou caractéristique d'une particulière agressivité tumorale (9). Les options thérapeutiques pour les LGG dépendent de plusieurs facteurs, tels que la taille et l'emplacement de la tumeur, l'âge et l'état de santé général du patient. Ces options peuvent comprendre la chirurgie, le recours à de la chimiothérapie ou des agents ciblés et, très rarement, la radiothérapie

(10). Le but du traitement est de prolonger la survie globale tout en maintenant une bonne qualité de vie.

Les LGG chez l'enfant diffèrent considérablement de leurs homologues adultes, à la fois par leurs altérations génétiques sous-jacentes, mais également par la rareté avec laquelle ils se transforment en tumeurs de grade supérieur. Néanmoins, les enfants atteints de LGG constituent un défi thérapeutique en raison de l'hétérogénéité de leur comportement clinique. Ceux dont la résection chirurgicale est incomplète souffrent souvent de progressions répétées.

### 1.1.2. Gliomes de haut grade

Les gliomes de haut grade (*High grade glioma*, HGG) regroupent les lésions de grades III et IV, largement plus agressives mais aussi plus rares, représentant 15 à 20% des tumeurs du SNC chez l'enfant. Malgré tous les efforts thérapeutiques, les gliomes de haut grade restent, à ce jour, largement incurables. Les formes les plus agressives sont mortelles en seulement quelques mois. Sont caractérisés comme gliomes de haut grade :

- Dans la section gliomes astrocytaires circonscrits :
  - *L'astrocytome anaplasique avec aspects piloïdes*
  - *Le xantho-astrocytome pléomorphe (de grade III)*
  - *L'astroblastome, avec altération de MN1*
  
- L'entièreté de la section gliomes diffus pédiatriques de haut-grade

Les HGG se caractérisent selon le statut mutationnel et, en second, selon la localisation. On identifie ainsi ceux présents dans les hémisphères ou dans la zone sustentorielle du cerveau appelés gliomes hémisphériques. Ceux présents dans la zone sustentorielle au niveau de la fosse postérieure sont nommés gliomes de la ligne médiane H3K27-altérés (*Diffuse midline glioma*, DMG, H3K27-altered). Les HGG hémisphériques surviennent plus souvent chez les adolescents et les jeunes adultes tandis que les DMG apparaissent plutôt chez les enfants et les nourrissons. Cette différence souligne l'importance de la prise en compte du contexte spatio-temporel dans l'étude de l'origine et des modalités d'apparition de ces pathologies (8).

Ces tumeurs se développent rapidement et ont tendance à infiltrer les tissus voisins, ce qui les rend difficiles à traiter de manière efficace. Les symptômes courants des HGG comprennent (11):

- Des signes d'hypertension intra-crânienne : maux de tête (céphalées), nausées, vomissements, ...
- Un déficit neurologique : hémiparésie ou hémiplégie, asymétrie du visage, dysesthésies, paresthésies, ...
- Des crises d'épilepsie

En fonction de la localisation et de leur statut mutationnel, le traitement des HGG comprend généralement une combinaison de chirurgie, de radiothérapie et de chimiothérapie. Ces dernières années, une thérapie ciblée peut également être associée, le plus souvent dans le cadre d'un essai clinique en cours. La chirurgie vise à retirer autant que possible la tumeur, mais en raison de l'infiltration des cellules cancéreuses, il est souvent difficile de les éliminer complètement. La radiothérapie est utilisée pour détruire les cellules cancéreuses restantes après la chirurgie, tandis que la chimiothérapie peut être administrée avant la chirurgie, pour réduire la taille de la tumeur, ou après, pour éliminer les cellules cancéreuses restantes.

Les HGG ont un pronostic généralement mauvais en raison de leur agressivité et de leur tendance à récidiver. Le traitement vise à prolonger la survie, à soulager les symptômes et à améliorer la qualité de vie. Par conséquent, des efforts de recherches parallèles se sont concentrés sur l'identification de l'étiologie moléculaire, génétique et non-génétique, des HGG pédiatriques afin de définir plus clairement des sous-groupes pronostiques permettant d'adapter la prise en charge tout en identifiant de nouvelles cibles thérapeutiques. C'est notamment le cas des DMG H3K27-altérés, incluant le sous-groupe des DIPG.

## 1.2 Physiopathologie, Epidémiologie, Symptômes et Traitements des DIPG

Dix à 15% des tumeurs du SNC sont localisées au niveau du tronc cérébral, zone anatomique constituée de trois régions distinctes : le mésencéphale, le pont et le bulbe rachidien. La plus fréquente des tumeurs du tronc cérébral est le DIPG ou gliome infiltrant du tronc cérébral, localisé au niveau du pont. En France, près de 50 enfants sont concernés chaque année, autant de filles que de garçons, faisant du DIPG une pathologie rare (12).

L'âge moyen au diagnostic se situe entre cinq et dix ans. Le diagnostic repose sur les données radiologiques par observation d'une masse tumorale diffuse au niveau du tronc cérébral, complété par le tableau clinique du patient. Ces caractéristiques cliniques varient en fonction de l'emplacement de la tumeur et de son schéma de croissance. Il y a généralement une courte latence (deux à trois mois) entre l'apparition des symptômes cliniques et le diagnostic. Les symptômes sont habituellement regroupés en 3 groupes : les signes cérébelleux (ataxie, dysmétrie, dysarthrie), les signes du long tractus (augmentation du tonus, clonus, signe de Babinski, déficit moteur, etc.) et des paralysies isolées ou multiples des nerfs crâniens (unilatérales ou bilatérales) (13).

Le DIPG est le cancer cérébral le plus agressif, et seulement 10 % des patients survivent plus de deux ans (14). Un sous-groupe de patients présente cependant une survie prolongée, liée à l'existence de co-mutations. D'autres facteurs pronostiques cliniques favorables identifiés sont le jeune âge au moment du diagnostic (< 3 ans), un intervalle prolongé entre l'apparition des symptômes et le diagnostic (> 6 mois) ainsi que l'absence de paralysie des nerfs crâniens.

Les options thérapeutiques sont extrêmement limitées. Seule la radiothérapie est à ce jour transitoirement efficace, avec un prolongement de la survie de 3 à 6 mois en moyenne. Celle-ci se déroule en 30-33 séances journalières de 1,8 Gy pour un total de 54 à 59,4 Gy (Cohen et al., 2017, ElKhouly et al., 2019). Cette stratégie reste cependant considérée comme une thérapie palliative et non curative, du fait de la résistance rapidement observée et de la rechute des patients 6 à 9 mois post-traitement. Aucune autre amélioration thérapeutique n'a été obtenue en plus de quatre décennies. De

nombreux essais cliniques évaluant le bénéfice de chimiothérapies et de thérapies ciblées, souvent extrapolées à partir d'études sur les tumeurs de l'adulte, se sont révélés décevants. Ceci résulte à la fois de l'agressivité intrinsèque des DIPG et de leur localisation dans le pont et derrière la barrière hémato-encéphalique (BHE), compliquant la distribution de certains médicaments. Cette barrière physiologique, séparant le SNC de la circulation sanguine, a pour fonction de prévenir des variations de concentration en hormones ou autres neurotransmetteurs mais aussi de protéger le SNC des substances toxiques ainsi que des microorganismes pathogènes. Or, pour qu'un médicament ou un agent thérapeutique ciblé soit efficace, le composé actif doit atteindre sa cible, à des concentrations et sur une durée suffisante pour qu'une cytotoxicité tumorale soit observée. Pour surmonter cet écueil lors du développement de nouvelles molécules actives, plusieurs stratégies alternatives d'administration de médicaments ont été testées, avec notamment : la perturbation osmotique transitoire de la BHE, l'amélioration de la lipophilie des médicaments, l'inhibition des pompes d'efflux membranaires, la chimiothérapie intra-artérielle/intra-thécale, la chimiothérapie nasale, ou la chimiothérapie intra-tumorale directe, mais aucune n'a apporté de réelle efficacité. La localisation des DIPG empêche également l'exérèse de ces tumeurs, compte-tenu du risque d'atteinte de centres vitaux.

Plusieurs traitements sont en cours d'essais cliniques, dont l'ONC201. L'ONC201 a montré des signes d'efficacité chez des patients en rechute de DIPG, notamment chez 30 % des patients atteints d'une tumeur du thalamus. Ses effets pourraient être pléiotropes. Il a initialement été caractérisé pour son rôle dans l'induction de la mort cellulaire, selon plusieurs processus incluant l'induction de l'apoptose par le récepteur TRAIL (15). L'action de l'ONC201 pourrait être plus large, avec des effets possibles sur le microenvironnement et le métabolisme énergétique, comme suggéré par des études récentes (16). L'essai international BIOMEDE 2.0 (NCT05476939) évalue l'efficacité de l'ONC201 versus l'Everolimus (agent antinéoplasique inhibiteur de protéine kinase et immunosuppresseur sélectif) ayant présenté une meilleure tolérance et une survie médiane plus importante lors du premier essai BIOMEDE 1.0 (NCT02233049), en association à la radiothérapie en première ligne de traitement des gliomes malins de la ligne médiane, incluant les DIPG, chez l'enfant, l'adolescent et l'adulte. Le critère de jugement principal d'efficacité est la survie sans progression avec possibilité d'un cross over thérapeutique à la progression. Bien

que les premiers résultats soient encourageants, les gains en termes de survie ne semblent pas permettre de contrer les rechutes chez les patients, renforçant l'urgence de mieux comprendre l'étiologie moléculaire des DMG, et des DIPG en particulier.

## 2. Altérations oncogéniques impliquées dans les DIPG

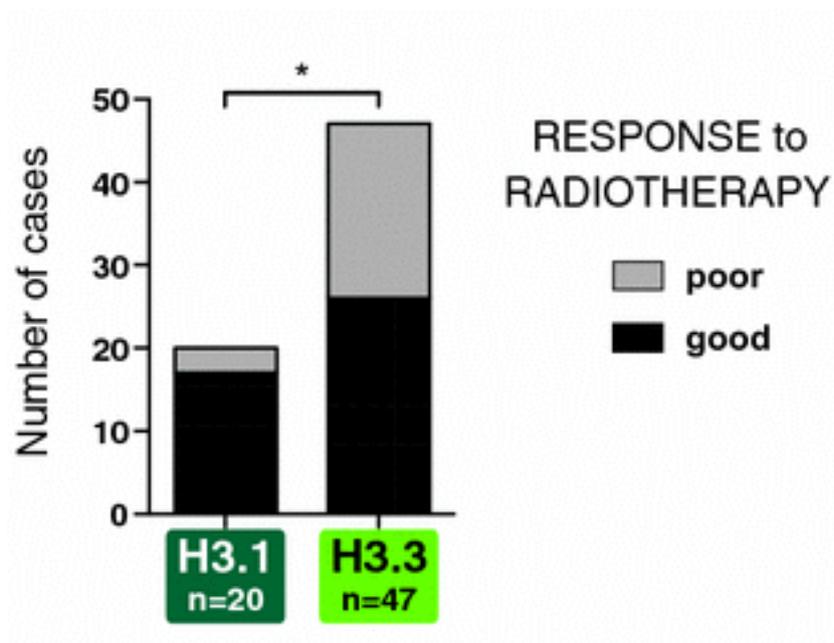
### 2.1 Caractéristiques génétiques des DIPG

Le décryptage du code génétique et la mise au point de techniques de séquençage a permis d'explorer les altérations génétiques potentiellement impliquées dans diverses pathologies. Avec un peu de retard par rapport aux cancers de l'adulte, les cancers pédiatriques ont été étudiés par ce biais ces dernières années. Ces découvertes ont permis d'expliquer les échecs des tentatives de repositionnement pédiatrique des thérapies utilisées chez l'adulte. En effet, des travaux ont clairement démontré la différence de charge mutationnelle entre tumeurs pédiatriques et adultes, plus élevées pour ces dernières, ainsi que la présence d'altérations génétiques majeures différentes, notamment ciblables en clinique. Des mutations spécifiques ont également été mises en évidence dans les formes pédiatriques. Ces analyses ont permis de mieux comprendre les tumeurs cérébrales pédiatriques, et d'améliorer leur classification (17).

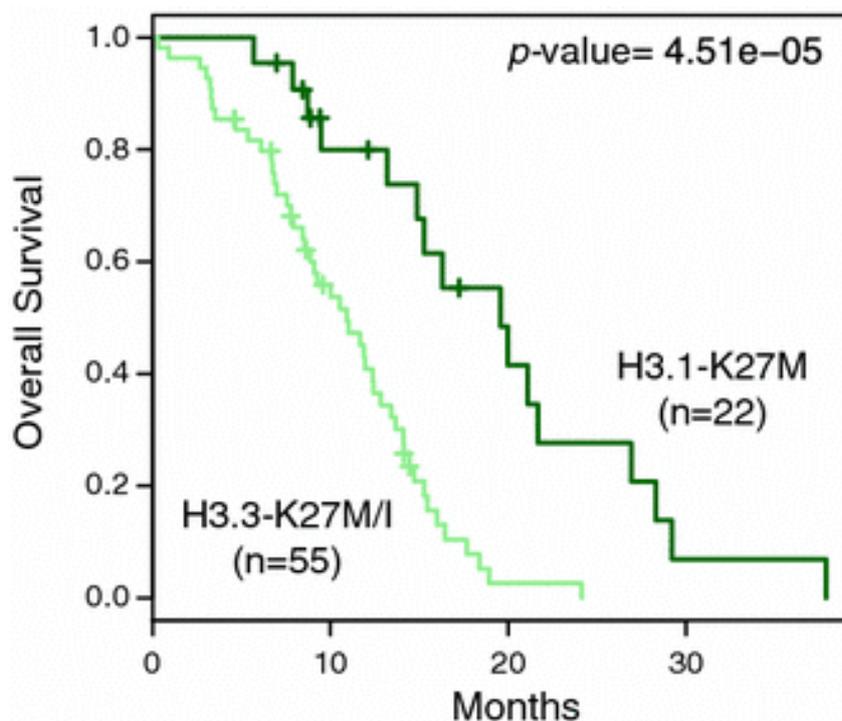
Parmi les gliomes pédiatriques de haut grade, des altérations génétiques des gènes codants pour l'histone 3 ont été mises en évidence (18). Les histones sont une famille de protéines participant à la formation des nucléosomes, des structures protéiques impliquées dans la condensation et donc l'accessibilité de l'ADN. Plusieurs variants de l'histone 3 existent, à savoir les histones canoniques H3.1 et H3.2 et le variant H3.3. Chacun est codé par différents gènes positionnés à différents loci du génome. Les altérations de type K27M sont dues à des mutations hétérozygotes des gènes *H3F3A* et *HIST1H3B*, codant respectivement pour le variant H3.3 et la forme canonique H3.1 (19). Dans les cas de gliomes localisés sur la ligne médiane, et plus particulièrement dans 80% des DMG, ces mutations conduisent au remplacement de la Lysine 27 par la Méthionine (K27M), dans le gène *H3F3A* (90%) ou *HIST1H3B* (10%) (20). Du fait de ces similitudes génétiques, les gliomes de la ligne médiane et les DIPG ont été réunis au sein d'une même entité, dénommée « diffuse midline glioma (DMG) H3K27-altered » (gliome diffus de la ligne

médiane H3K27-altéré) dans la nouvelle classification des gliomes établie par l'OMS en 2021(21). Cette mutation est quasi exclusive à la pédiatrie. D'autres mutations de l'histone 3 ont été décrites dans les gliomes pédiatriques hémisphériques, conduisant au remplacement du résidu Glycine 34 en Arginine ou en Valine (H3 G34R/V).

Les mutations dites H3-K27M sont associées à un pronostic encore plus sombre (médiane de survie après diagnostic  $\approx$  1 an) par rapport aux DMG présentant une histone 3 non mutée. Les patients atteints de DMG mutés H3.3K27M et H3.1K27M présentent donc des différences clinicopathologiques, mais également biologiques. D'un point de vue clinique, les patients mutés H3.1K27M sont globalement plus jeunes, avec une médiane d'âge au diagnostic de 4 ans contre 7 ans pour les patients mutés H3.3K27M. De plus, lorsque le variant H3.1 est muté, la tumeur présente un phénotype plus mésenchymateux et semble mieux répondre à la radiothérapie (Figure 2) alors que le variant H3.3 muté présente un phénotype oligodendroglial avec une signature pro-métastatique et rechute significativement plus tôt. Par conséquent, les tumeurs H3.1 sont associées à une meilleure survie globale que les tumeurs H3.3 (22) (Figure 3).



**Figure 2** - Diagramme représentant la réponse à la radiothérapie en fonction du statut de mutation H3.1 et H3.3. (18)



**Figure 3** - Estimations de Kaplan-Meier de la survie en fonction des mutations H3.1- ou H3.3-K27M. (18)

Bien que les DMG, dont les DIPG, soient majoritairement caractérisés par des mutations de l'histone 3, d'autres altérations peuvent être co-exprimées (Figure 4). Des altérations du gène TP53 et des amplifications de PDGFRA sont retrouvées le plus souvent dans les tumeurs H3.3K27M dans respectivement 71% et 30% des DMG (22,23). Des mutations d'ACVR1, le gène codant le récepteur de l'activine (ALK-2), impliqué dans la voie des BMP (*bone morphogenic protein*), sont également impliquées dans environ 20 % des DMG, majoritairement associées aux mutations H3.1K27M (Figure 5).

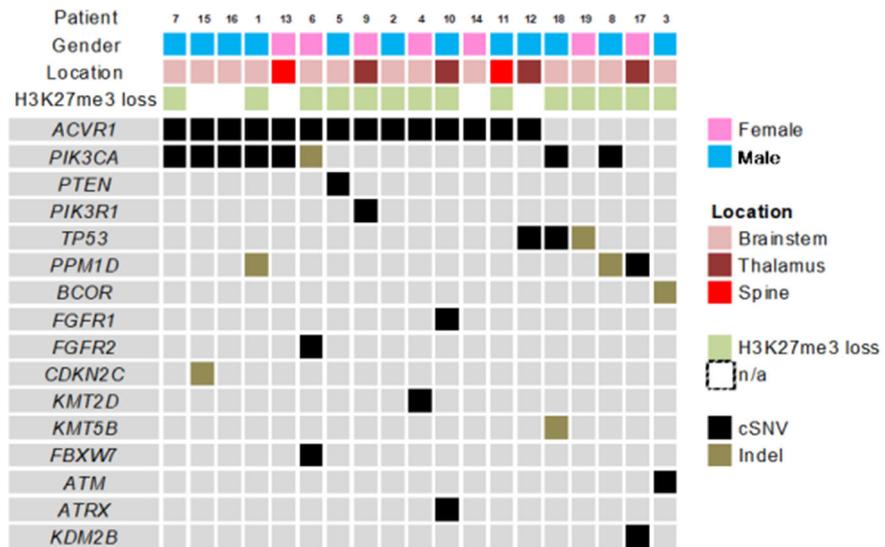


Figure 4 - Profil mutationnel des DIPG (David Castel, 2021)

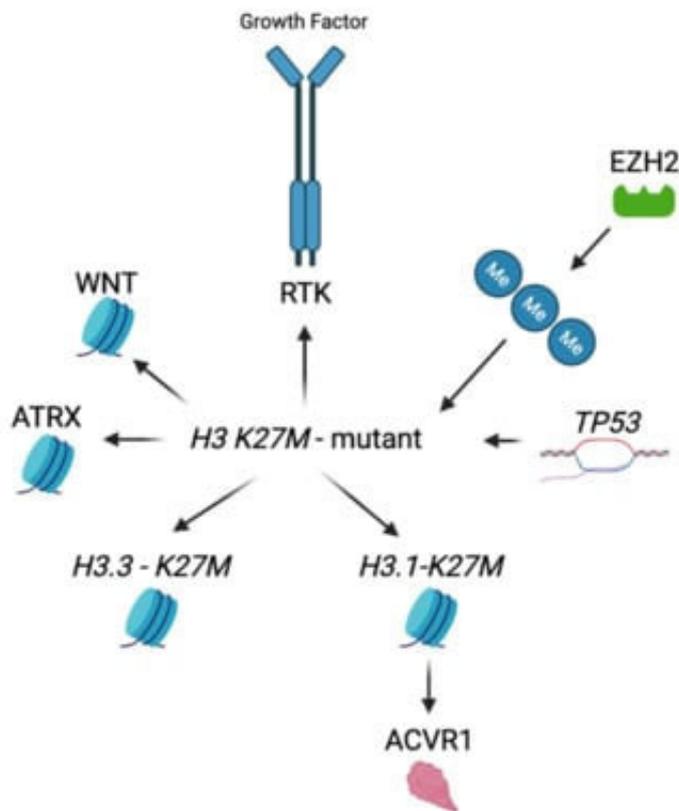


Figure 5 - Aperçu du paysage génétique des DIPG (25)

ACVR1 : récepteur de l'activine A, de type I, ATRX : alpha-thalassemia/mental retardation X-linked, EZH2 : Enhancer of zeste homolog 2, RTK : Récepteur à Tyrosine Kinase, WNT : Voie de signalisation WNT

Ces différentes mutations entraînent des altérations de nombreux processus biologiques.

Le gène *TP53* est un gène dit suppresseur de tumeur, jouant un rôle crucial dans la régulation du cycle cellulaire. Il est souvent appelé "gardien du génome". Lorsque des dommages à l'ADN sont détectés, le gène *TP53* est activé, ce qui conduit à la production de la protéine p53. Cette protéine agit comme un facteur de transcription, pouvant donc réguler l'expression de nombreux autres gènes impliqués dans l'arrêt du cycle ou l'induction de la mort cellulaire (26).

En somme, la voie de signalisation p53 joue un rôle crucial dans la prévention de la formation de tumeurs en maintenant l'intégrité du génome et en éliminant les cellules endommagées. La présence de la mutation *TP53* conjointement à la mutation H3.3K27M définit une sous-population de tumeurs répondant moins bien à la radiothérapie, leur conférant un pronostic encore plus péjoratif (27).

Le récepteur PDGFRA (Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha) est un récepteur à tyrosine kinase (RTK) présent à la surface des cellules, jouant un rôle essentiel dans la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire. Il appartient à la famille des récepteurs du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF). Lorsqu'il se lie à son ligand, le PDGF, il active des voies de signalisation intracellulaire qui peuvent stimuler la prolifération cellulaire, la migration et la survie des cellules. Il a été démontré que la signalisation PDGF est un puissant moteur de la gliomagenèse du tronc cérébral au sein des DIPG (28).

Des études ont pu démontrer l'implication d'autres voies dans le développement de la tumeur. Des mutations au sein de la voie WNT sont identifiées chez certains patients. La voie WNT est une voie de signalisation cellulaire qui joue un rôle crucial dans le développement embryonnaire, la régénération tissulaire et la croissance cellulaire chez les organismes multicellulaires. Elle tire son nom de la protéine Wnt, qui agit comme un ligand pour activer des récepteurs transmembranaires, et activer une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à des modifications transcriptionnelles. Dans le contexte de la voie WNT, la bêta-caténine est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes qui jouent un rôle dans le développement, la prolifération cellulaire, et d'autres processus biologiques.

Lorsque la voie WNT est activée, la bêta-caténine s'accumule dans la cellule et entre dans le noyau, où elle interagit avec des facteurs de transcription pour réguler l'expression de gènes cibles. Cette régulation génique est cruciale pour déclencher les réponses cellulaires spécifiques à l'activation de la voie WNT. Les mutations des effecteurs de la voie WNT entraînent donc une augmentation des niveaux de  $\beta$ -caténine, provoquant une prolifération excessive des cellules malignes (29).

La caractérisation du statut mutationnel des patients est donc essentielle en tant qu'outil diagnostique pour compléter les observations cliniques et d'imagerie des tumeurs.

## 2.2 Conséquences épigénétiques des mutations H3 des DIPG

L'étude des causes génétiques des cancers (amplifications, mutations ou pertes de matériel chromosomique) a longtemps occupé le devant de la scène pour comprendre leur étiologie moléculaire. Cependant, l'explosion actuelle des connaissances sur les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'expression des gènes en modifiant la structure de la chromatine, a révélé le rôle prépondérant des modifications épigénétiques dans le déclenchement et la progression de nombreuses maladies, et en particulier des cancers.

Dans les DIPG, et plus largement dans les DMG, les deux altérations majeures décrites concernent des histones, protéines structurales de base du nucléosome modulant l'épigénome, faisant de cette pathologie une pathologie épigénétique. Le rôle des histones est d'organiser la chromatine pour rendre l'ADN accessible aux processus cellulaires, notamment à la réplication, à la transcription et à la réparation. Ce remodelage, par assemblage/désassemblage des nucléosomes, est essentiellement dû à des modifications post-traductionnelles de type méthylation et/ou acétylation au niveau de résidus spécifiques situés sur les queues N-terminales des histones (17).

La lysine 27 de l'histone H3 est un résidu important car ses modifications sont associées à la fois à l'hypoactivité génique, associée aux marques de méthylation, et à la transcription active du gène, associée aux marques d'acétylation (19). Le remplacement de cette lysine par la méthionine dans les DIPG impacte fortement les modifications épigénétiques, entraînant une diminution globale de la marque de triméthylation

H3K27me3, marque répressive provoquant la condensation de l'ADN, et une augmentation réciproque de la marque d'acétylation H3K27ac, qui est, elle, activatrice, et provoque la décondensation de l'ADN (30).

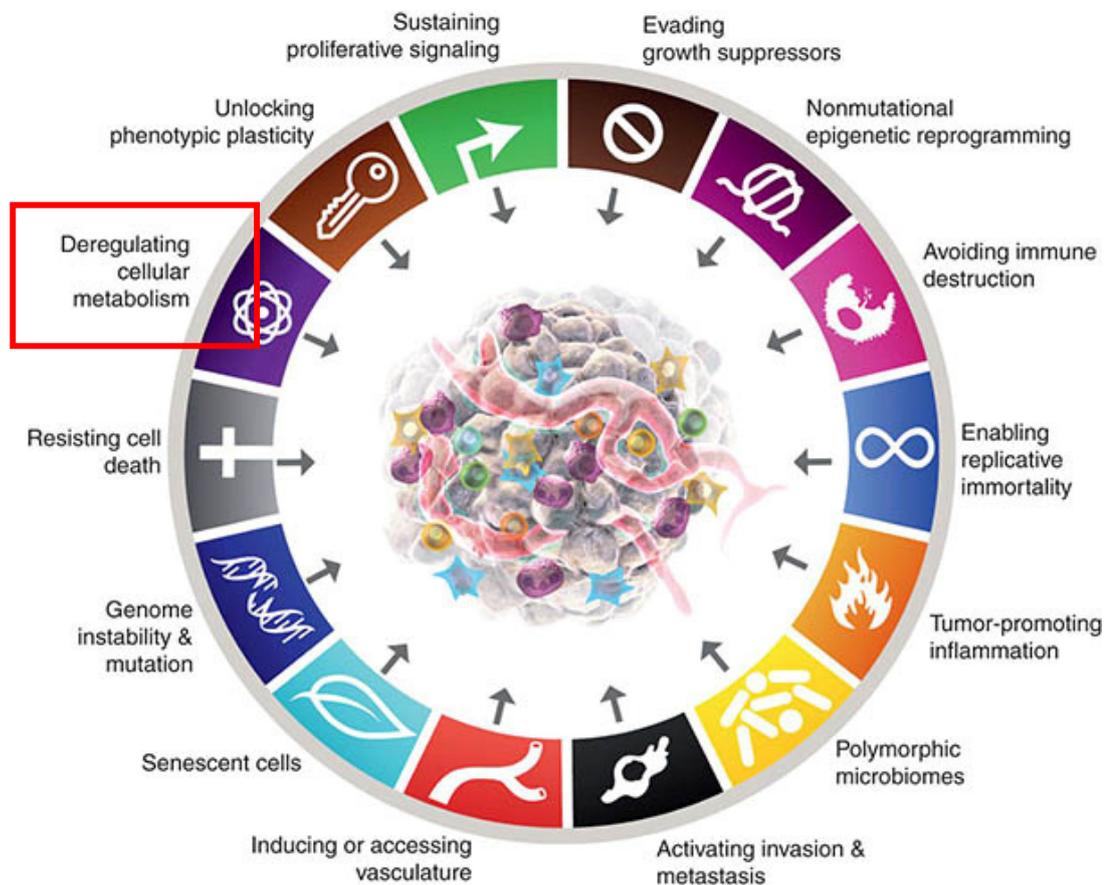
Bien que seulement 10% des histones expriment *in fine* la mutation H3K27M dans une tumeur donnée, la baisse de la marque H3K27me3 est observée de manière globale. Ce phénomène s'explique par l'inhibition de la fonction du complexe multiprotéique répressif polycomb 2 (PRC2), responsable de l'apposition de la marque de triméthylation en position K27 de l'histone H3 (H3K27me3) (31). En effet, le remplacement de la Lysine par une Méthionine sur l'histone 3 provoque une liaison transitoire entre l'histone mutée et *Enhancer of zeste homolog 2* (EZH2), protéine membre de PRC2, ce qui provoquerait un changement conformationnel du complexe, conduisant à une inhibition de sa capacité de triméthylation. Ce changement expliquerait ainsi la modification globale du ratio de marques de méthylation/acétylation, et ce même sur les histones non mutées.

La mutation H3K27M amène ainsi la chromatine à adopter une configuration plus accessible au niveau de régions régulatrices, ce qui entraîne une modification des processus transcriptionnels, et notamment l'augmentation de l'expression d'oncogènes, favorisant la capacité d'auto-renouvellement, et altérant la différenciation de progéniteurs gliaux. La compréhension des conséquences fonctionnelles, notamment métaboliques, de ces dérégulations épigénétiques représente un axe de recherche majeur, tant pour l'identification de cibles thérapeutiques que pour la compréhension de l'origine développementale de ces cancers.

## 2.3 Métabolisme et DIPG : un levier de dépendance à explorer

### 2.3.1. Altération du métabolisme dans les cancers : état des connaissances

Bien que les premières observations des altérations métaboliques caractéristiques des tumeurs remontent à près d'un siècle, notamment avec la découverte de l'effet Warburg (32), l'étude du métabolisme des cancers n'est devenu un sujet d'intérêt à part entière qu'au cours de la dernière décennie. En effet, sa prise en compte dans les caractéristiques majeures des cancers ou « Hallmarks of cancers » ne date que de 2011 (33) (*Figure 6*).



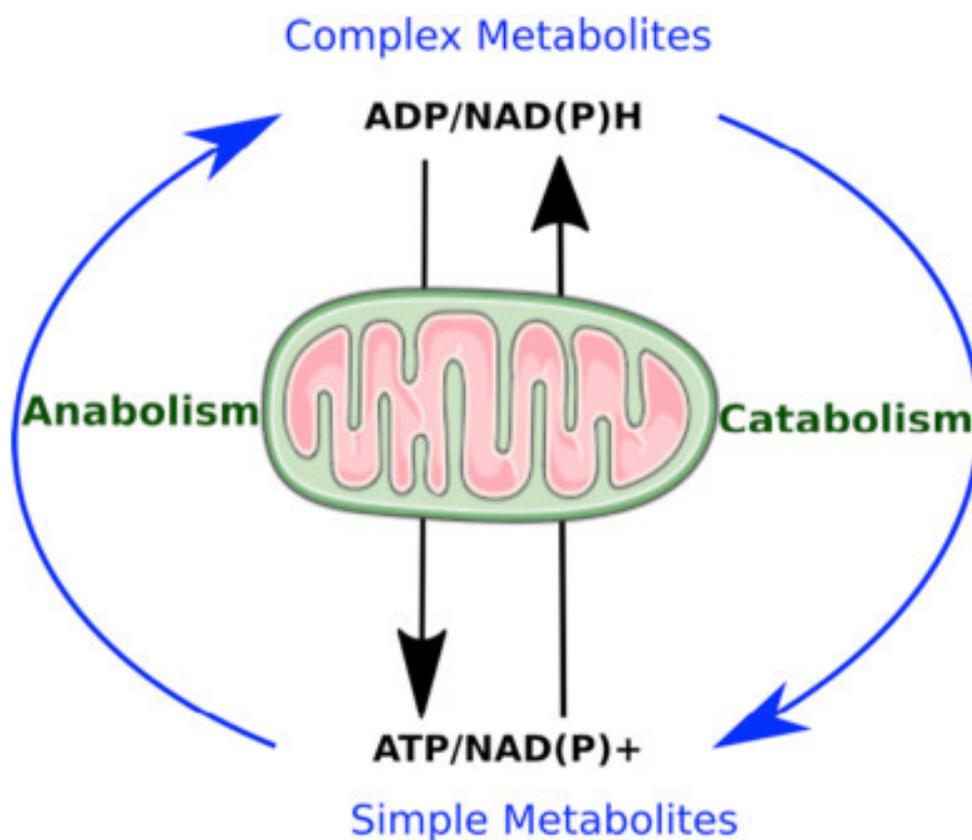
**Figure 6 - The Hallmarks of cancer (34)**

Les études sur le métabolisme des cellules cancéreuses ont élargi notre compréhension des mécanismes et des conséquences fonctionnelles des altérations métaboliques associées aux tumeurs à différents stades de la tumorigenèse, en caractérisant les avantages sélectifs associés aux dérèglements d'un certain nombre de voies. Certains des changements les plus frappants de la bioénergétique cellulaire tumorale comprennent l'élévation de la glycolyse, l'augmentation du flux glutaminolytique, la régulation positive du métabolisme des acides aminés et des lipides, l'amélioration de la biogenèse mitochondriale, l'induction de la voie des pentoses phosphates et la biosynthèse des macromolécules.

Le métabolisme énergétique, processus de production d'énergie (ATP) à partir des nutriments, ne fait donc pas exception aux dernières explorations et est ainsi devenu un sujet d'intérêt dans l'étude de vulnérabilités thérapeutiques au sein des cancers. En

conditions physiologiques, l'adaptation du métabolisme est indispensable pour le maintien de l'homéostasie cellulaire et les réponses à des conditions variables. Les cellules ont besoin d'énergie pour leur croissance et leur entretien et, pour ce faire, ont évolué en créant de multiples voies de production d'énergie. Au cours de la croissance, les molécules ATP/ADP et NADH/NAD<sup>+</sup> jouent un rôle clé (*Figure 7*). Les voies anaboliques nécessaires à la biosynthèse consommeront de l'ATP et généreront du NADH. Les voies cataboliques, telles que la phosphorylation oxydative mitochondriale, généreront, elles, de l'ATP à partir d'ADP + Pi et oxyderont le NADH en NAD<sup>+</sup> (35).

La régulation de la synthèse d'ATP est notamment un enjeu énergétique majeur. Cette synthèse se produit soit par phosphorylation au niveau du substrat (glycolyse et TCA), soit par phosphorylation oxydative (OXPHOS), comme résumé ci-dessous :



*Figure 7 - Métabolisme énergétique cellulaire. (35)*

- Phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est un processus biologique qui se produit dans les mitochondries, organites cellulaires responsables de la production d'énergie dans les cellules eucaryotes. La voie métabolique OXPHOS génère de l'ATP par transport d'électrons au travers d'une série de cinq complexes protéiques transmembranaires (Complexes I à V), localisés dans la membrane interne mitochondriale. Cette production est rendue possible par la présence d'O<sub>2</sub>, permettant l'oxydation de molécules chargées. Cette voie est aussi connue sous le nom de chaîne de transport d'électrons (ETC).

Lorsque les électrons traversent les complexes ETC multiprotéiques I à IV, les protons sont pompés de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire par les complexes I, III et IV. Lors du retour des protons dans la matrice mitochondriale, à travers une enzyme appelée ATP synthase, l'énergie libérée est utilisée pour relier un phosphate à une molécule d'ADP, formant ainsi une molécule d'ATP. C'est cette étape d'ajout d'un groupement phosphate à une molécule qui donne son nom au processus, la phosphorylation.

La régulation à la baisse d'OXPHOS est associée à de mauvais résultats cliniques pour tous les types de cancer et est en corrélation avec une signature génique caractéristique des tumeurs invasives et métastatiques.

- Glycolyse

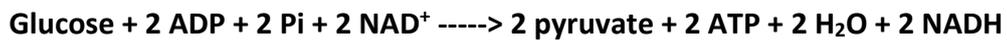
Non dépendante de la mitochondrie ou de l'accessibilité en oxygène, la glycolyse (ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas) a lieu, elle, dans toutes les cellules du corps. Il s'agit de la première étape de la dégradation du glucose, le transformant en pyruvate et permettant ainsi la production d'énergie sous forme d'ATP. En aérobie, le pyruvate généré s'oriente vers le cycle du TCA et la respiration cellulaire, tandis qu'en anaérobie, il subit une fermentation, dont le lactate sera le produit final.

La glycolyse est une voie métabolique centrale branchée via ses intermédiaires à d'autres voies métaboliques telles que la synthèse des acides aminés et des lipides.

La glycolyse se décompose en deux phases :

- La phase préparatoire, où le glucose est transformé en deux trioses phosphates avec consommation d'énergie.
- La phase de remboursement, qui produit de l'énergie sous forme d'ATP.

L'équation globale de la glycolyse est :



Dans les cellules tumorales, le taux de glycolyse est 200 fois plus élevé que dans les cellules saines. Par ailleurs, les cellules cancéreuses se reposent sur la glycolyse anaérobie pour pallier l'hypoxie, résultant de la forte croissance tumorale non totalement compensée par une néo-angiogenèse. L'inhibition de la glycolyse dans les cellules cancéreuses est une nouvelle stratégie pour surmonter la résistance aux médicaments associée aux anomalies respiratoires mitochondriales et à l'hypoxie (36).

De nombreux facteurs interviennent dans la régulation de l'activité de ces voies, pour assurer une balance énergétique appropriée dans les cellules. Ces régulations permettent d'optimiser le métabolisme cellulaire tumoral et de l'adapter au taux de prolifération élevé, mais aussi à l'acquisition d'autres propriétés oncogéniques. La migration cellulaire est notamment un processus énergivore qui nécessite une quantité importante d'ATP pour permettre aux cellules de se déplacer. L'ATP fournit l'énergie nécessaire aux processus cellulaires qui sous-tendent la migration, tels que la polymérisation des filaments d'actine, l'adhésion cellulaire aux substrats, la régulation des moteurs moléculaires impliqués dans le mouvement cellulaire, etc. Ainsi, un métabolisme efficace et une production adéquate d'ATP sont essentiels pour soutenir la migration cellulaire. La migration cellulaire peut également entraîner des changements métaboliques dans les cellules. Lorsqu'une cellule se déplace, elle peut être confrontée à des conditions environnementales changeantes, telles que des fluctuations de la disponibilité en nutriments et en oxygène. En réponse à ces changements, les cellules peuvent modifier leur métabolisme pour s'adapter aux nouvelles conditions (37). De plus, lorsque les cellules cancéreuses subissent l'EMT (transition épithélio-mésenchymateuse), elles deviennent plus plastiques sur le plan métabolique, ce qui signifie qu'elles peuvent utiliser différents

substrats énergétiques pour produire de l'ATP. Pendant l'EMT, les cellules cancéreuses peuvent passer d'un métabolisme aérobie (utilisant l'oxygène pour brûler du glucose et produire de l'ATP) à un métabolisme anaérobie (fermentation du glucose en absence d'oxygène pour produire de l'ATP). Cette plasticité métabolique permet aux cellules cancéreuses de s'adapter aux fluctuations de l'approvisionnement en nutriments et en oxygène dans leur microenvironnement tumoral.

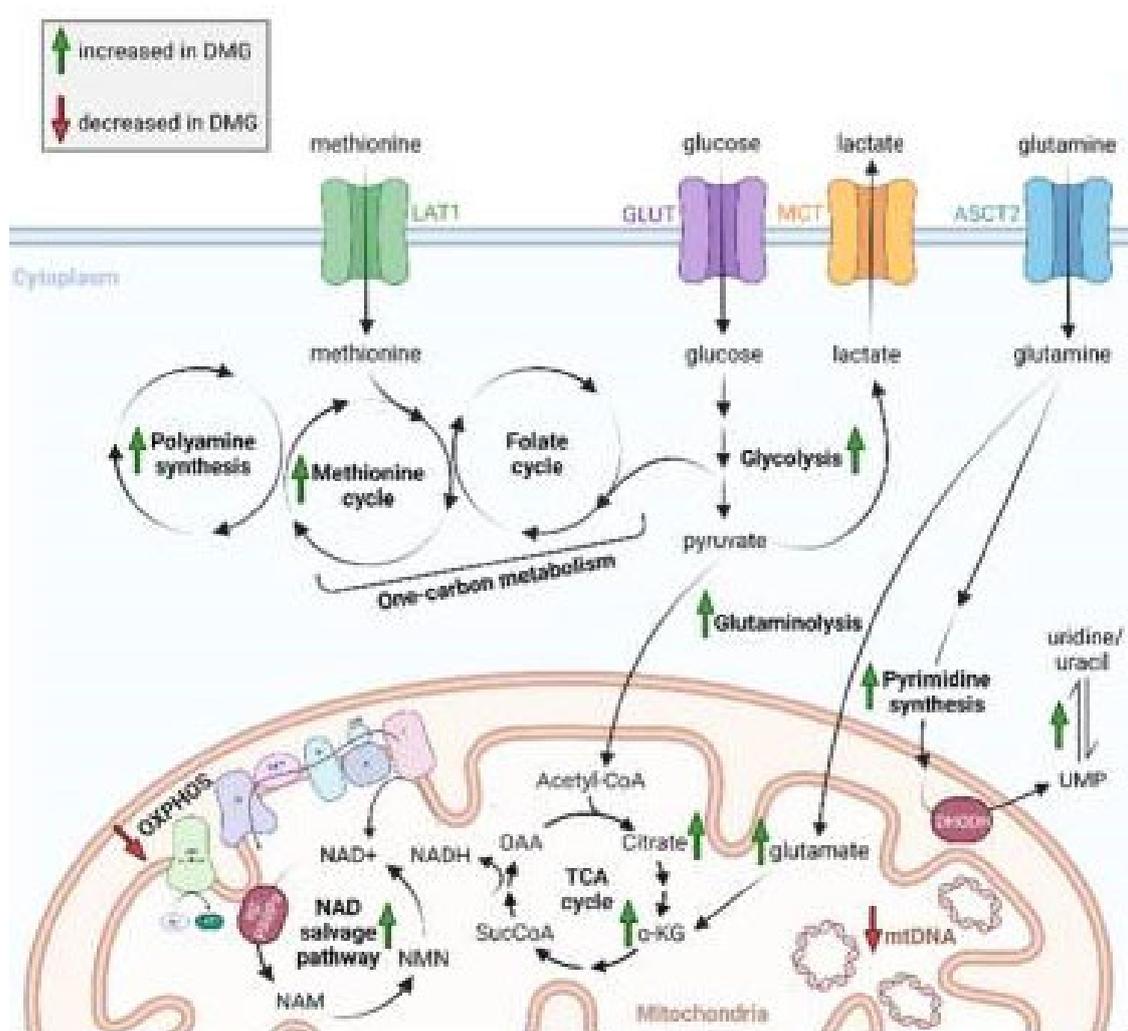
Les changements métaboliques dans une cellule sont essentiels pour maintenir l'équilibre énergétique, soutenir la croissance et la reproduction, et répondre de manière adaptative aux conditions changeantes de l'environnement. Ces processus sont interconnectés et forment un réseau complexe de voies métaboliques régulées pour assurer la survie et le fonctionnement optimal de la cellule. Au sein des cellules cancéreuses, des reprogrammation métaboliques soutiennent les caractéristiques distinctives et leur permettent de proliférer de manière incontrôlée. Prendre le contrôle du métabolisme des cellules cancéreuses, en les empêchant de combler leurs besoins énergétiques élevés, pourrait ainsi permettre de freiner la croissance rapide et incontrôlée de la tumeur mais aussi présenter un levier d'action contre les résistances aux traitements actuellement rencontrées (38). L'intérêt pharmacologique de la prise en compte du métabolisme des cellules tumorales réside également dans l'existence de thérapies déjà commercialisées et utilisées en routine depuis de nombreuses années pour le traitement d'autres pathologies, comme les statines permettant de réguler le métabolisme du cholestérol, protéine lipidique. Des études récentes ont montré que la reprogrammation du métabolisme lipidique joue un rôle crucial dans la synthèse membranaire, la production énergétique et la transduction de signaux, indispensables à la progression tumorale (39). Chez l'adulte, une perturbation du métabolisme lipidique a été largement décrite dans les glioblastomes. Ces gliomes de haut grade présentent une augmentation du métabolisme des glycosphingolipides, impliqués dans la formation de la membrane cellulaire, par rapport à leurs équivalents de bas grade, qui présentent plutôt une activation du métabolisme du phosphatidylinositol, impliqué dans des mécanismes de signalisation cellulaire et de remaniements du cytosquelette. Ces découvertes pourraient expliquer

certaines différences observées, telle qu'une prolifération cellulaire moins importante dans les gliomes de bas grade par rapport aux glioblastomes (40).

Cependant, bien que ces découvertes ouvrent la voie à de nouvelles possibilités de repositionnements thérapeutiques, l'efficacité des thérapies métaboliques anticancéreuses devra être soigneusement évaluée, en prenant en compte 1) la plasticité des cellules cancéreuses, 2) l'hétérogénéité inter et intratumorale, mais également 3) le respect des besoins énergétiques et développementaux spécifiques des patients, notamment dans le domaine pédiatrique.

### 2.3.2. Altération du métabolisme dans les DIPG : état des connaissances

Des dérégulations métaboliques commencent à être décrites dans les DIPG. Le profilage métabolique global de lignées cellulaires dérivées de patients a identifié la glycolyse et les voies métaboliques associées telles que le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) et la glutaminolyse comme les voies les plus dérégulées, en comparaison au niveau d'activation classique de cellules souches neurales non mutées. En d'autres termes, par rapport aux cellules tumorales de type sauvage H3 (H3WT), les cellules H3K27M amplifient certains programmes métaboliques dont la glycolyse, la glutaminolyse, le TCA, ou encore le cycle de la méthionine (*Figure 8*) (12). L'imagerie non invasive avec spectroscopie par résonance magnétique (IRM), réalisée chez quinze patients atteints de gliomes de la ligne médiane, a confirmé des niveaux significativement plus élevés de citrate, un des intermédiaires du cycle TCA, et de la glutamine dans les gliomes mutants K27M comparés aux non mutés. Ces informations suggèrent ainsi la possibilité d'un suivi par imagerie métabolique chez les patients atteints de DIPG (12).



**Figure 8** - Résumé des voies métaboliques altérées dans les DIPG (41)

Le métabolisme du glucose et celui des acides aminés ne sont pas les seuls impactés. Des études ont montré une dépendance sélective du DIPG à la voie de biosynthèse des pyrimidines *de novo*. Les synthèses des purines et des pyrimidines sont la condition *sine qua non* de la synthèse répliquative de l'ADN : les voies métaboliques impliquées dans la biosynthèse des nucléotides sont donc largement activées dans les cellules tumorales, en faisant des cibles attrayantes pour le développement de médicaments anticancéreux. Dans une étude réalisée sur des lignées cellulaires de DIPG, l'inhibition de l'expression de trois gènes impliqués dans la biosynthèse *de novo* de la pyrimidine [carbamoyl-phosphate synthétase 2, aspartate transcarbamylase, dihydroorotase, (CAD) ; la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH) ; uridine monophosphate synthétase (UMPS)] par CRISPR a suffi

à inhiber la prolifération des cellules tumorales, soulignant leur dépendance au métabolisme de la pyrimidine. Cette dépendance semble due à une augmentation concomitante de la dégradation de la pyrimidine, ce qui limiterait la capacité des cellules DIPG à utiliser la voie alternative de récupération de la pyrimidine. Par ailleurs, ces résultats ne s'observent que dans les cellules de DIPG et non dans les cellules de glioblastome adulte, soulignant une nouvelle fois les spécificités des tumeurs pédiatriques (42).

### 2.3.3 Hétérogénéité métabolique des DIPG

Si des altérations du métabolisme cellulaire sont visibles à l'échelle de la tumeur entière, un niveau de complexité supplémentaire opère avec l'identification de différents états cellulaires métaboliques, c'est-à-dire d'une hétérogénéité intra-tumorale métabolique. L'exploration du transcriptome en cellule unique (« single-cell ») de tumeurs DMG mutés H3K27M a permis de mettre en évidence la présence de types cellulaires distincts, et notamment de cellules tumorales se rapprochant sur le plan transcriptomique de précurseurs d'oligodendrocytes (dit OPC) et d'autres présentant de fortes similitudes avec des précurseurs de type astrocytaire (AC). L'analyse sur le plan métabolique de ces populations a révélé que les cellules de type OPC présentent une suractivation du métabolisme du cholestérol et de la phosphorylation oxydative mitochondriale, ce qui augmenterait leur sensibilité aux statines et aux inhibiteurs d'OXPPOS (43).

### 2.3.4 Potentiel du ciblage des voies métaboliques dans les DIPG

Ces dernières années, de nombreuses vulnérabilités métaboliques présentes dans les DIPG ont pu être étudiées et ont permis le développement de certaines molécules thérapeutiques.

Une des approches consiste à cibler la kinase 5 régulée par le signal extracellulaire (ERK5), qui régule la glycolyse dans les cellules de DIPG. L'inhibition de ERK5 peut réduire la prolifération cellulaire et la glycolyse (44). Il a été aussi démontré que le ciblage du métabolisme mitochondrial à l'aide de biguanides comme la metformine et la phenformine améliore la radiosensibilité des cellules DIPG (45). De récentes études ont aussi pu démontrer un effet potentiel de l'ONC201 sur le métabolisme mitochondrial. Les résultats

précliniques et cliniques encourageants ont catalysé une vague de nouveaux essais cliniques utilisant ONC201 (46). Au total, 5 essais sont centrés sur des patients atteints de tumeurs du SNC, dont 2 ouverts aux patients pédiatriques. Enfin, le métabolisme dérégulé des purines, en particulier la voie de biosynthèse des purines de novo, a été identifié comme une cible thérapeutique potentielle dans le DIPG.

Cibler des voies métaboliques dans les DIPG représente donc une stratégie intéressante dans la recherche de nouvelles thérapies.

En conclusion, ces avancées dans la compréhension des altérations biologiques des DMG, et notamment des DIPG, ont permis d'améliorer le diagnostic et de distinguer notamment les formes de bas grade localisées dans le pont et les formes de haut grade présentant une mutation H3K27M. L'identification des mutations a surtout permis de comprendre l'étiologie moléculaire de ces cancers, ouvrant de fait la voie à la mise en place de thérapies ciblées, basées sur le ciblage des nœuds de signalisation oncogénique. L'un des points clés est notamment de comprendre comment la décondensation de la chromatine favorise l'acquisition et le maintien d'un état oncogénique en potentialisant l'effet de facteurs de transcription. Au cours de cette thèse, j'ai donc décidé de me concentrer sur une voie impliquée dans la tumorigénèse des DIPG : la voie des BMP.

### 3. Synergie oncogénique entre BMP et K27M dans les DIPG

#### 3.1 Description de la voie des BMP

Les protéines morphogénétiques osseuses, également connues sous le nom de BMP ou ostéogénines, sont une famille de protéines initialement découvertes pour leur rôle dans la formation et la régénération osseuse. Ces cytokines appartiennent à la superfamille du TGF-beta (Transforming Growth Factor-beta). La famille BMP comprend désormais seize ligands qui exercent leurs effets en se liant à sept récepteurs, conduisant à une gamme large de combinaisons possibles avec des conséquences variées en aval.

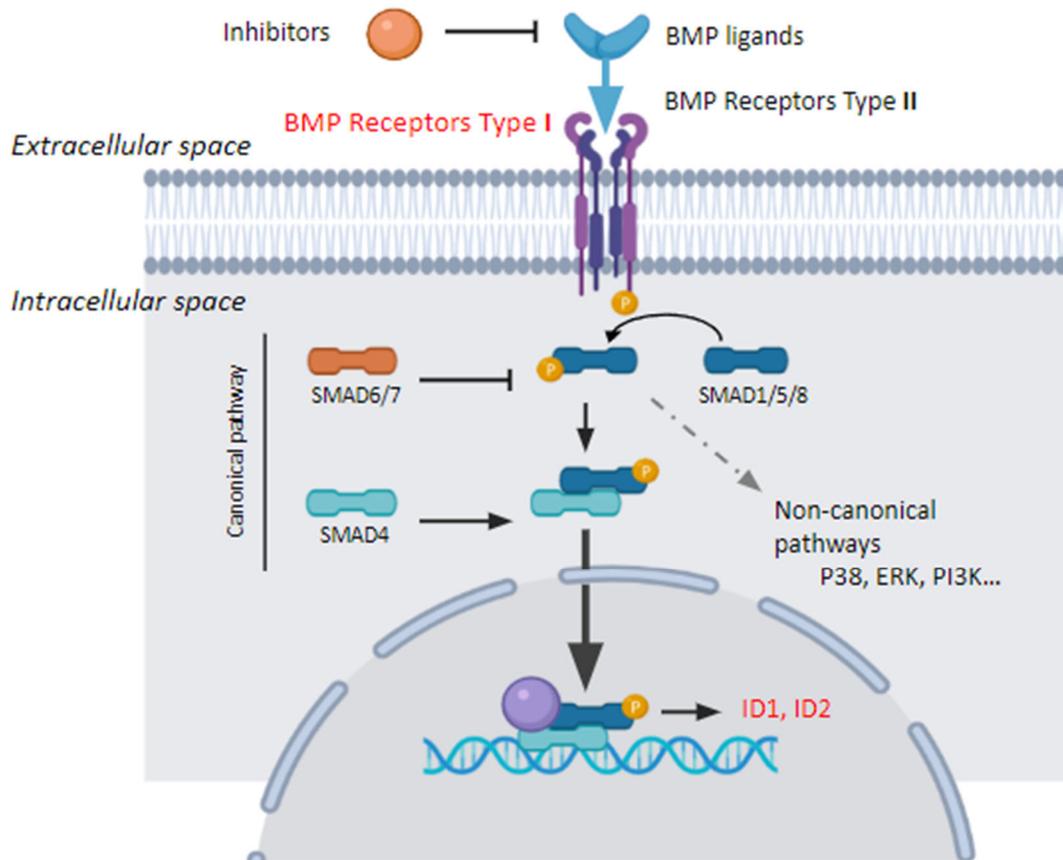
Ces ligands forment des homo- ou hétérocomplexes induisant la transduction de signaux à l'intérieur de la cellule. Ils se lient ensuite à deux récepteurs sérine/thréonine

kinase distincts de type I et de type II, tous deux nécessaires à la transduction du signal. Ces récepteurs sont exprimés de manière différentielle dans divers tissus. Il a été décrit :

- trois récepteurs de type I (BMPR-I) : les récepteurs BMP de type IA et IB, respectivement appelés BMPIA ou ALK3 et BMPIB ou ALK6, et le récepteur d'activine de type IA, appelé ActRIA ou encore ALK2 ;
- trois récepteurs de type II (BMPR-II) : le récepteur de BMP de type II (BMPR-II) et les récepteurs d'activine de type II et IIB, respectivement appelés ActR-II et ActR-IIB.

La phosphorylation du BMPR-I par le BMPR-II déclenche la cascade de phosphorylation des effecteurs Smad (*small mothers against decapentaplegic homolog*) 1, 5 et 8, leur permettant de former un complexe avec Smad4 qui se relocalise dans le noyau et agit comme facteur de transcription sur des gènes cibles, tels que *ID1*, *ID2*, etc. Il existe également plusieurs voies d'activations indépendantes des protéines Smad, que l'on nomme voies non canoniques, qui font par exemple intervenir les MAPK (*mitogen activated protein kinases*) (Figure 9). En particulier, la signalisation BMP peut également être médiée par la LIM Kinase 1 (LIMK1) (47). Les Rho GTPases (impliquées dans l'invasion) agissent théoriquement en amont des LIMK pour réguler la polymérisation de l'actine. Des chercheurs ont cependant identifié une interaction directe de LIMK1 avec la queue C-terminale de BMPRII permettant son activation. LIMK1 activée reste associée au complexe récepteur BMP et est capable de phosphoryler la cofiline effectrice en aval. La cofiline fait partie de la famille des protéines de liaison à l'actine F qui régule la dynamique de l'actine et intervient donc dans l'invasion cellulaire (48).

Via ces différentes voies de signalisation, transcriptionnelles ou non, les BMP peuvent réguler tout un panel de processus physiologiques.



**Figure 9** - Voie de signalisation des BMP (Huchede Paul, 2023)

*SMAD* : Small mothers against decapentaplegic homolog, *ID1, ID2* : DNA-binding protein inhibitors  
*ID-1 ID2, P38* : p38 mitogen-activated protein kinases, *ERK* : Extracellular signal-regulated kinases,  
*PI3K* : Phosphoinositide 3-kinase

### 3.2 Implication de la voie dans le développement et l'homéostasie tissulaire

Les BMP sont impliquées dans de nombreux processus biologiques. Initialement, les BMP ont été identifiées pour leur rôle dans la différenciation des cellules souches en cellules osseuses, mais aussi la régulation de la prolifération, de la maturation, de la survie et de l'apoptose des cellules osseuses, la stimulation de la formation de tissu osseux et la régénération osseuse après une lésion ou une fracture. En raison de leur potentiel à stimuler la formation osseuse, les BMP ont été utilisées comme thérapie dans certains champs cliniques précis tel que dans des procédures de fusion vertébrale, où elles sont utilisées pour stimuler la croissance osseuse entre les vertèbres et favoriser la fusion. Par

ailleurs, les BMP sont également utilisées dans le domaine de la médecine régénérative pour la régénération osseuse dans des situations telles que les fractures complexes, les défauts osseux non guérissables et les maladies osseuses.

Outre ce rôle dans la mise en place des tissus squelettiques, les BMP jouent des rôles majeurs dans la mise en place des axes de polarité au cours de l'embryogenèse. Les BMP sont aussi impliquées dans les mécanismes de cardiogénèse ou encore de neurogénèse. L'activation de la voie est nécessaire à la différenciation appropriée des cellules souches neurales (CSN). Les CSN sont des progéniteurs multipotents qui peuvent se différencier en neurones ou en cellules gliales, notamment en astrocytes et en oligodendrocytes dans le SNC. En période post-natale, la voie BMP induit la gliomagenèse et promeut principalement une différenciation astrogliale. La signalisation BMP joue également un rôle essentiel dans le maintien des niches CSN adultes dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) et la zone sous-granulaire (SGZ) pour permettre la régénération neuronale et gliale, indiquant que le rôle des BMP dans le SNC ne se limite pas au développement prénatal. Cette vision globale du rôle des BMP dans la structuration du SNC doit être nuancée et complexifiée par les caractéristiques spécifiques des paires ligand/récepteur impliquées dans ces régulations (Berthelot et al., in press). Par exemple, BMP-2 dirige le développement des cellules de la crête neurale vers des phénotypes neuronaux (Christiansen et al., 2000), tandis que les BMP-4 et 7 induisent spécifiquement un phénotype sympathique adrénérgique (49).

### 3.3 Implication de la voie BMP dans les cancers

#### 3.3.1. Rôle des BMP dans la régulation de la quiescence et de la différenciation des cellules tumorales

Si l'activité de la voie BMP est régulée avec précision au cours du développement, des altérations de cette cascade de signalisation ont été associées à l'initiation de la tumorigénèse, avec un rôle parfois contradictoire de suppresseur de tumeur ou d'oncogène (50).

Ce rôle paradoxal des BMP dans le cancer est extrêmement bien illustré par leur impact sur les gliomes adultes. Premièrement, les BMP – en particulier BMP2, BMP4 et BMP7 – sont fortement exprimées dans les gliomes, suggérant un rôle plutôt pro-oncogénique. Pourtant, contre-intuitivement, plusieurs études ont montré que le traitement des cellules de gliomes par des BMP entraînait une réduction de leur taux de prolifération *in vitro* et dans des modèles de xénogreffes murines (Berthelot et al., in press). De plus, le traitement des cellules souches de glioblastome avec une forme mutante de BMP7 ayant une activité accrue entraîne une diminution de l'expression des marqueurs de cellules souches (CS) (C. M. Tate et al., 2012). Cette dualité s'explique par des effets pléiotropes, et dépendant du contexte.

Les BMP peuvent notamment jouer un rôle dans la régulation de la quiescence des cellules cancéreuses. La quiescence cellulaire fait référence à un état de repos temporaire dans le cycle cellulaire où les cellules cessent temporairement de se diviser et entrent dans un état inactif. Cet état de quiescence est paradoxal puisqu'il constitue à la fois un état peu prolifératif, et donc moins agressif, mais aussi peu sensible aux traitements, avec un potentiel de renouvellement parfois plus important. On pense en effet que les CS cancéreuses (CSC) sont dans un état réversible de quiescence cellulaire. Plusieurs études ont établi un lien entre la quiescence des cellules tumorales, l'enrichissement en CSC et la récurrence tumorale. Une première étude concernant les glioblastomes démontre l'existence d'une sous-population de cellules souches quiescentes médiée par la signalisation BMP et TGF- $\beta$  (51). La signalisation BMP favorise en ce sens la résistance des cellules de gliomes à la chimiothérapie et la radiothérapie. Contrairement aux cellules tumorales hautement prolifératives, les CS de gliome ont un cycle lent et sont en effet moins sensibles aux

médicaments cytotoxiques endommageant l'ADN. La quiescence peut donc représenter un défi pour le traitement des gliomes, car les cellules cancéreuses quiescentes peuvent échapper à l'élimination et potentiellement se réactiver, entraînant une rechute de la maladie (52).

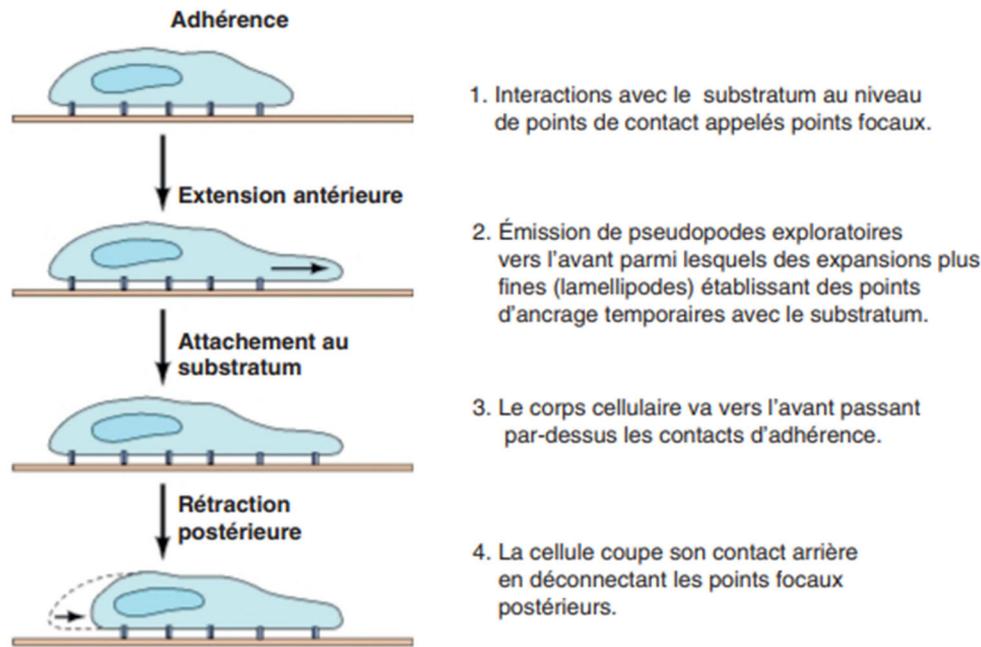
Outre ces rôles dans la régulation des états cellulaires quiescents, les BMP jouent également un rôle dans la régulation de la migration cellulaire.

### 3.3.2 Rôle des BMP dans la régulation du potentiel invasif des cellules cancéreuses

#### 3.3.2.1 Bases moléculaires et cellulaires de la migration cellulaire.

La migration cellulaire est au cœur non seulement de nombreux processus biologiques, notamment au cours de l'embryogenèse, de la réponse inflammatoire, de la réparation et de la régénération des tissus, mais également de processus pathologiques tels que le cancer et les métastases (53).

La migration cellulaire requiert la coordination de plusieurs processus cellulaires de manière cyclique. Ce processus a été décrit au début des années 1970 par les travaux pionniers d'Abercrombie et al. et nécessite 5 étapes. Le début de la migration s'accompagne de l'acquisition d'une asymétrie spatiale qui se manifeste par une morphologie cellulaire polarisée, c'est-à-dire l'observation d'un avant et d'un arrière, clairement distinguables. Dans un second temps, la cellule va émettre des protrusions membranaires de type lamellipodes et filopodes. Ces protrusions seront stabilisées par l'adhésion à la matrice extracellulaire (MEC), qui va permettre l'étalement de la cellule et la mise en place d'intégrines, points d'ancrages reliant la MEC au cytosquelette d'actine. Par la suite, les cellules vont se contracter par le biais d'interactions entre les filaments d'actines et la myosine II. Enfin, l'arrière de la cellule se rétractera grâce au désassemblage de l'actine, permettant ainsi d'amorcer un mouvement vers l'avant (*Figure 10*).



**Figure 10** - Schéma illustrant les différentes étapes de la locomotion cellulaire.(54)

La migration des cellules repose donc sur l'assemblage et le désassemblage des filaments d'actine. Ce cycle fournit la force mécanique qui assurera la projection des extensions membranaires vers l'avant. Dans le cytoplasme, l'actine existe sous forme de monomère globulaire (actine G) ou de polymère au sein de filaments (actine F). Les monomères d'actine G vont s'assembler pour former des dimères instables qui deviendront des trimères ou des tétramères d'actine plus stables. Ces trimères forment un noyau stable qui servira de support pour l'ajout d'autres monomères. Le processus de polymérisation, conditionné par la présence d'ATP, se poursuit du pôle négatif d'une actine vers le pôle positif.

Ainsi, une migration efficace nécessite une coordination bien équilibrée des activités protrusives et rétractiles, la suractivité de ces dernières étant souvent contre-productive pour une migration efficace. Afin d'éviter que les monomères d'actine soient trop concentrés dans la cellule, des facteurs de séquestrations tels que la famille des profilines ou la thymosine  $\beta 4$  se lient aux monomères pour les stabiliser. Il est important de savoir que les monomères d'actine sont toujours associés à un nucléotide, sans quoi l'actine se dénature (55).

De nombreuses protéines participent à la régulation de la polymérisation de l'actine. Les complexes Arp2/3 sont à l'origine de la formation de réseaux dendritiques de filaments d'actine entremêlés. La polymérisation des filaments d'actine à l'extrémité (+) est stimulée par la profiline et pousse la membrane vers l'avant. La cofiline entraîne la dépolymérisation à l'extrémité (-) des filaments. D'autres protéines comme Vasp et Arp2/3 facilitent l'assemblage, et la stabilisation. La cellule étant un compartiment délimité, l'assemblage rapide des filaments d'actine ne peut se poursuivre longtemps sans être équilibré par un désassemblage rapide et très régulé.

Les protrusions membranaires émises jouent un rôle crucial dans divers processus cellulaires, notamment la chimiotaxie et l'haptotaxie. Trois archétypes de protrusion sont couramment reconnus dans les cellules de mammifères en culture (56) (*Figure 11*).

- Les lamellipodes :

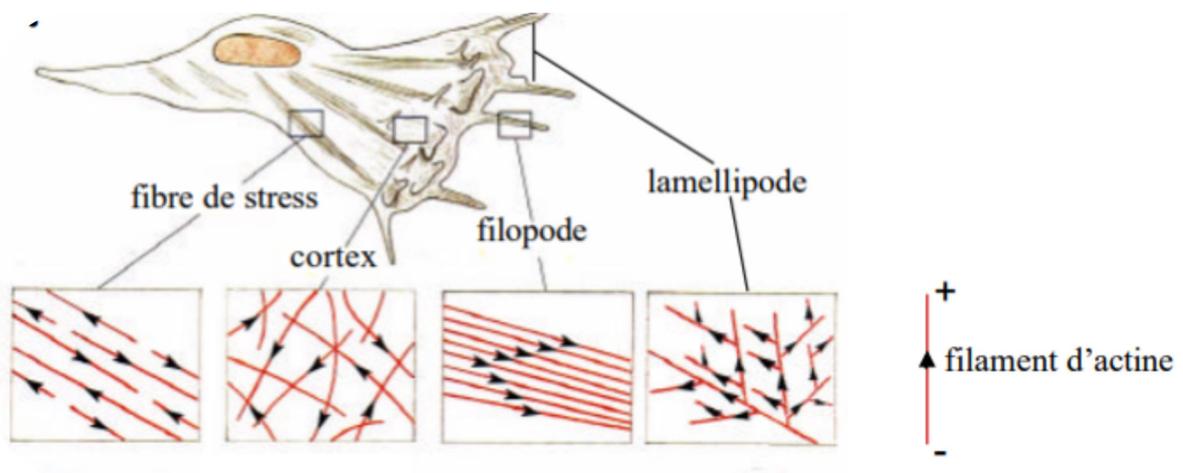
Il s'agit de saillies ressemblant à des pseudopodes, retrouvées au bord de la cellule et formant généralement un arc peu profond au point le plus éloigné du centre de la cellule. Dans la cellule mobile, le lamellipode est étendu dans le sens du déplacement. La cellule utilise les lamellipodes pour explorer son environnement à la recherche de MEC. Les lamellipodes qui ne parviennent pas à établir des adhérences stables se détachent du substrat et se rétractent vers le corps cellulaire. Il a été supposé que, pendant ce processus de rétraction, des volants membranaires se forment, clairement visibles au microscope optique sous forme de vagues de contraste sombre sur la surface frontale des cellules. Malgré l'utilisation courante du terme « volant membranaire », leur structure, leur composition moléculaire et les mécanismes conduisant à leur formation restent très largement inconnus.

- Les filopodes :

Les filopodes sont des saillies dynamiques et étroites de la membrane plasmique remplies de filaments d'actine groupés. Les filopodes jouent un rôle dans la détection, la migration et l'interaction cellule-cellule. Leur diamètre varie de 60 à 200 nm et ils contiennent 10 à 30 filaments d'actine. Les filopodes peuvent mesurer seulement quelques microns de long ou s'étendre sur des dizaines de microns (57).

- Les fibres de stress

Également connues sous le nom de fibres de tension ou fibres de traction, les fibres de stress sont des éléments du cytosquelette des cellules eucaryotes, responsables du maintien de la forme cellulaire, de la résistance mécanique et de la transmission des forces mécaniques à travers la cellule. Elles interagissent avec d'autres composants cellulaires et protéines, notamment les protéines motrices, qui permettent le déplacement des organites et des vésicules le long du cytosquelette. Ces interactions dynamiques jouent un rôle crucial dans les mouvements cellulaires, en permettant aux cellules de se déplacer, de changer de forme et de répondre aux signaux mécaniques et chimiques de leur environnement.



**Figure 11** - Schéma de l'organisation et de l'orientation des fibres d'actine dans le cytoplasme d'une cellule (58)

La polymérisation de l'actine est régulée par des stimuli extracellulaires interceptés par des récepteurs transmembranaires qui déclenchent des cascades de signalisation. Ces cascades de signalisation vont activer des GTPases de la famille Rho faisant partie de la super famille des protéines Ras, connues pour être des protéines fondamentales de la régulation du cytosquelette d'actine [Hall, 1998]. Les Rho GTPases comportent environ 200 acides aminés et un poids moléculaire de 21 kDa (58). Ridley et Hall ont été les premiers à montrer que l'injection de formes actives de Rac 1 et RhoA induit une réorganisation

dynamique du cytosquelette d'actine dans des fibroblastes. Il est admis que la GTPase Rac contrôle la formation des lamellipodes, Cdc42 contrôle la formation des filopodes et Rho contrôle la formation des fibres de stress.

### 3.3.2.2 L'EMT : un changement d'état au cœur du potentiel invasif des cellules cancéreuses.

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus biologique réversible au cours duquel les cellules épithéliales acquièrent un phénotype mésenchymateux, par 1) la perte d'adhésion cellule-cellule, 2) l'acquisition de propriétés migratoires et invasives et 3) la perte de polarité cellulaire. La cellule épithéliale maintient la polarité apicale-basale et le contact avec les cellules adjacentes par les jonctions adhérentes, les jonctions serrées et les desmosomes. Les cellules mésenchymateuses, quant à elles, sont séparées les unes des autres par la matrice extracellulaire, n'ont pas de lame basale les séparant des tissus adjacents, et ne présentent pas la polarité apicale-basolatérale distinctive des cellules épithéliales.

L'EMT est induite par des facteurs externes, tels que les facteurs de croissance, les cytokines et l'hypoxie. Ces voies conduisent à l'activation des facteurs de transcription caractéristiques de l'EMT, notamment SNAI1 (SNAIL), SNAI2 (SLUG), ZEB1, ZEB2 et TWIST. Ces facteurs de transcription inhibent l'expression de gènes qui favorisent le contact cellule-cellule, principalement la E-cadhérine, Zonula occludens-1 (ZO-1), et induisent des gènes qui favorisent la migration. La façon dont ces voies se connectent les unes aux autres, et affectent différentes modalités d'EMT, reste encore largement inexplorée (59).

L'EMT est associée à trois types de processus. Le premier type se produit pendant le développement embryonnaire. Le deuxième type est associé à la régénération des tissus adultes, et à la cicatrisation des plaies. Et enfin le troisième type se produit au cours de la progression du cancer.

L'EMT contribue en effet à l'augmentation de l'agressivité des tumeurs en renforçant leur caractère invasif et leur capacité métastatique, ce qui favorise la création d'un microenvironnement propice à la progression du cancer (60). Le rôle de l'EMT dans la

tumorigenèse de différents cancers, notamment les cancers de la prostate, du poumon, du foie, du pancréas et du sein, a été démontré (61). Les signaux qui déclenchent l'EMT dans les cellules cancéreuses comprennent différents membres de la superfamille du facteur de croissance transformant (TGF), facteur de croissance épidermique (EGF), facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) et le facteur inductible par l'hypoxie (HIF), etc (62).

Les tumeurs secondaires ou les métastases, histopathologiquement reliées aux tumeurs primaires, sont un argument de plus suggérant la mise en place de processus transitionnels, permettant aux cellules tumorales d'acquérir un phénotype mésenchymateux. Cependant, bien que l'EMT suggère une transdifférenciation, les cellules cancéreuses n'ont pas besoin de subir une conversion complète en un phénotype mésenchymateux pour acquérir les modifications morphologiques et phénotypiques observées dans les métastases, supportant l'hypothèse que l'EMT n'est pas un événement « tout ou rien » (62).

L'EMT a également été connectée à la résistance aux médicaments anticancéreux, notamment dans le phénomène de résistance multiple aux médicaments mais aussi la radiorésistance (63).

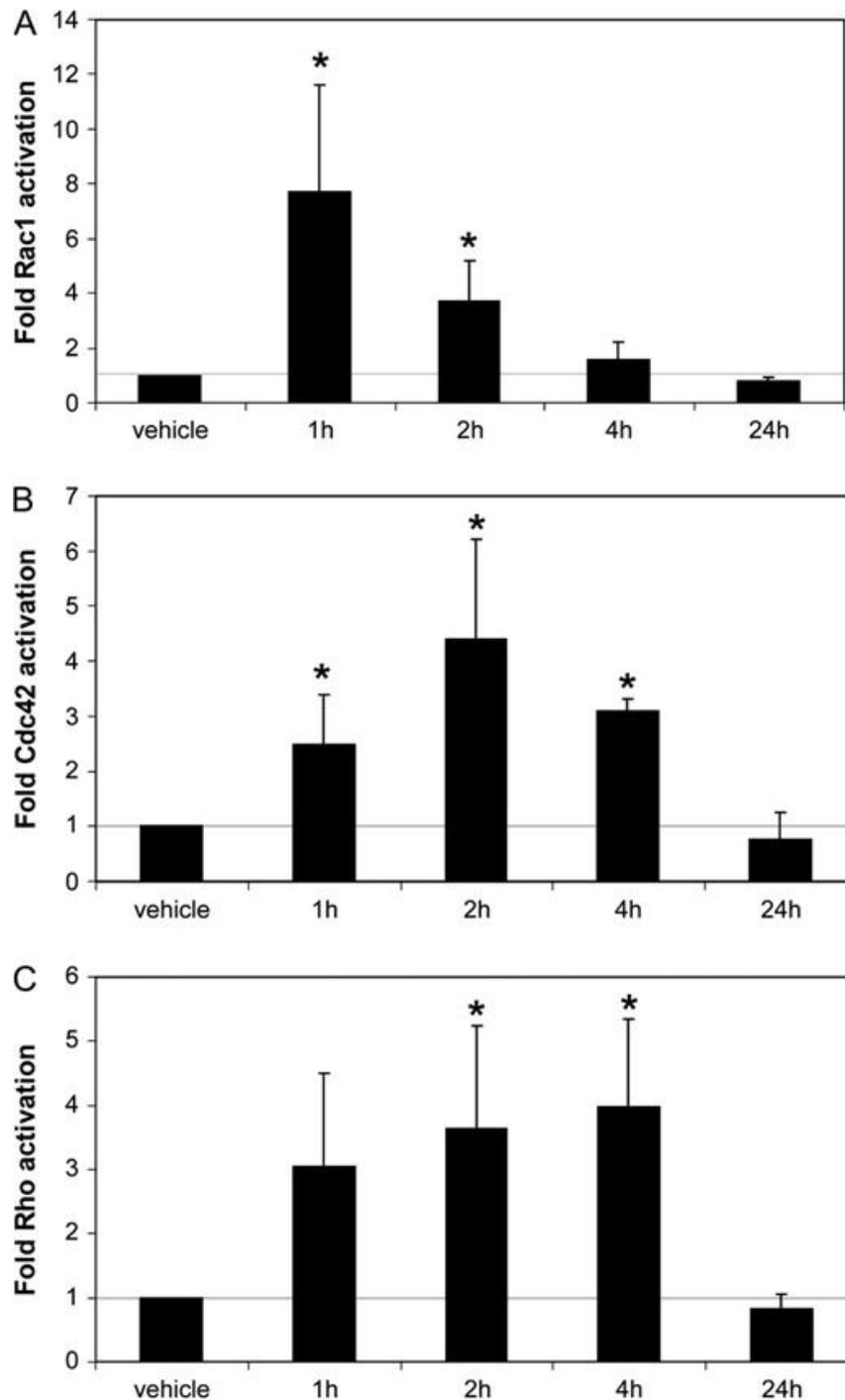
Comprendre les mécanismes sous-jacents à l'EMT dans le contexte du cancer est donc essentiel pour développer de nouvelles stratégies de traitement ciblant spécifiquement ce processus. Des recherches sont en cours pour identifier des cibles thérapeutiques susceptibles d'inhiber l'EMT et, par conséquent, de réduire la propagation métastatique des cellules cancéreuses. Ces approches pourraient ouvrir de nouvelles perspectives prometteuses dans la lutte contre le cancer avancé et métastatique.

Ceci est notamment vrai dans les gliomes, qui comme tout autre type de cancer, présentent une grande plasticité phénotypique associée à des processus de type EMT. Les composants de la transition mésenchymateuse ont souvent été proposés comme cibles thérapeutiques et/ou agents sensibilisateurs thérapeutiques, notamment dans le traitement du glioblastome adulte. Cependant, peu de données sont disponibles sur le rôle de la transition mésenchymateuse dans les HGG et les DIPG. Alors qu'un phénotype mésenchymateux n'apparaît que rarement dans le HGG supratentorial pédiatrique, des

résultats suggèrent que près de la moitié des DIPG pédiatriques sont caractérisés par la surexpression de biomarqueurs de transition mésenchymateuse, qui pourrait être responsable de la chimiorésistance intrinsèque et de la nature diffuse de ces tumeurs (64). Parmi ces marqueurs, SNAIL s'avère être un acteur clé de la transition mésenchymateuse dans les gliomes malins, y compris le DIPG. Les niveaux de SNAIL augmentent après irradiation et son expression est corrélée au grade de la tumeur et à la survie. ZEB 1 semble aussi être surexprimée dans les HGG adultes et pédiatriques entraînant un phénotype tumoral hautement infiltrant en partie lié à l'hypoxie, autre inducteur connu de la transition mésenchymateuse. L'hypoxie est un événement courant dans les tumeurs solides, y compris les gliomes. C'est une condition dans laquelle le taux de croissance des cellules cancéreuses dépasse son apport sanguin, générant des cellules privées d'oxygène, en raison d'un flux sanguin limité. Dans les cellules de glioblastome en particulier, l'hypoxie induit et maintient les caractéristiques des CS. Ces zones typiques d'hypoxie dans les gliomes ont été associées à un mauvais pronostic et ont un impact négatif sur la survie des patients.

### 3.3.2.3 Rôles établis des BMP dans l'EMT et la migration

Certaines BMP ont déjà démontré leur implication dans l'invasion cellulaire dans d'autres cellules tumorales. Au sein des cellules de mélanome, la signalisation BMP induit un phénotype agressif conduisant à une EMT et à une invasion accrue (65). Le traitement par BMP2 augmente la production d'activine A et favorise l'invasion des cellules trophoblastiques (66). De son côté, BMP4 induit une EMT et active la Rho GTPase dans les cellules cancéreuses de l'ovaire responsable de modifications de morphologie, d'adhésion, de motilité et d'invasion (67)(Figure 12). Enfin, BMP9 inhibe la migration et l'invasion des cellules d'ostéosarcome (OS) par une voie dépendante de Smad (68).



**Figure 12** - Le traitement par BMP4 entraîne une augmentation de l'activation de la Rho GTPase. (67)

Les cellules ont été traitées avec BMP4 jusqu'à 24 h (1, 2, 4 et 24 h après l'ajout de BMP4) et l'activation de la Rho GTPase (Rho, Rac1 ou Cdc42) a été évaluée. Les données sont exprimées sous la forme d'un facteur de variation de l'activation par rapport aux échantillons traités avec le véhicule apparié dans le temps. Les barres représentent l'écart type de trois expériences indépendantes menées en triple exemplaire.

La fonction cellulaire et l'importance biologique de la signalisation BMP dans un large éventail de tissus embryonnaires et adultes sont bien connues. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires afin de comprendre plus précisément leur rôle dans le développement des DIPG et notamment de leur effet synergique potentiel avec l'altération H3K27M, caractéristique des DIPG.

### 3.4 BMP et DIPG : mise en évidence d'une synergie oncogénique dans les DIPG

L'identification de la mutation *ACVR1* et du potentiel oncogénique lié à l'activation de la voie BMP en aval a posé la question de l'implication plus générale de cette voie dans la tumorigenèse des DMG, et des DIPG en particulier. Pourtant seuls 20% des DMG sont mutés pour *ACVR1* et la mutation est associée dans 80% des cas à une mutation de H3.1 (69).

L'hypothèse d'un rôle général de l'activation de la voie BMP a été envisagée dans les tumeurs mutantes non-*ACVR1* mutantes (69). Les premières données, notamment issues de la comparaison des lignées cellulaires avant et après traitement, ont conduit à suggérer que la surexpression des ligands BMP pourrait avoir un effet suppresseur de tumeur, en induisant la quiescence des cellules tumorales. En utilisant des lignées de gliomes pédiatriques génétiquement modifiées pour surexprimer H3.3K27M, l'équipe a démontré que BMP7 présente une synergie avec H3.3K27M pour maintenir l'activation de la signalisation BMP, et promouvoir un état cellulaire quiescent mais aussi invasif, présentant potentiellement des propriétés accrues de résistance aux traitements (70).

Cet état invasif résulte de l'activation de la voie des BMP dans un contexte épigénétique H3.3K27M, qui provoque l'expression d'un programme transcriptomique particulier, soutenant ce potentiel invasif. Cet état cellulaire quiescent et invasif, et présentant un haut niveau d'activation de la voie BMP, est également identifiable dans des analyses réalisées sur des échantillons de patients (71)(72)(70).

Ces données suggèrent que les altérations épigénétiques induites par H3.3K27M peuvent favoriser l'expression d'un programme oncogénique transcriptionnel piloté par la voie des BMP. Des preuves récentes issues de la caractérisation d'un panel de modèles et

de données transcriptomiques suggèrent que le ciblage de cette interaction BMP/K27M pourrait constituer une voie thérapeutique pertinente pour bloquer la dissémination des cellules tumorales et ralentir la progression de la maladie. Ainsi, définir une approche thérapeutique ciblant simultanément l'état quiescent invasif sensible aux BMP est un véritable enjeu.

Dans ce cadre, l'objectif de ma thèse a été d'avancer sur la caractérisation des modifications moléculaires induites par la voie BMP dans le contexte K27M, afin de définir des axes thérapeutiques liés à l'inactivation des voies oncogéniques en aval.

## **Partie 2 : Projet**

## 1. Introduction

L'exploration génomique et épigénomique des DIPG a mis en évidence, dans 90% des cas, des altérations des gènes codants pour deux variants de l'histone 3 : H3.3 et H3.1. Comme nous l'avons vu précédemment, ces mutations conduisent au remplacement de la lysine en position 27 par la méthionine (K27M), ce qui entraîne des altérations épigénétiques dont notamment la baisse des marques répressives triméthylées H3K27me3. Des mutations d'*ACVR1*, gène codant pour le récepteur de l'activine (ALK-2), impliqué dans la voie des BMP, sont également retrouvées, dans environ 20 % des DIPG. Ces altérations sont majoritairement associées aux mutations du variant H3.1.

De manière intéressante, l'analyse transcriptomique de l'activation de la voie des BMP ne montre pas de différence quel que soit le statut mutationnel d'*ACVR1*, suggérant un mécanisme alternatif d'activation dans les tumeurs *ACVR1* WT. Le séquençage en cellules uniques (scRNA-seq) des modèles d'organoïdes H3.3K27M mutés et *ACVR1* WT, développés au sein de l'équipe et représentatifs de l'hétérogénéité tumorale initiale, a montré l'existence d'une sous-population présentant une activation de la voie des BMP. Cette sous-population est caractérisée par un statut quiescent, des marqueurs invasifs, mais présente également un métabolisme glycolytique. A l'inverse, les autres populations cellulaires identifiées présentent un métabolisme de type OXPHOS. De plus, la comparaison du transcriptome de lignées d'astrocytomes exprimant ou non la mutation H3.3K27M et traitées aux BMP a montré un enrichissement dans les gènes reliés à la migration et l'invasion par rapport à la condition contrôle, ainsi qu'une diminution de l'expression de gènes du cycle. Ces données supportent l'idée d'un état de quiescence induit par l'activation de la voie des BMP, qui pourrait être associé à un remodelage du métabolisme cellulaire et à des capacités migratoires. Il apparaît ainsi intéressant d'explorer la mécanistique et les liens de causalité éventuels entre ces différentes observations.

Compte-tenu de ces éléments et du rôle établi des BMP dans les cancers, l'objectif de départ de mes travaux est de définir 1) si la synergie oncogénique entre BMP et K27M induit des modifications métaboliques spécifiques et 2) de définir les mécanismes moléculaires associés au phénotype invasif et d'explorer leur lien avec les BMP ou des états de stress tel que l'hypoxie.

## 2. Cibler le métabolisme OXPHOS dans les DIPG : un potentiel thérapeutique ?

### 2.1 Matériels et Méthodes

#### 2.1.1 Culture cellulaire

Afin d'étudier l'effet de l'altération K27M, nous avons utilisé une lignée commerciale d'astrocytomes de grade II, la lignée Res259, génétiquement modifiée par nos collaborateurs (73) pour exprimer 1) la mutation K27M de l'histone 3 (Res259-H3.3K27M) ou 2) la forme non-mutée de l'histone (Res259-H3.3WT). Ces modèles sont cultivés en deux dimensions en flasque T75 contenant 10mL de milieu DMEM (Gibco, 31966-021), 10% de Sérum de Veau foetal (SVF), 1% de pénicilline-streptomycine (Gibco, 11548876) et 1% de Glutamax (Gibco, 13462629).

#### 2.1.2 Conditions expérimentales

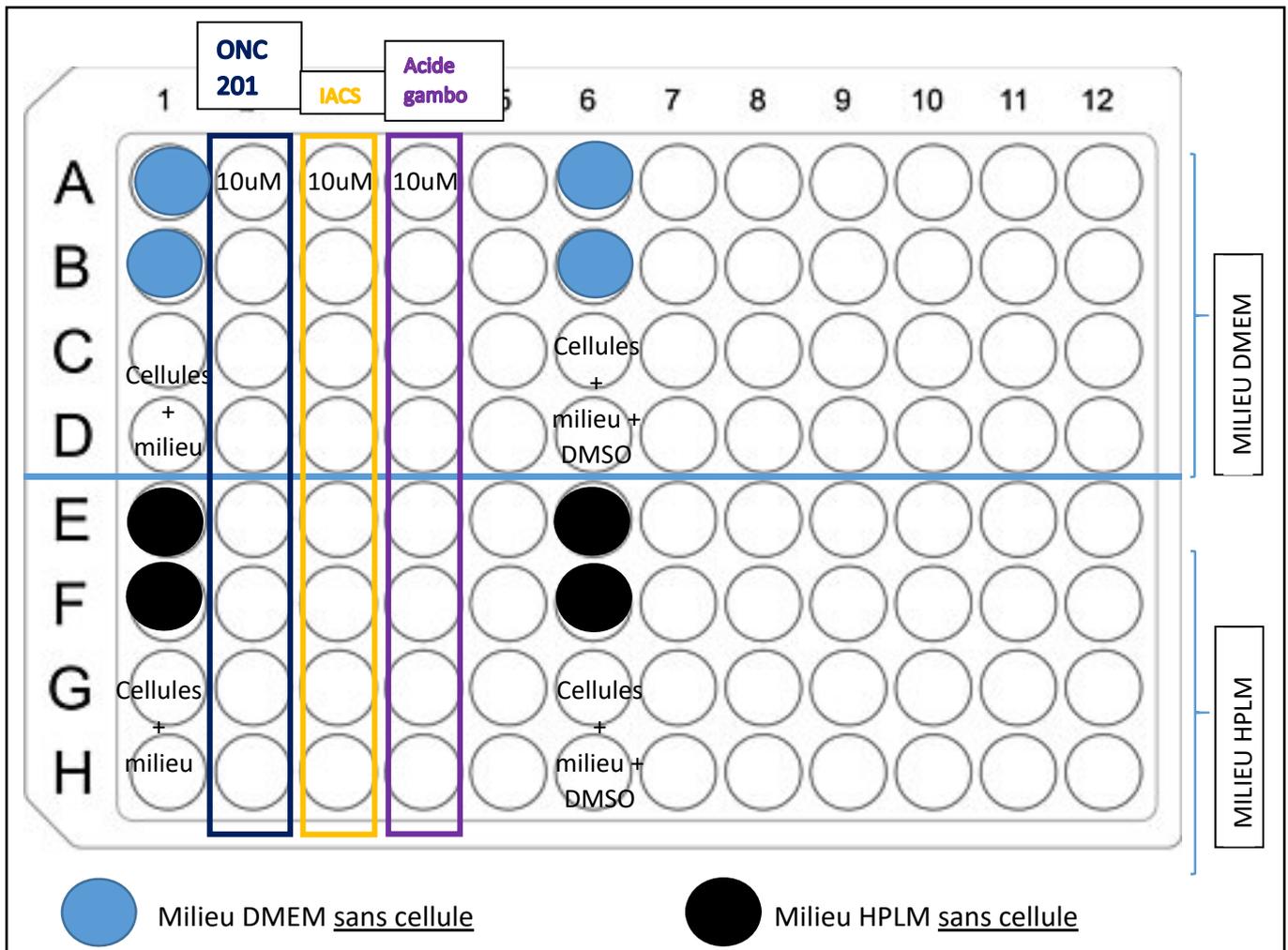
Les deux lignées Res259-H3.3WT et Res259-H3.3K27M ont été cultivées en deux dimensions en flasque T75 dans deux types de milieux différents : le milieu DMEM classiquement utilisé et le milieu HPLM (Life Techno, A4899102, formulé avec plus de 60 métabolites polaires) conçu pour ressembler à l'environnement cellulaire naturel présent dans le corps, en imitant le profil métabolique du plasma humain. Par la suite, les cellules ont étéensemencées dans une plaque 96 puits (*fond plat (2D) et fond U 7007 (3D)*) à une densité de 1'000 cellules par puits pour la culture en deux dimensions (2D) et 10'000 pour la culture en trois dimensions (3D), puis incubées pendant 24h ou 48h en normoxie. Plusieurs traitements à différentes concentrations ont ensuite été ajoutés (20uL) et les plaques ont été placées dans l'incubateur pendant 48h ou 72h (*Figure 13*).

Différentes molécules classiquement utilisées en clinique ont été testées :

- IACS-010759 10µM, inhibiteur de chaîne respiratoire
- ONC201 (Selleckchem, S7963) 10µM, molécule actuellement utilisée en clinique avec un effet potentiel sur le métabolisme des cellules tumorales.

Nous avons également utilisé un contrôle de mort cellulaire :

- Acide gambogique (Bertin Technologies, 14761) 10µM

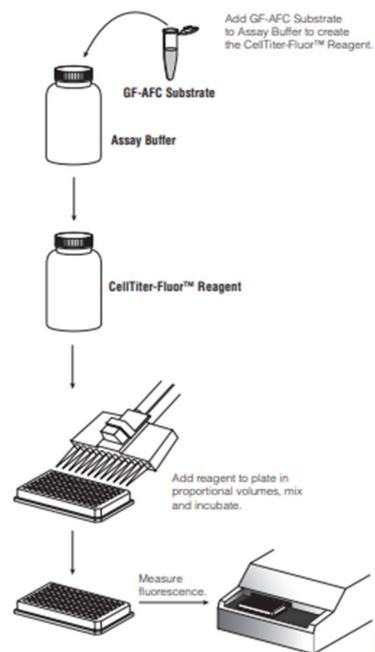


**Figure 13** - Plan de plaque représentant les différents traitements appliqués 24h ou 48h après ensemencement des lignées Res259 H3.3WT et H3.3K27M dans deux milieux différents.

### 2.1.3 Test de viabilité cellulaire - Celltiter fluor™

Le test de viabilité cellulaire CellTiter-Fluor™ (Promega, G6083) est un test de fluorescence non lytique, à réactif unique, qui mesure le nombre relatif de cellules vivantes dans une population de culture après une manipulation expérimentale. Le test CellTiter-Fluor™ mesure une activité protéasique conservée et constitutive dans les cellules vivantes et sert donc de marqueur de la viabilité cellulaire (74).

Premièrement, le substrat GF-AFC (1000X) a été ajouté au tampon permettant d'obtenir un réactif. 100  $\mu$ L du réactif a été ajouté directement dans chaque puit lorsque la culture était réalisée en 2D ou après une dissociation mécanique avec une pipette lorsque la culture était réalisée en 3D. Les plaques ont été placées à l'incubateur pendant 30 minutes et enfin la fluorescence a été mesurée au *SPARK® multimode microplate reader* (TECAN) (Figure 14).



**Figure 14** - Schéma du test de viabilité cellulaire CellTiter-Fluor™ (74)

#### 2.1.4 Test de viabilité cellulaire à la Calcéine

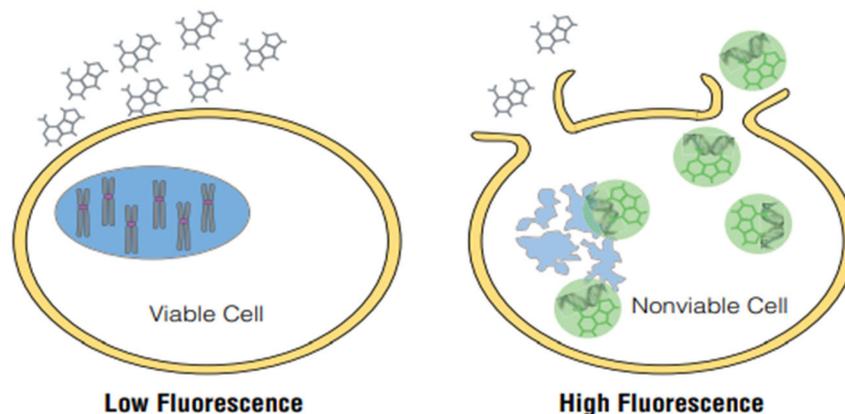
Un deuxième test a été réalisé afin de marquer les cellules vivantes grâce à la calcéine. La calcéine (Invitrogen, L3224) est un colorant perméable à la membrane permettant le marquage des cellules vivantes. En pénétrant dans la cellule, les estérases intracellulaires clivent le groupe ester d'acétoxyméthyle, ce qui donne le colorant fluorescent. Les cellules apoptotiques et mortes dont les membranes cellulaires sont compromises ne retiennent pas la calcéine. La calcéine est excitée de manière optimale à 495 nm et a un pic d'émission à 515 nm.

La fluorescence a été observée par un système d'imagerie EVOS.

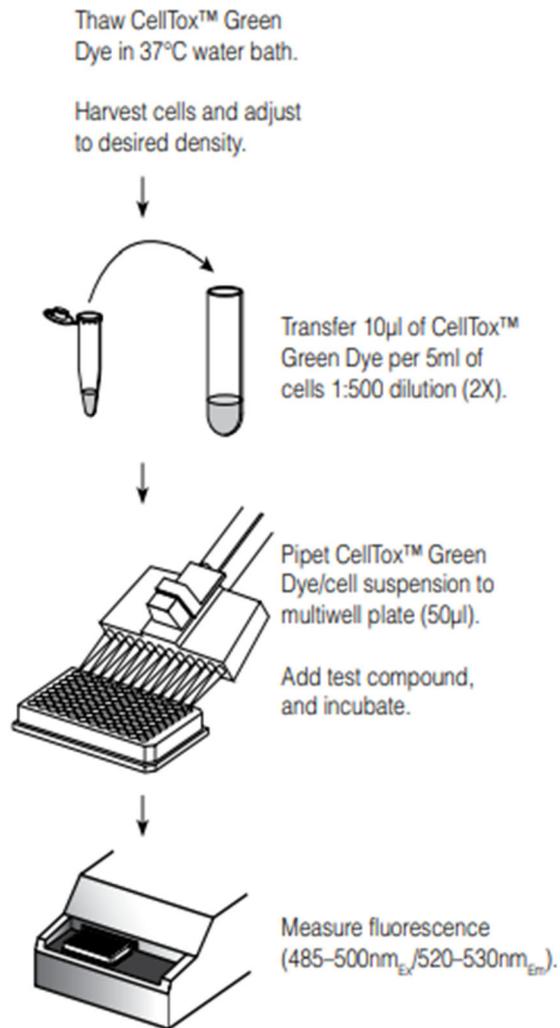
### 2.1.5 Test de cytotoxicité – CellTox Green

Le test CellTox™ Green Cytotoxicity Assay (Promega, G8731) mesure les modifications de l'intégrité membranaire résultant de la mort cellulaire. Le test est destiné à évaluer la cytotoxicité dans les cultures cellulaires après une manipulation expérimentale et peut être utilisé avec des cellules cultivées en monocouche, en suspension ou en modèle 3D. Le système d'essai utilise un colorant cyanine asymétrique qui est exclu des cellules viables mais qui colore préférentiellement l'ADN des cellules mortes (Figure 15). Lorsque le colorant se lie à l'ADN des cellules mortes, les propriétés fluorescentes du colorant sont considérablement renforcées. Les cellules viables ne produisent pas d'augmentation sensible de la fluorescence.

Le colorant a été directement ajouté dans le milieu DMEM ou HPLM, en même temps que les différents traitements. Les cellules cultivées en trois dimensions ont ensuite été incubées et placées dans un système d'imagerie Cellcyte X™ permettant un suivi de croissance dans le temps (photos toutes les 6 heures pendant 48h ou 96h). Et la fluorescence a été mesurée au SPARK® multimode microplate reader (TECAN) à 48h ou 72h (Figure 16). Le signal fluorescent obtenu est proportionnel à la mort cellulaire.



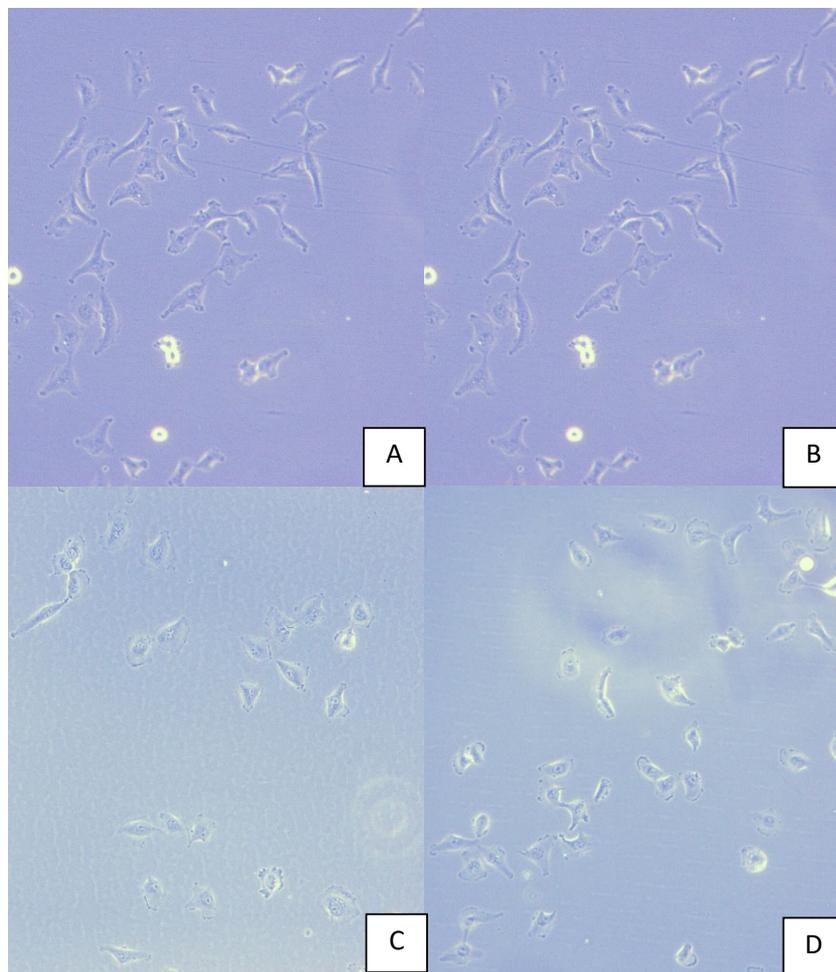
**Figure 15** - Le colorant vert CellTox™ se lie à l'ADN des cellules dont l'intégrité membranaire est altérée. (75)



**Figure 16** - Schéma des méthodes d'administration du colorant vert CellTox™ (75)

## 2.2 Résultats

Le milieu HPLM est plus proche du milieu physiologique et permet d'obtenir des résultats plus extrapolables au comportement des cellules dans l'organisme humain en permettant notamment de s'affranchir des biais liés aux milieux classiques, anormalement riches en glucose et/ou glutamine. J'ai commencé par définir si la culture des cellules Res259-H3.3WT et Res259-H3.3K27M était possible dans le milieu HPLM et si elle entraînait une différence de croissance et de morphologie. Aucune différence n'a été constatée concernant la forme, la croissance et la viabilité cellulaire, et ce sur une durée prolongée de culture cellulaire (*Figure 17*).



**Figure 17** - Image de microscopie représentant la confluence et la forme des cellules Res259-H3.3WT et Res259-H3.3K27M en fonction du milieu.

A – Res259-H3.3WT, milieu DMEM ; B – Res259-H3.3K27M, milieu DMEM ; C – Res259-H3.3WT, milieu HPLM ; D – Res259-H3.3WT, milieu HPLM

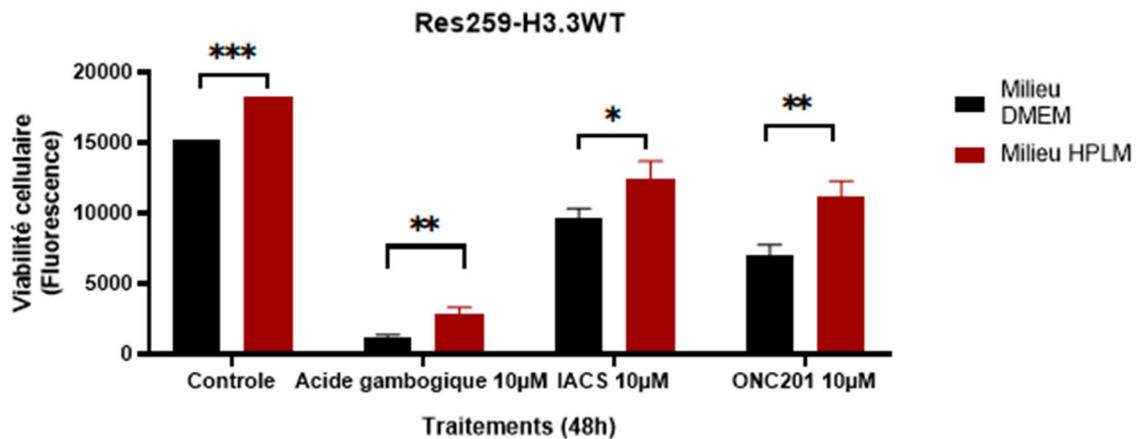
Afin d'évaluer l'impact de la mutation K27M sur la sensibilité à des inhibiteurs métaboliques, j'ai ensuite évalué l'impact du IACS, un inhibiteur classique de la chaîne respiratoire et testé en clinique, en comparaison avec le composé actuellement utilisé, l'ONC 201 sur les lignées mutées ou non, dans les deux milieux (*Figures 18 et 19*).

Les molécules utilisées comme contrôle positif de mort induisent une diminution de la viabilité d'un facteur 12,3 et 6,46 dans les modèles H3.3WT cultivés respectivement en milieu classique ou en milieu HPLM. Les modèles H3.3K27M résistent légèrement plus à la mort, avec une diminution de la viabilité d'un facteur 4,16 et 2,9 en milieu classique et HPLM.

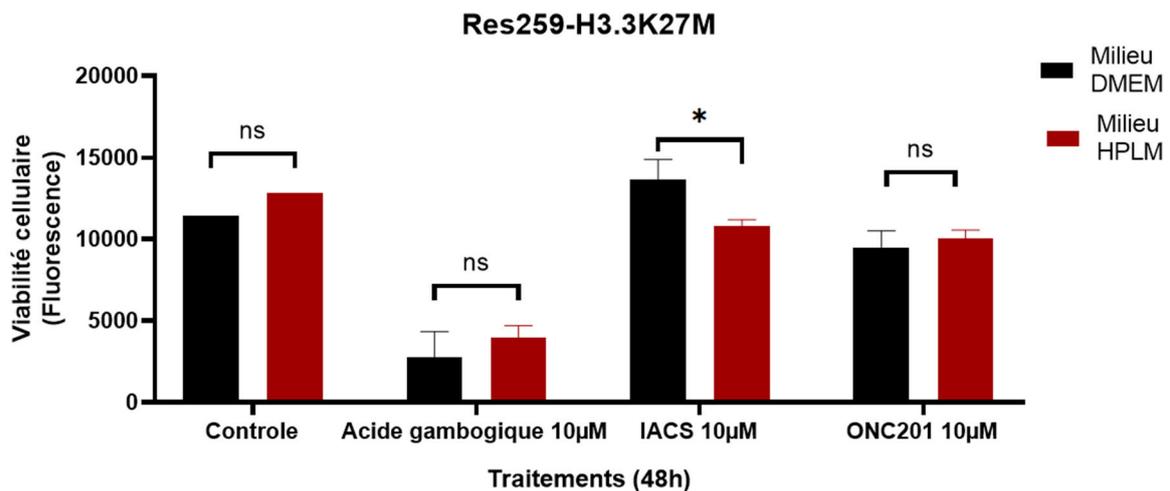
Le IACS, tout comme l'ONC201, induisent une diminution de la viabilité cellulaire d'un facteur 1.5 environ sur les cellules H3.3WT mais ne présentant quasiment aucun effet sur les cellules H3.3K27M. Les mêmes résultats ont pu être observés visuellement lors du test de viabilité à la Calcéine (*Figure 20*).

Dans les cellules H3.3WT, une survie plus élevée est observée dans le milieu HPLM (p-value = 0,0233, unpaired t-test with Welch's correction). Les différences de survie observées dans la lignée mutée sont, elles, non significatives. L'enrichissement en glucose semble favoriser la sensibilité des cellules mutées aux inhibiteurs métaboliques : l'IACS provoque une diminution de la viabilité d'un facteur 1,56 en milieu classique contre 1,46 en milieu HPLM (p-value = 0.036, unpaired t-test with Welch's correction).

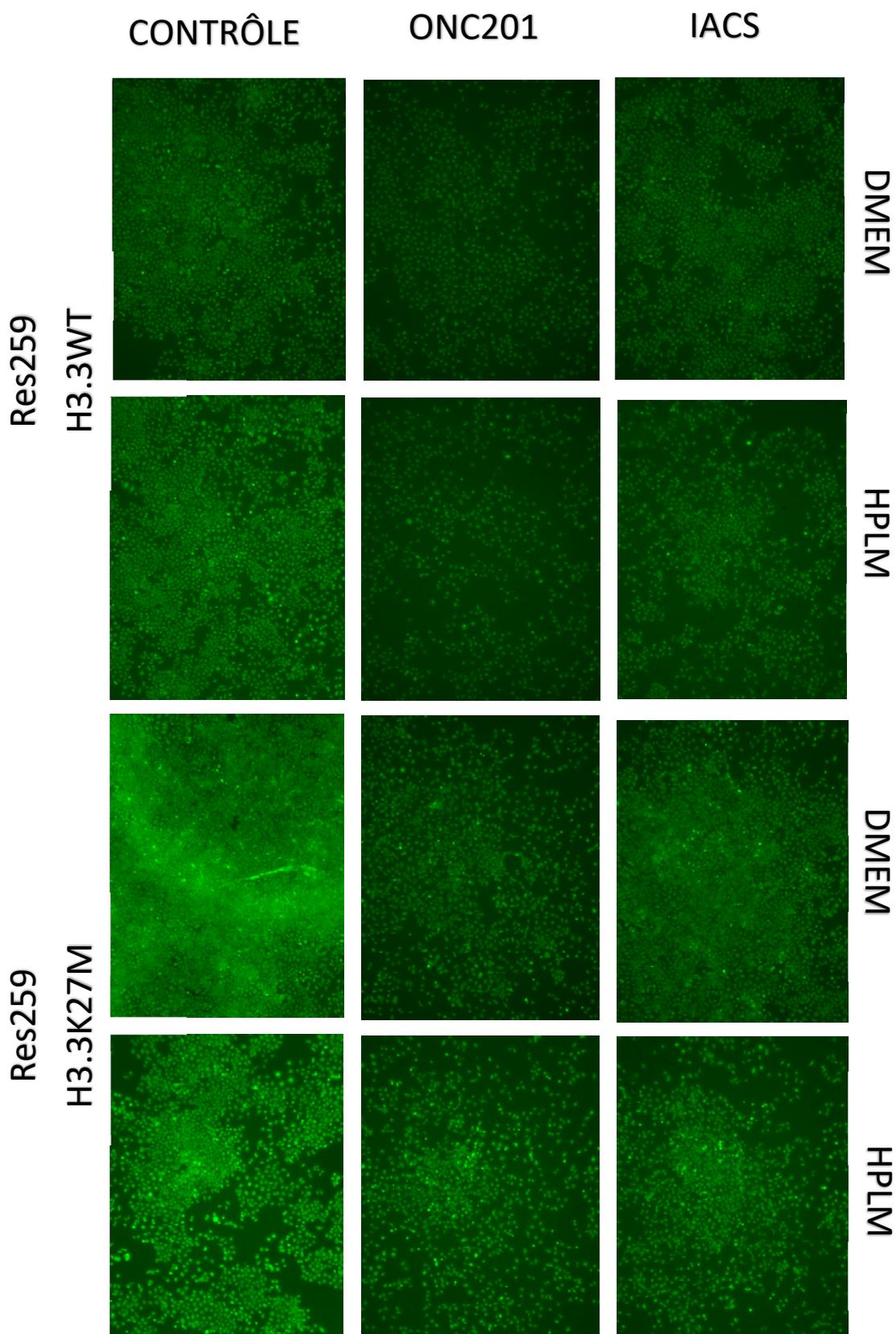
Comparé à l'ONC201, l'IACS présente une efficacité anti-tumorale légèrement inférieure aux doses testées. En effet, la viabilité est diminuée d'un facteur 2.18 avec 10 $\mu$ M d'ONC201 (p-value = 0.003, unpaired t-test with Welch's correction), contre seulement 1,57 fois avec 10 $\mu$ M de IACS (p-value = 0.005, unpaired t-test with Welch's correction) dans la lignée non mutée en milieu classique.



**Figure 18** – Résultats du test de viabilité cellulaire Celltiter Fluor™ après 48h de traitement sur la lignée Res259-H3.3WT cultivée en deux dimensions.  
 Résultats : moyenne+/- écart-type de n=3 expériences (contrôle, n=2).  
 (\* : p-value<0.05, \*\* : p-value<0.01, \*\*\* : p-value<0.001)



**Figure 19** – Résultats du test de viabilité cellulaire Celltiter Fluor™ après 48h de traitement sur la lignée Res259-H3.3K27M cultivée en deux dimensions.  
 Résultats : moyenne+/- écart-type de n=3 expériences (contrôle, n=2).  
 (\* : p-value<0.05, \*\* : p-value<0.01, \*\*\* : p-value<0.001)



**Figure 20** – Résultats du test de viabilité cellulaire à la calcéine. La fluorescence verte est un marqueur des cellules vivantes.

Nous avons cherché à définir si ces tendances étaient observables sur des cultures en 3D, qui miment mieux le comportement de la tumeur. La culture en trois dimensions des lignées Res259-H3.3WT et Res259-H3.3K27M s'est avérée délicate. En effet, il a été décidé, dans un premier temps, de reproduire exactement les conditions de manipulation effectuées en deux dimensions. Cependant, nous avons remarqué que les cellules mettent du temps à s'agréger. De ce fait, le traitement après 24h d'incubation était trop précoce. Nous avons essayé d'adapter les conditions expérimentales selon le schéma expérimental suivant : 48h d'incubation avant traitement et 96h d'incubation avec traitement avant révélation, suivies d'une révélation au test CellTox™ Green Cytotoxicity Assay seulement. La fluorescence étant proportionnelle à la mort cellulaire, il est possible de voir une efficacité des deux molécules testées dans les deux milieux (*Figures 21 et 22*).

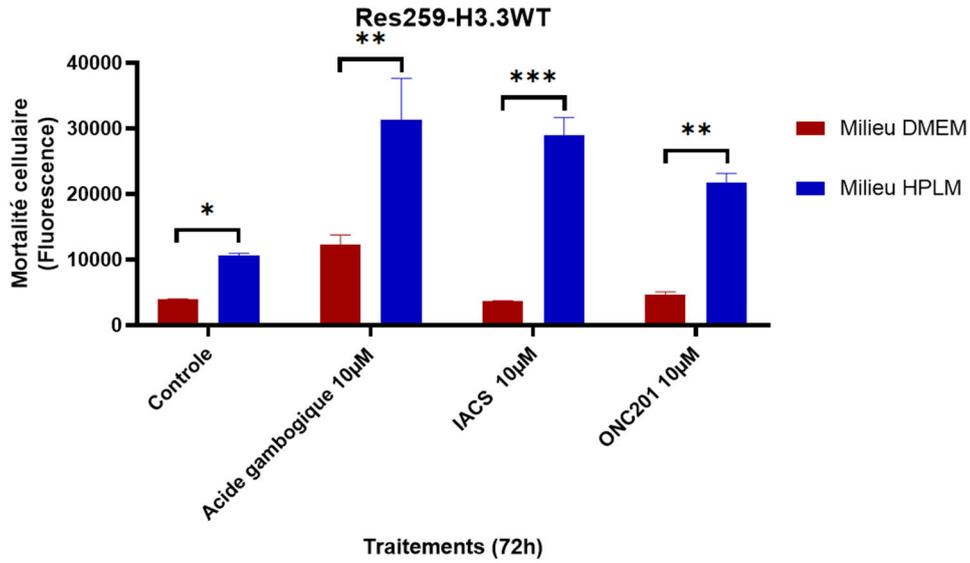
Les contrôles de mort induisent une augmentation de la mortalité d'un facteur 3,07 et 2,96 dans les modèles H3.3WT cultivés respectivement en milieu classique ou en milieu HPLM, et d'un facteur de 2,14 et 4,67 en milieu classique et HPLM pour les lignées mutées.

De manière générale, une augmentation significative de la mortalité est observée dans le milieu HPLM pour les 2 lignées, excepté pour la lignée mutée traitée à l'ONC201.

Concernant le traitement au IACS, une augmentation d'un facteur de 2,96 (p-value = 0.0007, unpaired t-test with Welch's correction) de la mortalité cellulaire est observée dans la lignée WT mais seulement dans le milieu HPLM. Pour la lignée K27M, le IACS augmente la mortalité cellulaire d'un facteur de 3,48 pour le milieu HPLM contre seulement 1,27 (p-value = 0.001, unpaired t-test with Welch's correction) pour le milieu classique. Ainsi, il semblerait que le IACS soit efficace sur les lignées cultivées en 3D, avec une modulation de son activité selon le milieu de culture utilisé.

De son côté, l'ONC201 provoque aussi une augmentation significative de la mortalité cellulaire dans les deux lignées, de 1,17 et 2,04 pour les WT et 1,41 et 1,90 pour les K27M, respectivement pour les milieux DMEM et HPLM.

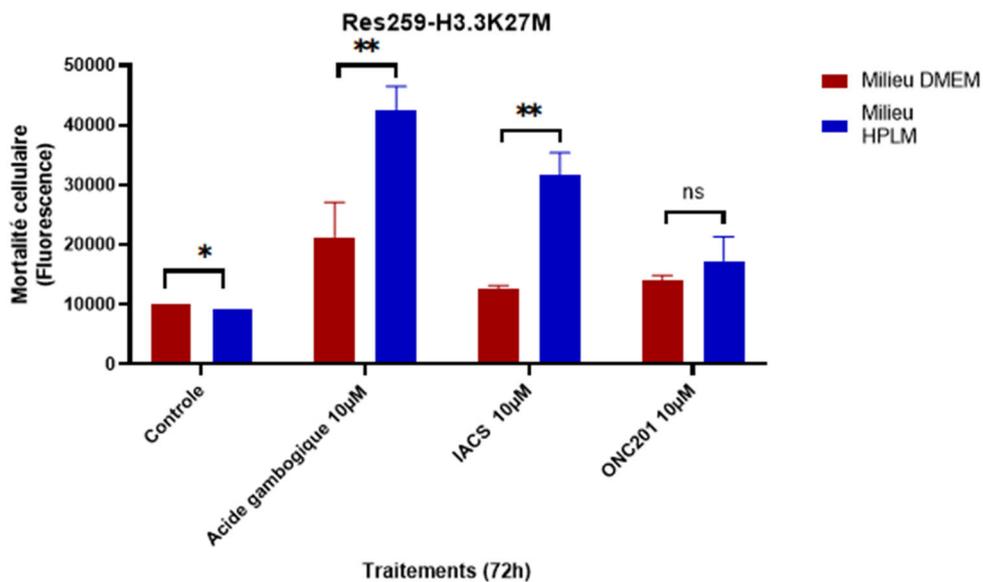
Nous avons pu observer les mêmes résultats visuellement sur les photos des sphères (*Figure 23*) réalisées à la fin de la manipulation (96h post traitement).



**Figure 21** – Résultats du Green Cytotoxicity Assay™ après 72h de traitement sur la lignée Res259-H3.3WT cultivée en trois dimensions.

Résultats : moyenne+/- écart-type de n=3 expériences (contrôle, n=2).

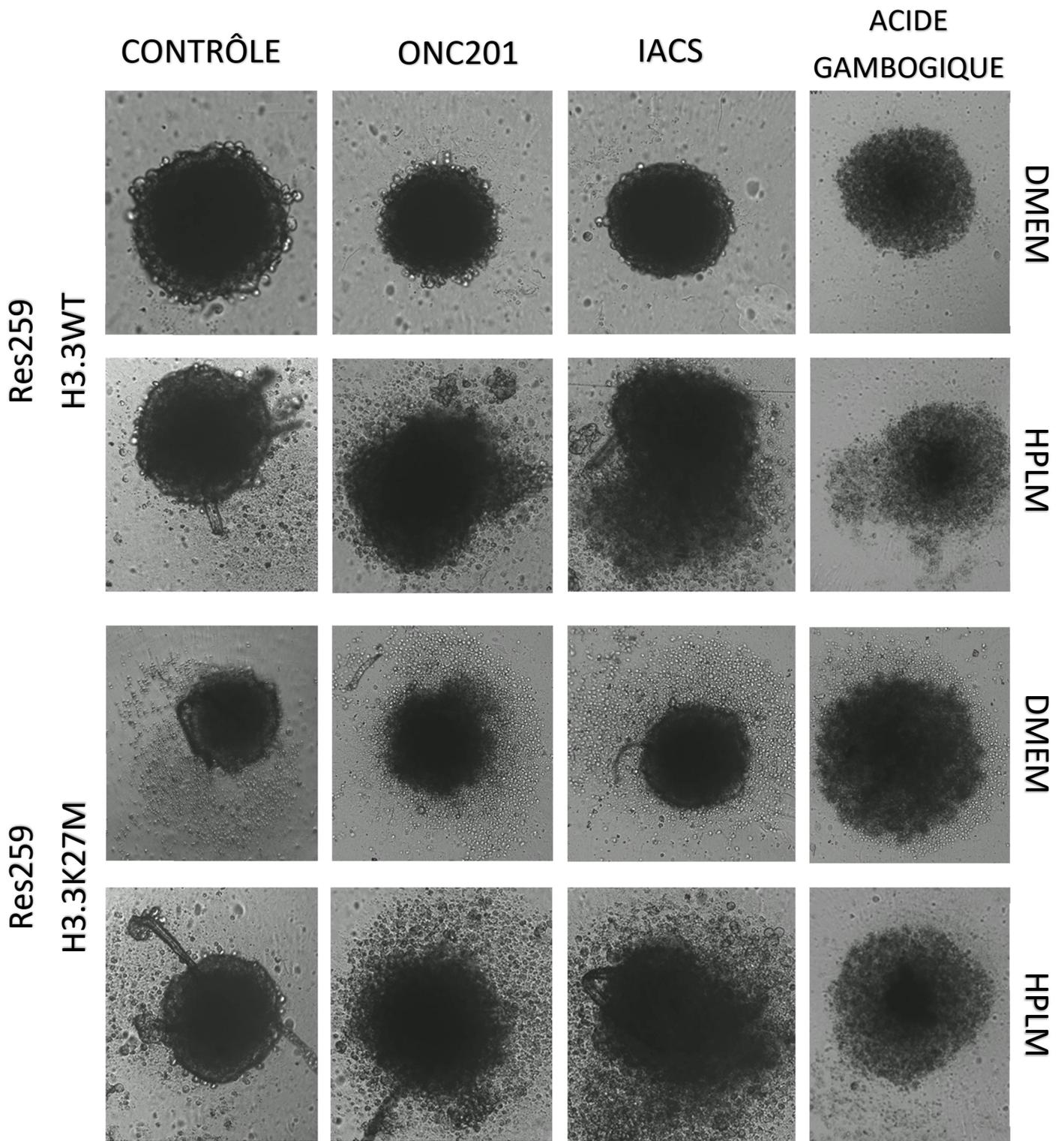
(\* : p-value<0.05, \*\* : p-value<0.01, \*\*\* : p-value<0.001)



**Figure 22** – Résultats du Green Cytotoxicity Assay™ après 72h de traitement sur la lignée Res259-H3.3K27M cultivée en trois dimensions.

Résultats : moyenne+/- écart-type de n=3 expériences.

(\* : p-value<0.05, \*\* : p-value<0.01, \*\*\* : p-value<0.001)



**Figure 23** - Photos des sphères placées dans un système d'imagerie Cellcyte X<sup>TM</sup>, 96h après le traitement.

## 2.3 Discussion

Notre objectif était ici de définir la sensibilité de nos modèles d'étude à un inhibiteur métabolique, le IACS, en fonction des conditions de culture et par rapport au traitement standard, l'ONC201. Nos données indiquent que les conditions de culture influent de manière significative sur la sensibilité des cellules aux traitements.

En particulier, les cellules K27M sont totalement résistantes aux molécules testées lorsqu'elles sont cultivées en 2D, alors qu'une sensibilité au IACS est observée en 3D. Ceci pourrait résulter d'une plus forte dépendance au métabolisme OXPHOS, devenu limitant par suite d'un cœur hypoxique créé par la modélisation en 3D. Des différences sont également observées entre les milieux de culture, avec des effets contrastés puisque l'efficacité des molécules est plus importante dans le milieu DMEM pour la culture 2D des cellules H3.3 WT, alors que l'efficacité est supérieure dans le milieu HPLM si les cellules sont cultivées en 3D. Ceci suggère des switchs métaboliques en fonction des conditions de culture utilisées, créant des susceptibilités différentes aux inhibiteurs testés et compliquant de fait l'extrapolation des données dans un cadre pré-clinique. Ces données justifient de fait le recours à des systèmes modélisant au plus près les conditions observées chez les patients, qu'ils s'agisse du milieu de culture (glucose/glutamine), de l'hypoxie, ou des contraintes mécaniques et des communications entre cellules (2D/3D) par exemple.

### 3. Impact de l'activation de la voie des BMP sur l'état métabolique des DIPG

#### 3.1 Matériels et Méthodes

##### 3.1.1. Culture cellulaire

Plusieurs lignées cellulaires ont été cultivées au sein du laboratoire pour la réalisation des différentes manipulations.

Des sphéroïdes, modèles 3D récapitulant l'hétérogénéité tumorale ont été établis à partir de lignées. Ces lignées, HSJD-DIPG-012 et HSJD-DIPG-013 (*Tableau 1*), ont été dérivées de biopsies tumorales de patients atteints de DIPG au sein de l'Hôpital Sant Jeu de Dèu en Espagne. La culture et l'amplification de ces lignées suit un protocole mis au point au sein du laboratoire, avec utilisation d'un milieu de culture adapté à la dérivation de tumoroides (confidentiel).

La lignée commerciale d'astrocytomes (Res259) génétiquement modifiée par nos collaborateurs, précédemment décrite, a aussi été utilisée.

**Tableau 1** – Description des lignées cellulaires utilisées

Lignées	Diagnostic	Âge du patient	Grade OMS	Mutation K27M	Mutation ACVR1	Mutation TP53
HSJD-DIPG-012	DIPG	6 ans	IV	Oui	Non	Oui
HSJD-DIPG-013	DIPG	6 ans	IV	Oui	Non	Oui

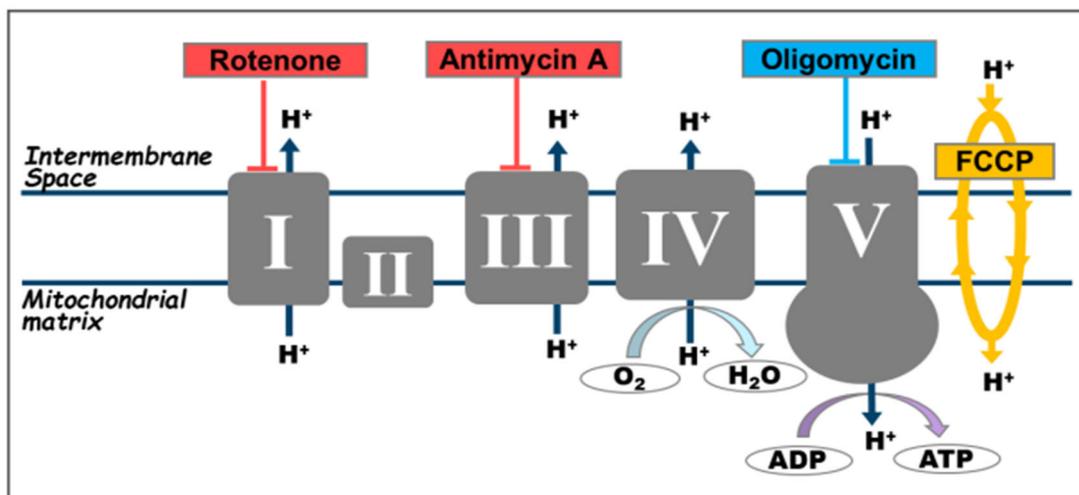
##### 3.1.2 Seahorse ou test de stress mitochondrial

Le test de stress mitochondrial est une méthode courante pour mesurer les paramètres clés de la respiration mitochondriale, la glycolyse et la production d'ATP en temps réel dans des cellules vivantes (Seahorse XFe96 Analyzer, Agilent). Cette analyse consiste en la mesure du taux de consommation d'oxygène (OCR) et du taux d'acidification extracellulaire (ECAR) à des intervalles réguliers (5-8 minutes). L'OCR est un indicateur de la respiration mitochondriale et l'ECAR est en grande partie le résultat de la glycolyse (77).

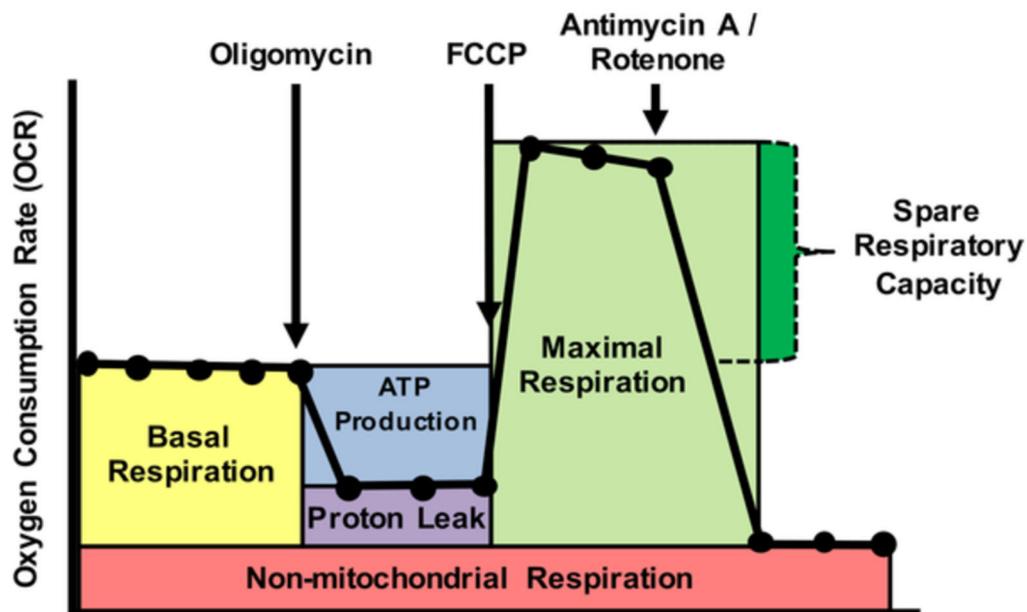
Le test de stress mitochondrial commence par une mesure initiale du taux de consommation d'oxygène (OCR) des cellules, correspondant à la somme de la respiration mitochondriale basale et de la respiration non mitochondriale. L'ajout d'oligomycine,

inhibiteur de l'ATP synthase, aussi nommé complexe V de la chaîne mitochondriale, bloque la production d'ATP et le retour des protons, provoquant de ce fait une hyperpolarisation rapide de la membrane mitochondriale. Cette hyperpolarisation empêche le pompage ultérieur de protons à travers les complexes respiratoires, diminuant la fréquence respiratoire et de ce fait la consommation d'oxygène. Cette étape permet de mesurer la respiration mitochondriale résiduelle. Cette respiration résulte de la fuite de protons, à travers d'autres canaux.

Par la suite le cyanure de carbonyle-4 (trifluorométhoxy) phénylhydrazine (FCCP), un agent de découplage qui abaisse le gradient de proton et perturbe le potentiel membranaire mitochondrial, est injecté. L'OCR mesuré, stimulé par le FCCP, peut ensuite être utilisé pour calculer la capacité respiratoire de réserve, définie comme la différence entre la respiration maximale et respiration basale. La capacité respiratoire de réserve est une estimation de la capacité de la cellule à répondre à une demande énergétique accrue ou sous contrainte. Enfin, la dernière étape consiste en l'ajout de roténone (inhibiteur du complexe I) et d'antimycine A (inhibiteur du complexe III) bloquant totalement la respiration mitochondriale. La consommation d'oxygène mesurée à cet instant n'est donc pas due à l'activité mitochondriale mais aux enzymes cellulaires et pourra être retranchée des valeurs précédemment acquises pour définir l'OCR des différents types de respirations mitochondriales (Figures 24-25).



**Figure 24** - Cibles de chacun des composés utilisés dans la chaîne de transport d'électrons.(77)



**Figure 25** - Illustration des niveaux d'OCR (axe y) par rapport au temps (axe x). L'injection des trois composés oligomycine, FCCP et antimycine A/roténone délimite quatre intervalles de temps à l'intérieur desquels l'OCR est à peu près constant. (77)

### 3.1.3 Test de viabilité cellulaire au CellTiter-Fluor™

Le test de viabilité cellulaire Celltiter fluor™ précédemment décrit a été utilisé pour mesurer la viabilité cellulaire à la suite de l'ajout des différents traitements sur les deux lignées. 100uL du réactif a été ajouté directement dans chaque puit. Les plaques ont été placées à l'incubateur pendant 30 minutes et enfin la fluorescence a été mesurée au SPARK® multimode microplate reader (TECAN). La fluorescence obtenue est inversement proportionnelle à la mort cellulaire.

### 3.1.4 Objectif

Notre objectif ici était de définir l'impact potentiel de la modulation de la voie BMP sur le métabolisme des cellules tumorales de DIPG, puisque nous avons observé dans nos données de single-cell transcriptomique que l'activation de la voie BMP était corrélée à un

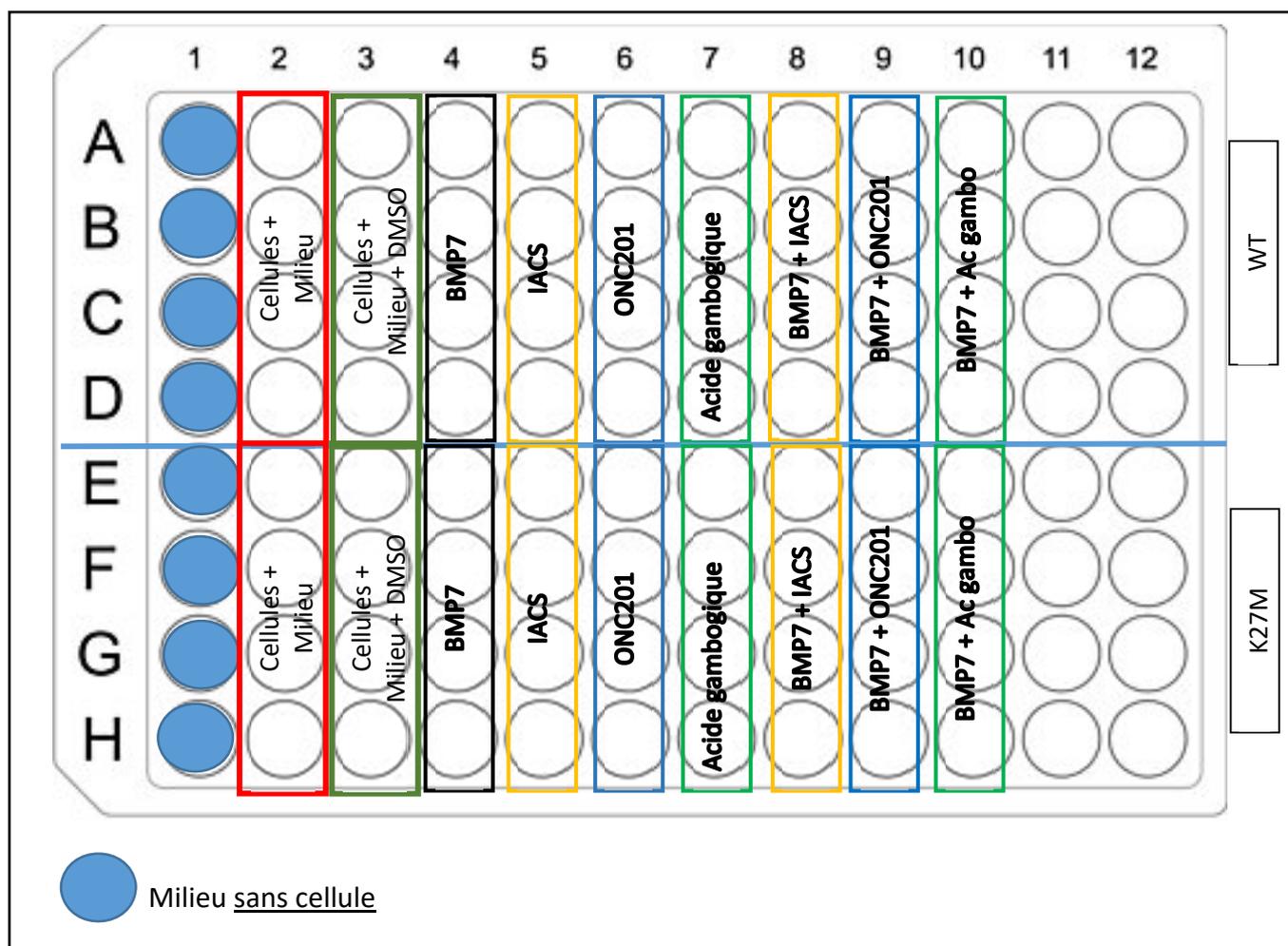
état glycolytique dans nos cellules. Pour cela, nous avons utilisés deux approches. Nous avons premièrement évalué l'impact de la voie BMP sur le métabolisme OXPHOS.

Plusieurs conditions expérimentales ont été étudiées sur les deux lignées HSJD-DIPG012 et HSJD-DIPG013 lors de la réalisation du test Seahorse. Les cellules ont été traitées avec différentes molécules :

- BMP2 (Human BMP-2, Peprtech, 120-02C), 10ng/mL, molécule activatrice d'un récepteur de la voie des BMP et surexprimée dans les DIPG
- BMP7 (Human BMP-7, Peprtech, 120-03P), 50ng/mL, molécule activatrice d'un récepteur de la voie des BMP et surexprimée dans les DIPG
- LDN 193189 hydrochloride (SML0559-5MG), 1 $\mu$ M, un inhibiteur des BMP
- ONC201 (Selleckchem, S7963), 10 $\mu$ M

Dans une seconde série d'expériences, l'effet de BMP7 sur les deux lignées Res259-H3.3WT et Res259-H3.3-K27M, cultivées en 2D, a été étudié en présence de traitements ciblant le métabolisme énergétique, le IACS et l'ONC201 (*Figure 26*). Cette expérience permet de déterminer si la sensibilité des cellules à ce type de molécules peut être médiée par la voie des BMP :

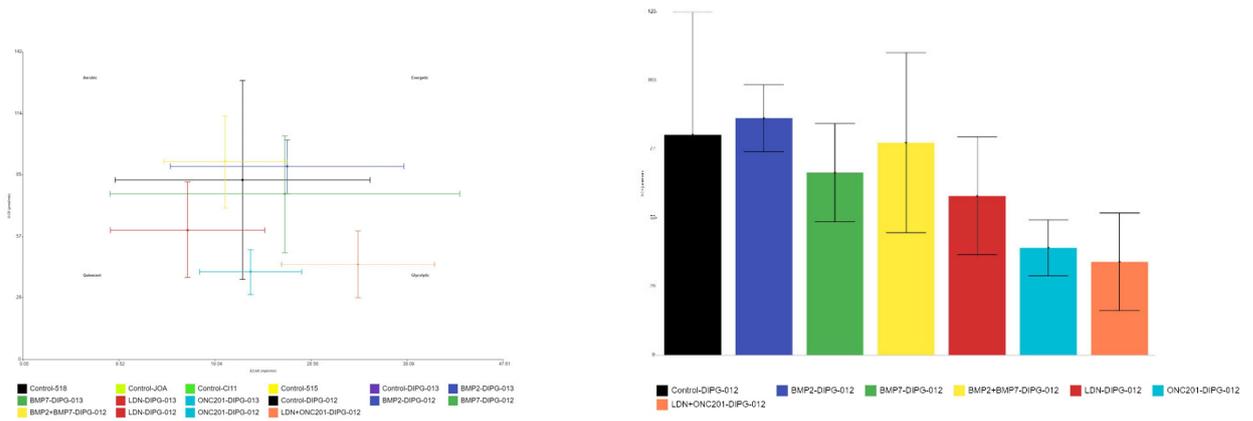
- BMP7, 50ng/mL
- IACS-010759, 10 $\mu$ M
- ONC201, 10 $\mu$ M
- Acide gambogique, 10 $\mu$ M : contrôle positif de mort cellulaire



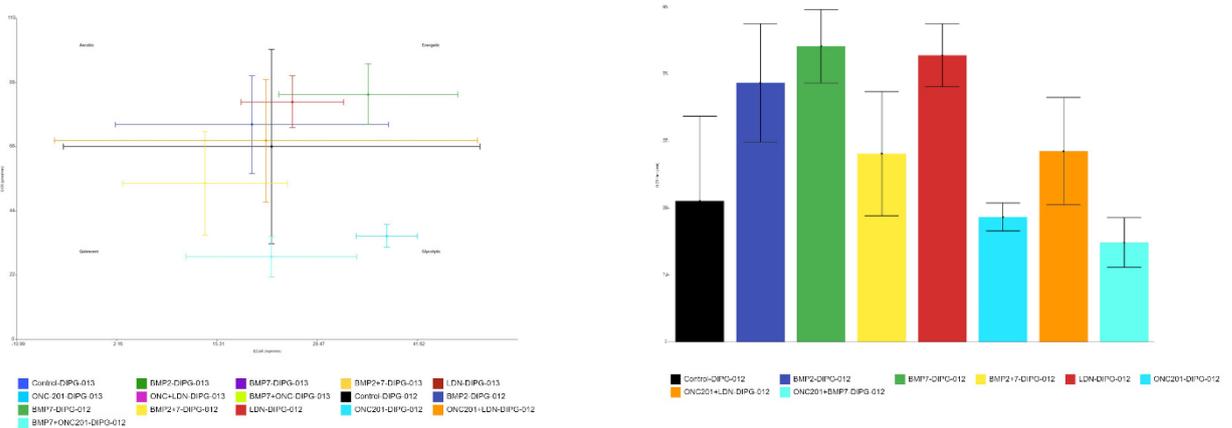
**Figure 26** - Plan de plaque représentant les différents traitements appliqués 24h après incubation des lignées Res259 H3.3WT et H3.3K27M

### 3.2 Quel est l'impact de la voie BMP sur le métabolisme OXPHOS ?

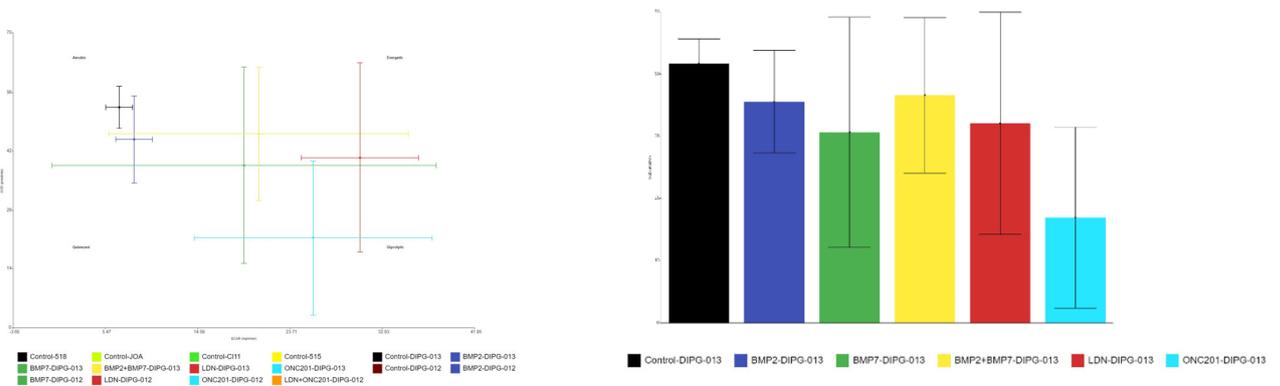
Le test de Seahorse a permis d'étudier les changements métaboliques dus à la présence des BMP. Dans les différentes conditions testées pour les deux lignées HSJD-DIPG-012 et HSJD-DIPG-013, aucune différence significative n'a pu être retrouvée concernant l'OCR et l'ECAR lors de l'ajout de BMP2, de BMP7 et de LDN dans les deux expériences de Seahorse. Une légère baisse de l'OCR semble être provoquée par l'ONC 201, mais aucun effet additionnel de l'ajout de BMP ou de LDN n'a pu être relevé (Figure 27). L'ONC 201 pourrait provoquer un léger switch métabolique glycolytique mais la présence de BMP ne semble pas influencer ce changement.



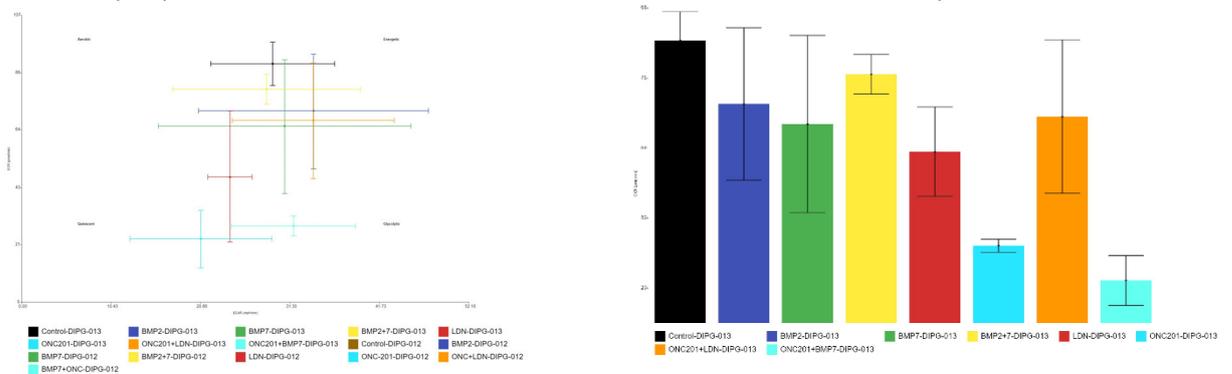
A. Graphiques des variations de l'OCR et de l'ECAR de DIPG-012 lors de l'expérience SeaH1



B. Graphiques des variations de l'OCR et de l'ECAR de DIPG-013 lors de l'expérience SeaH1



C. Graphiques des variations de l'OCR et de l'ECAR de DIPG-012 lors de l'expérience SeaH2



D. Graphiques des variations de l'OCR et de l'ECAR de DIPG-013 lors de l'expérience SeaH2

**Figure 27 – Résultats des tests de stress mitochondrial (SeaH1 et SeaH2)**

### 3.3 Quel est l'impact de la voie BMP sur le ciblage thérapeutique de la chaîne respiratoire ?

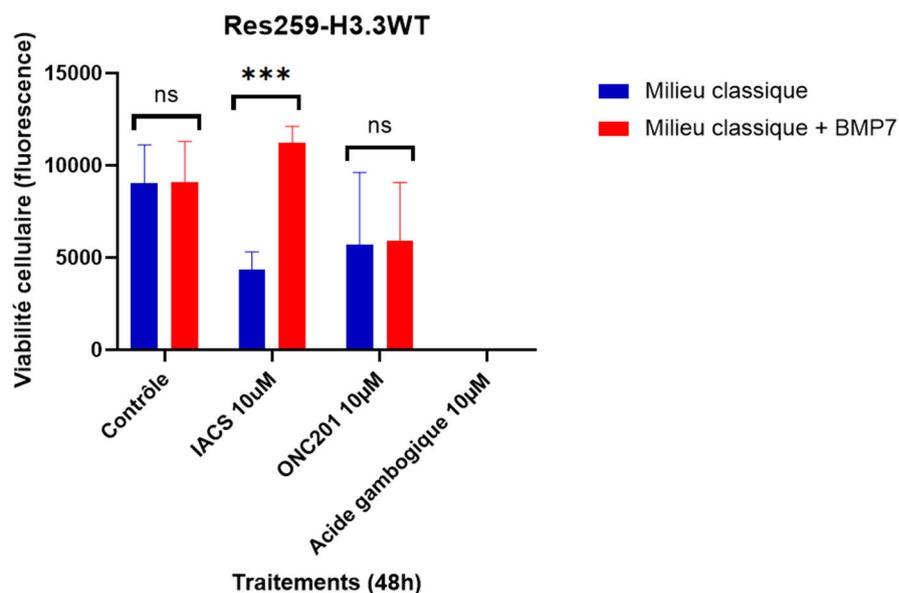
Les cellules souches de gliome présentent un métabolisme plutôt OXPHOS. Cibler ce métabolisme via l'utilisation de IACS a pu être présenté comme une stratégie thérapeutique potentielle. Afin de poursuivre l'exploration de notre hypothèse initiale, à savoir la possibilité d'un remodelage métabolique par une activation de la voie des BMP (80), nous nous sommes demandés si l'ajout de BMP dans l'environnement cellulaire pouvait moduler l'efficacité de ces différents inhibiteurs (*Figures 28 et 29*).

Les contrôles de mort induisent une diminution totale de la viabilité en présence ou non de BMP7.

De manière générale, une diminution de la viabilité cellulaire est observée dans les deux lignées pour les différents traitements sans ajout de BMP7, quoique plus légère dans la lignée K27M (diminution de la viabilité d'un facteur de 2,08 et 1,59 respectivement pour le traitement par IACS et ONC201 pour la lignée WT, et d'un facteur de 1,3 et 1,47 pour la lignée K27M).

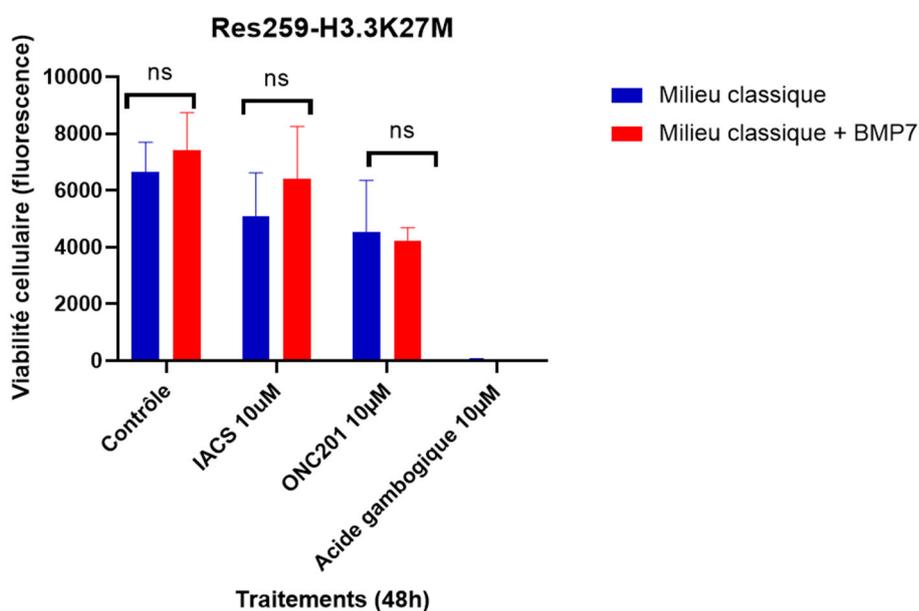
De manière intéressante, l'ajout de BMP7 diminue la sensibilité des cellules WT à l'IACS, avec une augmentation de la viabilité cellulaire d'un facteur de 2,57 (p-value = 4.8E-5, unpaired t-test) pour la lignée WT par rapport au traitement IACS seul. L'effet est plus modéré pour les cellules K27M, compte-tenu de leur plus forte résistance intrinsèque au IACS.

En revanche, l'effet de l'ONC201 ne semble pas être modulé par l'ajout de BMP7 dans le milieu. En effet, dans la lignée WT une diminution de la viabilité cellulaire d'un facteur de 1,59 est observée contre 1,54 lors de l'ajout de BMP7. Il en est de même pour la lignée mutée qui présente une diminution de la viabilité cellulaire d'un facteur de 1,47 sans BMP7 et 1,75 avec BMP7.



**Figure 28** – Résultats du test de viabilité cellulaire Celltiter Fluor™ après 48h de traitement sur la lignée Res259-H3.3WT cultivée en deux dimensions dans un milieu DMEM seul ou DMEM+BMP7. Résultats : moyenne±/± écart-type de n=3 expériences.

(\* : p-value<0.05, \*\* : p-value<0.01, \*\*\* : p-value<0.001)



**Figure 29** – Résultats du test de viabilité cellulaire Celltiter Fluor™ après 48h de traitement sur la lignée Res259-H3.3K27M cultivée en deux dimensions dans un milieu DMEM seul ou DMEM+BMP7. Résultats : moyenne±/± écart-type de n=3 expériences.

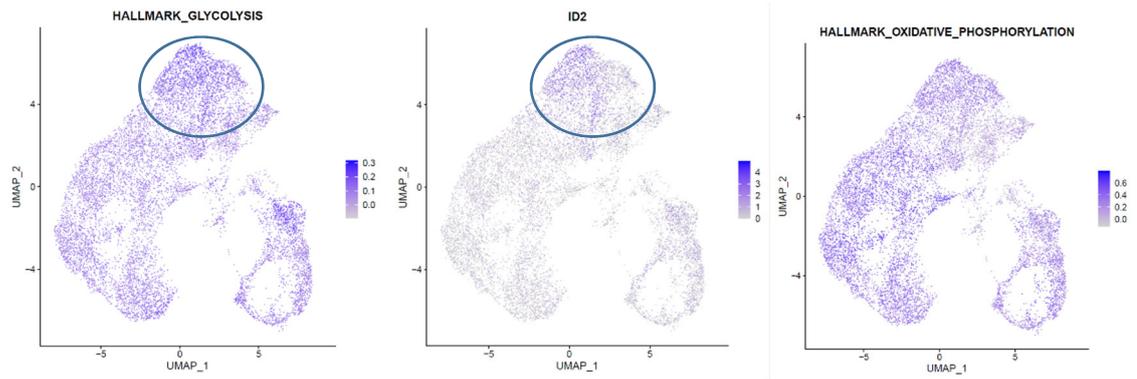
(\* : p-value<0.05, \*\* : p-value<0.01, \*\*\* : p-value<0.001)

### 3.4 Discussion

Lors de précédentes analyses en scRNA-seq (*Figure 30*), l'équipe a pu démontrer une sous-population de cellules présentant un haut niveau d'activation de la voie BMP associé à un métabolisme plutôt glycolytique (70). Cibler des vulnérabilités métaboliques a déjà été testée en utilisant du IACS (81), même si les résultats des tests cliniques se sont avérés décevants. Cependant, nous souhaitons ici tester la possibilité que les états cellulaires induits par la synergie K27M/BMP puissent présenter des sensibilités particulières à ce type de molécule.

De précédentes études ont déjà pu démontrer l'implication des BMP dans l'activation de la glycolyse. La voie des BMP permet une augmentation du métabolisme du glucose entraînant une production accrue d'ATP au sein des cellules (82). Cependant, nous n'avons pas observé dans nos expériences d'impact de la modulation de la voie BMP sur le métabolisme du glucose dans les conditions testées. Ces expériences méritent d'être renouvelées en modifiant les milieux de culture utilisés par exemple (HPLM versus DMEM). Il conviendrait par ailleurs d'analyser d'autres modifications métaboliques potentielles, notamment par spectrométrie de masse.

En revanche, nous avons pu observer une résistance au IACS induite par le traitement à BMP7, plus marquée dans le contexte H3.3WT compte-tenu de leur plus forte sensibilité intrinsèque à ce composé thérapeutique. Ces données sont intéressantes puisqu'elles suggèrent effectivement un switch métabolique potentiel induit par les BMP. Des approches de CRIPR-Cas9 permettront de définir la pertinence de stratégies basées sur le ciblage simultanée de la voie BMP et du métabolisme cellulaire.



**Figure 30** - Représentation UMAP de données scRNA-seq d'un modèle de DIPG.

A et B – Identification d'un cluster enrichi en gènes reliés à la glycolyse (A), co-localisant avec un cluster de cellules exprimant ID2 (B), dont la transcription est sous la dépendance de l'activation de la voie des BMP. Les autres clusters arborent, eux, un enrichissement plus marqué en gènes du métabolisme OXPHOS (C).

## 4. Impact de la mutation K27M et des BMP sur le remodelage du cytosquelette d'actine

### 4.1 Matériels et Méthodes

#### 4.1.1 Culture cellulaire

La lignée commerciale d'astrocytomes (Res259) précédemment décrite a été utilisée. Ces modèles sont cultivés en deux dimensions en flasque T75 contenant 10mL de milieu DMEM (Gibco, 31966-021) + 10% SVF + 1% pénicilline-streptomycine (Gibco, 11548876) + 1% Glutamax (Gibco, 13462629).

#### 4.1.2 Analyse du remodelage du cytosquelette par marquage à la phalloïdine

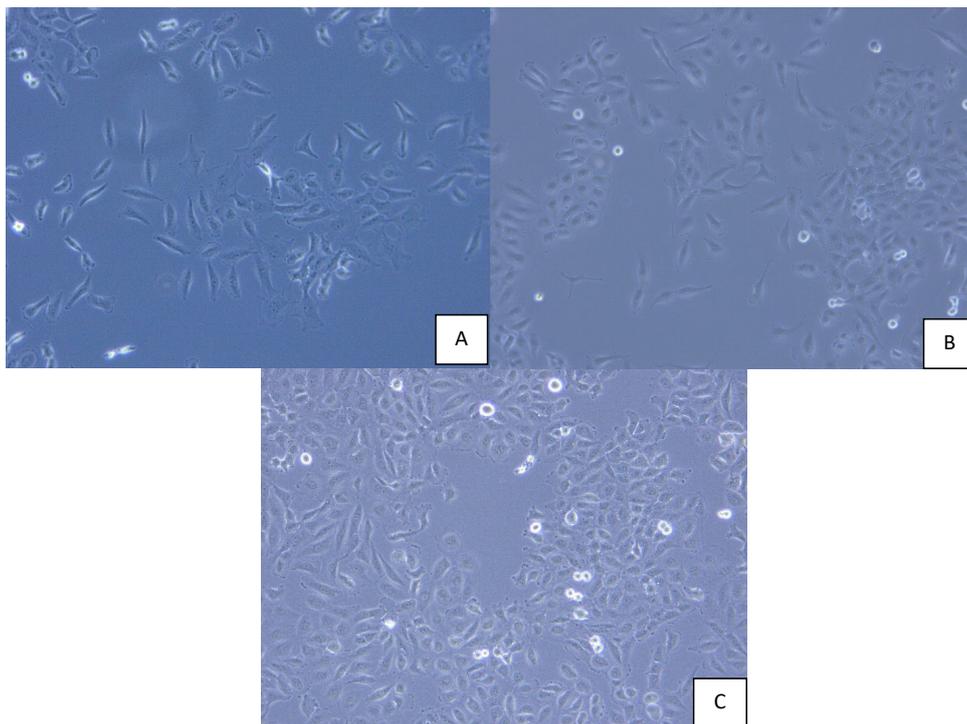
L'actine est un constituant du cytosquelette et intervient dans l'architecture et la migration des cellules. En tant que marqueur des filaments d'actine, la phalloïdine permet d'étudier les caractéristiques migratoires des cellules en analysant le remodelage du cytosquelette.

Afin d'étudier les différences architecturales des cellules selon les différentes conditions expérimentales, les filaments d'actine ont été marqués en rouge à l'aide de la phalloïdine couplées à un fluorochrome. Le cytosquelette étant une structure mobile, l'actine peut être retrouvée sous forme 1) filamenteuse, actine F, forme polymérisée, alors liée à l'ATP, ou 2) dépolymérisée, non liée à l'ATP et appelée actine G (globuleuse). En fonction de l'état de la cellule (migratoire ou statique), il est possible d'observer différentes protrusions membranaires décrites précédemment.

Le marquage à la phalloïdine a été réalisé sur les lignées Res259-H3.3WT et Res259-H3.3K27M. Des tests préliminaires ont été effectués afin de déterminer la concentration cellulaire optimale par puits et le temps de culture nécessaire pour obtenir un nombre satisfaisant de cellules sans excéder une confluence de 80%. Ainsi, la concentration optimale est de 10000 cellules par puits (plaque 24 puits) et le temps d'incubation est de 48h (*Figure 31*).

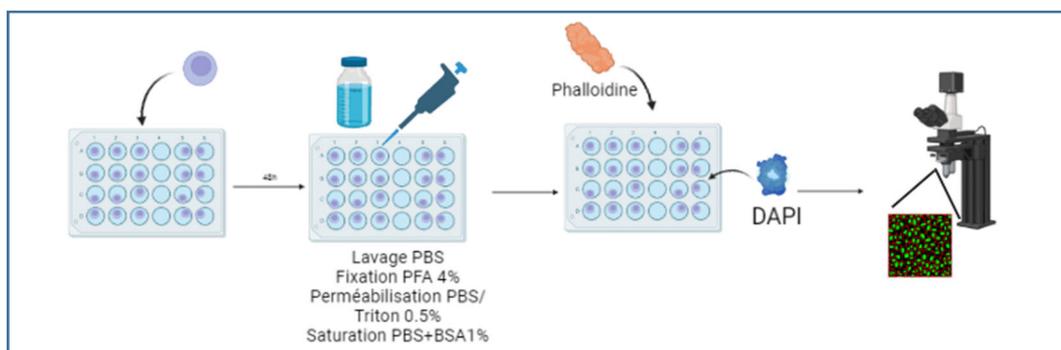
Après 48h de traitement, les cellules ont été fixées au Paraformaldehyde 4% (PFA) (Fischer Scientific, 11400580) pendant 30 minutes à température ambiante (RT), puis perméabilisées avec du PBS/Triton 0.5% (Gibco, 11590476) pendant 5 minutes à RT. Une

saturation au PBS + albumine de sérum bovin (BSA) 1% (Fisher BioReagents™, 11423164) a été réalisée pendant 30 minutes à RT. Par la suite, les filaments d'actine de nos cellules ont été marqués avec la phalloïdine (phalloidin, TRITC-conjugated, Sigma-Aldrich P1951) pendant 30 minutes à RT. L'ajout de DAPI (Invitrogen #D1306) pendant 5 minutes à RT a permis de marquer le noyau des cellules. Enfin, une lamelle a été apposée sur chaque puits avec ajout d'une goutte de milieu de montage permettant d'observer la fluorescence. Les plaques ont été laissées pendant une heure à RT puis à 4°C jusqu'à observation au microscope à fluorescence (channel : Cy5, DAPI) (Figure 32).



**Figure 31** - Image de microscopie représentant la confluence et la forme des cellules Res259-H3.3K27M.

A – 48h, 10000 cellules/mL, confluence 30%; B – 48h, 20000 cellules/mL, confluence 50%;  
C – 72h, 20000 cellules/mL, confluence 90%



**Figure 32** - Schéma représentant les différentes étapes du marquage à la phalloïdine

### 4.1.3 Conditions expérimentales

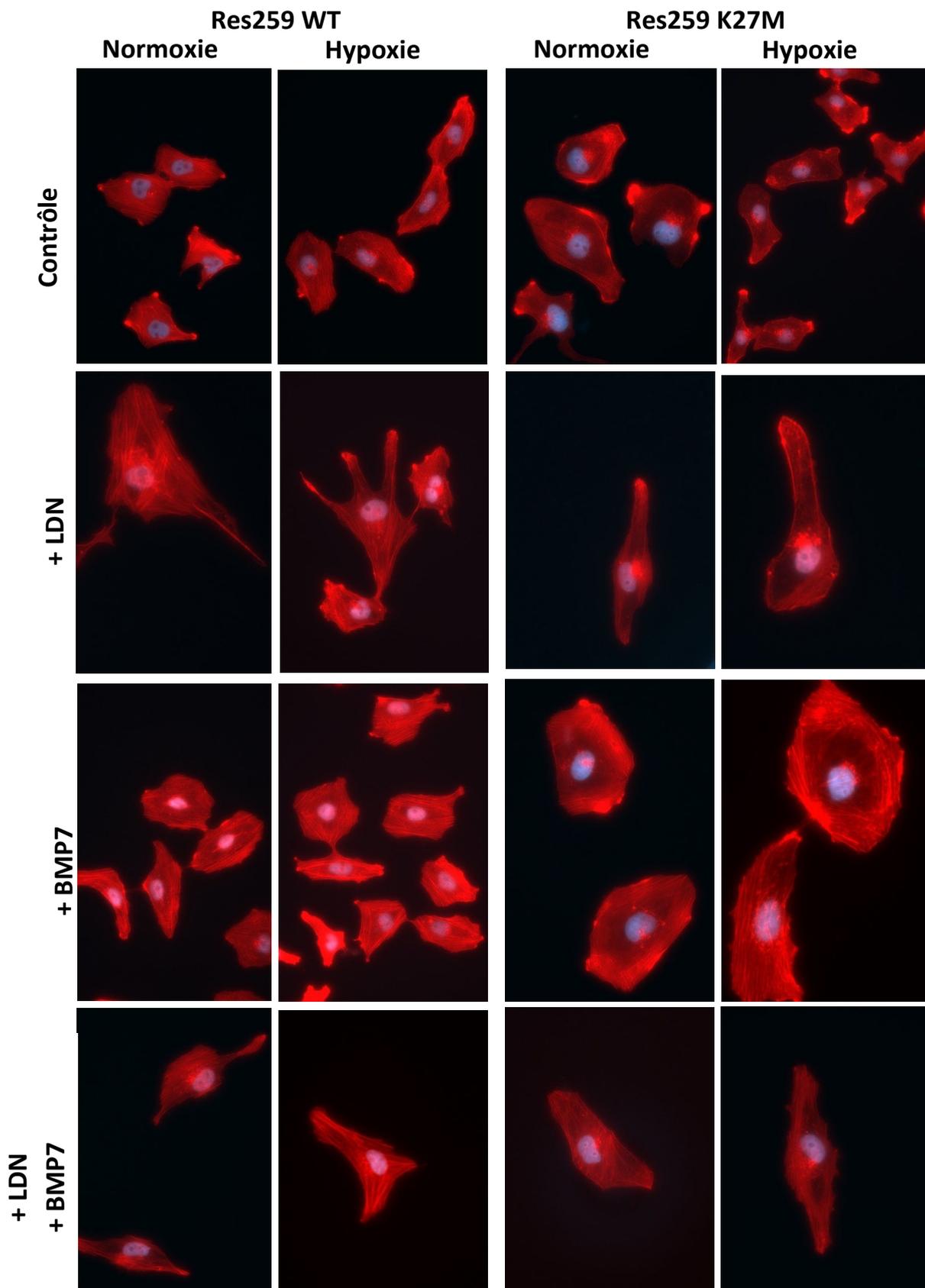
Comme nous l'avons vu précédemment, les BMP impactent l'invasion cellulaire et donc le remodelage du cytosquelette d'actine. Ainsi, nous nous sommes demandé comment les BMP déclenchent l'invasion et quelles sont les différents mécanismes reliés à ce processus. Cette première étude porte donc sur le remodelage du cytosquelette d'actine dans des milieux contenant du BMP7 (50 ng/mL) et/ou du LDN (1  $\mu$ M).

De plus, l'apport en oxygène a été étudié. En effet une précédente étude a démontré que la modulation dynamique de l'expression de BMP2 en réponse au stress, tel que l'hypoxie, pourrait entrer en synergie avec la production constitutive de BMP7 pour conduire à l'émergence d'un état cellulaire agressif (70). Ainsi, nous avons donc voulu étudier si la présence d'oxygène pouvait influencer l'effet des BMP sur le remodelage du cytosquelette d'actine. Pour ce faire, les cellules ont été cultivées en normoxie (5% de CO<sub>2</sub>) ou en hypoxie (5% de CO<sub>2</sub>, 1% d'O<sub>2</sub>).

## 4.2 Résultats

Dans toutes les conditions expérimentales sans distinction, des lamellipodes et des filopodes ont été observés. En condition d'hypoxie, une dépolymérisation (zone moins dense) est retrouvée dans les conditions WT et K27M traitées au LDN (inhibiteur de la voie des BMP). Ces zones moins denses sont moins retrouvées en condition normoxique. La présence de BMP7 seule permet une augmentation de la polymérisation de l'actine d'autant plus marquée en hypoxie.

L'ajout de BMP7 aux conditions hypoxie/LDN semble permettre aux cellules d'à nouveau polymériser leur actine (*Figure 33*). Il pourrait donc exister un remodelage de l'actine induit par BMP.



*Figure 33 - Images de microscopie à fluorescence des cellules Res259, coloration DAPI/phalloïdine hypoxie*

### 4.3 Discussion

L'étude de l'impact d'un changement d'environnement sur le cytosquelette d'actine montre que l'inactivation de la voie des BMP en hypoxie suffit à remodeler le cytoplasme de manière K27M indépendante, provoquant la dépolymérisation de l'actine. La polymérisation de l'actine nécessite de l'ATP (83). En hypoxie, la voie de respiration mitochondriale étant réduite à un seuil minimal d'activation, seule la glycolyse permet cette production d'énergie (84). Or, la sous-population tumorale BMP active identifiée dans les DIPG présente un métabolisme glycolytique. La dépolymérisation de l'actine pourrait s'expliquer par un manque de production d'ATP, conséquence 1) du blocage du fonctionnement des populations OXPHOS par l'hypoxie, 2) associé au blocage de la population glycolytique, par inhibition de la voie des BMP. Rétablir l'activation de la voie des BMP en supplémentant le milieu nutritionnel en BMP permettrait alors de relancer une production énergétique de type glycolytique, expliquant ainsi la repolymérisation de l'actine observée. Des quantifications des différentes molécules impliquées dans la polymérisation de l'actine seront essentielles afin de confirmer ces observations et d'établir une véritable synergie oncogénique entre les BMP et les DIPG induisant une modulation du cytosquelette d'actine. Plus largement, il sera indispensable de compléter ces premières observations par des analyses quantitatives (nombre de lamellipodes par exemple) et en utilisant d'autres marqueurs plus spécifiques de modifications associées à l'acquisition d'un état migratoire, comme Phospho-FAK par exemple.

## Conclusions générales

Le gliome infiltrant du tronc cérébral (DIPG) reste à ce jour un défi redoutable en neuro-oncologie pédiatrique, en raison d'une dérégulation moléculaire et épigénétique intrinsèque et d'une barrière hémato-encéphalique intacte qui entrave l'administration de médicaments. Après des années d'échecs et d'errance thérapeutique, le séquençage génétique de ces tumeurs a ouvert la voie à une nouvelle ère. La compréhension de leur étiologie moléculaire, basée sur un remodelage majeur de l'épigénome, ouvre la possibilité au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, basées sur le ciblage de leurs vulnérabilités. Il est maintenant possible de dépister des mutations afin d'améliorer le diagnostic et le pronostic de ces tumeurs. Une meilleure compréhension de leurs rôles ont notamment permis le développement d'une nouvelle classification de l'OMS.

Les altérations métaboliques et des capacités invasives font indéniablement partie de ces vulnérabilités potentielles. En effet, les propriétés oncogéniques des cellules tumorales sont soutenues par un phénotype invasif et par un métabolisme hyperactif, qui soutiennent une agressivité importante, dans un microenvironnement parfois complexe, notamment hypoxique. En parallèle, ces modifications métaboliques peuvent renforcer les anomalies épigénétiques existantes, compte-tenu de la dualité fonctionnelle de nombreux métabolites, qui peuvent servir de substrats donneurs/accepteurs aux modifications épigénétiques de l'ADN ou des histones. Quoiqu'encore peu caractérisé, le métabolisme énergétique pourrait être l'archétype de ce rôle de pivot oncogénique via l'implication de la voie des protéines morphogénétiques osseuses (BMP), impliquée tout à la fois dans les synthèses et les remaniements épigénétiques tout en modifiant les capacités migratoires des cellules.

Ainsi mon objectif de thèse a été d'étudier la synergie oncogénique entre la mutation H3.3K27M présente dans 80% des DIPG et la voie des BMP.

Si les données obtenues sont largement préliminaires, elles soutiennent l'idée 1) d'un switch métabolique dans les cellules exprimant la mutation K27M, conduisant à des différentiels de sensibilité à des molécules ciblant ces mécanismes, et 2) d'une modulation

possible par BMP7. Des analyses complémentaires sont indispensables pour mieux caractériser l'impact de BMP7 sur le métabolisme, en réalisant des analyses métabolomiques, et pour identifier les vulnérabilités thérapeutiques qui en résultent. Il en est de même pour les mécanismes associés au remodelage du cytosquelette, qui pourraient sous-tendre le potentiel invasif induit par la synergie K27M/BMP.

Ces données mécanistiques sont indispensables pour améliorer la prise en charge des patients. En effet, cibler directement la voie BMP dans son ensemble paraît complexe, compte-tenu de son importance au cours du développement et des potentiels effets indésirables associés à un blocage total de la voie. En revanche, cibler les mécanismes déclenchés par son induction pourrait s'avérer être une stratégie pertinente, pour développer de nouvelles combinaisons thérapeutiques indispensables.

La combinaison d'approches -omiques intégratives et fonctionnelles sur des modèles innovants devrait permettre de relever ce défi.

**Le Président de la thèse,**  
Nom : Dr Meurette Olivier

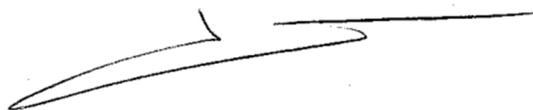
Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 21/12/2023  
Vu, le Directeur de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et  
Biologiques, Faculté de Pharmacie

Signature :



Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1

Professeur C. DUSSART



## Bibliographie

1. Figarella-Branger D, Appay R, Metais A, Tauziède-Espariat A, Colin C, Rousseau A, et al. La classification de l'OMS 2021 des tumeurs du système nerveux central. *Ann Pathol.* 1 oct 2022;42(5):367-82.
2. Gritsch S, Batchelor TT, Gonzalez Castro LN. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. *Cancer.* 1 janv 2022;128(1):47-58.
3. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol.* 29 juin 2021;23(8):1231-51.
4. histoseminaire-2021-tumeurs-ce-re-brales.pdf [Internet]. [cité 12 déc 2023]. Disponible sur: <https://www.sopathol.org/media/pdf/histoseminaire-2021-tumeurs-ce-re-brales.pdf>
5. Di Nunno V, Gatto L, Tosoni A, Bartolini S, Franceschi E. Implications of BRAF V600E mutation in gliomas: Molecular considerations, prognostic value and treatment evolution. *Front Oncol.* 4 janv 2023;12:1067252.
6. Couderc-Enguiale I, Ducray F. Gliomes avec mutation d'un gène IDH - Un polymorphisme nucléotidique d'une région non codante du chromosome 8 impliqué dans l'oncogenèse. *médecine/sciences.* 1 juin 2023;39(6-7):499-501.
7. Singla AK, Madan R, Gupta K, Goyal S, Kumar N, Sahoo SK, et al. Clinical behaviour and outcome in pediatric glioblastoma: current scenario. *Radiat Oncol J.* 30 mars 2021;39(1):72-7.
8. Toubez A. Conception et caractérisation de modèles en 3D de tumoroïdes utilisés comme outils pour le criblage de drogues dans les tumeurs cérébrales pédiatriques [Thèse d'exercice]. [Lyon]: Université Claude Bernard Lyon 1; 2021.
9. Les gliomes de bas grade | GHU Paris psychiatrie & neurosciences [Internet]. [cité 12 déc 2023]. Disponible sur: <https://www.ghu-paris.fr/fr/les-gliomes-de-bas-grade>
10. Wang TJC, Mehta MP. Low-Grade Glioma Radiotherapy Treatment and Trials. *Neurosurg Clin N Am.* janv 2019;30(1):111-8.
11. Les gliomes de haut grade | GHU Paris psychiatrie & neurosciences [Internet]. [cité 12 déc 2023]. Disponible sur: <https://www.ghu-paris.fr/fr/les-gliomes-de-haut-grade>
12. Gliome infiltrant du tronc cérébral | Gustave Roussy [Internet]. [cité 12 avr 2023]. Disponible sur: <https://www.gustaveroussy.fr/fr/gliome-infiltrant-du-tronc-cerebral>

13. Vanan MI, Eisenstat DD. DIPG in Children – What Can We Learn from the Past? *Front Oncol* [Internet]. 2015 [cité 12 avr 2023];5. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2015.00237>
14. Pellot JE, De Jesus O. Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cité 12 avr 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560640/>
15. 20211102-put-pm-onc201.pdf [Internet]. [cité 12 avr 2023]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/uploads/2021/11/02/20211102-put-pm-onc201.pdf>
16. ONC201 and imipridones: Anti-cancer compounds with clinical efficacy - PubMed [Internet]. [cité 8 mai 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33142238/>
17. Truffaux N. Nouvelles cibles thérapeutiques dans les gliomes infiltrants du tronc cérébral de l'enfant [Internet] [phdthesis]. Université Paris Sud - Paris XI; 2014 [cité 12 avr 2023]. Disponible sur: <https://theses.hal.science/tel-01165044>
18. Castel D, Philippe C, Calmon R, Le Dret L, Truffaux N, Boddaert N, et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2015;130(6):815-27.
19. Zhang X, Zhang Z. Onco-histone mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Trends Cancer*. déc 2019;5(12):799-808.
20. Mayo Clinic [Internet]. [cité 12 avr 2023]. Experimental Drug and Therapeutics for Pediatric Brain Tumor Lab - Histone Mutation and Tumor Development in Diffused Intrinsic Pontine Gliomas. Disponible sur: <https://www.mayo.edu/research/labs/experimental-drug-therapeutics-pediatric-brain-tumor/research-activities/histone-mutation-tumor-development-diffused-intrinsic-pontine-gliomas>
21. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol*. 29 juin 2021;23(8):1231-51.
22. Bailleul Q, Rakotomalala A, Ferry I, Leblond P, Meignan S, Furlan A. L'art de la guerre appliqué aux DIPG - Connais ton ennemi. *médecine/sciences*. 1 févr 2021;37(2):159-66.
23. Hoeman C, Shen C, Becher OJ. CDK4/6 and PDGFRA Signaling as Therapeutic Targets in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front Oncol*. 31 mai 2018;8:191.
24. Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu XY, Fontebasso AM, Bouffet E, et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*. sept 2012;124(3):439-47.

25. Damodharan S, Lara-Velazquez M, Williamsen BC, Helgager J, Dey M. Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: Molecular Landscape, Evolving Treatment Strategies and Emerging Clinical Trials. *J Pers Med*. mai 2022;12(5):840.
26. Lehmann-Che J, Turpin E, Bertheau P, Espié M, Thé H de. La fonction de TP53 - Facteur prédictif majeur de la réponse à une chimiothérapie dose-intense dans le cancer du sein. *médecine/sciences*. 1 nov 2007;23(11):1021-3.
27. Werbrouck C, Evangelista CCS, Lobón-Iglesias MJ, Barret E, Le Teuff G, Merlevede J, et al. TP53 Pathway Alterations Drive Radioresistance in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPG). *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 nov 2019;25(22):6788-800.
28. Hoeman C, Shen C, Becher OJ. CDK4/6 and PDGFRA Signaling as Therapeutic Targets in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front Oncol*. 31 mai 2018;8:191.
29. Zhao H, Ming T, Tang S, Ren S, Yang H, Liu M, et al. Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target. *Mol Cancer*. 14 juill 2022;21:144.
30. Harutyunyan AS, Krug B, Chen H, Papillon-Cavanagh S, Zeinieh M, De Jay N, et al. H3K27M induces defective chromatin spread of PRC2-mediated repressive H3K27me2/me3 and is essential for glioma tumorigenesis. *Nat Commun*. 19 mars 2019;10(1):1262.
31. Keane L, Cheray M, Saidi D, Kirby C, Friess L, Gonzalez-Rodriguez P, et al. Inhibition of microglial EZH2 leads to anti-tumoral effects in pediatric diffuse midline gliomas. *Neuro-Oncol Adv*. 5 juill 2021;3(1):vdab096.
32. Phan LM, Yeung SCJ, Lee MH. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biol Med*. mars 2014;11(1):1-19.
33. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 7 janv 2000;100(1):57-70.
34. PhD SL. New Dimensions in Cancer Biology: Updated Hallmarks of Cancer Published [Internet]. American Association for Cancer Research (AACR). 2022 [cité 12 déc 2023]. Disponible sur: <https://www.aacr.org/blog/2022/01/21/new-dimensions-in-cancer-biology-updated-hallmarks-of-cancer-published/>
35. Rigoulet M, Bouchez CL, Paumard P, Ransac S, Cuvellier S, Duvezin-Caubet S, et al. Cell energy metabolism: An update. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. 1 nov 2020;1861(11):148276.
36. Ashton TM, McKenna WG, Kunz-Schughart LA, Higgins GS. Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*. 31 mai 2018;24(11):2482-90.
37. Zanutelli MR, Zhang J, Reinhart-King CA. Mechanoresponsive metabolism in cancer cell migration and metastasis. *Cell Metab*. 6 juill 2021;33(7):1307-21.
38. Masson E. EM-Consulte. [cité 12 avr 2023]. Métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse : exemple des tumeurs endocrines riches en mitochondries. Disponible sur:

<https://www.em-consulte.com/article/76806/metabolisme-energetique-de-la-cellule-cancereuse->

39. Liu Q, Luo Q, Halim A, Song G. Targeting lipid metabolism of cancer cells: A promising therapeutic strategy for cancer. *Cancer Lett.* 10 août 2017;401:39-45.
40. Wu F, Zhao Z, Chai R, Liu Y, Li G, Jiang H, et al. Prognostic power of a lipid metabolism gene panel for diffuse gliomas. *J Cell Mol Med.* nov 2019;23(11):7741-8.
41. Lovibond S, Gewirtz AN, Pasquini L, Krebs S, Graham MS. The promise of metabolic imaging in diffuse midline glioma. *Neoplasia N Y N.* 20 mars 2023;39:100896.
42. Pal S, Kaplan JP, Nguyen H, Stopka SA, Regan MS, Nguyen QD, et al. A druggable addiction to de novo pyrimidine biosynthesis in diffuse midline glioma [Internet]. *bioRxiv*; 2021 [cité 12 avr 2023]. p. 2021.11.30.470644. Disponible sur: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.11.30.470644v1>
43. Mbah NE, Myers AL, Chung C, Thompson JK, Hong HS, Sajjakulnukit P, et al. Therapeutic targeting of differentiation state-dependent metabolic vulnerabilities in DIPG [Internet]. *Cancer Biology*; 2022 mars [cité 12 avr 2023]. Disponible sur: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.03.01.482555>
44. Casillo S, Gatesman T, Chilukuri A, Jane E, Premkumar D, Barber C, et al. DIPG-46. TARGETING THE METABOLIC ERK5-PFKFB3 AXIS IN PEDIATRIC DIFFUSE MIDLINE GLIOMA. *Neuro-Oncol.* 12 juin 2023;25(Suppl 1):i23-4.
45. Shen H, Chang C, Ing P, Nguyen S, Mudassar F, Cook K, et al. DIPG-02. A NOVEL STRATEGY TO RADIOSENSITISE DIFFUSE MIDLINE GLIOMAS VIA DUAL-TARGETING OF GLUCOSE METABOLISM. *Neuro-Oncol.* 12 juin 2023;25(Suppl 1):i12-3.
46. Bonner ER, Waszak SM, Grotzer MA, Mueller S, Nazarian J. Mechanisms of imipridones in targeting mitochondrial metabolism in cancer cells. *Neuro-Oncol.* 18 déc 2020;23(4):542-56.
47. Lee-Hoeflich ST, Causing CG, Podkova M, Zhao X, Wrana JL, Attisano L. Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *EMBO J.* 8 déc 2004;23(24):4792-801.
48. Thériault BL, Shepherd TG, Mujoomdar ML, Nachtigal MW. BMP4 induces EMT and Rho GTPase activation in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis.* 1 juin 2007;28(6):1153-62.
49. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors.* 1 déc 2004;22(4):233-41.
50. Sun Z, Cai S, Zabkiewicz C, Liu C, Ye L. Bone morphogenetic proteins mediate crosstalk between cancer cells and the tumour microenvironment at primary tumours and metastases (Review). *Int J Oncol.* juin 2020;56(6):1335-51.

51. Sachdeva R, Wu M, Johnson K, Kim H, Celebre A, Shahzad U, et al. BMP signaling mediates glioma stem cell quiescence and confers treatment resistance in glioblastoma. *Sci Rep.* 10 oct 2019;9:14569.
52. Atkins RJ, Stylli SS, Kurganovs N, Mangiola S, Nowell CJ, Ware TM, et al. Cell quiescence correlates with enhanced glioblastoma cell invasion and cytotoxic resistance. *Exp Cell Res.* 15 janv 2019;374(2):353-64.
53. Trepast X, Chen Z, Jacobson K. Cell Migration. *Compr Physiol.* oct 2012;2(4):2369-92.
54. Themes UFO. 21: Migration cellulaire, domiciliation | *Medicine Key* [Internet]. 2017 [cité 12 déc 2023]. Disponible sur: <https://clemedicine.com/21-migration-cellulaire-domiciliation/>
55. celluloyd. Polymérisation de l'actine [Internet]. *Tumblr.* [cité 12 déc 2023]. Disponible sur: <https://celluloyd.tumblr.com/post/157209076585/polym%C3%A9risation-de-lactine-les>
56. Heckman CA, Plummer HK. Filopodia as sensors. *Cell Signal.* 1 nov 2013;25(11):2298-311.
57. Gallop JL. Filopodia and their links with membrane traffic and cell adhesion. *Semin Cell Dev Biol.* 1 juin 2020;102:81-9.
58. Castets M. Bases moléculaires du syndrome de l'X Fragile : de l'identification d'interacteurs de FMRP à l'établissement d'une connexion avec la voie de signalisation Rac1 [Internet] [These de doctorat]. Université Louis Pasteur (Strasbourg) (1971-2008); 2006 [cité 12 déc 2023]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2006STR13074>
59. Meel MH, Schaper SA, Kaspers GJL, Hulleman E. Signaling pathways and mesenchymal transition in pediatric high-grade glioma. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(5):871-87.
60. Ribatti D, Tamma R, Annese T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol.* 22 avr 2020;13(6):100773.
61. Lee TK, Poon RTP, Yuen AP, Ling MT, Kwok WK, Wang XH, et al. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 sept 2006;12(18):5369-76.
62. Iser IC, Pereira MB, Lenz G, Wink MR. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Like Process in Glioblastoma: An Updated Systematic Review and In Silico Investigation. *Med Res Rev.* 2017;37(2):271-313.
63. Hashemi M, Arani HZ, Orouei S, Fallah S, Ghorbani A, Khaledabadi M, et al. EMT mechanism in breast cancer metastasis and drug resistance: Revisiting molecular interactions and biological functions. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* nov 2022;155:113774.

64. Puget S, Philippe C, Bax DA, Job B, Varlet P, Junier MP, et al. Mesenchymal Transition and PDGFRA Amplification/Mutation Are Key Distinct Oncogenic Events in Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas. *PLoS ONE*. 28 févr 2012;7(2):e30313.
65. Gao J, Muroya R, Huang F, Nagata K, Shin M, Nagano R, et al. Bone morphogenetic protein induces bone invasion of melanoma by epithelial-mesenchymal transition via the Smad1/5 signaling pathway. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. nov 2021;101(11):1475-83.
66. Zhao HJ, Klausen C, Li Y, Zhu H, Wang YL, Leung PCK. Bone morphogenetic protein 2 promotes human trophoblast cell invasion by upregulating N-cadherin via non-canonical SMAD2/3 signaling. *Cell Death Dis*. 7 févr 2018;9(2):1-12.
67. Thériault BL, Shepherd TG, Mujoomdar ML, Nachtigal MW. BMP4 induces EMT and Rho GTPase activation in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*. juin 2007;28(6):1153-62.
68. Lv Z, Yang D, Li J, Hu M, Luo M, Zhan X, et al. Bone morphogenetic protein 9 overexpression reduces osteosarcoma cell migration and invasion. *Mol Cells*. août 2013;36(2):119-26.
69. Sun Y, Yan K, Wang Y, Xu C, Wang D, Zhou W, et al. Context-dependent tumor-suppressive BMP signaling in diffuse intrinsic pontine glioma regulates stemness through epigenetic regulation of CXXC5. *Nat Cancer*. sept 2022;3(9):1105-22.
70. Huchédé P, Meyer S, Berthelot C, Hamadou M, Bertrand-Chapel A, Rakotomalala A, et al. BMP2 and BMP7 cooperate with H3.3K27M to promote quiescence and invasiveness in pediatric diffuse midline gliomas. *eLife [Internet]*. 23 nov 2023 [cité 12 déc 2023];12. Disponible sur: <https://elifesciences.org/reviewed-preprints/91313>
71. Furst L, Atkins RJ, Dinevska M, Stylli SS, Corcoran NM, Hovens CM, et al. Identification and isolation of slow-cycling glioma stem cells. *Methods Cell Biol*. 2022;170:21-30.
72. Auffret L, Ajilil Y, Tauziède-Espariat A, Kergrohen T, Puisieux C, Riffaud L, et al. A new subtype of diffuse midline glioma, H3 K27 and BRAF/FGFR1 co-altered: a clinico-radiological and histomolecular characterisation. *Acta Neuropathol (Berl)*. 8 déc 2023;147(1):2.
73. H3.3K27M Mutation Controls Cell Growth and Resistance to Therapies in Pediatric Glioma Cell Lines - PubMed [Internet]. [cité 5 juill 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34771714/>
74. CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay Protocol [Internet]. [cité 14 déc 2023]. Disponible sur: <https://france.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-fluor-cell-viability-assay-protocol/>
75. celltox-green-cytotoxicity-assay-protocol.pdf [Internet]. [cité 14 déc 2023]. Disponible sur: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/celltox-green-cytotoxicity-assay-protocol.pdf>

76. Lonidamine - un aperçu | Sujets ScienceDirect [Internet]. [cité 15 déc 2023]. Disponible sur: <https://www-sciencedirect-com.docelec.univ-lyon1.fr/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/lonidamine>
77. Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit User Guide.
78. Soma MR, Mims MP, Chari MV, Rees D, Morrisett JD. Triglyceride metabolism in 3T3-L1 cells. An in vivo <sup>13</sup>C NMR study. *J Biol Chem*. 5 juin 1992;267(16):11168-75.
79. Nieva C, Marro M, Santana-Codina N, Rao S, Petrov D, Sierra A. The Lipid Phenotype of Breast Cancer Cells Characterized by Raman Microspectroscopy: Towards a Stratification of Malignancy. *PLOS ONE*. 17 oct 2012;7(10):e46456.
80. Yang J, Ueharu H, Mishina Y. Energy metabolism: A newly emerging target of BMP signaling in bone homeostasis. *Bone*. sept 2020;138:115467.
81. Yap TA, Daver N, Mahendra M, Zhang J, Kamiya-Matsuoka C, Meric-Bernstam F, et al. Complex I inhibitor of oxidative phosphorylation in advanced solid tumors and acute myeloid leukemia: phase I trials. *Nat Med*. janv 2023;29(1):115-26.
82. Yang J, Ueharu H, Mishina Y. Energy metabolism: A newly emerging target of BMP signaling in bone homeostasis. *Bone*. sept 2020;138:115467.
83. Castets M. Bases moléculaires du syndrome de l'X Fragile : de l'identification d'interacteurs de FMRP à l'établissement d'une connexion avec la voie de signalisation Rac1 [Internet] [These de doctorat]. Université Louis Pasteur (Strasbourg) (1971-2008); 2006 [cité 5 juill 2023]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2006STR13074>
84. Kierans SJ, Taylor CT. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J Physiol*. janv 2021;599(1):23-37.

L'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

**ROUSSEL** Charlène

**Etude de la synergie oncogénique entre la mutation K27M et les protéines morphogénétiques osseuses (BMP) dans le gliome infiltrant du tronc cérébral (DIPG) : impact sur la migration et le métabolisme**

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2024, 101 pages

**RESUME**

Les gliomes infiltrant du tronc cérébral (DIPG) sont caractérisés par une mutation K27M affectant les variants d'histones H3.1 et H3.3. L'altération H3.1K27M est fréquemment associée à une mutation du gène *ACVR1*, codant pour un récepteur de la protéine morphogénétique osseuse (BMP). Comme les tumeurs *ACVR1 WT* et mutantes présentent les mêmes niveaux d'activation de la voie BMP, nous avons émis l'hypothèse que l'activation oncogénique de cette voie pourrait être pilotée par un mécanisme alternatif dans les tumeurs *ACVR1 WT*. Le but de notre travail est d'étudier l'existence d'une synergie oncogénique entre K27M et BMP dans le DIPG, et de son impact sur la migration et le métabolisme énergétique.

Les lignées mutées K27M nous ont dévoilé une potentielle dépendance au glucose qui pourrait participer à l'augmentation de la résistance thérapeutique. Un changement métabolique de ces cellules vers un métabolisme énergétique de type OXPHOS pourrait expliquer la grande sensibilité des cellules vis-à-vis du IACS (inhibiteur de la chaîne respiratoire). Par ailleurs, les lignées WT apparaissent plus sensibles aux potentiels changements métaboliques induits par l'ajout de BMP7 lors du traitement par IACS. D'un autre côté, l'étude du cytosquelette d'actine a permis de montrer que, en condition d'hypoxie, la dépolymérisation de l'actine se produit en présence d'un inhibiteur de la voie des BMP (cellules K27M et WT). L'ajout de BMP7 dans ces conditions semble inverser cet effet, très certainement par modulation du métabolisme énergétique impliqué dans la polymérisation du cytosquelette d'actine.

Ainsi les BMP sont au cœur des reprogrammations métaboliques des cellules tumorales de DIPG, perturbant les capacités migratoires par modifications du cytosquelette d'actine. Cibler directement la voie BMP dans son ensemble paraît complexe. En revanche, cibler les mécanismes déclenchés par son induction pourrait s'avérer être une stratégie pertinente pour développer de nouvelles combinaisons thérapeutiques indispensables.

**MOTS CLES**

DIPG, BMP, Métabolisme énergétique, Migration

**JURY**

M. MEURETTE Olivier  
Mme CASTETS Marie  
M. LINCET Hubert  
Mme DOLEANS-JORDHEIM Anne  
Mme HAMADOU Maud

**DATE DE SOUTENANCE**

Lundi 22 janvier 2024

**CONTACT**

Dr Lincet Hubert : hubert.lincet@univ-lyon1.fr