

Année 2022

N° : MM402022

MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE « **Biotechnologie Médicale** »
OPTION : « **Biomédicale** »

Intitulé

Etude in vitro des effets Antitumoraux des agents anti-cancéreux, Panobinostat et ONC201 sur les cellules DIPG primaires humaines

Soutenu par :
Abdessamad LAHRACH

Le 22 Juillet 2022

Devant le jury composé de :

Pr. AANNIZ Tarik, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Président

Pr. BENTAYEBI Kaoutar, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat,
Encadrante

Pr. LOUATI Sara, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat,
Examinatrice

Dédicace

À toute ma famille

À tous mes amis

*À tous ceux et celles qui m'ont marqué
par un geste, un mot ou un état
d'esprit,*

Je dédie ce travail.

Abdessamad LAHRAÏH

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Allah, le tout puissant, de m'avoir donné la force et la patience de bien mener ce modeste travail.

Je tiens à remercier très chaleureusement mes encadrants Pr. BENTAYEBI Kaoutar et Pr. HAJITOU Amin pour m'avoir accepté de m'encadrer tout au long de ce travail, notamment pour la confiance, les conseils qu'ils ont accordé malgré leurs nombreuses charges, merci également pour votre gentillesse, je vous adresse ma profonde reconnaissance pour vos remarques en vue d'améliorer ce travail.

J'adresse mes chaleureux remerciements au Pr. AANNIZ Tarik et au Pr. LOUATI Sara, pour l'honneur qu'ils me font d'avoir acceptés d'être membre de jury de ce travail et pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre sujet de recherche.

Mes vifs remerciements accompagnés de mon profond respect et ma gratitude envers nos professeurs, Mme. OUADGHIRI Mouna la coordonnatrice du master et Mr. IBRAHIMI Azeddine le responsable du laboratoire de biotechnologie médicale, pour leur disponibilité, leurs précieux conseils, leur soutien et leur encouragement prodigué tout au long de la formation.

Sans rater l'occasion de remercier les thésards de notre laboratoire, pour avoir été toujours là, tous les enseignants du Master qui ont contribué à forger nos connaissances et à assister notre formation, et mes collègues, pour le climat chaleureux, je vous souhaite un avenir merveilleux

Ceci est le fruit de vos efforts. Merci à toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation et le bon déroulement de ce travail

Résumé

Les tumeurs de système nerveux centrale (CNS) sont les cancers les plus communs chez l'enfants, elles représentent 20% de tumeurs pédiatriques, sont les causes principales de mortalité liées au cancer chez les enfants âgés de moins de 15 ans. Les gliomes de tronc cérébrale (BSG) représentent 12% des tumeurs pédiatriques du SNC, dont 75% sont sous forme de gliome infiltrant du tronc cérébral ou « Diffuse Intrinsic Pontine Glioma » (DIPG). Ce dernier est une tumeur cérébrale très agressive et difficile à traiter. Il se développe dans le pont du tronc cérébral, qui contrôle plusieurs fonctions vitales du corps. DIPG est une tumeur cérébrale très maligne de haut grade qui apparaît généralement chez les enfants de 5 à 10 ans, avec un taux de survie de moins de 10%, deux ans après le diagnostic.

Le traitement standard des tumeurs nouvellement diagnostiqués est la radiothérapie par modulation d'intensité (IMRT), Qui n'a comme effet qu'un soulagement temporairement les symptômes. Plusieurs traitements ont échoué en raison de La localisation de la tumeur, sa nature infiltrative et la présence de la barrière hémato-encéphalique qui contrôle les échanges entre les compartiments sanguins et cérébraux, et empêche le passage de médicaments et des agents thérapeutiques. Donc il est important d'étudier les réponses des cellules de DIPG humaines aux nouveaux agents anticancéreux.

Cette étude a pour objectif de comparer les effets des agents anticancéreux, Panobinostat (HDACi) et ONC201, sur les cellules DIPG primaires humaines. En comptant le nombre de cellules avant et après traitement, nous allons évaluer les effets du Panobinostat et de l'ONC201 sur la viabilité et le nombre de cellules pendant trois jours. Ensuite, nous allons déterminer l'IC50 (la concentration inhibitrice médiane) et identifier l'agent le plus efficace. Et enfin sélectionner la concentration optimale de cet agent.

Les mots clés : DIPG, Panobinostat, ONC201, Viabilité cellulaire.

Abstract

Central nervous system (CNS) tumors are the most common cancers in children, they represent 20% of pediatric tumors, and are the main causes of cancer-related mortality in children under the age of 15. Brain stem glioma (BSG) account for 12% of pediatric CNS tumors, 75% of which are a Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG). The latter is a very aggressive brain tumor and difficult to treat, arising in the ventral pons, which controls several vital body functions. DIPG is a very malignant, high-grade brain tumor that usually appears in children between the ages of 5 and 10, with a survival rate of less than 10% two years after diagnosis.

The standard treatment for newly diagnosed tumors is intensity-modulated radiation therapy (IMRT), which only provides a temporary relief of symptoms. Several treatments have failed due to the location of the tumor, its infiltrative nature and the presence of the blood-brain barrier which controls the exchanges between the blood and brain compartments, and plays an important role in the restriction of drugs in tumors. Therefore, it is important to study the responses of human DIPG cells to novel anticancer agents.

This study aims to compare the effects of two anticancer agents, Panobinostat (HDACi) and ONC201, on primary human DIPG cells. By counting the number of cells before and after treatment, we will monitor the effects of Panobinostat and ONC201 on cell viability / number over three days. Next, we will determine the median inhibitory concentration (IC50) and identify the most effective anti-cancer agent. And finally select the optimal concentration of this agent.

Keywords: DIPG, Panobinostat, ONC201, Cell viability.

ملخص

أورام الجهاز العصبي المركزي هي أكثر أنواع السرطانات شيوعًا لدى الأطفال، فهي تمثل 20% من أورام الأطفال، وهي الأسباب الرئيسية للوفيات المرتبطة بالسرطان لدى الأطفال دون سن 15 عامًا. تمثل أورام جذع الدماغ الدبقية 12% من أورام الجهاز العصبي المركزي لدى الأطفال، 75% من هذه الأورام على شكل الورم الدبقي المنتشر. هذا الأخير هو ورم شديد العدوانية ويصعب علاجه. يتطور في منطقة الجسر من جذع الدماغ، والتي تتحكم في العديد من وظائف الجسم الحيوية. الورم الدبقي المنتشر هو ورم دماغي خبيث للغاية وعالي الدرجة يظهر عادة في الأطفال الذين تتراوح أعمارهم بين 5 و10 سنوات، مع معدل بقاء لا يتجاوز 10% بعد عامين من التشخيص.

العلاج القياسي للأورام التي تم تشخيصها حديثًا هو العلاج الإشعاعي المعدل، والذي يقتصر على تخفيف الأعراض مؤقتًا فقط. فشلت عدة علاجات بسبب موقع الورم وطبيعته الإرتشاحية ووجود الحاجز الدموي الدماغي الذي يتحكم في التبادلات بين الدم والدماغ، والذي يلعب دورًا رئيسيًا في تقييد الأدوية من الوصول إلى الدماغ. لذلك، من المهم دراسة استجابة خلايا الورم الدبقي المنتشر لأدوية ومواد جديدة مضادة للسرطان.

تهدف هذه الدراسة إلى مقارنة تأثيرات بعض العوامل المضادة للسرطان، Panobinostat et ONC201، على خلايا الورم البقي المنتشر البشرية. من خلال حساب عدد الخلايا قبل وبعد معالجتها بهذه الأدوية، سنراقب تأثيرات Panobinostat وONC201 على حيوية الخلايا وعددها لمدة ثلاثة أيام. بعد ذلك، سنحدد IC50 (تركيز العمل اللازم للتنشيط النصفى للخلايا السرطانية) ثم نحدد العامل الأكثر فعالية لمكافحة هذا السرطان. وأخيرًا نحدد التركيز الأمثل لهذا العامل.

الكلمات المفتاح: Panobinostat, ONC201, الورم الدبقي المنتشر.

Table des matières

INTRODUCTION	1
Revue bibliographique.....	4
I. Tumeurs cérébrales	5
1. Anatomie de cerveaux.....	5
2. Tissus nerveux.....	6
3. Généralité sur les tumeurs cérébrales	10
4. Classification	11
II. Le gliome pontique intrinsèque diffus	13
1. Généralité.....	13
2. Diagnostic	13
3. Alteration génétiques.....	15
4. Conséquences de la mutation H3-K27M	18
5. Traitement.....	20
6. La barrière hématoencéphalique, défis et perspectives	22
III. Epigénétique et traitement du cancer	24
1. La contribution de l'épigénétique dans le traitement du cancer	24
2. Inhibiteurs des histones désacétylases (HDACI).....	25
3. Les histones désacétylases et traitement du cancer	25
4. La modulation de l'acétylation des histones comme cible pour le traitement du DIPG.....	26
IV. Les hypothèses.....	28
V. Objectifs	29
Matériels et méthodes	30
I. Matériels utilisés.....	31
1. Les cellules DIPG	31
2. Panobinostat.....	31
3. ONC201	31
II. Méthodes	31
Résultats	33
I. Effet de l'ONC201 sur la prolifération des cellules DIPG.....	34
II. Effet du Panobinostat sur la Prolifération des cellules DIPG.....	35
Discussion	37
Conclusion.....	39
Liste de références	40

Listes de figures

Figure 1:l'anatomie du cerveaux.	5
Figure 2: La neurogenèse.	7
Figure 3: La Gliogenèse.	9
Figure 4: Incidence et mortalité liées aux tumeurs du système nerveux central et distribution de ces tumeurs selon leurs malignités.	11
Figure 5: Les gliomes infiltrants du tronc cérébral : localisation et diagnostic.	14
Figure 6: Biopsie stéréotaxique de DIPG.	15
Figure 7: Structure de la chromatine et modifications post-traductionnelles.	17
Figure 8: Les enzymes de modification des marques épigénétiques.	18
Figure 9: Conséquence de la mutation H3-K27M sur la marque épigénétique.	19
Figure 10: Barriere hémato-encéphalique.	22
Figure 11: Effets de l'inhibition des HDAC sur les cellules cancéreuses.	26
Figure 12: L'effet de ONC201 sur la viabilité des cellules DIPG.	34
Figure 13: L'effet de Panobinostat sur la viabilité des cellules DIPG.	36

Listes des tableaux

Tableau 1: Représente la densité optique moyenne pour chaque concentration de ONC201 (0.002, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 1, 2, 10, 20 μM)34

Tableau 2: : Représente la densité optique moyenne pour chaque concentration de Panobinostat (0.002, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 1, 2, 10, 20 μM)35

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AKT : Protéine kinase B

ARNseq : séquençage de l'acide ribonucléique

BBB : Blood–brain barrier

BSG : Brain stem glioma

CNS : Central nervous system

CTCL : Cutaneous T-cell lymphoma

DACs : Désacétylases

DIPG : Diffuse Intrinsic Pontine glioma

DMG : Diffuse Midline Glioma

DO : Densité optique

EGFR : Epidermal growth factor

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

GFAP : Glial fibrillary acidic protein

GLAST : Glutamate-aspartate Transporter

HATs : Histone acetyl transferases HDMs: Histone demethylases

HDACi : Histone deacetylases inhibitor

HDACs : Histone deacetylases

HDMs : Histone demethylases

HGG : High grade glioma

HMTs : Histone methyltransferases

IC50 : Concentration inhibitrice médiane

IMRT : Intensity-modulated radiation therapy

IPCs : Intermediate progenitor cells

IRM : Imagerie par résonance magnétique

NSCs : Neural Stem Cells

OMS : Organisation mondiale de la santé

pHGG : Pediatric high-grade glioma

PRC2 : le Polycomb Repressive Complex

RGC : Radial glial cells

RT : Radiotherapy

SSP : Survie sans progression

TRAIL: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

WES : whole exome sequencing

WT : Wild type

INTRODUCTION

Le gliome infiltrant du tronc cérébral, variant anatomique des gliomes de haut grade, se développe presque exclusivement chez l'enfant et le jeune adulte. Il s'agit de la troisième tumeur cérébrale en fréquence à cet âge et la première cause de mortalité par tumeur cérébrale chez l'enfant. Son caractère infiltrant et sa localisation rendent impossible toute chirurgie d'exérèse. Cette tumeur ne répond que transitoirement à la radiothérapie. Elle présente presque systématiquement une chimiorésistance et depuis la preuve d'efficacité de la radiothérapie (Coutel 1959) aucun autre traitement n'a été validé en 50 ans. Malgré la radiothérapie, la plupart des patients décèdent dans les deux ans après diagnostic. Depuis ces 20 dernières années, l'imagerie par résonance magnétique ayant remplacé la biopsie, des signes cliniques et radiologiques évocateurs suffisent pour bien des équipes pour établir ce diagnostic (Albright et al. 1993). Cette approche est néanmoins prise en défaut dans un certain nombre de cas (Hankinson et al. 2011; Sufit et al. 2012) justifiant pour d'autres équipes une pratique plus systématique des biopsies (Roujeau et al. 2007). Depuis une dizaine d'années, de nombreux essais cliniques combinant chimiothérapie, radiothérapie et plus récemment nouvelles thérapies ciblées impliquant les inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase et les agents anti-angiogéniques ont été réalisés dans ces affections malheureusement sans succès. Le développement de ces nouvelles stratégies thérapeutiques chez l'enfant a été influencé par les thérapies de l'adulte en occultant leurs différences biologiques. Cependant, des études récentes portant sur les altérations moléculaires du DIPG ont pu identifier des nouvelles cibles thérapeutiques, ouvrant la voie à une nouvelle gamme de médicaments. Il a été démontré que la majorité des patients atteints de DIPG présentent la mutation (H3K27M) dans les gènes codant pour l'histone 3 (H3), ce qui entraîne une substitution de la lysine 27 par une méthionine (K27M) (Khuong-Quang et al., 2012), ce qui mène à suggérer que la modulation de l'acétylation des histones est un potentiel cible thérapeutique pour le traitement du DIPG. En conséquence, les inhibiteurs de l'histone désacétylase (HDACi) ont été testés comme traitement. Le Panobinostat, en particulier, est un HDACi qui s'est révélé efficace dans le traitement du DIPG in vitro (Hennika et al., 2017). L'ONC201 est un autre médicament prometteur. Il s'agit d'un antagoniste sélectif du récepteur dopaminergique D2 qui peut traverser la barrière hémato encéphalique (Ishida et al., 2018).

Cette étude a pour objectif de comparer les effets des agents anticancéreux, le Panobinostat et l'ONC201, sur les cellules DIPG primaires humaines. En comptant le nombre de cellules avant et après traitement, nous allons évaluer les effets du Panobinostat et de l'ONC201 sur la viabilité et le nombre de cellules pendant trois jours. Ensuite, nous allons déterminer l'IC50 (la

concentration inhibitrice médiane) et identifier l'agent anticancéreux le plus efficace. Et enfin sélectionner la concentration optimale de cet agent.

Revue bibliographique

I. Tumeurs cérébrales

1. Anatomie de cerveaux

Le cerveau est un organe complexe qui joue un rôle primordial dans le contrôle du système nerveux centrale (SNC) à travers un réseau complexe de processus moléculaires et neuronaux, ces processus sont hautement organisés pendant le développement et finis par la formation des différentes structures qui compose ce système (Bassett and Gazzaniga 2011).

Le cerveau a la forme générale d'un ovoïde à grand axe antéro – postérieur, il peut diviser d'un point de vue anatomique aux trois régions principales: le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral (Figure 1).

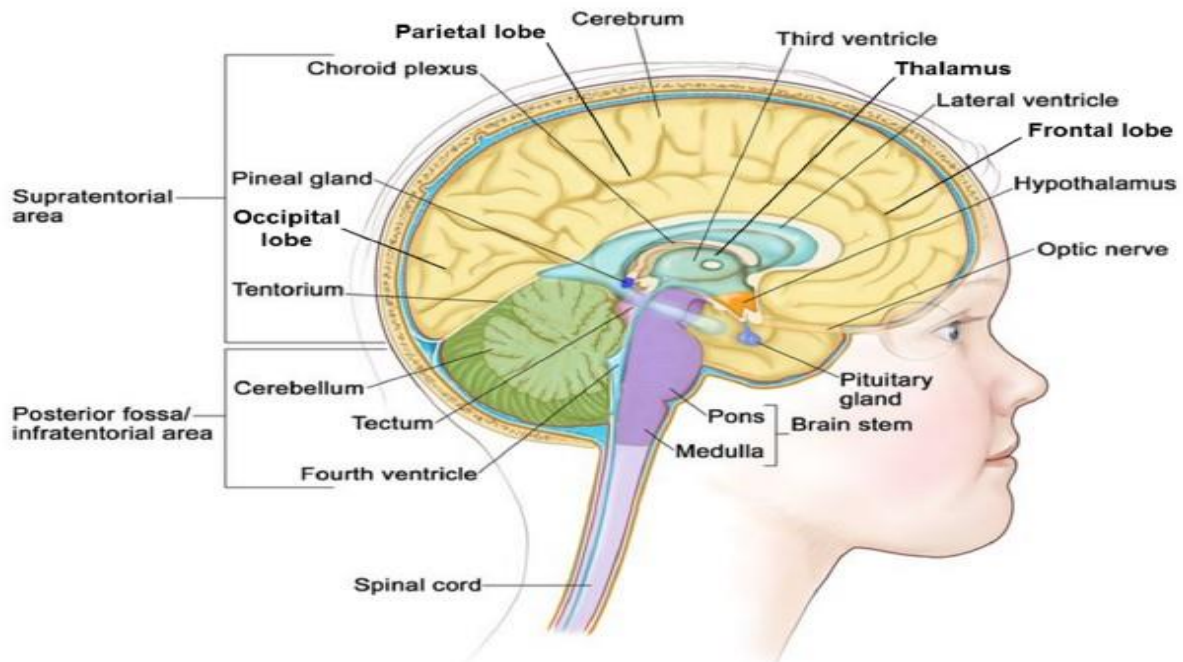


Figure 1: l'anatomie du cerveaux (adapté de Winslow 2013).

Le cortex cérébral représente la partie externe du cerveau, il est divisé en deux hémisphères (hémisphères droit et hémisphère gauche) séparés par un profond sillon médian (fissure longitudinale du cerveau) et chaque hémisphère est subdivisé en quatre lobes : frontale temporale, pariétal et occipital (Keunen, Counsell, and Benders 2017), les lobes les plus larges sont les lobes frontaux. Ce sont les régions du cerveau qui coordonnent la cognition, le raisonnement, langage expressif et la motricité. Les lobes temporaux sont situés au-dessous des lobes frontaux et pariétaux, ils assurent la perception et la reconnaissance de son, le stock du mémoire verbale et visuelle à court terme et l'interprétation des émotions. Les lobes pariétaux

sont localisés en arrière des lobes frontaux, ils sont sièges de la conscience du corps et de l'espace environnant. Les lobes occipitaux sont localisés près de l'arrière du crâne, ils sont responsables de la détection et le traitement des informations visuelles (Bassett and Gazzaniga 2011).

Le cervelet est placé dans la fosse crânienne postérieure sous les lobes occipitaux. Il joue un rôle dans le contrôle moteur, étant responsable de la posture et de l'équilibre du corps en recevant des informations du système d'équilibre de l'oreille interne, des nerfs sensoriels, des systèmes auditifs et visuels (McLachlan and Wilson 2017).

Le tronc cérébral est la partie du système nerveux centrale située entre la moelle épinière en bas, et le diencephale en haut. Il comprend de bas en haut trois parties: la moelle allongée (bulbe rachidien), le pont et le mésencéphale. Le bulbe rachidien joue un rôle essentiel dans la régulation cardiaque, la modulation du rythme et l'amplitude respiratoires et il constitue une zone de passage de nombreuses voies motrices et sensibles. Le pont constitue le deuxième étage du tronc cérébral et il en présente la plus grande partie, Il joue un rôle essentiel dans la transmission des informations entre le corps et le cerveau. Le mésencéphale qui assure le contrôle du mouvement des yeux et le traitement des informations visuelles et auditives (McLachlan and Wilson 2017).

Entre le cortex et le tronc cérébral sont localisées: le thalamus et l'hypothalamus. Le thalamus est responsable de la transmission des signaux sensoriels et moteurs vers le cortex et il est impliqué dans la régulation des cycles sommeil et la mémoire. L'hypothalamus joue le rôle du maintien de l'homéostasie du corps en contrôlant notamment l'équilibre énergétique, la régulation de la température corporelle et agit aussi comme connecteur le système nerveux et le système endocrinien par la production et la libération d'hormones (Bassett and Gazzaniga 2011).

2. Tissus nerveux

Les processus de prolifération cellulaire, migration et différenciation sont les responsables de la complexité de la structure du cerveau, les modifications anatomiques des vésicules cérébrales durant le développement embryonnaire reflètent les changements histologiques survenus et la présence de différents types cellulaires (Keunen, Counsell, and Benders 2017).

Durant le développement du système nerveux central, les cellules souches neurales qui sont dominantes dans le neuroépithélium précoce sont des cellules souches pluripotentes avec une capacité d'auto-renouvellement qui se différencie pour générer les lignées cellulaires neurales. Elles sont considérées comme les cellules progénitrices primaires qui génèrent des cellules neuronales par neurogenèse et des cellules gliales par gliogenèse durant les différents stades de développement (Teng et al. 2008).

a. Neurogenèse

La neurogenèse commence à une étape très précoce du développement embryonnaire, la fin de la gastrulation, et se poursuit jusqu'aux des stades postnatals dans des zones germinales restreintes du cerveau adulte, comme l'hippocampe et la zone sous ventriculaire (Bystron, Blakemore, and Rakic 2008; Stiles and Jernigan 2010). Les cellules neurales sont essentiellement générées par deux mécanismes (**Figure 2**): la division directe des cellules souches neurales, ou par l'amplification des cellules souches neurales en tant que cellules progénitrices intermédiaires IPCs (intermediate progenitor cells). Ces IPCs sont des percusseurs avec more potentialité de différenciation que les NSCs. Les deux mécanismes permettent l'amplification et la maintenance des NSCs avant la migration et la différenciation pour donner les différentes lignées cellulaires neurales (Temple 2001; Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

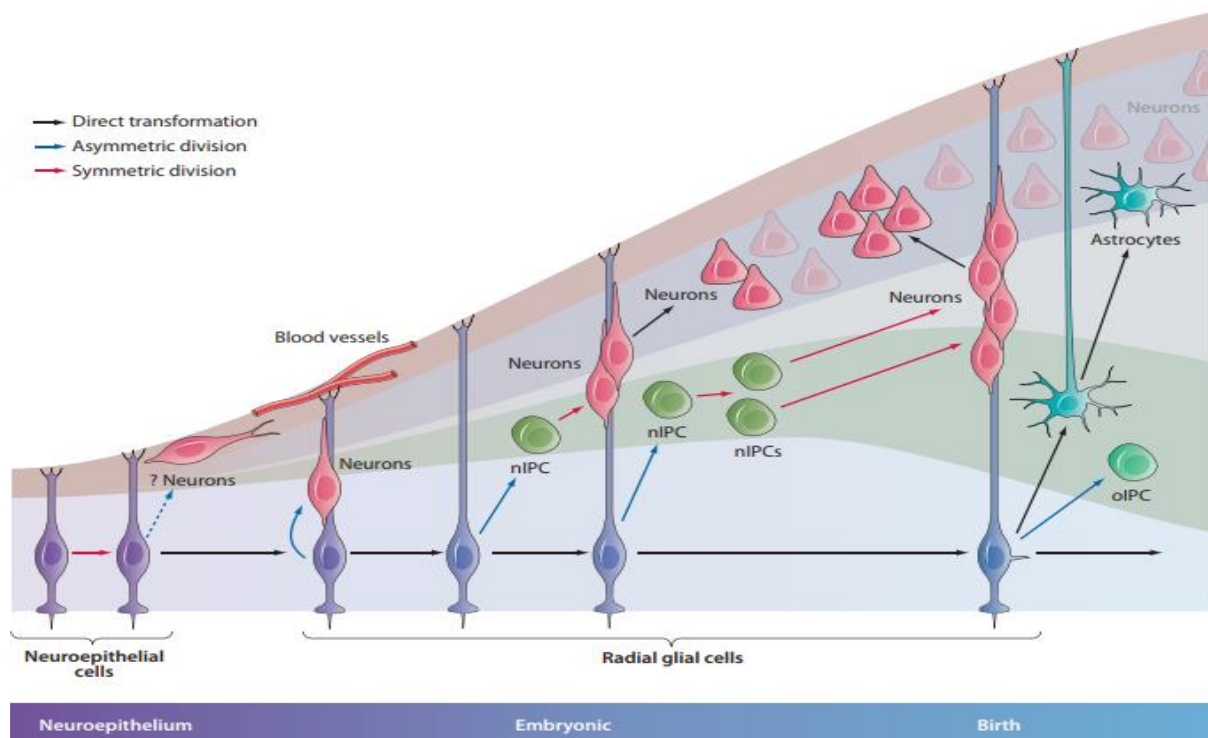


Figure 2: La neurogenèse (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

Au départ, les cellules neuroépithéliales qui forment la plaque neurale commencent à présenter des changements caractéristiques des cellules gliales différenciées, telle que la polarité basale-apicale et l'expression du transporteur glutamate aspartate astrocytaires (GLAST), la protéine de nestin, la protéine lipide binding, et la protéine d'acide fibrillaire gliale (GFAP). Cette population nommée cellules gliales radiales et reconnue comme des cellules progénitrices clés, Durant ce dernier stade les cellules gliales subissent une division dans la zone ventriculaire asymétrique qui permette l'auto-renouvellement et la génération d'un neurone post mitotique d'une manière directe ou indirect par l'intermédiaire d'une cellule fille progénitrice intermédiaire (IPC) (Temple 2001; Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

b. Gliogenèse

Les cellules gliales ou névroglies, sont des cellules non neuronales de système nerveux centrale et périphérique qui ne produisent pas des impulsions électriques, ils sont responsables de plusieurs fonctions (Stiles and Jernigan 2010)., le maintien de l'hémostasie, formation de myéline dans le système nerveux périphérique et fournissent la protection et le soutien aux neurones (Qian et al. 2000; Urbán and Guillemot 2014). A la fin de la neurogenèse, les cellules radiales gliales (RGC) présentes un switch neuronal au glial, elles arrêtent la production de neurones pour commencer la génération des cellules gliales. La production et la migration des neurones sont des événements prénatals, tandis que la prolifération et la migration des progéniteurs gliaux se produisent à la fin de l'embryogenèse et se prolongent tout au long de l'enfance, Contrairement aux cellules neuronales, les cellules gliales peuvent se multiplier, proliférer et devenir cancéreuses. Les cellules gliales comprennent : astrocytes, oligodendrocytes, microglie, et cellules épendymaires (Qian et al. 2000; Urbán and Guillemot 2014).

Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes des cellules gliales. Véritable tissu de soutien, Elles ont un aspect étoilé, ramifié, autour d'un corps cellulaire volumineux, elles ont un rôle dans la régulation de la vasoconstriction et de la vasodilatation, dans la régulation de l'homéostasie métabolique et ionique et sont impliquées dans la formation de la barrière hémato-encéphalique (Rowitch and Kriegstein 2010; Martynoga, Drechsel, and Guillemot 2012; Dimou and Götz 2014). A la fin de développement, les RGC migrent vers la zone corticale, avec une régression du processus radial et subissent une transformation progressive en astrocytes (**Figure 3**). Les astrocytes subissent une amplification locale par divisions symétriques avec formation de cellules progénitrices astrocytaires (aIPCs) avant la différenciation terminale.

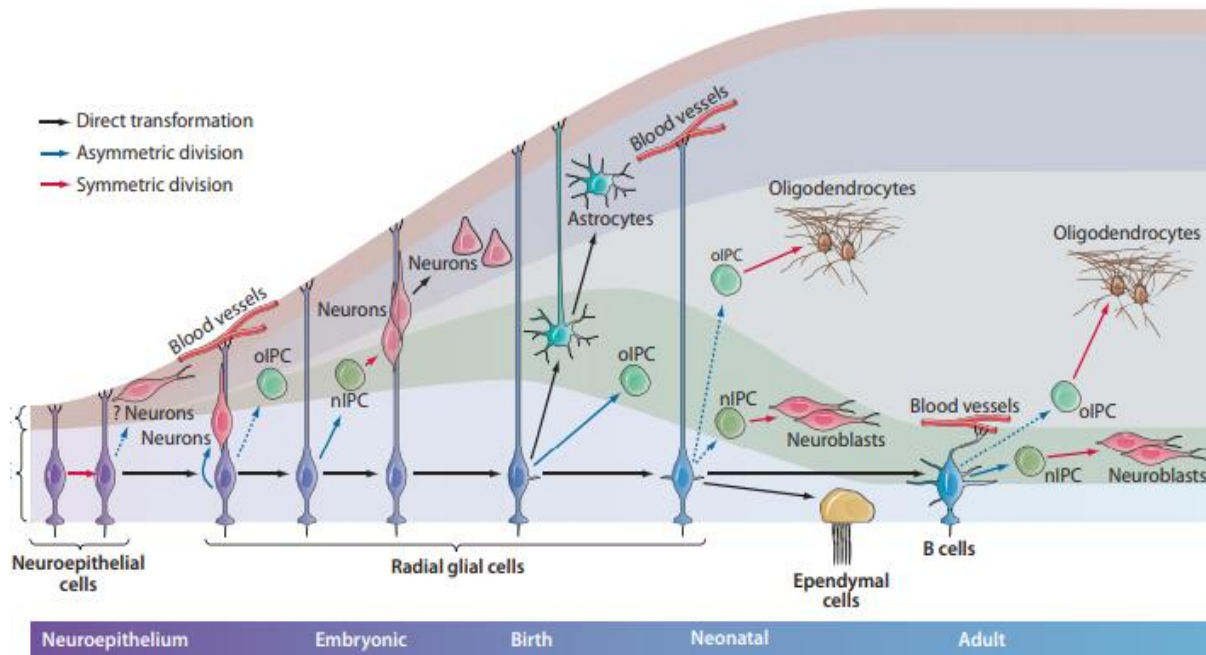


Figure 3: La Gliogenèse (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

Les oligodendrocytes sont des cellules de petite taille et moins nombreuses que les astrocytes. Leur rôle est l'élaboration de la myéline des axones, la production du facteur trophique et de l'intégrité axonale et de la survie neuronale. Tout au long du développement Les cellules progénitrices oligodendrocytes (oIPCs) sont générées par la division asymétrique des cellules RG. Puis les oIPC passent par des divisions symétriques pour se différencient en oligodendrocytes (Rowitch and Kriegstein 2010; Martynoga, Drechsel, and Guillemot 2012; Dimou and Götz 2014).

Il existe d'autres types de cellules gliales dans le SNC : les cellules épendymaires, les cellules B et la microglie. Les cellules épendymaires sont générées de la conversion d'une sous-population de RGC. Ces cellules sont localisées dans la moelle épinière et le système ventriculaire et sont impliquées dans la production et la sécrétion du liquide cébrospinal et jouent un rôle important dans les échanges avec le parenchyme cérébral. Les lymphocytes B semblent être des RGC quiescentes qui maintiennent la génération des IPCs dans le cerveau adulte et agissent dans le maintien de l'organisation épithéliale. La microglie localisée dans tout le cerveau et la moelle épinière, À cause de l'imperméabilité de la barrière hématoencéphalique (BBB), LES cellules immunitaires sont incapables de pénétrer le SNC, et la microglie correspond à des macrophages spécialisés étant une défense immunitaire active dans le SNC (Ginhoux et al. 2013).

3. Généralité sur les tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales constituent de nos jours la principale cause de mortalité par cancer chez les enfants, devant les leucémies (**Figure 4**) (Siegel et al., 2016). D'après les rapports statistiques du registre central des tumeurs cérébrales des États-Unis (CBTRU), les tumeurs du système nerveux central ont une incidence d'environ 5 cas pour 100 000 enfants de moins de 14 ans. 30,9% des tumeurs du SNC sont malignes. Cela représente 28% des tumeurs cérébrales chez les adultes de plus de 20 ans et 67% chez les enfants de moins de 14 ans. Parmi les tumeurs cérébrales malignes, la majorité d'entre elles sont des gliomes. Ces tumeurs expriment des marqueurs gliaux présumant un développement à partir de cellules gliales ou de leurs progéniteurs (Ludwig and Kornblum, 2017). Les gliomes de haut grade sont les gliomes les plus agressifs, ils représentent d'environ 85% des gliomes chez l'adulte et approximativement 15 à 20% des gliomes des enfants (Braunstein et al., 2017). Parmi les gliomes de haut grade, les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes sont les glioblastomes. Ils touchent majoritairement des adultes (Ostrom et al., 2018). Au sein des gliomes de haut grade pédiatrique, les DIPG ou plus largement les gliomes diffus de la ligne médiane (DMG), représentent la forme la plus sévère des tumeurs pédiatriques avec une taux de survie inférieur à 10% (Louis et al., 2016).

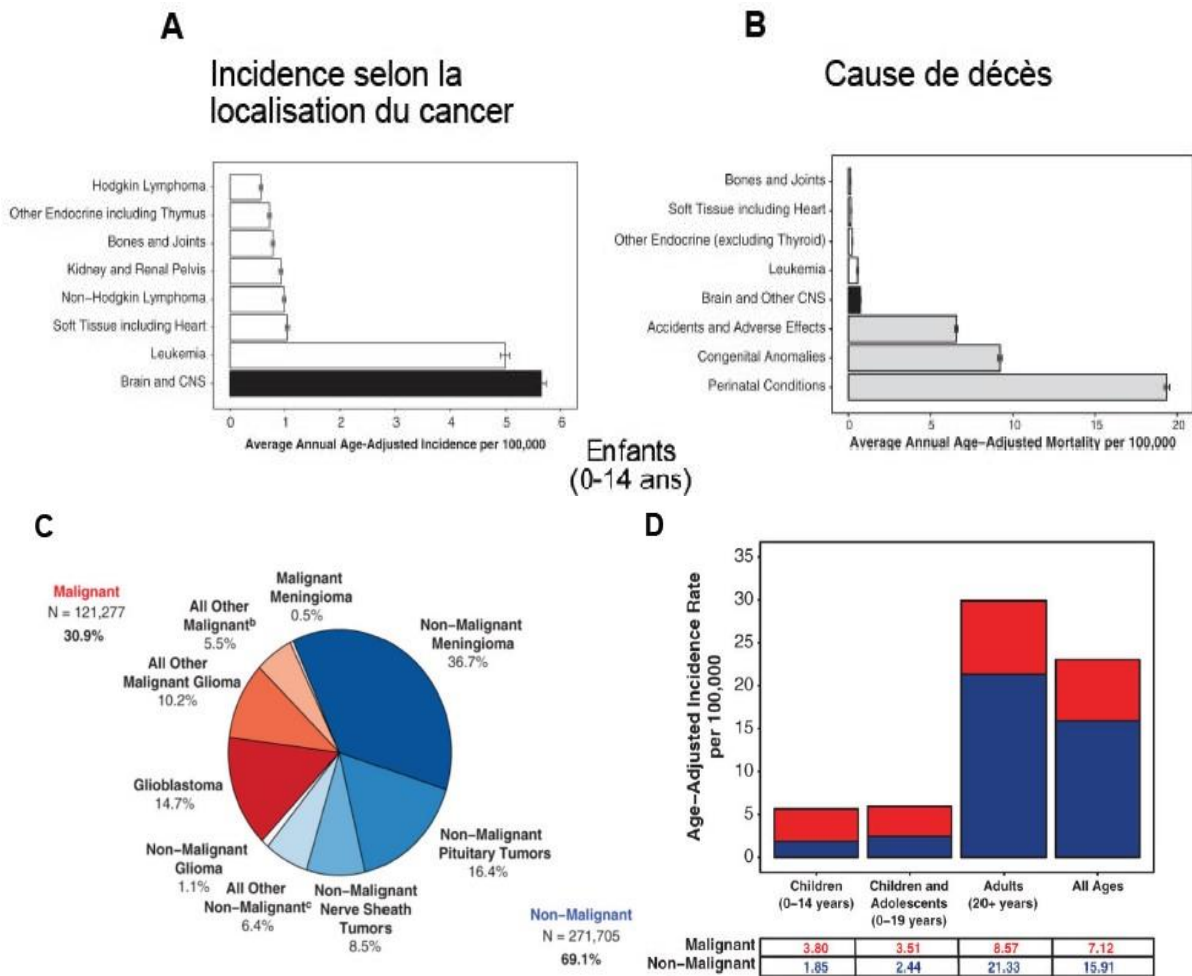


Figure 4: Incidence et mortalité liées aux tumeurs du système nerveux central et distribution de ces tumeurs selon leurs malignités (Ostrom et al., 2018).

4. Classification

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a été mise à jour la classification des tumeurs cérébrales en 2016, et cette classification est fondée principalement sur des caractéristiques moléculaires pour la définition des différentes entités de ces néoplasmes, plus de 120 types différents de tumeurs cérébrales et du SNC ont été identifiés (Wesseling and Capper, 2018). Avec les progrès des techniques génomiques, la transcriptomique, le séquençage du génome entier et les profils de la méthylation de l'ADN, une quantité de données importantes ont été collectées. Ces données génomiques ont montré que les tumeurs considérées auparavant comme une même entité, elles présentent une large hétérogénéité. En effet, la classification de l'OMS de 2016 prend en compte les altérations moléculaires récemment découvertes pour certaines entités (Louis et al. 2016).

En particulier, nous pouvons observer un affinement dans la classification des tumeurs du tissu neuroépithéliales, notamment dans les gliomes. Des sous-groupes plus homogènes

qui tiennent compte des altérations génétiques rapportées dans plusieurs études, telle que la mutation IDH dans les tumeurs astrocytaires et oligodendrogiales diffuses, la délétion de chromosomes 1p et 19q dans les oligodendrogliomes (A. Cohen, Holmen, and Colman 2013; N. Hu, Richards, and Jensen 2016), la mutations K27M des gènes codant pour l'histone H3 dans les gliomes diffus apparaissant dans le thalamus et le tronc cérébral, en se basant sur cette altération, une nouvelle entité nommée gliome médian diffus (DMG) a été identifiée (Schwartzentruber et al. 2012 ; Sturm et al. 2012). Cette entité comprend les DIPG, un gliome de haut grade (HGG) qui représente 20 % de toutes les tumeurs cérébrales pédiatriques, ainsi que d'autres HGG pédiatriques (Louis et al. 2016).

II. Le gliome pontique intrinsèque diffus

1. Généralité

Le DIPG est la forme la plus agressive de gliomes du tronc cérébral, il représente 10 à 15 % de toutes les tumeurs cérébrales pédiatriques (Jansen et al. 2012). La localisation délicate profondément ancrée dans le pont du tronc cérébral et la nature infiltrative des cellules tumorales rendent ces tumeurs inopérables par l'intervention chirurgicale. Chaque année 40 à 50 nouveaux cas sont diagnostiqués en France. Le DIPG apparaît chez les enfants et les adultes, avec un début moyen entre 6 à 9 ans. Le Survie Globale médian varie de 9 à 12 mois après le diagnostic et moins de 10 % des patients survivent plus de 2 ans (Jones et Baker, 2014 ; Buczkowicz et Hawkins, 2015).

La radiothérapie (RT) est le traitement standard. Néanmoins, il n'offre qu'une efficacité transitoire, retardant la progression de la tumeur avec une rechute systématiquement fatale en quelques mois (Zaghloul et al. 2014). La survie médiane sans progression (SSP) est de 5,6 mois (Puget et al. 2015). Au cours des 50 dernières années, aucun progrès n'a été réalisé dans le traitement, malgré les efforts dans l'utilisation de divers agents chimiothérapeutiques et radiosensibilisants dans différents protocoles combinatoires avec la RT (Hummel et al. 2016) dans plus de 250 essais cliniques qui n'ont pas réussi à améliorer la survie des patients (Lapin et al., 2017).

La biopsie des patients DIPG a été abandonnée en raison des risques potentiels de la procédure, de la capacité d'établir un diagnostic basé seulement sur les symptômes cliniques et l'analyse par imagerie (IRM), mais aussi car il ne permettait pas d'améliorer le résultat du patient ou de choisir un meilleur traitement (Cartmill et Punt 1999). La rareté du matériel primaire et l'association du DIPG avec d'autres gliomes de haut grade (HGG) qu'été auparavant, ont retardé les progrès thérapeutiques et entraîné une mauvaise compréhension des mécanismes moléculaires de cette maladie (Roujeau et al. 2007 ; Jones et Baker 2014).

2. Diagnostic

Les DIPG sont localisées au niveau du tronc cérébral, ne forment pas de masse tumorale, mais infiltrent le tissu sain. Les premiers symptômes apparaissent brutalement, et sont suivis d'une rapide progression en quelques jours à quelques semaines. Le délai entre les premiers signes et le diagnostic est généralement inférieur à 3 mois (Cohen et al., 2017). Les patients souffrent généralement d'une ataxie, d'un syndrome pyramidal ainsi que d'une paralysie des

nerfs crâniens (Robison and Kieran, 2014). Le diagnostic est généralement réalisé par imagerie par résonance magnétique (IRM). L'IRM permet de détecter une masse centrée sur le pont du tronc cérébral qui en occupe généralement plus de 50% et qui comprime le cervelet (**Figure 5**).



Figure 5: Les gliomes infiltrants du tronc cérébral : localisation et diagnostic.

IRM d'un patient de Gustave Roussy atteint de DIPG : coupes T2-FLAIR sagittale (gauche) et axiale (droite).

Pendant longtemps les DIPG ont été assimilés aux gliomes de l'adulte, et la compréhension de leur biologie n'en est qu'à ses prémices. Ce manque de connaissance sur les mécanismes moléculaires sous-jacents résulte notamment d'un accès très limité à du matériel biologique jusqu'à récemment. Les neurochirurgiens de l'hôpital Necker-Enfants malades ont été les premiers à réaliser des biopsies stéréotaxiques au diagnostic dès 2002 (**Figure 6**) (Puget et al., 2015). Dans leur étude publiée en 2015, le Pr S. Puget et son équipe ont montré que le risque associé à la biopsie du tronc cérébral n'était pas supérieur au risque associé aux biopsies réalisées dans d'autres localisations du cerveau.

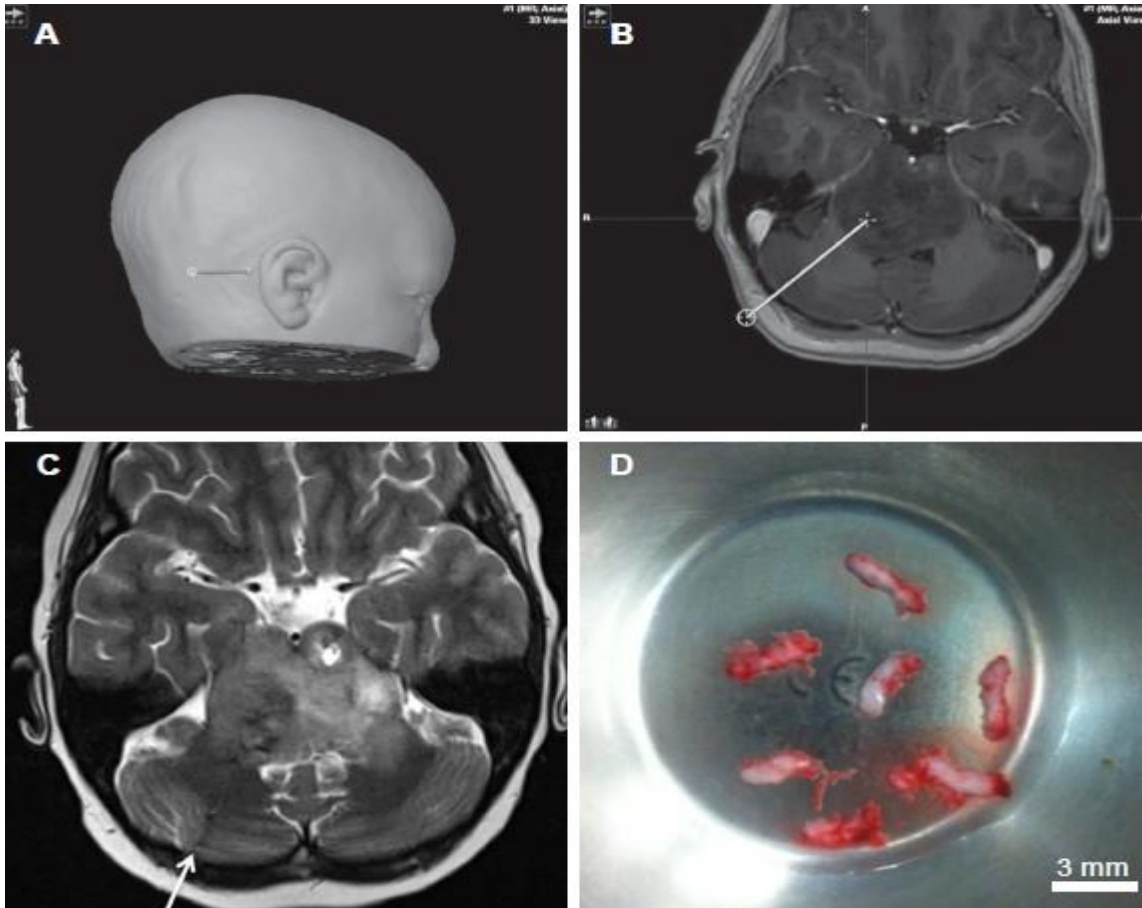


Figure 6: Biopsie stéréotaxique de DIPG.

Planification du trajet de la biopsie par schéma 3D (A) et IRM T1 en coupe axiale (B). IRM T2 post opératoire ; la flèche indique le trajet de l'aiguille (C). Biopsies obtenues (D), (Puget et al., 2015).

Actuellement la réalisation d'une biopsie au diagnostic est largement pratiquée. La biopsie permet : de confirmer le diagnostic par immunohistochimie, d'étudier les altérations moléculaires par un séquençage à haut débit de l'exome ou «whole exome sequencing» (WES) de la tumeur et du sang du patient, permettant d'identifier les mutations somatiques et les remaniements chromosomiques accumulés dans l'ensemble des gènes codants, et l'étude du transcriptome par RNAseq qui permet d'étudier les dérégulations dans l'expression des gènes et de développer des modèles cellulaires et murins (Puget et al., 2015).

3. Alteration génétiques

Grace à la réalisation des biopsies, l'analyse des altérations chromosomiques comme des délétions ou des amplifications de segments d'ADN réalisé par puce d'hybridation génomique comparative (CGH array) ont permis de distinguer les HGG pédiatriques (pHGG) des HGG adultes (Paugh et al., 2010). Puis, l'analyse du profil d'expression des gènes par puce à ADN

a permis d'individualiser les DIPG des pHGG hémisphériques (Puget et al., 2012). En 2012, grâce au développement des technologies de génomique, des mutations somatiques récurrentes entraînant la substitution de la lysine en position 27 par une méthionine (K27M) de l'histone H3 ont été découvertes (Schwartzentruber et al., 2012 ; Wu et al., 2012). Cette mutation H3-K27M a permis d'individualiser sur le plan moléculaire les pHGG de la ligne médiane situées dans le tronc, le thalamus et la moelle épinière (Sturm et al., 2012). Ceci a conduit à la création d'une nouvelle entité dans la nouvelle classification de l'OMS, Diffuse Midline Glioma (DMG). Chez les patients atteints de DIPG, plus de 90% des patients présentent la mutation H3-K27M (Castel et al., 2015). A noté qu'il existe d'autres altérations de l'histone H3, comme la mutation H3.3-G34R/V qui définit un sous-groupe de HGG hémisphériques (Sturm et al., 2012).

A. Présentation schématique d'un nucléosome composé de huit protéines d'histone (H2A, H2B, H3 et H4)₂ autour desquelles s'enroule l'ADN. B. Les chaînes de nucléosomes se compactent pour former des fibres de chromatine qui vont se condenser plus ou moins pour former l'euchromatine et l'hétérochromatine. C. Ces différents états de la chromatine sont régulés par des modifications post-traductionnelles au niveau des queues N-terminales des histones (phosphorylation (P), acétylation (Ac), ubiquitinylation (Ub) et méthylation (Me)). (Tollervey et Lunyak, 2012).

La chromatine est une structure nucléoprotéique permettant l'enroulement et l'empaquetage de l'ADN, dans les noyaux des cellules eucaryotes. La chromatine est constituée d'octamères d'histones autour desquels 146 paires de base de la double hélice d'ADN s'enroulent pour former les nucléosomes, l'unité fonctionnelle de la chromatine (**Figure 7**) (Luger et al., 1997). La chromatine peut être sous deux états différents de compaction : une forme relâchée, l'euchromatine, transcriptionnellement active et une forme hautement condensée, l'hétérochromatine, au sein de laquelle les séquences nucléotidiques sont rendues inaccessibles et par conséquent la transcription est impossible (Tollervey and Lunyak, 2012).

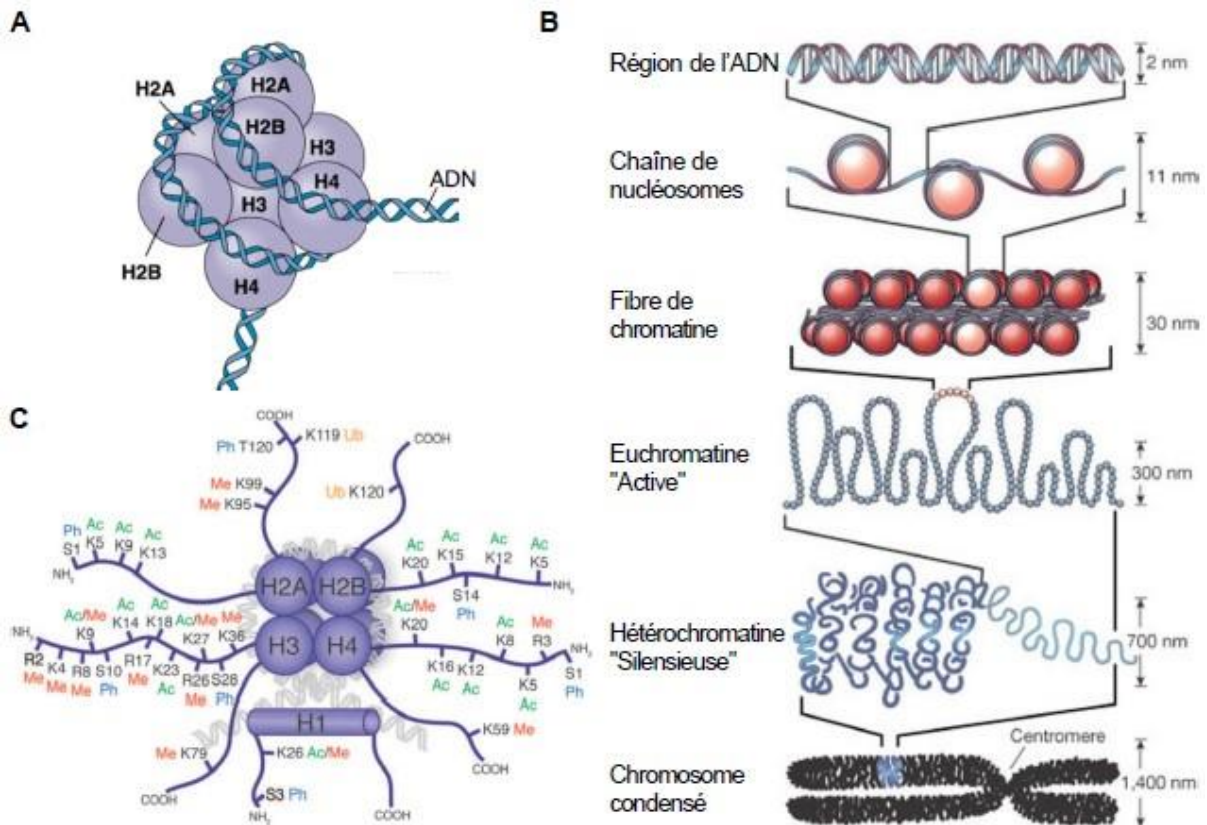


Figure 7: Structure de la chromatine et modifications post-traductionnelles.

Cette dynamique de la chromatine est régulée par des modifications post traductionnelles (méthylation, acétylation, phosphorylation, ubiquitination) sur des résidus d'acides aminés spécifiques au niveau des queues N- et C terminales non structurées des histones. La combinaison de l'ensemble de ces modifications forme le code histone. Les régions sous forme d'euchromatine active sont notamment caractérisées par la présence des marques épigénétiques H3K4me3, H3K9ac et H3K27ac alors que les régions sous forme d'hétérochromatine présentent les modifications post-traductionnelles H3K9me3 et H3K27me3.

Les mécanismes épigénétiques permettant l'expression des gènes sans modification de la séquence d'ADN sont des mécanismes complexes hautement orchestrés et collaboratifs au sein de la cellule. Parmi ces mécanismes, plusieurs familles d'enzymes sont responsables de la modification des marques épigénétiques. Ces marques sont apposées, lues et supprimées par des enzymes dites "writers", "readers" et "erasers", respectivement (**Figure 8**).

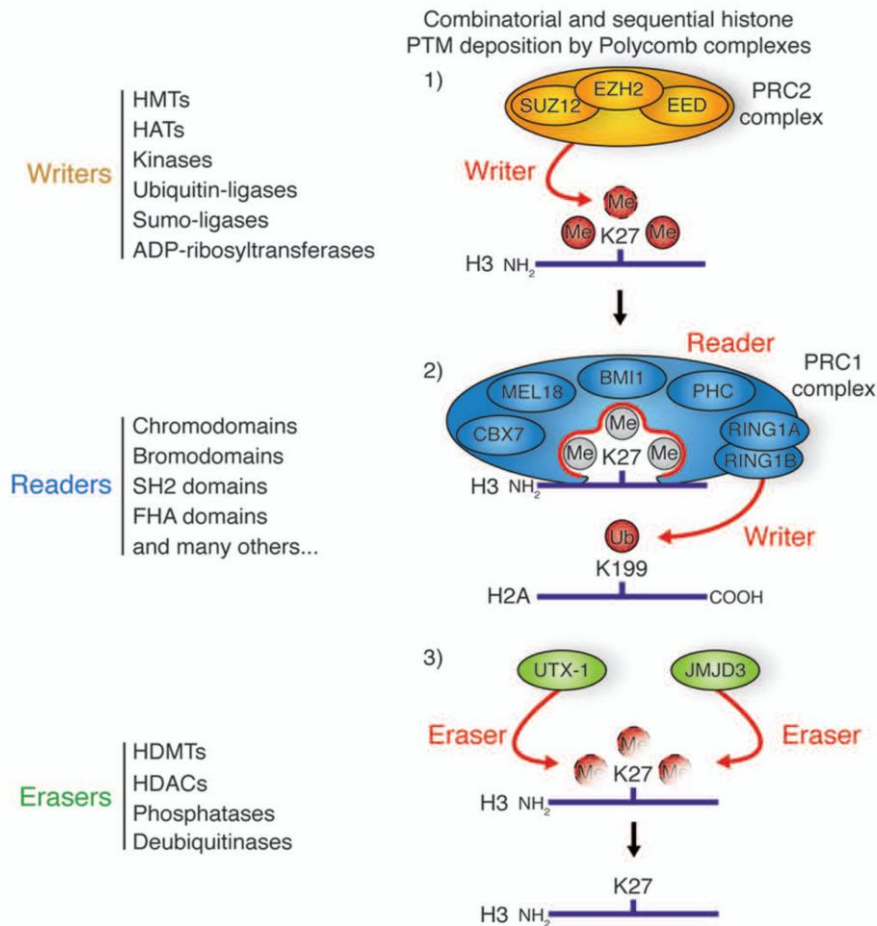


Figure 8: Les enzymes de modification des marques épigénétiques.

Il existe 3 familles d'enzymes de modification des marques épigénétiques. Les *writers* sont des complexes qui apposent des marques épigénétiques comme le complexe PRC2. Les *readers* sont des complexes qui reconnaissent la présence des marques épigénétiques. Les *erasers* sont des complexes qui ont pour fonction d'enlever les marques épigénétiques. Histone methyltransferases (HMTs); histone acetyl transferases (HATs); histone demethylases (HDMs); histone deacetylases (HDACs), (Tollervey and Lunyak, 2012).

4. Conséquences de la mutation H3-K27M

Afin de déterminer l'impact des mutations H3-K27M, Lewis et coll. ont analysé les modifications des histones régulatrices chez des patients qui n'ont pas la mutation dit « Wild type » (WT) et des patients mutés (Lewis et al. 2013).

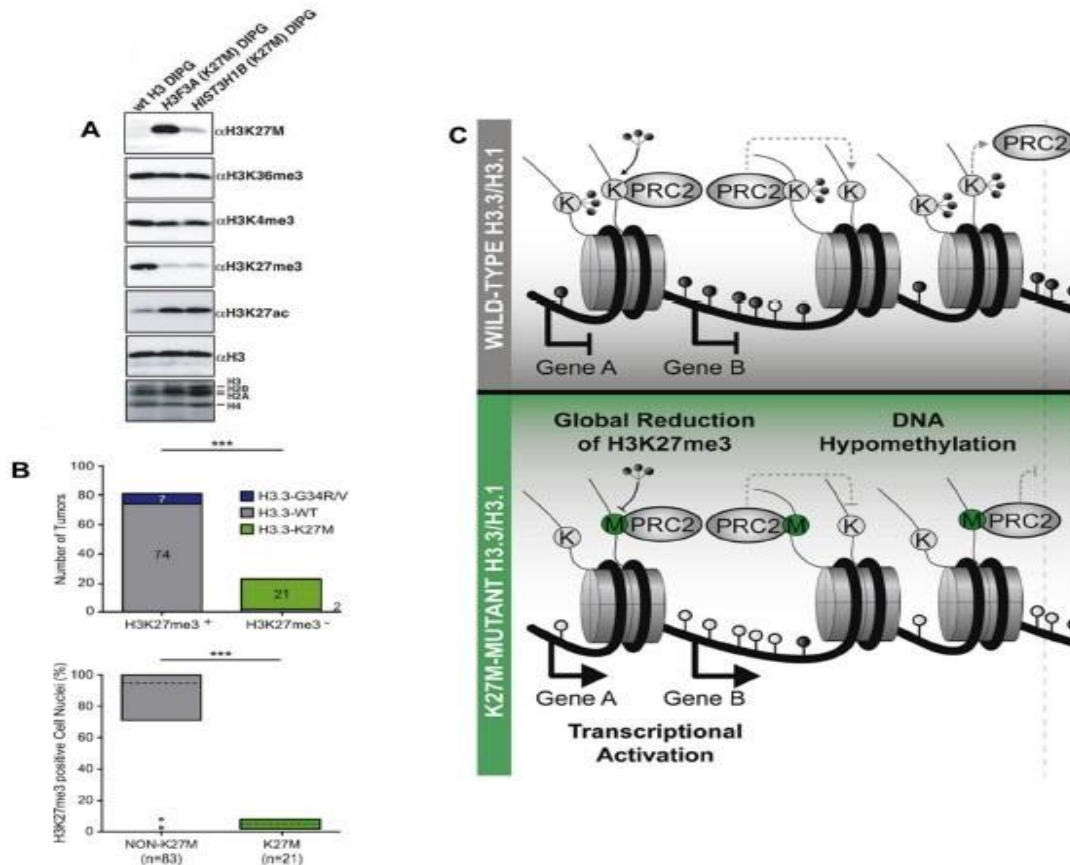


Figure 9: Conséquence de la mutation H3-K27M sur la marque épigénétique

(A) Western Blot sur des extraits d'histones à partir de cellules de DIPG présentant une forme sauvage ou mutée de l'histone H3 (Lewis et al. 2013). (B) Immunomarquage de H3K27me3 de type sauvage (H3.3-WT), mutant K27M ou mutant G34R/V H3.3 (n = 104 pHGG, ***p < 0,001). IHC pour H3K27me3 des noyaux cellulaires sans (non-K27M) ou avec la mutation K27M (200 noyaux cellulaires/tumeur) (**p < 0,001) (Bender et al. 2013). (C) l'effet du le Polycomb Répressive Complexe 2 (PRC2) dans le contexte normal et en présence de la forme mutée H3-K27M (Bender et al. 2013).

Ils ont montré que les tumeurs mutées ont une perte globale significative de la marque répressive H3-K27me3 avec une légère augmentation de H3K27ac par rapport aux tumeurs WT, sans aucune altération des autres modifications régulatrices telles que H3-K36me3 et H3-K4me3 (**Figure 9A**). De plus, Bender a confirmé ces résultats dans une cohorte, dans laquelle tous les patients mutés K27M (n = 21) ont présenté une réduction des niveaux de H3K27me3 (**Figure 9B**) (Bender et al. 2013).

Dans les cellules normales, la triméthylation sur H3K27 est médiée par le Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). Ce complexe multiprotéique PRC2 assure la médiation du silencement génique par la di- et/ou la triméthylation des histones de K27 via ses sous-unités enzymatiques EZH1 et EZH2 (Margueron et Reinberg 2011). La substitution H3K27M inhibe l'activité enzymatique de la sous-unité EZH2 qui ne peut plus reconnaître le résidu lysine en

position 27 de l'histone sauvage H3 résiduelle, qui reste par conséquent non méthylée. Ensuite, la mutation H3 K27M a un effet négatif important dû au recrutement aberrant de PRC2 qui bloque la méthylation de K27 sur les histones WT. Par conséquence, il y a une perte globale du niveau de H3K27me3 qui conduit à une dérégulation majeure de l'expression génique. De plus, ils ont montré que l'hypométhylation de l'ADN est également observée dans ces tumeurs (**Figure 9C**), renforçant ainsi l'augmentation de l'expression des gènes. (Bender et al. 2013 ; Lewis et al. 2013).

5. Traitement

a. Les classes thérapeutiques

Il existe plusieurs classes thérapeutiques pour les cancrs, le choix de traitement dépend de type de cancer et de leur stade. Des patients ont besoins d'un seul traitement alors que d'autres ont besoins de la combinaison de plusieurs traitements selon la nature et le stade de tumeur. La radiothérapie, le traitement standard est typiquement une dose précise de rayons X appliquée sur la tumeur, répartie sur plusieurs séances (Zaghloul et al., 2014). La chimiothérapie qui repose à utiliser des agents chimiothérapeutiques toxiques pour tuer la tumeur. (Clymer et Kieran, 2018). L'immunothérapie, qui permet de restaurer une certaine immunité chez les patients afin d'éliminer les tumeurs (Platten et al., 2016). Systèmes de délivrance, Cela consiste en l'implantation stéréotaxique d'un cathéter au niveau de la tumeur afin de pouvoir administrer directement le traitement à travers le cathéter (Gwak et Park, 2017).

b. Techniques conventionnelles

Contrairement à d'autres tumeurs du cerveau, le DIPG ne peut pas être enlevé chirurgicalement car la tumeur infiltre le tronc cérébral, région du cerveau qui contrôle plusieurs fonctions vitales.

Le seul traitement standard utilisé à ce jour est la radiothérapie, typiquement une dose de rayons X entre 54 et 60 grays est applique sur la zone de la tumeur, répartie sur 30 séances pendant 6 semaines (Zaghloul et al., 2014). La radiothérapie est le seul traitement des DIPG qui induit un prolongement de la survie des patients. Il agit aussi transitoirement sur la diminution des symptômes. C'est donc plutôt un traitement palliatif qui permet d'augmenter la survie de plusieurs mois au lieu de plusieurs semaines (Clymer et Kieran, 2018). Des glucocorticoïdes sont fréquemment administrés en association avec la radiothérapie afin d'éviter ou de réduire des oedèmes développés lors des radiations ou à cause de la tumeur (Clymer et Kieran, 2018).

Plusieurs stratégies chimiothérapeutiques ont déjà été testées pour traiter les patients, incluant la chimiothérapie combinée avec les radiations. Malheureusement, la survie ou encore la durée de vie sans aggravation reste inchangée (Clymer et Kieran, 2018). Les traitements utilisant des agents alkylants de l'ADN tels que le cisplatine, le temozolomide ou le carboplatine ont échoué, que ce soit seuls ou associés à la radiothérapie. Le temozolomide est un agent utilisé dans le traitement standard des glioblastomes. Or dans les DIPG, ce traitement n'a aucun effet bénéfique sur les patients (Clymer et Kieran, 2018).

La chimiothérapie n'a pas démontré de bénéfice pour plusieurs raisons. Principalement car il est nécessaire de prendre en considération la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique qui empêche certains composés d'atteindre la tumeur (Gwak et Park, 2017).

c. Cibles thérapeutiques

La thérapie cible représente l'alternative à la chimiothérapie classique, qui n'est pas efficace, la thérapie ciblée est tout simplement l'utilisation des agents thérapeutiques adaptés aux caractéristiques moléculaires de la tumeur. La recherche et la compréhension des altérations et de processus biologiques impliqués dans le développement des DIPG a permis de mettre en place ce type de thérapie.

La mutation de l'histone H3, qui induit l'hypométhylation des histones H3K27, constitue une cible thérapeutique. En effet, de nombreux essais cliniques sont en cours afin d'étudier l'effet de l'utilisation de régulateurs épigénétiques contre les tumeurs DIPG. Certains agents ont déjà démontré leur efficacité *in vitro* sur des cellules issues de biopsies de patients et *in vivo* chez la souris (Lewis et al., 2013).

L'activation aberrante de la voie de signalisation PI3K-Akt a conduit à la recherche d'inhibiteurs de cette voie. Le dasatinib, un inhibiteur des tyrosines kinases, induit une diminution de la prolifération cellulaire *in vitro* grâce à la diminution de l'activité du récepteur à tyrosine kinase, PDGF α R qui joue un rôle clé dans le développement des cellules gliales du SNC. (Truffaux et al., 2014). En revanche, les essais cliniques associés au crizotinib (inhibiteur de c-Met) ou au vandetanib (inhibiteur du VEGFR2) n'ont pas été concluants (Broniscer et al., 2013 ; Broniscer et al., 2018). L'utilisation du temsirolimus, inhibiteur de mTOR également impliqué dans la voie PI3K-Akt, est en phase d'essai clinique en association avec la périfosine (inhibiteur d'Akt et de PI3K) ou encore avec du vorinostat (régulateur épigénétique) (Kaye et al., 2014 ; Lapin et al., 2017). Des agents cibles tels que le tamoxifène (cible les récepteurs des oestrogènes), l'erlotinib (inhibiteur de la tyrosine kinase du récepteur "epidermal growth

factor”, EGFR) ou le bevacizumab (anticorps dirigé contre le facteur de croissance de l’endothélium vasculaire, VEGF) n’ont en revanche pas d’effet (Mathew et Rutka, 2018).

6. La barrière hématoencéphalique, défis et perspectives

Durant les 50 dernières années, centaines d’essais cliniques ont été menés avec l’espoir de guérir ou seulement ralentir la progression des DIPG en association ou non avec la RT (Jansen et al., 2012). Malheureusement, aucun d’entre eux n’a montré de succès. L’une des explications de cette inefficacité est la faible biodisponibilité des médicaments administrés par voie systémique qui devront traverser la barrière hémato-encéphalique ou « Blood-brain barrier » (BBB), qu’est hautement sélective, pour accéder aux tumeurs du SNC (**Figure 10**) (Sweeney et al., 2018).

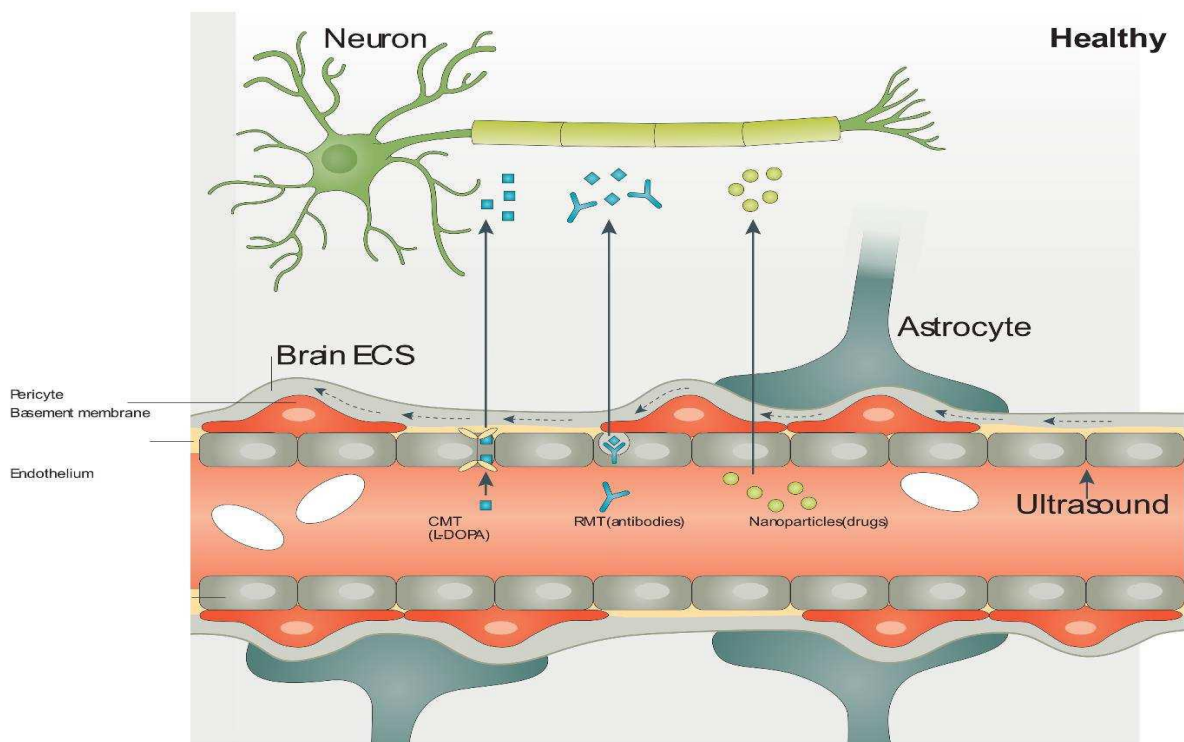


Figure 10: Barrière hémato-encéphalique (Sweeney et al., 2018).

Les cellules endothéliales qui composent le système vasculaire du cerveau sont reliées par des jonctions serrées et entourées d’une membrane basale épaisse et de pieds astrocytaires et d’une couche de péricytes. La forme et l’épaisseur de la BBB permettent le passage passif de quelques molécules telles que l’eau, certains gaz, les lipides solubles, ainsi que le transport actif d’autres comme le glucose, les protéines et les acides aminés (Stamatovic et Andjelkovic, 2008). Aucun lymphocyte ne peut traverser la BBB, ce qui fait que les cellules microgliales sont les seules cellules immunogènes résidant dans le cerveau. Bien que, la proportion d’agents

thérapeutiques capables de franchir la BBB a été estimée à moins de 2 % (Pardridge, 2005). De plus, la BBB est presque intacte chez les enfants atteints de DIPG, ce qui rend encore plus difficile l'administration d'agents aux cellules tumorales.

Pour surmonter l'accès limité aux cellules tumorales, ainsi que pour délivrer le médicament à la bonne concentration, au bon moment et au bon endroit, plusieurs stratégies sont actuellement développées. Parmi eux, on peut citer la délivrance améliorée par convection, l'encapsulation de médicaments dans des nanoparticules ou l'utilisation d'ultrasons qui ouvrent physiquement de manière transitoire la BHE pour permettre la diffusion du composé injecté par voie intraveineuse (Pardridge, 2005).

III. Epigénétique et traitement du cancer

1. La contribution de l'épigénétique dans le traitement du cancer

Une cellule peut se différencier en différents types cellulaires, La régulation épigénétique y joue un rôle primordial. Elle est non seulement essentielle pour générer la diversité cellulaire lors du développement mais également pour maintenir la stabilité et l'intégrité du génome des différentes cellules. Ces changements épigénétiques sont héréditaires et réversibles.

Le mot épigénétique a été inventé pour définir les changements phénotypiques sans changement de génotype afin d'expliquer les mécanismes du développement (Waddington, 2012). Actuellement, les mécanismes épigénétiques sont décrits comme étant la régulation de l'expression des gènes par l'intermédiaire de l'altération de la chromatine sans changement dans la séquence d'ADN. Ces mécanismes, sont la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et la régulation par des ARN non codants. Ils stabilisent l'expression des gènes et régulent ainsi l'identité de la cellule (Allis et Jenuwein, 2016). De ce fait, le développement d'un cancer n'est pas seulement lié aux changements génétiques par la translocation, l'amplification, la délétion ou la mutation de gènes, mais il est maintenant prouvé que l'altération de la régulation épigénétique est impliquée dans la cancérogenèse (Jones et Baylin, 2007). Dans les DIPG, la mutation H3K27M induit l'altération de la régulation épigénétique de l'acétylation des lysines. L'acétylation affaiblit l'interaction avec l'ADN et cela conduit à l'ouverture de la chromatine pour la transcription des gènes. Elle est enrichie dans les régions actives du génome et permet de faciliter la liaison avec les facteurs de transcription. La désacétylation des histones engendre la condensation de la chromatine et la diminution de l'expression des gènes.

La mutation qui implique l'inactivation des histone acétyltransférase (HAT) augmente le risque de développer un cancer, ainsi que la translocation et l'amplification des gènes HAT (Mai et al., 2005). Ces altérations génétiques sont retrouvées dans le glioblastome, le cancer colorectal, le carcinome hépatocellulaire et les tumeurs gastriques (Wood et al., 2018). L'acétylation des histones induit le recrutement des protéines contenant un bromodomaine. Par exemple, la protéine BRD4 a un rôle dans la reconnaissance des histones acétylées. Elle permet l'initiation de la transcription en attirant des cofacteurs et en activant l'ARN polymérase II (Hashizume et al., 2014). Des régulateurs de protéines à bromodomaine ont été développés. Ils ont une activité antitumorale dans les cancers solides mais aussi hématologiques.

2. Inhibiteurs des histones désacétylases (HDACi)

Les HDAC induisent la condensation de la chromatine et par conséquent la diminution de l'expression des gènes. L'Homme possède 18 HDAC regroupées en 2 familles et classées en 4 groupes basés sur l'homologie de séquence avec la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Singh et al., 2018). Ces HDAC régulent plus de 1750 protéines qui sont impliquées dans divers processus biologiques : la réplication et la réparation de l'ADN, le remodelage de la chromatine, la transcription des gènes, la progression du cycle cellulaire, la dégradation des protéines et la réorganisation du cytosquelette (Laubach et al., 2015).

Les HDACi sont des molécules très diversifiées, selon qu'ils inhibent une classe HDAC ou plusieurs à la fois. Certaines classes peuvent être spécifiquement inhibées (Anne et al., 2013). On retrouve ces inhibiteurs dans la nature (arbres, plantes, champignons ou encore bactéries) ou sous forme synthétique. Ils sont classés en 4 groupes : acide hydroxamique, benzamide, peptide cyclique et les acides gras à chaînes courtes. Ils ont été découverts en 1977 par Riggs et al. Avec le composé nommé n-butyrate (Singh et al., 2018).

3. Les histones désacétylases et traitement du cancer

Les HDACi restaurent le niveau d'acétylation dans la cellule et induisent ainsi l'expression des gènes qui étaient réprimés dans les cellules cancéreuses. Ce sont potentiellement des gènes suppresseurs de tumeurs anormalement réprimés dans les cellules malignes (Wood et al., 2018). Pour éviter le développement et la progression d'un cancer, il existe un certain équilibre entre les protéines HAT et HDAC. En inhibant la désacétylation, ces inhibiteurs sont responsables de l'activation des mécanismes d'apoptose, d'arrêt du cycle cellulaire et de l'inhibition de l'angiogenèse ou des processus métastatiques (**Figure 11**).

En 2009, le FK228 ou romidepsin a été validé dans le traitement de seconde intention des CTCL « Cutaneous T-cell lymphoma ». Le belinostat (PXD101) et le Panobinostat (Farydak) ont été introduits entre 2015 et 2016 pour le traitement des lymphomes périphériques à cellules T et des myélomes multiples, respectivement (Suraweera et al., 2018). Les composées du groupe des acides hydroxamiques, qui sont le vorinostat, le berlinostat et le Panobinostat, inhibent directement le site actif des enzymes HDAC. Ils sont capables de se loger dans la poche enzymatique des HDAC pour en chélater les ions Zn^{++} (Bayat et al., 2018).

Plusieurs mécanismes d'action des HDACi ont été décrits dans les processus cellulaires et dans le traitement des cancers. En revanche, chaque mécanisme d'action est différent selon

le type de cancer étudié, le type d'inhibiteur et la dose utilisée. Ces mécanismes ne sont donc pas représentatifs de tous les HDACi (Singh et al., 2018).

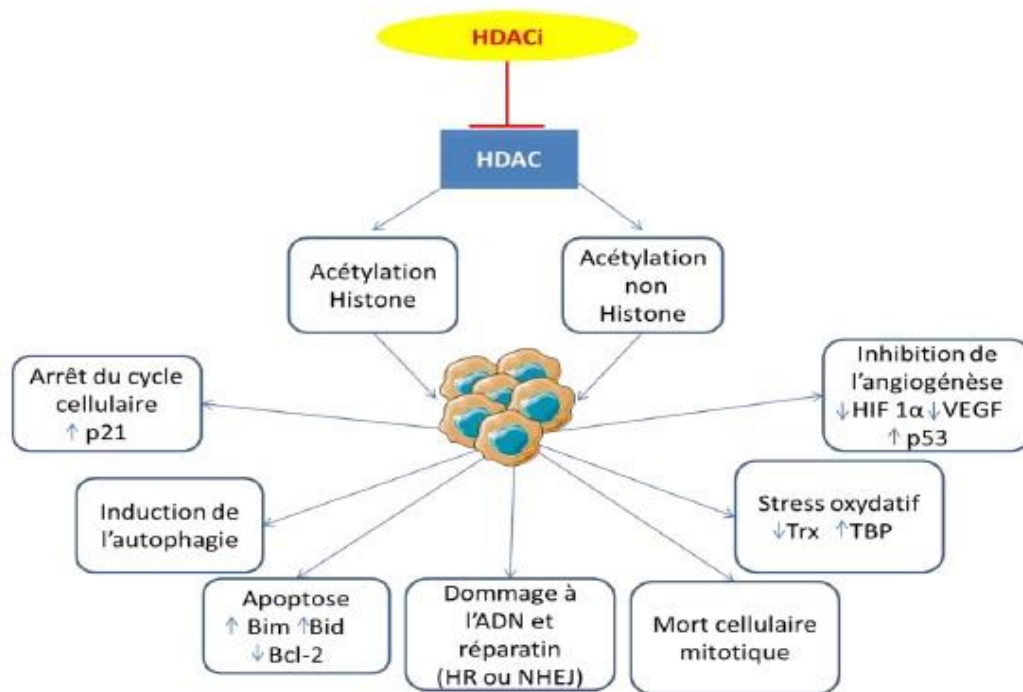


Figure 11: Effets de l'inhibition des HDAC sur les cellules cancéreuses. (Singh et al.2018).

Tous ces mécanismes d'action permettent de lutter contre le maintien et la prolifération des cellules cancéreuses. Mais il existe aussi des effets néfastes du traitement des tumeurs par ces inhibiteurs. Les HDACi ont la capacité de reprogrammer les cellules somatiques en cellules pluripotentes. Par exemple, ces inhibiteurs induisent l'expression de CD133 (marqueur de cellules souches cancéreuses) dans des cellules de gliomes humains (Eckschlager et al., 2017). De plus, le traitement par HDACi augmente la migration et la formation des métastases dans les différentes lignées de cancers (foie, sein, poumon, estomac) à cause de l'augmentation de l'expression des métalloprotéases (Lin et al., 2012a).

4. La modulation de l'acétylation des histones comme cible pour le traitement du DIPG

Le criblage de 83 drogues sur 14 lignées de DIPG à démontrer une sensibilité accrue à un inhibiteur des HDAC, le Panobinostat (Ps). Cet inhibiteur est efficace sur les cellules DIPG mutées ou non mutées pour H3 (H3K27M) (Grasso et al., 2015).

Le PS diminue la viabilité et la prolifération cellulaire et induit la mort de cellules isolées de patients atteints d'un DIPG. Une des conséquences du traitement est l'augmentation de l'acétylation des histones H3 et de la triméthylation des H3K27 qui dépendent de la dose de PS. L'augmentation de la triméthylation est une conséquence inattendue mais elle permet de restaurer la méthylation globale qui est anormalement diminuée dans les DIPG mutées H3K27M. L'addition de groupes acétyles sur la queue d'histone H3 permet de lever l'inhibition de PRC2, complexe qui catalyse la triméthylation K27, induite par la mutation H3K27M (Brown et al., 2014). Ces travaux ont ensuite été validés après implantation orthotopique d'une lignée de DIPG mutée H3K27M dans des souris immunodéficientes. Après traitement par voie intrapéritonéale (20 mg/kg, une fois par semaine pendant 4 semaines), la croissance de la tumeur est significativement diminuée contrairement aux tumeurs non traitées. Un nouveau protocole de traitement, après implantation d'une lignée DIPG non mutée sur H3 et qui est issue d'une xénotransplantation dérivée du patient (10 mg/kg, 5 jours de traitement puis 5 jours sans, pendant 2 cycles), met en évidence une augmentation du taux de survie dans les souris traitées. Dans cette étude, le PS diminue la croissance cellulaire des tumeurs DIPG in vitro et in vivo, mutées ou non pour H3K27M (Grasso et al., 2015). L'étude de Hennika et al en 2017 montre une diminution de la prolifération tumorale, de la viabilité et une augmentation de l'apoptose après traitement. Cela suggère un rôle antitumoral sur les gliomes murins du tronc cérébral. Les auteurs concluent également, après comparaison du traitement de cellules portant H3.3K27M ou H3 sauvage, que la mutation n'a pas d'impact sur l'effet du PS in vitro à la fois dans les cellules murines et dans les cellules humaines DIPG (Hennika et al., 2017).

IV. Les hypothèses

Les hypothèses proposées d'étudier :

H0 - aucun des médicaments anticancéreux ne provoquera une diminution significative de la viabilité des cellules DIPG par rapport au contrôle.

H1- il y aura une diminution significative de la viabilité des cellules DIPG avec les deux médicaments anticancéreux après 72 heures d'exposition.

H2- Panobinostat sera plus efficace que l'ONC201.

V.Objectifs

Le DIPG reste mal connu et incurables avec un taux de survie de moins de 10%. Plusieurs traitements ont échoué en raison de La localisation de la tumeur, sa nature infiltrative et la présence de la barrière hémato-encéphalique qui empêche le passage de la plupart des médicaments et les agents thérapeutiques. Pour cette raison cette étude a pour objectif d'évaluer l'efficacité des agents anti-cancéreux l'ONC201 et le Panobinostat sur des cultures de cellules DIPG primaires humaines avant de faire des tests in vivo.

Matériels et méthodes

I. Matériels utilisés

1. Les cellules DIPG

Les tissus tumoraux ont été obtenus à partir des patients DIPG qui n'ont jamais reçus un traitement (treatment-naive DIPG patients) à travers des procédures chirurgicales ou de biopsie.

2. Panobinostat

Le Panobinostat (FARYDAK) est un médicament de la classe d'antinéoplasiques, les inhibiteurs de l'histone-désacétylase (HDACi). Le Panobinostat inhibe une large gamme des histone-désacétylases, les désacétylases (DACs) régulent l'acétylation d'environ 1750 protéines impliquées dans des divers processus biologiques, dont la réplication et La réparation de l'ADN, transcription des gènes, progression du cycle cellulaire et la dégradation de protéines. La surexpression de DACs est observée en plusieurs gliomes (Choudhary et *al.*, 2009).

3. ONC201

L'ONC201 est une molécule qui antagonise le récepteur de la dopamine D2, elle a été identifiée dans le criblage des ligands qu'induisent l'apoptose liée au TNF, "TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand" (TRAIL). Onc201 inactive les kinases AKT (Protéine kinase B) et ERK (Extracellular signal-regulated kinase) Ce qui conduit à la stimulation de la production de TRAIL et l'activation de la réponse au stress qui favorise la mort des cellules cancéreuses (Wierzbicki et *al.*, 2020).

II. Méthodes

Les cellules DIPG récupérées ont été placées dans deux microplaques à 96 puits et cultivées dans un incubateur pendant 24 heures à 37°C. neuf concentrations de médicaments anticancéreux, Panobinostat et ONC201, ont été constituées, à partir d'une solution mère, et ajoutées aux plaques allant de 0,002 à 20 µM. Pour chaque médicament, une colonne de puits a été conservée comme témoin (à 0 µM). Chaque concentration pour chaque plaque a été répétée trois fois pour calculer la densité optique moyenne (DO) après 72 heures d'incubation à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂. Les répétitions améliorent la fiabilité et discernent si les différences étaient spécifiquement dues à l'ajout de médicaments. Après cette période, le test MTT a été effectué, une méthode colorimétrique permet de mesurer l'activité métabolique cellulaire, en se basant sur la capacité des oxydoréductases NADPH-dépendent des cellules de transformer la Tetrazolium en sa forme insoluble violette, Formazan. Vingt µl

de solution MTT a été ajouté à chaque puit des plaques préparées, puis elles ont été incubées à 37°C pendant 50 minutes. Ensuite 150 µl de DMSO a été additionné pour solubiliser le produit MTT. Après 15 minutes, la densité optique des échantillons a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre en 570 nm.

La viabilité cellulaire a ensuite été calculée en divisant la DO à une certaine concentration de médicament par la DO de contrôle du médicament à 0 µM. Ceci a été calculé pour les trois répétitions et une viabilité cellulaire moyenne en a été dérivée à partir des DO calculées en utilisant la formule :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{\mathbf{DO}_{\text{traitement}} - \mathbf{DO}_{\text{blanc}}}{\mathbf{DO}_{\text{control}} - \mathbf{DO}_{\text{blanc}}} * 100$$

L'IC50 qui représente la concentration inhibitrice médiane est estimée à partir des courbes de la viabilité cellulaire en fonction de la concentration de médicament.

Résultats

I. Effet de l'ONC201 sur la prolifération des cellules DIPG

Le tableau 1 montre que plus la concentration de l'Onc201 augmente la densité optique moyenne diminue, de 0.14967 jusqu'à 0.112767, la minimale concentration qu'induit une diminution de la densité optique est 0.002 μM .

Tableau 1: Représente la densité optique moyenne pour chaque concentration de ONC201 (0.002, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 1, 2, 10, 20 μM).

Concentration de ONC201 (μM)	0	0,002	0,01	0,02	0,1	0,2	1	2	10	20
Densité optique moyenne	0,14967	0,141267	0,131433	0,119967	0,116433	0,113667	0,113233	0,113533	0,113567	0,112767

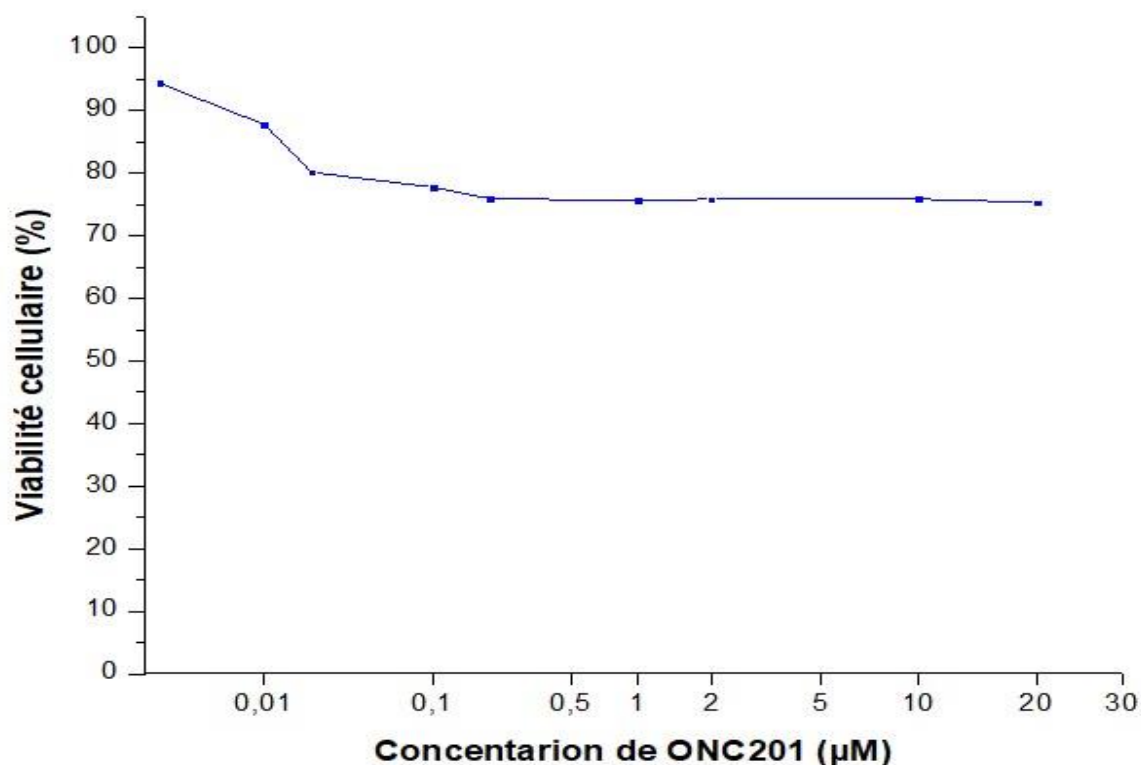


Figure 12: L'effet de ONC201 sur la viabilité des cellules DIPG.

La courbe montre l'effet des différentes concentrations de ONC201 (0.002, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 1, 2, 10, 20 μM) sur la viabilité cellulaire moyenne (%) des cellules DIPG. Chaque administration de différentes concentrations de ONC201 a été répétée trois fois, et la moyenne de la densité optique est calculé pour chaque concentration afin de déterminer la viabilité cellulaire.

La figure 12 montre que la viabilité cellulaire diminue quand la concentration de ONC201 augmente, de 0.14967 jusqu'au 0.113667 à la concentration 0.2 μM (75.88%), puis la viabilité cellulaire a été relativement stabilisée même si la concentration de ONC201 s'élève. ONC201 n'atteint pas la valeur de l'IC50, la viabilité cellulaire n'a présenté qu'une diminution de 24,6% sous le traitement ONC201.

II. Effet du Panobinostat sur la Prolifération des cellules DIPG

Le tableau 2 montre que la viabilité cellulaire diminue avec l'augmentation de la concentration de Panobinostat, de 0.1324 à 0.0428 unité d'absorbance à 20 μM (Une réduction d'a peut être 67.57%). 0.002 μM est la concentration qui donne une réduction de la densité optique moyenne, Panobinostat présente l'efficacité d'éliminer les cellules DIPG avec des concentrations inférieures à 0.002 μM .

Tableau 2: Représente la densité optique moyenne pour chaque concentration de Panobinostat (0.002, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 1, 2, 10, 20 μM).

Concentration de Panobinostat (μM)	0	0,002	0,01	0,02	0,1	0,2	1	2	10	20
Densité optique moyenne	0,1324	0,1243	0,1003	0,0812	0,0436	0,043	0,0431	0,0433	0,0431	0,0428

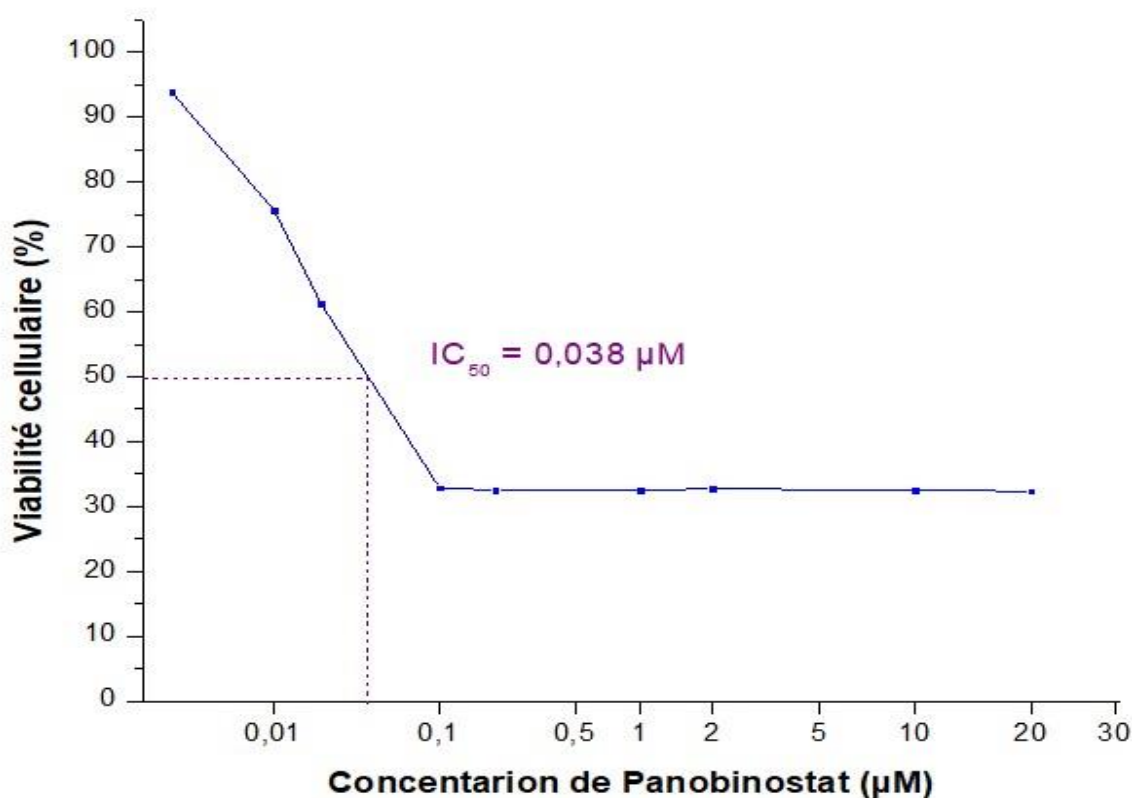


Figure 13: L'effet de Panobinostat sur la viabilité des cellules DIPG.

La courbe montre l'effet des différentes concentrations de Panobinostat (0.002, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 1, 2, 10, 20 µM) sur la viabilité cellulaire moyenne (%) des cellules DIPG. Chaque administration de différentes concentrations de Panobinostat a été répétée trois fois, et la moyenne de la densité optique est calculé pour chaque concentration afin de déterminer la viabilité cellulaire. La courbe montre une valeur de IC₅₀ de 0.038 µM.

Les figures 12 et 13 montrent que le pourcentage de la viabilité cellulaire diminue avec l'élévation des concentrations de Panobinostat et de ONC201.

Panobinostat montre la plus forte efficacité de l'élimination des cellules DIPG, avec une réduction de 67.57% à 20 µM. Alors que dans le ONC201 la viabilité cellulaire n'a atteint qu'un minimum de 75.88% (24.12% de réduction). L'IC₅₀ de Panobinostat est 0.038 µM, alors que ONC201 n'atteint pas la réduction de 50% de la viabilité cellulaire.

Discussion

Notre étude a été dessinée pour évaluer l'effet des agents anticancéreux ONC201 et Panobinostat sur les cellules DIPG humaine et leur potentiel d'être des agents thérapeutiques pour les patients atteints par le DIPG.

72 h après l'administration du médicament, le Panobinostat présentait une efficacité supérieure à ONC201, avec une concentration minimale pour induire un résultat significatif plus faible et une IC50 de 0,038 μM , la dose optimale est de 0,1 μM , après cela la réduction de la viabilité cellulaire atteint un plateau. En comparaison, ONC201 ne pourrait pas atteindre une IC50 à la dose maximale utilisée (20 μM) avec une dose optimale plus élevée de 0,2 μM . Plusieurs études montrent ces résultats, dont des études montrant que le Panobinostat était un agent efficace pour cibler les cellules tumorales humaines et murines DIPG *in vitro* et *in vivo* à court terme chez la souris (Hennika et al., 2017). Cette étude s'ajoute également à des recherches antérieures montrant que les cellules DIPG ont une réponse dose-dépendante aux médicaments et suggère que le Panobinostat est le médicament de choix pour une utilisation future.

Cela contredit avec d'autres études qui prouvent l'efficacité de l'ONC201 dans la réduction des tumeurs, Borsuk et al. ont trouvés avec succès l'IC50 de ONC201, à des concentrations équivalentes à celles utilisées dans cette étude. Cependant, ils ont incubé des cellules DIPG avec ONC201 pendant 96 heures, laissant le médicament encore plus 24 heures supplémentaires par rapport à la présente étude pour détruire les cellules. Cela met en évidence le besoin de recherche pour établir la durée optimale d'exposition des cellules DIPG aux agents thérapeutiques afin d'obtenir les meilleurs résultats.

Le Panobinostat est actuellement approuvé pour l'utilisation dans le traitement du myélome multiple par son efficacité d'inhiber l'histone désacétylase, qui endommage l'ADN et favorise l'apoptose. Bien que le Panobinostat semble être efficace contre les cellules DIPG *in vitro* dans des études cliniques antérieures, l'utilisation d'inhibiteurs d'HDAC en tant qu'agents uniques pour traiter les tumeurs solides a donné des mauvais résultats cliniques (Kim et al., 2011). Cependant, son utilisation en association avec d'autres agents chimiothérapeutiques s'avère prometteuse (Choi et al., 2019).

Des études sur des modèles murins de glioblastome ont montré que l'ONC201 traverse la barrière hémato-encéphalique et inhibe la croissance tumorale par plusieurs mécanismes,

notamment l'induction de l'expression du ligand induisant l'apoptose lié au facteur de nécrose tumorale (Wagner et al., 2017). De plus, ONC201 s'est révélé posséder un excellent profil d'innocuité à des doses qui dépassent de 10 fois les doses efficaces, il peut donc être possible d'utiliser des doses plus élevées pour atteindre un niveau d'efficacité similaire à celui de Panobinostat (Allem et al., 2015).

Notamment, nous n'avons pas mesuré directement le nombre ou la viabilité des cellules, mais nous l'avons plutôt dérivé des mesures de densité optique. La densité optique est couramment utilisée pour estimer la densité cellulaire dans les cultures; cependant, il n'est pas directement représentatif du nombre de cellules et n'est proportionnel au nombre de cellules que dans des conditions limitées (Stevenson et al., 2016).

L'utilisation de tests MTT dans cette expérience pourrait être considérée comme une limitation potentielle car ils ont une faible sensibilité de détection et sont sensibles aux interférences chimiques, en particulier l'exposition à la lumière. Ainsi, même avec des mesures de contrôle strictes, il existe une probabilité de résultats faux négatifs. Pour améliorer l'expérience, un test ATP pourrait être utilisé car il s'avère supérieur en termes de reproductibilité et de sensibilité (Petty et al., 2021).

Pour s'appuyer sur cette étude, d'autres expériences pourraient être menées pour évaluer les effets de chaque médicament sur la viabilité cellulaire à différents délais (par exemple 3h, 6h, 12h, 24h, 48h) ainsi qu'à des intervalles de concentration plus étroits pour déterminer plus précisément la dose optimale.

Ceci nous mène à conclure que l'ONC 201 et le Panobinostat sont efficaces pour réduire la viabilité des cellules DIPG, ce qui est une nouvelle promesse pour le développement de futurs traitements DIPG. Le Panobinostat présentait l'efficacité la plus élevée ce qui fait un objectif potentiel pour une thérapie ciblée, mais des tests supplémentaires sont nécessaires avant que l'un ou l'autre de ces médicaments puisse être utilisé en pratique clinique.

Conclusion

Dans la présente étude le Panobinostat a montré une activité antitumorale *in vitro* plus efficace sur les cellules DIPG que l'ONC201. Alors que ONC201 a montré un certain effet inhibiteur, il n'a pas montré une activité cytotoxique similaire ; cependant, en tenant compte les limites de l'étude, nous ne pouvons pas écarter l'ONC201 en tant qu'agent thérapeutique potentiel. La puissance établie du Panobinostat justifie des travaux supplémentaires sur son potentiel thérapeutique ; mais nous devons d'abord bien examiner l'efficacité de ces agents sur des cellules DIPG naïves avant d'évaluer leur potentiel pour des études *in vivo*. De plus, le ciblage des mécanismes de résistance proposés par les DIPG pourrait offrir des perspectives intéressantes pour augmenter l'efficacité de ces agents thérapeutiques.

Liste de références

- Albright, A L, R J Packer, R Zimmerman, L B Rorke, J Boyett, et G D Hammond. (1993): Magnetic Resonance Scans Should Replace Biopsies for the Diagnosis of Diffuse Brain Stem Gliomas: A Report from the Children's Cancer Group. *Neurosurgery*. 33 (6): 1026-1029; discussion 1029-1030.
- Allen JE, Crowder RN, El-Deiry WS. (2015): First-In-Class Small Molecule ONC201 Induces DR5 and Cell Death in Tumor but Not Normal Cells to Provide a Wide Therapeutic Index as an Anti-Cancer Agent. *PLoS One*. 10: e0143082.
- Allis CD, Jenuwein T. (2016): The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews. Genetics*. 17: 487-500.
- Anne M, Sammartino D, Barginear MF, Budman D. (2013): Profile of panobinostat and its potential for treatment in solid tumors: an update. *OncoTargets and Therapy*. 6: 1613-1624.
- Bassett, Danielle S., and Michael S. Gazzaniga. (2011): Understanding Complexity in the Human Brain. *Trends in Cognitive Sciences*. 15 (5): 200–209.
- Bayat S, Shekari Khaniani M, Choupani J, Alivand MR, Mansoori Derakhshan S. (2018): HDACis (class I), cancer stem cell, and phytochemicals: Cancer therapy and prevention implications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 97: 1445-1453.
- Bender, S., Tang, Y., Lindroth, A.M., Hovestadt, V., Jones, D.T.W., Kool, M., Zapatka, M., Northcott, P.A., Sturm, D., Wang, W., et al (2013): Reduced H3K27me3 and DNA Hypomethylation Are Major Drivers of Gene Expression in K27M Mutant Pediatric High-Grade Gliomas. *Cancer Cell*. 24, 660–672.
- Borsuk R, Zhou L, Chang W, Zhang Y, Sharma A, Prabhu VV, et al (2021): Potent preclinical sensitivity to imipridone-based combination therapies in oncohistone H3K27M-mutant diffuse intrinsic pontine glioma is associated with induction of the integrated stress response, TRAIL death receptor DR5, reduced ClpX and apoptosis. *American Journal of Cancer Research*. 11 (9): 4607-4623.
- Braunstein, S., Raleigh, D., Bindra, R., Mueller, S., and Haas-Kogan, D. (2017): Pediatric high-grade glioma: current molecular landscape and therapeutic approaches. *J. Neurooncol*. 134, 541–549.

- Broniscer A, Baker SD, Wetmore C, Pai Panandiker AS, Huang J, Davidoff AM et al (2013): Phase I Trial, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Vandetanib and Dasatinib in Children with Newly Diagnosed Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 19: 3050-3058.
- Broniscer A, Jia S, Mandrell B, Hamideh D, Huang J, Onar-Thomas A et al (2018): Phase 1 trial, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of dasatinib combined with crizotinib in children with recurrent or progressive high-grade and diffuse intrinsic pontine glioma. *Pediatric Blood & Cancer*. 65: e27035.
- Brown ZZ, Muller MM, Jain SU, Allis CD, Lewis PW, Muir TW. (2014): Strategy for "detoxification" of a cancer-derived histone mutant based on mapping its interaction with the methyltransferase PRC2. *J Am Chem Soc*. 136: 13498-501.
- Buczkowicz, Pawel, and Cynthia Hawkins. (2015): Pathology, Molecular Genetics, and Epigenetics of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Frontiers in Oncology*. 5: 147.
- Bystron, Irina, Colin Blakemore, and Pasko Rakic. (2008): Development of the Human Cerebral Cortex: Boulder Committee Revisited. *Nature Reviews Neuroscience*. 9 (2): 110–22.
- Cartmill, M., and J. Punt. (1999): Diffuse Brain Stem Glioma. A Review of Stereotactic Biopsies. *Child's Nervous System: ChNS: Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 15 (5): 235–237; discussion 238.
- Castel D, Philippe C, Calmon R, Dret LL, Truffaux N, Boddaert N et al (2015): Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathologica*. 130: 815-827.
- Choi, S. A., Lee, C., Kwak, P. A., Park, C., Wang, K., Phi, J. H., Lee, J. Y., Chong, S. & Kim, S. (2019): Histone deacetylase inhibitor Panobinostat potentiates the anti-cancer effects of mesenchymal stem cell-based sTARIL gene therapy against malignant glioma. *Cancer Letters*. 442 161-169.
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, et al (2009): Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 325:834–40.

- Clymer J, Kieran MW. (2018): The Integration of Biology Into the Treatment of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: A Review of the North American Clinical Trial Perspective. *Front Oncol.* 8: 169.
- Cohen, Adam, Sheri Holmen, and Howard Colman. (2013): IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 13 (5): 345.
- Cohen, Kenneth J., Nada Jabado, and Jacques Grill. (2017): Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas-Current Management and New Biologic Insights. Is There a Glimmer of Hope? Neuro-Oncology, March.
- Coutel, Y. (1959): Infiltrating glioblastoma of the brain stem in an 8-year-old child; normalization of the pneumoencephalogram after radiotherapy. *Revue d'oto-neuro-ophtalmologie.* 31: 119-123.
- Dimou, Leda, and Magdalena Götz. (2014): Glial Cells as Progenitors and Stem Cells: New Roles in the Healthy and Diseased Brain. *Physiological Reviews* 94 (3): 709–37.
- Eckschlagler T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. (2017): Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *International Journal of Molecular Sciences.* 18.
- Tollervey, J., and Lunyak, V.V. (2012): Epigenetics: Judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics.* 7, 823.
- Ginhoux, Florent, Shawn L, Guillaume H, Donovan L, Tara H. (2013): Origin and Differentiation of Microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 7.
- Grasso CS, Tang Y, Truffaux N, Berlow NE, Liu L, Debily MA et al (2015): Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Med.* 21: 555-9.
- Gwak HS, Park HJ. (2017): Developing chemotherapy for diffuse pontine intrinsic gliomas (DIPG). *Crit Rev Oncol Hematol.* 120: 111-119.
- Hankinson, Todd C, Elizabeth J Campagna, Nicholas K Foreman, et Michael H Handler. (2011): Interpretation of Magnetic Resonance Image in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: A Survey of Pediatric Neurosurgeons. *Journal of Neurosurgery. Pediatrics.* 8 (1): 97-102.
- Hashizume R, Andor N, Ihara Y, Lerner R, Gan H, Chen X et al (2014): Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat Med.* 20: 1394-6.

- Hennika T, Hu G, Olaciregui NG, Barton KL, Ehteda A, Chitranjan A et al (2017): Pre-Clinical Study of Panobinostat in Xenograft and Genetically Engineered Murine Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Models. *PLoS One*. 12.
- Hu, Nan, Rachel Richards, and Randy Jensen. (2016): Role of Chromosomal 1p/19q Co-Deletion on the Prognosis of Oligodendrogliomas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Interdisciplinary Neurosurgery* 5: 58–63.
- Hummel, Trent R., Ralph Salloum, Rachid Drissi, Shiva Kumar, Matthew Sobo, Stewart Goldman, Ahna Pai, et al (2016): A Pilot Study of Bevacizumab-Based Therapy in Patients with Newly Diagnosed High-Grade Gliomas and Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*. 127 (1): 53–61.
- Ishida CT, Zhang Y, Bianchetti E, Shu C, Trang NTT, Kleiner G, et al (2018): Metabolic Reprogramming by Dual AKT/ERK Inhibition Through Imipridones Elicits Unique Vulnerabilities in Glioblastoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 24(21): 5392.
- Jansen, M.H.A., van Vuurden, D.G., Vandertop, W.P., and Kaspers, G.J.L. (2012): Diffuse intrinsic pontine gliomas: A systematic update on clinical trials and biology. *Cancer Treatment Reviews*. 38, 27–35.
- Jones PA, Baylin SB. (2007): The epigenomics of cancer. *Cell*. 128: 683-692.
- Jones, Chris, and Suzanne J. Baker. (2014): Unique Genetic and Epigenetic Mechanisms Driving Paediatric Diffuse High-Grade Glioma. *Nat Rev Cancer*.
- Kaye EC, Baker JN, Broniscer A. (2014): Management of diffuse intrinsic pontine glioma in children: current and future strategies for improving prognosis. *CNS Oncology*. 3: 421-431.
- Keunen, Kristin, Serena J. Counsell, and Manon J. N. L. Benders. (2017): The Emergence of Functional Architecture during Early Brain Development. *NeuroImage, Functional Architecture of the Brain*. 160: 2–14.
- Khuong-Quang D-A, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu X-Y, Fontebasso AM, Bouffet E, et al. (2012): K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathologica*. 124(3): 439.
- Kim, H. & Bae, S. (2011): Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *American Journal of Translational Research*. 3 (2), 166-169.

- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009): The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 149–184.
- Lapin DH, Tsoli M, Ziegler DS. (2017): Genomic Insights into Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front Oncol.* 7: 57.
- Lapin, Danielle H., Maria Tsoli, and David S. Ziegler. (2017): Genomic Insights into Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Frontiers in Oncology.* 7.
- Laubach JP, Moreau P, San-Miguel JF, Richardson PG. (2015): Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research.* 21: 4767-4773.
- Lewis, P.W., Müller, M.M., Koletsky, M.S., Cordero, F., Lin, S., Banaszynski, L.A., Garcia, B.A., Muir, T.W., Becher, O.J., and Allis, C.D. (2013): Inhibition of PRC2 Activity by a Gain-of-Function H3 Mutation Found in Pediatric Glioblastoma. *Science.* 340, 857–861.
- Lin KT, Wang YW, Chen CT, Ho CM, Su WH, Jou YS. (2012): HDAC inhibitors augmented cell migration and metastasis through induction of PKCs leading to identification of low toxicity modalities for combination cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 18: 4691-701.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016): The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 131, 803–820.
- Ludwig, K., and Kornblum, H.I. (2017): Molecular Markers in Glioma. *J. Neurooncol.* 134, 505–512.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997): Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 389, 251–260.
- Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R et al (2005): Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Medicinal Research Reviews.* 25: 261-309.
- Margueron, Raphaël, and Danny Reinberg. (2011): The Polycomb Complex PRC2 and Its Mark in Life. *Nature.* 469 (7330): 343–49.

- Martynoga, Ben, Daniela Drechsel, and François Guillemot. (2012): Molecular Control of Neurogenesis: A View from the Mammalian Cerebral Cortex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 4 (10): a008359.
- Mathew RK, Rutka JT. (2018): Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: Clinical Features, Molecular Genetics, and Novel Targeted Therapeutics. *J Korean Neurosurg Soc*. 61: 343-351.
- McLachlan, Neil M., and Sarah J. Wilson. 2017: The Contribution of Brainstem and Cerebellar Pathways to Auditory Recognition. *Frontiers in Psychology* 8.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Truitt, G., Boscia, A., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J.S. (2018): CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro Oncol*. 20, iv1–iv86.
- Pardridge, W.M. (2005): The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*. 2, 3–14.
- Paugh, Barbara S, Chunxu Qu, Chris Jones, Zhaoli Liu, Martyna Adamowicz-Brice, Junyuan Zhang, Dorine A Bax, et al. (2010). Integrated Molecular Genetic Profiling of Pediatric High-Grade Gliomas Reveals Key Differences with the Adult Disease. *Journal of Clinical Oncology* 28 (18): 3061–68.
- Petty, R.D., Sutherland, L.A., Hunter, E.M. & Cree, I.A. (1995): Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*. vol. 10, no. 1, pp. 29-34.
- Platten M, Bunse L, Wick W, Bunse T (2016). Concepts in glioma immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 65: 1269-1275.
- Puget, Stephanie, Cathy Philippe, Dorine A. Bax, Bastien Job, Pascale Varlet, Marie-Pierre Junier, Felipe Andreiuolo, et al. (2012): Mesenchymal Transition and PDGFRA Amplification/Mutation Are Key Distinct Oncogenic Events in Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas. *PLoS ONE*. 7 (2): e30313.
- Puget, Stephanie, Kevin B, Thomas B, Thomas R, Syril J, Jacques G, Michel Z, Pascale V, Christian S.R. (2015): Biopsy in a Series of 130 Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas. *Child’s Nervous System*. 31 (10): 1773–80.
- Robison NJ, Kieran MW. (2014): Diffuse intrinsic pontine glioma: a reassessment. *J Neurooncol*. 119: 7–15.

- Roujeau, Thomas, Guilherme M, Matthew R.G, Catherine M, Stephane P, Birgit G, Jacques G, et al (2007): Stereotactic Biopsy of Diffuse Pontine Lesions in Children. *Journal of Neurosurgery*. 107 (1 Suppl): 1-4.
- Rowitch, David H, Arnold R.K. (2010): Developmental Genetics of Vertebrate Glial-cell Specification. *Nature*. 468 (7321): 214–22.
- Schwartzenuber, Jeremy, Andrey K, Xiao-Yang L, David T.W, Elke P, Karine J, Dominik S, et al (2012): Driver Mutations in Histone H3.3 and Chromatin Remodelling Genes in Paediatric Glioblastoma. *Nature*. 482 (7384): 226–31.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2016): Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* 66, 7–30.
- Singh AK, Bishayee A, Pandey AK. (2018): Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy. *Nutrients*. 10.
- Stamatovic, S.M., and Andjelkovic, R.F.K. and A.V. (2008): Brain Endothelial Cell-Cell Junctions: How to “Open” the Blood Brain Barrier.
- Stevenson K, Mcvey A, Clark I, Swain P, Pilizota T. (2016): General calibration of microbial growth in microplate readers. *Scientific Reports*. 6(1).
- Stiles, Joan, and Terry L. Jernigan. (2010): The Basics of Brain Development. *Neuropsychology Review*. 20 (4): 327–48.
- Sturm, Dominik, Hendrik Witt, Volker Hovestadt, Dong-Anh Khuong-Quang, David T.W. Jones, Carolin Konermann, Elke Pfaff, et al (2012): Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma.” *Cancer Cell*. 22 (4): 425–37.
- Sufit Alexander, Andrew M Donson, Diane K Birks, Jeffrey A Knipstein, Laura Z Fenton, Paul Jedlicka, Todd C Hankinson, Michael H Handler, Nicholas K Foreman. (2012): Diffuse Intrinsic Pontine Tumors: A Study of Primitive Neuroectodermal Tumors versus the More Common Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas. *Journal of Neurosurgery. Pediatric*. 10 (2): 81-88.
- Suraweera A, O'Byrne KJ, Richard DJ. (2018): Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi. *Frontiers in Oncology*. 8: 92.
- Sweeney, M.D., Sagare, A.P., and Zlokovic, B.V. (2018): Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol*. 14, 133–150.

- Taylor KR, Mackay A, Truffaux N, Butterfield YS, Morozova O, Philippe C et al (2014): Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Genet.* 46: 457-61.
- Temple, Sally. (2001): The Development of Neural Stem Cells. Special Features. *Nature.* November 1, 2001.
- Teng, Yang D., Filipe N. C. Santos, Peter M. Black, Deniz Konya, Kook In Park, Richard L. Sidman, and Evan Y. Snyder. (2008): 18 - Neural Stem Cells. In *Principles of Regenerative Medicine.* 300–317.
- Tollervey, J., and Lunyak, V.V. (2012): Epigenetics: Judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics.* 7, 823.
- Urbán, Noelia, and François Guillemot. (2014); Neurogenesis in the Embryonic and Adult Brain: Same Regulators, Different Roles. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 8.
- Waddington CH. (2012): The epigenotype. 1942. *International Journal of Epidemiology* 41: 10-13.
- Wagner J., Kline C.L., Ralff M.D., Lev A., Lulla A., Zhou L., Olson G.L., Nallaganchu B.R., Benes C.H., Allen J.E., et al (2017): Preclinical Evaluation of the Imipridone Family, Analogs of Clinical Stage Anti-Cancer Small Molecule ONC201, Reveals Potent Anti-Cancer Effects of ONC212. *Cell Cycle.* 16:1790–1799.
- Wesseling, P., and Capper, D. (2018): WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 44, 139–150.
- Wierzbicki K, et al (2020): Targeting and Therapeutic Monitoring of H3K27M-Mutant Glioma. *Curr Oncol Rep.* 6;22(2):19.
- Wood PJ, Strong R, McArthur GA, Michael M, Algar E, Muscat A et al (2018): A phase I study of panobinostat in pediatric patients with refractory solid tumors, including CNS tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.*
- Wu, Gang, Alberto Broniscer, Troy A McEachron, Charles Lu, Barbara S Paugh, Jared Beckfort, Chunxu Qu, et al. (2012): Somatic Histone H3 Alterations in Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas and Non-Brainstem Glioblastomas. *Nature Genetics.* 44 (3): 251–53.
- Zaghoul, Mohamed S., Eman Eldebawy, Soha Ahmed, Amr G. Mousa, Amr Amin, Amal Refaat, Iman Zaky, Nada Elkhateeb, and Mohamed Sabry. (2014): Hypofractionated Conformal Radiotherapy for Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine

Glioma (DIPG): A Randomized Controlled Trial. *Radiotherapy and Oncology*. 111 (1): 35–40.

- Zhong, Qian, Zhi-Hua Liu, Zhi-Rui Lin, Ze-Dong Hu, Li Yuan, Yan-Min Liu, Ai-Jun Zhou, et al (2018): TheRARS-MAD1L1Fusion Gene Induces Cancer Stem Cell-like Properties and Therapeutic Resistance in Nasopharyngeal Carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 24 (3): 659–73.