



HAL
open science

Modèles in vivo de tumeurs gliales pédiatriques : développement et application en préclinique

Ludivine Le Dret

► **To cite this version:**

Ludivine Le Dret. Modèles in vivo de tumeurs gliales pédiatriques : développement et application en préclinique. Cancer. 2018. hal-01982364

HAL Id: hal-01982364

<https://ephe.hal.science/hal-01982364>

Submitted on 16 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

présenté

par

Ludivine LE DRET

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Modèles *in vivo* de tumeurs gliales pédiatriques : développement et
application en préclinique**

Soutenu le 28 novembre 2018

devant le jury suivant :

Catherine PAUL - Président

Jacques GRILL - Tuteur scientifique

David CASTEL - Co-tuteur scientifique

Sophie GAD-LAPITEAU - Tutrice pédagogique

Maite VERREAULT - Rapportrice

Julie TALBOT - Examinatrice

Mémoire préparé sous la direction de :

Jacques GRILL & David CASTEL

Laboratoire : UMR-CNRS 8203, Gustave Roussy

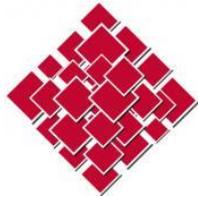
Directeur : Lluís MIR

Et de

Sophie GAD-LAPITEAU

Laboratoire : EPHE & UMR Inserm U1186, Gustave Roussy

Directeur : Stéphane RICARD



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

présenté

par

Ludivine LE DRET

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Modèles *in vivo* de tumeurs gliales pédiatriques : développement et
application en préclinique**

Soutenu le 28 novembre 2018

devant le jury suivant :

Catherine PAUL - Président

Jacques GRILL - Tuteur scientifique

David CASTEL - Co-tuteur scientifique

Sophie GAD-LAPITEAU - Tutrice pédagogique

Maite VERREAULT - Rapportrice

Julie TALBOT - Examinatrice

Mémoire préparé sous la direction de :

Jacques GRILL & David CASTEL

Laboratoire : UMR-CNRS 8203, Gustave Roussy

Directeur : Lluís MIR

Et de

Sophie GAD-LAPITEAU

Laboratoire : EPHE & UMR Inserm U1186, Gustave Roussy

Directeur : Stéphane RICARD

*La phrase la plus excitante à entendre en science, celle qui annonce de nouvelles découvertes,
n'est pas « Eureka », mais plutôt « Tiens, c'est marrant... »*

Isaac Asimov

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Jacques et David pour m'avoir permis de réaliser mon projet de diplôme dans l'équipe, de m'avoir encadrée pendant ces 4 années en me laissant une grande autonomie dans mon travail. La confiance que vous m'accordez est inestimable.

Je remercie également les Dr Verreault et Dr Talbot d'avoir accepté de juger ce travail et j'apprécie sincèrement l'intérêt qu'elles ont eu pour mon projet de recherche.

Je tiens à remercier le Dr Sophie Gad-Lapiteau pour toute l'énergie dépensée quant à la relecture du manuscrit, relance pour les documents administratifs, ainsi que pour m'avoir reboostée quand il le fallait.

Bien évidemment, mes remerciements vont à l'ensemble de la Grill Team, il n'y a pas plus agréable que de travailler avec des gens formidables autant professionnellement que personnellement. Ma première pensée va bien sûr pour mon stagiaire, sans qui les modèles vivo ne seraient pas là (ou pas !). Tu as été mon pilier pendant ces 4 années, celui qui m'a fait venir le matin au labo avec le sourire. J'espère avoir absorbé un centième de ton génie scientifique. Ton ombre planera pour toujours dans les murs de l'UMR (sauf ceux de l'animalerie) ainsi que dans mes futurs projets professionnels. J'en profite pour remercier le reste de ma petite team champion, mon charlou qui m'a accompagné pendant de longues années bien avant ce projet et qui a préféré le monde aviaire, Batmane mon héros partis dans des contrées lointaines et glaciales (merci pour tes petits dosages secrets du samedi soir) et Antoine, le prof le plus cool de la planète. Sans vous ces années auraient été bien longues et sobres...

Merci aux autres membres du labo, Emilie bien sûr ma coloc de bureau pour les récits de toutes tes aventures trépidantes (vivement la suite !) et de ton oreille attentive pour mes plaintes quotidiennes, Jane ma super copine, Claudia, Coralie, Manon, Marco, Thomas, Stéphanie, Gâétan... et tous les stagiaires qui ont pu croiser ma route. Merci aux animaliers, particulièrement Laure et Pascal pour tous les soins que vous avez pu apporter à mes pépettes et tous les petits passe-droits que vous m'avez offert.

Une pensée particulière pour mon neurochirurgien préféré, le meilleur dans toutes les catégories. Un jour, je serai ton infirmière de bloc.

Je remercie aussi particulièrement Birgit et Estelle, qui m'ont accueilli dans l'UMR il y a fort longtemps maintenant avec un accueil plus que chaleureux. Vous m'avez toutes les deux incité à développer mes compétences et pousser à passer ce diplôme. Je ne serai pas là où j'en suis sans toi Estelle.

Enfin, je saurais conclure sans penser à ma famille, ma mère qui a fait de moi ce que je suis, surtout le meilleur de moi-même. Merci de m'avoir fait vivre la vie que j'ai eu, c'est grâce à ton amour et ta bienveillance que j'en suis là. Merci à mon chéri pour me supporter au quotidien et ce n'est pas facile tous les jours... Et bien sûr, la plus belle expérience de ma vie commencée il y a maintenant 13 mois et 6 jours, mon petit bout de cul, ma belle Roxane. Grâce à toi j'ai pu rédiger une partie de ce manuscrit entre 2 et 5h du matin.

SOMMAIRE

Abréviations	3
Liste des figures.....	4
Liste des tableaux	6
Preambule	7
Introduction	8
1. Les tumeurs gliales de l'enfant.....	8
2. Les gliomes infiltrant du tronc	9
2.1. Tableau clinique et épidémiologie.....	9
2.2. Oncogenèse, dérégulation épigénétique et mutations somatiques associées.....	10
2.3. Histologie tumorale	11
2.4. Traitement et progression tumorale des DIPG	12
3. Les épendymomes	13
3.1. Tableau clinique, épidémiologie et histopathologie	13
3.2. Les EPN-PF : signature CIMP, tenascine C et altérations chromosomiques	14
3.3. L'instabilité génomique des EPN-ST conduit à des fusions de gènes.....	15
4. Modèles précliniques <i>in vivo</i>	16
4.1. Les modèles <i>in vivo</i> : nouveaux avatars en cancérologie.....	16
4.2. Les modèles de DIPG existants	18
4.3. Les modèles <i>in vivo</i> d'épendymomes existants	20
5. Thérapeutiques dans les DIPG	21
5.1. Le panobinostat	21
1.1. Médicaments ciblant l'épigénétique dans le DIPG	22
5.2. Le repositionnement d'un anti-helminthique : le mébendazole	23
6. La barrière hémato-encéphalique	23
6.1. Découverte et spécificités.....	23
6.2. Le concept des ultrasons.....	24
6.3. Technologie SonoCloud®	25
Objectifs	27
1. Développement et caractérisation de nouveaux modèles <i>in vivo</i> de DIPG et d'EPN.....	27
2. Évaluations thérapeutiques <i>in vivo</i> de deux médicaments dans le DIPG	28
3. Ouverture de la barrière hémato-encéphalique à l'aide d'ultrasons	29
Matériels et Méthodes	30
1. Echantillons cliniques.....	30
2. Modèles animaux	30
3. Greffe intracérébrale par stéréotaxie	31
4. Les modèles PDOX de DIPG et d'épendymomes.....	31
4.1. Mise en place du modèle <i>in vivo</i> PDOX chez la souris Swiss/Nude.....	31
4.2. Entretien de la banque de xénogreffes.....	32
4.3. Développement de modèles PDOX bioluminescents	33
5. Les modèles CDOX de DIPG.....	34
5.1. Mise en culture cellulaire des biopsies de DIPG et transduction	34
5.2. Mise en place du modèle <i>in vivo</i> CDOX de DIPG chez la souris Swiss/Nude	34
5.3. Suivi longitudinal par bioluminescence des modèles	35
5.4. Imagerie par fluorescence <i>ex vivo</i>	36
5.5. IRM de haut champ	36

6.	Génotypage des tumeurs.....	37
6.1.	Mutation H3K27M.....	37
6.2.	Fusion RELA/C11orf95	37
7.	Histopathologie des tumeurs	38
8.	Perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique avec les ultrasons.....	39
8.1.	Mise en place du système SONOCLOUD	39
8.2.	Injections de bleu d'Evans.....	39
9.	Evaluations thérapeutiques et pharmacocinétique <i>in vivo</i>	40
9.1.	Evaluations précliniques.....	40
9.2.	Pharmacocinétiques.....	42
Résultats	43
1.	Développement de modèles PDOX et CDOX de DIPG.....	43
1.1.	Description de la cohorte de DIPG.....	43
1.2.	Tumorigénicité des modèles PDOX.....	43
1.1.	Développement des modèles CDOX.....	44
1.2.	Présence de la mutation H3K27M dans les modèles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	46
1.1.	Greffes tumorales chez la souris Nude et NSG	47
1.2.	Conditions de culture des cellules <i>in vitro</i>	47
1.3.	Suivi <i>ex vivo</i> par fluorescence des cellules tumorales	48
1.4.	Suivi <i>ex vivo</i> de la croissance tumorale par IRM	48
1.5.	Caractéristiques histologiques	49
2.	Développement de modèles PDOX d'EPN.....	51
2.1.	Tumorigénicité	51
2.2.	Caractéristiques histologiques des PDOX.....	52
2.3.	Fusion RELA/C11orf95	53
3.	Développement de modèles PDOX bioluminescents.....	53
4.	Évaluations thérapeutiques du Mébendazole dans le DIPG.....	54
4.1.	Evaluation de la poudre « sigma ».....	54
4.2.	Pharmacocinétique et distribution intracérébrale du mébendazole	55
4.3.	Evaluation de la poudre « Cayman ».....	56
5.	Potentialisation de l'effet thérapeutique du panobinostat après ouverture de la BHE	57
5.1.	Conservation de la BHE dans nos modèles CDOX et PDOX	57
5.2.	Validation de l'ouverture de la BHE avec les US	57
5.3.	Evaluation thérapeutique du panobinostat dans un modèle CDOX de DIPG avec et sans US.....	59
5.4.	Pharmacocinétique et distribution intracérébrale du panobinostat chez la souris saine avec et sans US	60
Conclusion, Discussion et Perspectives	62
1.	Développement et caractérisation de modèles <i>in vivo</i> de tumeurs gliales pédiatriques	62
1.1.	Dérivation de modèles PDOX et CDOX de DIPG.....	62
1.2.	Dérivation de modèles PDOX d'épendymomes.....	66
2.	Evaluations thérapeutiques <i>in vivo</i> dans le DIPG.....	68
2.1.	Le mébendazole, reconversion d'un antihelminthique.....	68
2.2.	HDAC : résistance du DIPG au panobinostat	69
3.	Ouverture de la BHE à l'aide d'US non focalisés	71
Bibliographie	74
Annexes	85

ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
BLI : Bioluminescence
CDOX : Cell Derived Orthotopic Xenograft
CIMP : CpG Island Methylator Phenotype
DIPG : Diffuse Intrinsic Pontine Glioma ou gliome infiltrant du tronc cérébral
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EPN : Ependymome
EPN-PF : Ependymome de la Fosse Postérieure
EPN-ST : Ependymome Supratentorial
GEM : Modèle Génétiquement Modifié
HDACi : Inhibiteur des Histones Déacétylase
HES : Hématoxyline Eosine Safran
IHC : Immunohistochimie
IP : Intra-Péritonéale
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
IV : Intra-Veineuse
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
MB : Microbulles
MBZ : Mébendazole
MOI : Multiplicity of Infection
NEM : Necker Enfants Malades
NSC : Neural Stem Cell
NSG : NOD-scid gamma
me3 : triméthylation
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDOX : Patient Derived Orthotopic Xenograft
PEG : Polyéthylène glycol
PK : Pharmacocinétique
PRC2 : Complexe Répresseur Polycomb 2
RT : rétro-transcription
SEM : Standart error of mean
SNC : Système nerveux central
STR : Short tandem repeat
TNC : Tenascine C
US : Ultrason

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Nombre moyen de cas annuels de cancers de l'enfant en France.....	8
Figure 2 : Répartition des tumeurs cérébrales de l'enfant.....	8
Figure 3 : Survie globale des patients atteints de DIPG.....	9
Figure 4 : Localisation intracérébrale du DIPG.....	10
Figure 5 : IRM d'un patient atteint de DIPG.....	10
Figure 6 : Conséquence de la forme mutée H3K27M de l'histone H3 sur son interaction avec le complexe PCR2 affectant la transcription des gènes en regard.....	11
Figure 7 : Localisations intracérébrales des EPN.....	13
Figure 8 : Classification des EPN intracérébraux en six sous-groupes moléculaires selon leur profil de méthylation.....	14
Figure 9 : Profil de méthylation des EPN-PF.....	14
Figure 10 : Établissement, maintien et utilisation de modèles <i>vivo</i> PDX.....	18
Figure 11 : Résultats du criblage de 80 médicaments sur différentes lignées de DIPG.....	21
Figure 12 : Résultats du crible sur les 3 300 médicaments testés.....	23
Figure 13 : Illustration schématique d'un capillaire cérébral.....	24
Figure 14 : Mécanismes d'ouverture de la BHE par sonication.....	25
Figure 15 : Génération de modèles <i>in vivo</i> direct (PDOX) et indirect (CDOX) à partir d'un échantillon tumoral.....	30
Figure 16 : Utilisation d'un atlas stéréotaxique pour cibler une structure cérébrale.....	31
Figure 17 : Représentation schématique des différentes structures cérébrales.....	32
Figure 18 : Application du système SONOCLOUD à la souris.....	39
Figure 19 : Corrélations entre la survie des patients et la survie des PDOX.....	45
Figure 20 : Exemple de mesure qualitative de la fluorescence pour deux lignées cellulaires de DIPG <i>in vitro</i> 5 jours post transduction avec le lentivirus.....	45
Figure 21 : Cinétique de bioluminescence après injection de luciférine dans les modèles de CDOX de DIPG.....	45
Figure 22 : Suivi longitudinal de la croissance tumorale par mesure de la bioluminescence dans la région du tronc cérébral des modèles CDOX de DIPG.....	46
Figure 23 : Corrélations entre la survie du patient et de sa CDOX associée.....	46
Figure 24 : Conservation de la mutation de l'histone H3 dans les modèles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de DIPG mise en évidence par séquençage Sanger.....	47
Figure 25 : Suivi longitudinal de la croissance tumorale par quantification de la BLI dans la région du tronc cérébral des CDOX développés à partir de dilutions de cellules préalablement cultivées <i>in vitro</i> en condition « Normoxie » et « Hypoxie ».....	47
Figure 26 : Imagerie <i>ex vivo</i> d'un cerveau de CDOX NEM 292 par macroscopie et microscopie.....	48
Figure 27 : Séquence IRM à 11.7T en T2 de la CDOX NEM292 à deux stades d'évolution de la maladie et d'une souris contrôle obtenue <i>ex vivo</i>	48
Figure 28 : Profils immunophénotypiques pour la forme mutée H3K27M et de la triméthylation de H3K27 dans les modèles PDOX et CDOX de NEM290 en comparaison avec la tumeur du patient... ..	49
Figure 29 : Profils immunophénotypiques des modèles PDOX et CDOX de NEM290 en comparaison avec la tumeur du patient.....	49
Figure 30 : Invasion et dissémination dans le cerveau des cellules tumorales mises en évidence par le marquage de la forme mutée H3K27M des modèles PDOX et CDOX de NEM290.....	50
Figure 31 : Infiltration des cellules tumorales dans le parenchyme cérébral à distance du site d'injection de la CDOX NEM290.....	50

Figure 32 : Invasion des cellules tumorales dans le bulbe olfactif dans le modèle CDOX de NEM290 mise en évidence par BLI et IHC	50
Figure 33 : Localisation intracérébrale des PDOX d'EPN-PF et ST-EPN.....	52
Figure 34 : Organisation morphologique des cellules tumorales d'EPN dans les tumeurs des patients et des PDOX associées.....	52
Figure 35 : Mise en évidence des fusions 1 et 2 RELA/C11ORF95 dans les tumeurs des patients atteints d'EPN-ST par PCR et séquençage Sanger.....	53
Figure 36 : Suivi longitudinal par bioluminescence des modèles de PDOX NEM290 et NEM392 après infection et après le premier passage avec les cellules sélectionnées mKate2 positives.....	53
Figure 37 : Évaluation préclinique <i>in vivo</i> de l'activité du MBZ « Sigma » sur la croissance tumorale et la survie des animaux dans les modèles CDOX NEM290 et NEM292 de DIPG.	54
Figure 38 : Pharmacocinétique et distribution du MBZ et de ses métabolites dans le sang et le tronc cérébral chez la souris Nude dosés par spectrométrie de masse.....	55
Figure 39 : Evaluation préclinique <i>in vivo</i> de l'activité du MBZ « Cayman » sur la croissance tumorale et la survie des animaux dans les modèles CDOX NEM290 et NEM292 de DIPG.	56
Figure 40 : Conservation des propriétés barrières de la BHE dans le modèle CDOX NEM292.	57
Figure 41 : Impact de la pression acoustique des US sur l'ouverture de la BHE chez la souris saine...	58
Figure 42 : Suivi de différents paramètres cliniques avant, pendant et après une sonication de 0.3MPa pendant 120s chez la souris saine.....	58
Figure 43 : Mise en évidence de l'ouverture de la BHE par l'effet des US à l'aide de la coloration au bleu Evans chez la souris saine et dans les modèles CDOX NEM290 et NEM292 et de son impact histologique.	59
Figure 44 : Évaluation préclinique <i>in vivo</i> de l'activité du panobinostat sur la croissance tumorale et la survie des animaux avec et sans ouverture de la BHE par US dans le modèle CDOX NEM292..	59
Figure 45 : Pharmacocinétique et distribution du panobinostat dans le sang et le cerveau chez la souris ayant reçue ou non des ultrasons au niveau du cervelet et du tronc cérébral.	60

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des tumeurs du SNC selon leur type tumoral et leur classe de gravité selon l'OMS en 2016.....	9
Tableau 2 : Conditions d'implantation des cellules tumorales pour la primogreffe.	32
Tableau 3 : Liste des amorces pour le séquençage ciblé de la mutation H3K27M.	37
Tableau 4 : Liste des amorces pour la détermination du point de cassure des fusions 1 et 2 de C11orf95 et RELA.....	38
Tableau 5 : Caractéristiques cliniques et moléculaires des patients atteints de DIPG et tumorigénicité observée <i>in vivo</i>	43
Tableau 6 : Prise tumorale et survie des PDOX de DIPG au fil des passages.	44
Tableau 7 : Caractéristiques cliniques des modèles CDOX.	46
Tableau 8 : Prise tumorale et survie des animaux chez les souris Nude et NSG pour 4 lignées cellulaires de DIPG.	47
Tableau 9 : Suivi de la croissance tumorale des CDOX NEM290 et NEM292 après injection de différentes quantités de cellules tumorales.....	48
Tableau 10 : Caractéristiques cliniques et moléculaires des patients atteints d'EPN et tumorigénicité <i>in vivo</i>	51
Tableau 11 : Prise tumorale et survie des PDOX d'EPN à mesure des passages.....	51

PREAMBULE

L'unité CNRS-UMR8203 « Vectorologie et thérapeutique anticancéreuse », s'organise autour de 5 équipes possédant leurs propres thématiques de recherche. L'équipe à laquelle j'appartiens « Identification de nouvelles cibles et thérapeutiques innovantes dans les cancers pédiatriques », est dirigée par le docteur Jacques Grill et s'intéresse à l'étude de mécanismes d'oncogenèse et de progression tumorale dans les tumeurs cérébrales de l'enfant, dans le but d'identifier de nouvelles options thérapeutiques dans ces cancers. Ces dernières années, la principale thématique développée comprend un vaste programme autour des tumeurs gliales pédiatriques, en particulier les gliomes infiltrants du tronc cérébral (ou DIPG) et les épendymomes. Ce programme, basé sur l'obtention d'échantillons tumoraux de patients, comprend autant l'étude de la biologie de ces tumeurs par des profilages moléculaires que le développement de modèles précliniques *in vitro* et *in vivo*. Au sein de ce programme, mon projet s'articule autour de la mise en place des modèles précliniques *in vivo* dans des souris immunodéprimées, leur caractérisation ainsi que leur utilisation pour l'évaluation thérapeutique de médicaments. La mise en œuvre de ce projet est facilitée par l'accès aux différentes plateformes techniques de Gustave Roussy : plateforme d'évaluations précliniques, plateforme d'imagerie et cytométrie et plateforme de génomique. Concernant les DIPG, le développement de ces modèles ainsi que leur caractérisation entrent dans le cadre d'un projet INCa réalisé en collaboration avec 3 autres équipes de recherche : le service de neurochirurgie de l'hôpital Necker, le service de neuropathologie de l'hôpital Sainte-Anne et l'unité d'Imagerie par Résonance magnétique et de Spectroscopie de Neurospin au CEA. Une collaboration internationale avec le DKFZ en Allemagne nous a permis en outre d'évaluer, sur les modèles développés au laboratoire, différentes thérapeutiques identifiées à partir d'un criblage *in vitro* à large échelle. Ce projet est encadré par le Dr Jacques Grill et co-encadré par le Dr David Castel.

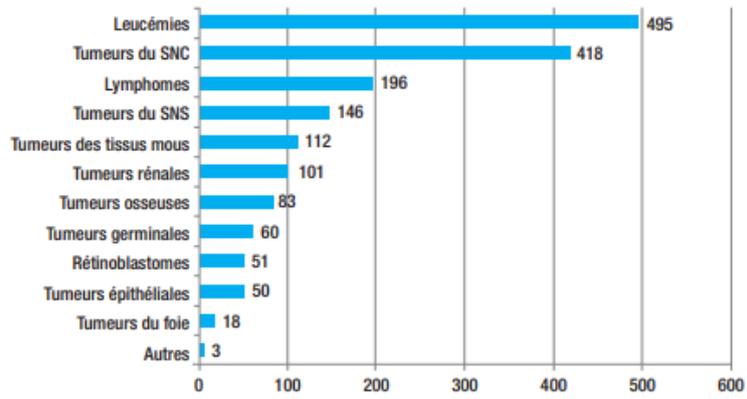


Figure 1 : Nombre moyen de cas annuels de cancers de l'enfant en France. SNC : système nerveux central ; SNS : système nerveux sympathique. (Lacour and Clavel, 2014)

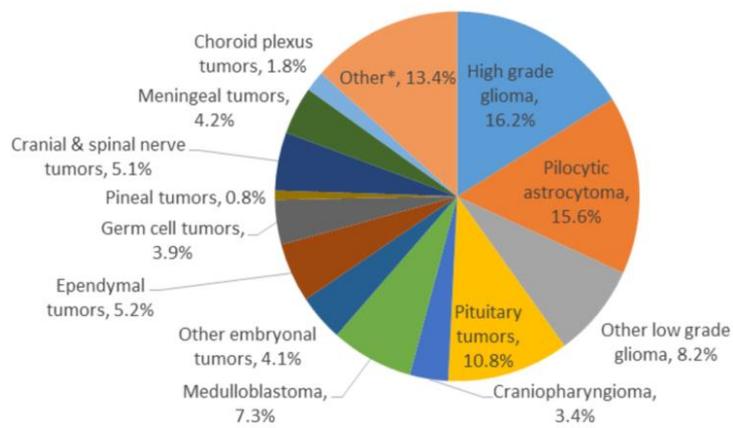


Figure 2 : Répartition des tumeurs cérébrales de l'enfant. (Segal and Karajannis, 2016)

INTRODUCTION

En France, 2500 nouveaux cas de cancers pédiatriques sont déclarés chaque année (Institut National du Cancer). Cette maladie est la 4^{ème} cause de mortalité chez les moins de 15 ans, et un enfant sur 440 est susceptible de développer un cancer avant cet âge. Dans la plupart des cas, les facteurs favorisant l'apparition des cancers chez les adultes sont connus (consommation de tabac ou d'alcool, exposition aux ultraviolets, prédisposition génétique,...), alors que la cause chez l'enfant n'est que très rarement identifiée.

1. Les tumeurs gliales de l'enfant

Les tumeurs du système nerveux central (SNC) sont les tumeurs solides de l'enfant les plus fréquentes (Lacour and Clavel, 2014). Elles représentent près de 24% des tumeurs, juste après les leucémies (29%). Elles touchent plus de 400 enfants par an en France (Figure 1).

En 2016, l'OMS distingue environ 200 types de tumeurs cérébrales, classées en fonction des tissus dont elles sont issues (Segal and Karajannis, 2016). Les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez les enfants sont les tumeurs gliales (45%), les tumeurs hypophysaires (14%) et les tumeurs embryonnaires (11%). Dans les tumeurs gliales, on distingue principalement trois types de tumeurs : les gliomes de haut grade, les astrocytomes pilocytiques et les épendymomes (Figure 2).

Dans le système nerveux, les cellules gliales servent de support structural au tissu cérébral, mais elles jouent également un rôle important dans la transmission neuronale ainsi que dans le maintien de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Ludwig and Bhimji, 2017). On distingue plusieurs types cellulaires gliaux: les astrocytes, cellules étoilées dont la fonction principale est d'être le support et la protection du neurone ; les oligodendrocytes, qui forment les gaines de myéline ; la microglie, composée de macrophages résidents assurant la défense immunitaire du SNC ; et les épendymocytes, qui assurent l'interface entre le liquide céphalo-rachidien et le système nerveux.

Les gliomes pédiatriques de haut grade composent une famille de tumeurs histologiquement hétérogènes avec des profils mutationnels différents caractérisés par une agressivité clinique. Ces tumeurs sont classées en grade III et IV par l'OMS et présentent des phénotypes gliaux astrocytaires, oligodendrocytaires ou épendymaires (Louis et al., 2016). Très récemment, des études d'expression génique conduites sur des gliomes de haut grade pédiatriques et adultes ont montré des différences importantes dans les caractéristiques moléculaires entre les deux, indiquant que les gliomes de l'enfant étaient très différents des

WHO grades of select CNS tumours			
Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours			
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	II	Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	I
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	III	Papillary glioneuronal tumour	I
Glioblastoma, IDH-wildtype	IV	Rosette-forming glioneuronal tumour	I
Glioblastoma, IDH-mutant	IV	Central neurocytoma	II
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	IV	Extraventricular neurocytoma	II
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	II	Cerebellar liponeurocytoma	II
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	III		
Other astrocytic tumours		Tumours of the pineal region	
Pilocytic astrocytoma	I	Pineocytoma	I
Subependymal giant cell astrocytoma	I	Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	II or III
Pleomorphic xanthoastrocytoma	II	Pineoblastoma	IV
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	III	Papillary tumour of the pineal region	II or III
Ependymal tumours		Embryonal tumours	
Subependymoma	I	Medulloblastoma (all subtypes)	IV
Myxopapillary ependymoma	I	Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	IV
Ependymoma	II	Medulloepithelioma	IV
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	II or III	CNS embryonal tumour, NOS	IV
Anaplastic ependymoma	III	Atypical teratoid/rhabdoid tumour	IV
Other gliomas		CNS embryonal tumour with rhabdoid features	IV
Angiocentric glioma	I	Tumours of the cranial and paraspinal nerves	
Chordoid glioma of third ventricle	II	Schwannoma	I
Choroid plexus tumours		Neurofibroma	I
Choroid plexus papilloma	I	Perineurioma	I
Atypical choroid plexus papilloma	II	Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)	II, III or IV
Choroid plexus carcinoma	III	Meningiomas	
Neuronal and mixed neuronal-glia tumours		Meningioma	I
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	I	Atypical meningioma	II
Gangliocytoma	I	Anaplastic (malignant) meningioma	III
Ganglioglioma	I	Mesenchymal, non-meningothelial tumours	
Anaplastic ganglioglioma	III	Solitary fibrous tumour / haemangiopericytoma	I, II or III
Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	I	Haemangioblastoma	I
		Tumours of the sellar region	
		Craniopharyngioma	I
		Granular cell tumour	I
		Pituitaryoma	I
		Spindle cell oncocytoma	I

Tableau 1 : Classification des tumeurs du SNC selon leur type tumoral et leur classe de gravité selon l’OMS en 2016. (Louis et al, 2016)

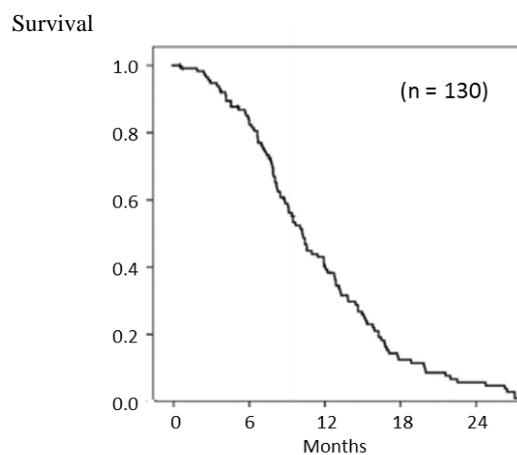


Figure 3 : Survie globale des patients atteints de DIPG. Dans les deux années suivant le diagnostic, plus de 95% des patients atteints de DIPG décèdent. (Puget et al, 2015)

gliomes de l'adulte (Paugh et al., 2010). L'extrapolation de la connaissance des gliomes de l'adulte, jusqu'alors utilisé pour le choix des traitements des patients, n'était ainsi plus pertinent. Il est devenu nécessaire de classer et d'étudier spécifiquement ces tumeurs pédiatriques.

On peut identifier deux sous-groupes tumoraux distincts qui nous intéresseront dans ce travail, de par leur histologie, leur localisation intra-cérébrale et leur biologie spécifique : les gliomes diffus de la ligne médiane et les épendymomes (EPN) (Tableau 1). Dans le laboratoire, nous nous sommes plus particulièrement intéressé aux gliomes diffus uniquement situés dans le tronc cérébral, entité possédant une biologie et un phénotype particulier, qui sont nommés gliomes infiltrant du tronc cérébral (ou DIPG pour Diffuse Intrinsic Pontine Glioma).

2. Les gliomes infiltrant du tronc (DIPG)

2.1. Tableau clinique et épidémiologie

Les DIPG représentent 10 à 15% des tumeurs cérébrales pédiatriques (Puget et al., 2015). Ce sont des tumeurs rares, avec 30 à 40 cas détectés par an en France, mais dévastatrices. Ce sont en effet les cancers pédiatriques les plus graves avec une survie globale des patients de 8 à 11 mois ; plus de 95% des enfants décèdent dans les deux ans suivant le diagnostic (Figure 3).

Le DIPG est une tumeur typique de l'enfant avec une médiane d'incidence à 7 ans sans différence dans la répartition selon le sexe. La tumeur est localisée dans le tronc cérébral, structure qui sert de relai entre l'encéphale et la moelle épinière, où la plupart des nerfs crâniens naissent. Cette structure est située au-dessus de la moelle, sous le cerveau, en avant du cervelet (Figure 4) (Robison and Kieran, 2014).

Le diagnostic du DIPG repose en premier lieu sur un tableau clinique évocateur et des données d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). L'histoire clinique est brève, inférieure à 6 mois, avec des enfants présentant des troubles neurologiques caractéristiques de la zone atteinte : déficit cérébelleux : perte d'équilibre et de coordination ; affection du tractus pyramidal : troubles de la motricité ; paralysie des nerfs crâniens : troubles oculomoteurs et/ou de la déglutition/phonation. La caractéristique unique du DIPG, relevée par imagerie IRM, est une lésion de type infiltrante occupant environ 50% du tronc cérébral, typiquement hypo-intense en T1 et hyper-intense en T2 (Figure 5) (Robison and Kieran, 2014).

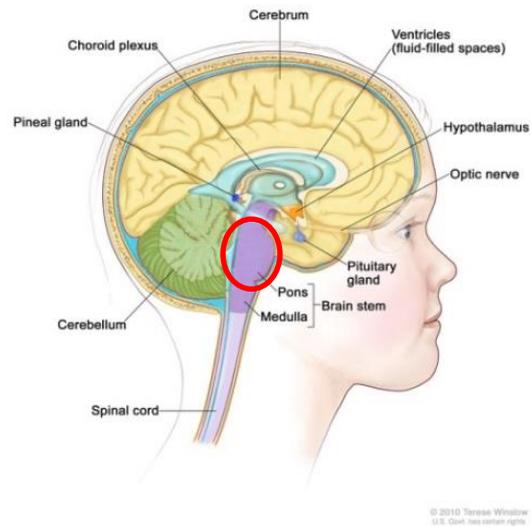


Figure 4 : Localisation intracérébrale du DIPG. (Modifiée d'après <https://www.cancer.gov/types/brain/hp/child-ependymoma-treatment-pdq>)

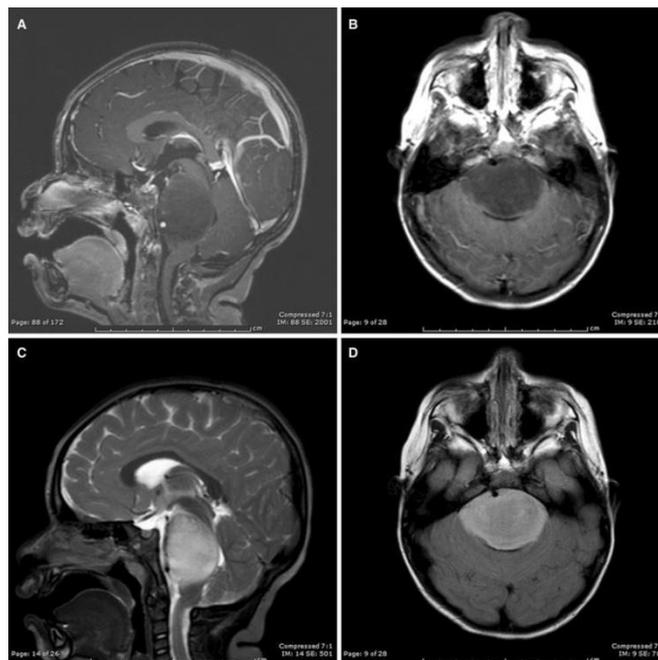


Figure 5 : IRM d'un patient atteint de DIPG. Les coupes (a) sagittale et (b) axiale en T1, et (c) sagittale et (d) axiale en séquence T2/FLAIR révèlent une tumeur typique de DIPG située dans le tronc cérébral. (Robison and Kieran, 2014)

Le tableau clinique et l'imagerie IRM suffisent en général pour établir le diagnostic de DIPG, mais récemment, l'étude histologique et biologique de la biopsie tumorale permet de discriminer plus précisément le sous-type tumoral de la lésion et de ces mutations caractéristiques associées, orientant le devenir du patient. En effet, la faisabilité et la sécurité du geste biopsique par voie transcérébelleuse ont été démontrées récemment (Puget et al., 2012). Cette procédure a alors permis d'avoir accès à du matériel tumoral précoce dans l'évolution de la maladie et ainsi améliorer sa compréhension.

2.2. *Oncogenèse, dérégulation épigénétique et mutations somatiques associées*

En 2012, des séquençages de génome entier réalisés sur sept prélèvements biopsiques ou autoptiques de DIPG ont permis de mettre en évidence des mutations somatiques récurrentes dans les gènes *H3F3A* et *HIST1H3B/C* codant deux isoformes de l'histone H3, H3.3 et H3.1 respectivement, mutations exclusivement retrouvées dans les gliomes pédiatriques (Wu et al., 2012). Ces mutations ont exclusivement été détectées dans les gliomes diffus de la ligne médiane des enfants, en dehors de quelques cas atypiques de gliomes de l'adulte, démontrant ici la spécificité de ces cancers pédiatriques (Schwartzentruber et al., 2012).

Les histones sont des protéines composant le nucléosome, complexe comportant un octamère d'histones autour duquel s'enroule un fragment d'ADN. Cette conformation permet le premier niveau de compaction de l'ADN dans le noyau. Les histones sont composées d'un domaine central globulaire sur lequel s'enroule l'ADN et d'une extrémité N-terminale, cible de nombreuses modifications post-traductionnelles (méthylation, acétylation, phosphorylation et ubiquitination) affectant les interactions avec d'autres protéines et contrôlant ainsi l'état de compaction chromatinienne et par conséquent la régulation de l'expression des gènes (Strahl and Allis, 2000).

Les mutations identifiées dans le DIPG résultent en une substitution de la méthionine par une lysine en position 27 située sur la queue N-terminale de l'histone H3. Ces substitutions H3K27M sont présentes dans 78% des DIPG : 60% présentent une mutation dans H3.3 et 18% présentent une mutation dans H3.1 (Wu et al., 2012).

Cette forme mutée de l'histone H3K27M va influencer la dynamique et l'accessibilité des protéines et de la machinerie transcriptionnelle à la chromatine, perturbant la régulation de l'expression des gènes. En effet, la forme mutée H3K27M conduit à une perte de la triméthylation sur la position 27 de l'histone H3 (H3K27me₃) (Lewis et al., 2013). En condition normale, la triméthylation de ce résidu lysine est associée à la répression de

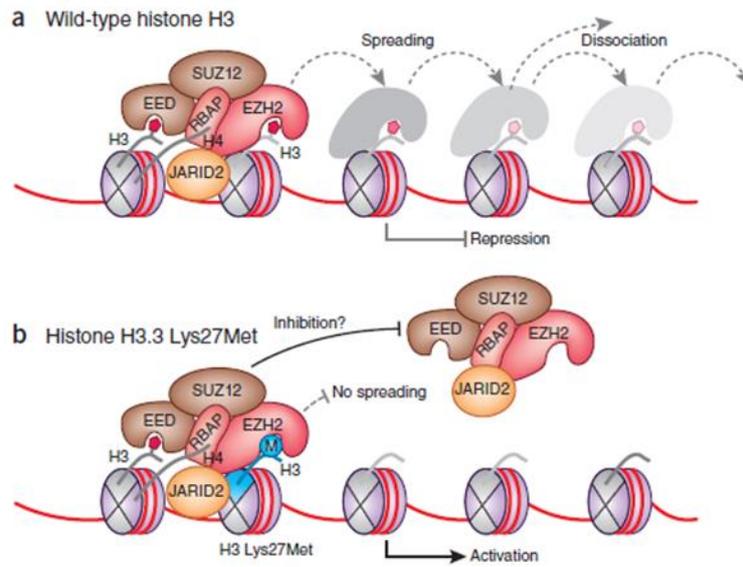


Figure 6 : Conséquence de la forme mutée H3K27M de l'histone H3 sur son interaction avec le complexe PRC2 affectant la transcription des gènes en regard. L'histone H3K27M séquestre et inhibe le complexe PRC2 *via* le site catalytique de la sous-unité EZH2 sur la chromatine, conduisant à une perte de H3K27me3 sur l'ensemble des histones voisines et à une activation de la transcription des gènes en regard. (Voigt and Reinberg, 2013)

l'expression génique par l'intervention du complexe répresseur polycomb 2 (PRC2) *via* le site catalytique EZH2. Or, il a été montré qu'en présence du mutant d'histone H3K27M, l'histone mutée se lie à EZH2 et le séquestre. Ceci conduit à inhiber l'activité méthyltransférase de PRC2 sur les lysines 27 de l'histone H3K27M ainsi que les histones H3K27 voisines (Figure 6) (Lewis et al., 2013). En effet, l'ensemble du génome montre une perte de triméthylation globale sur l'ensemble des lysines position 27 des histones H3. Cependant, il est tout de même observé des gains focaux de H3K27me3 sur le génome (Chan et al., 2013). La forme mutée H3K27M est donc considérée comme une mutation gain de fonction pour l'histone H3 avec un effet dominant négatif sur la fonction de PRC2.

Le laboratoire a récemment montré que les DIPG présentant des substitutions H3.3-K27M ou H3.1-K27M, présentent des phénotypes tumoraux et des pronostics cliniques différents, constituant ainsi deux sous-groupes de DIPG (Castel et al., 2015). Des mutations dans la voie PI3K/AKT/mTOR sont retrouvées indifféremment dans les deux sous-groupes dans 50% des tumeurs. En revanche, on peut séparer les deux groupes selon leur associations mutationnelles préférentielles : les tumeurs H3.3-K27M sont associées à une mutation dans *TP53* (ou *PPM1D*) dans 50% des cas et/ou une amplification de *PDGFRA* dans 27% des cas et les tumeurs H3.1-K27M sont associées à des mutations dans *ACVR1* dans 67% des cas.

2.3. Histologie tumorale

Histologiquement, les DIPG regroupent plusieurs sous-types tumoraux dans la classification OMS 2007 de par leur aspect histologique hétérogène. En effet, en comparaison avec les gliomes adultes, ils pouvaient être classés en astrocytome diffus de grade II, astrocytome anaplasique de grade III ou glioblastome de grade IV, voire PNET de grade IV (primitive neuroectodermal tumor) (Louis et al., 2007). Cependant, cette classification histo-clinique des gliomes adultes n'était pas prédictive de la survie des patients atteints de DIPG, contrairement à leur profil mutationnel unique qui permet de les individualiser (Buczkwicz et al., 2014). En 2016, l'OMS a donc révisé sa classification des tumeurs cérébrales pour répertorier les DIPG en tant que gliome diffus de la ligne médiane, mutant H3K27M, les regroupant avec les tumeurs thalamiques et médullaires présentant une altération de l'histone H3 (Tableau 1).

Les DIPG sont caractérisés par un aspect infiltrant et invasif des cellules tumorales dans le tissu cérébral normal (Buczkwicz et al., 2014). En diagnostic de routine à l'hôpital Sainte-Anne pour le DIPG, un marquage de l'histone muté H3K27M ainsi qu'un marquage de

la triméthylation H3K27me3 sont réalisés (Castel et al., 2015). Afin de caractériser la tumeur, il est aussi réalisé des marquages : Olig2, marqueur oligodendrocytaire ; GFAP, marqueur astrocytaire ; p53, marqueur de la présence d'une mutation sur le gène *TP53* par accumulation de la protéine dans la cellule ; EGFR, marqueur de la présence d'une mutation sur le gène *EGFR* par accumulation de la protéine dans la cellule ; PTEN, marqueur d'une perte de la protéine, phosphatase impliquée dans la voie de signalisation PI3K/AKT (Goberdhan and Wilson, 2003), dans la cellule tumorale et le microenvironnement ; MIB-1, marqueur de la prolifération cellulaire.

2.4. Traitement et progression tumorale des DIPG

La localisation dans le tronc cérébral des DIPG et leur nature infiltrante rendent leur résection tumorale impossible. La radiothérapie reste le seul traitement standard du DIPG depuis une soixantaine d'années (Coutel, 1959). Les patients sont irradiés focalement durant 6 semaines jusqu'à délivrer une dose totale de 60 Gy dans la tumeur divisée en fraction journalière de 2 Gy. Il a été observé que la réponse tumorale à la radiothérapie était dépendante de la mutation d'histone associée : les patients porteurs de tumeurs H3.3-K27M sont plutôt de mauvais répondeurs (55% de non-répondeurs) tandis que ceux présentant des tumeurs H3.1-27M sont globalement de bons répondeurs à la radiothérapie (85% de bons répondeurs) (Castel et al., 2015). Malgré cela, l'amélioration des symptômes neurologiques associée à une diminution du volume tumoral suivi par imagerie chez les patients répondeurs ne sont que transitoires puisqu'une progression tumorale survient généralement 3 à 8 mois après la fin de la radiothérapie (Lobon-Iglesias et al., 2018).

L'évolution métastatique des patients est aussi dépendante du sous-groupe tumoral, les patients dont la tumeur est H3.3-K27M ont 50% de rechute métastatique contre moins de 2% pour les patients avec une tumeur H3.1-K27M (Castel et al., 2015). Enfin, la survie des patients est aussi dépendante du sous-groupe tumoral : elle est de 15 mois pour les patients H3.1-K27M contre 9.2 mois pour les patients H3.3-K27M (Castel et al., 2015).

Depuis plus de trente ans, de nombreux essais cliniques comprenant différentes chimiothérapies et thérapies ciblées ont inclus des cas de DIPG. Une étude en recense plus de 55 dont 26 entre 2007 et 2012, qui n'ont montré aucune augmentation de survie en comparaison avec la radiothérapie seule qui constitue le traitement standard (Kebudi and Cakir, 2013). En 2018, une dizaine d'essais cliniques sont en cours, dont l'essai BIOMEDE à Gustave Roussy, piloté par le Docteur Grill (d'après ClinicalTrials.gov en 2018). Cet essai randomise les patients en fonction de leurs altérations génomiques vers l'une des trois

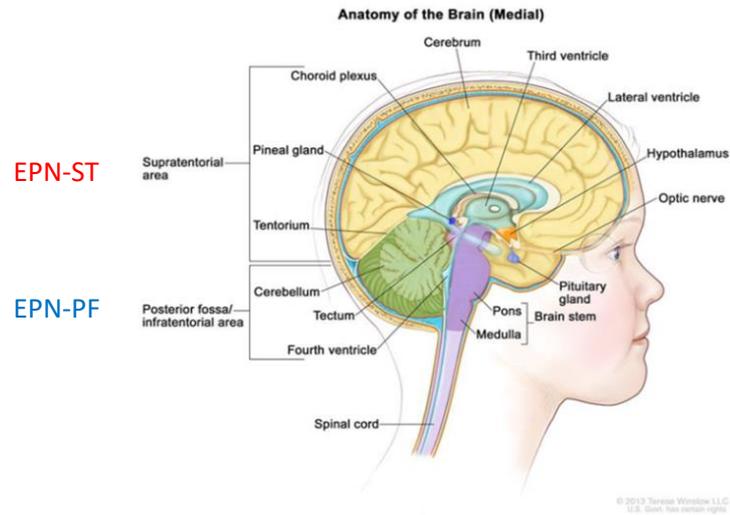


Figure 7 : Localisations intracérébrales des EPN. Les EPN-ST sont hémisphériques, dans l'aire supratentorielle et les EPN-PF sont dans la fosse postérieure, dans l'aire infratentorielle. (Modifiée d'après <https://www.cancer.gov/types/brain/hp/child-ependymoma-treatment-pdq>)

thérapies ciblées que comprend l'étude : la dasatinib, inhibiteur des tyrosines kinases de la famille de SRC et du récepteur du facteur de croissance PDGFA ; l'everolimus, inhibiteur sélectif de mTOR ; et l'erlotinib, inhibiteur du récepteur du facteur de croissance EGFR.

3. Les épendymomes

3.1. Tableau clinique, épidémiologie et histopathologie

Les épendymomes (EPN) représentent 7% des tumeurs pédiatriques du SNC (Ostrom et al., 2015). Il s'agit de la troisième tumeur la plus fréquente après les astrocytomes et les médulloblastomes. Dans plus de 90% des cas, les tumeurs sont intracrâniennes, les lésions spinales étant très rares chez l'enfant. Deux sous-groupes tumoraux sont distingués en fonction de leur localisation intracérébrale : les tumeurs supratentorielles (EPN-ST) (70% des cas), localisées dans les hémisphères cérébraux, à la surface des ventricules latéraux ou du troisième ventricule ; et les tumeurs infratentorielles (ou EPN de la fosse postérieure, EPN-PF) (30% des cas), localisées dans la fosse postérieure, le plus souvent dans le quatrième ventricule (Figure 7). L'âge médian au diagnostic est de 5 ans pour les tumeurs infratentorielles et de 8 ans pour les tumeurs supratentorielles avec une prépondérance plus importante pour les garçons (ratio 1,6:1).

Les symptômes dans les cas des formes infratentorielles sont principalement liés à l'obstruction du IVème ventricule par la tumeur : torticolis, ataxie, paralysie des nerfs crâniens. Dans le cas des formes supratentorielles, les symptômes se déclarent à un stade avancé de la croissance tumorale avec principalement des maux de tête et des déficits neurologiques locomoteurs. Le diagnostic de l'épendymome ne se fait que sur observation histologique de la tumeur.

Le traitement des EPN reste principalement l'exérèse chirurgicale, dont l'ampleur conditionne la survie du patient, et la radiothérapie. La chimiothérapie n'a, à ce jour, pas démontré d'efficacité sur la survie globale des patients (Frappaz et al., 2016). La survie sans récurrence à 5 ans est estimée entre 30 et 60%, sachant qu'il existe de nombreuses rechutes locales (50% des cas) qui dépendent de la qualité de l'exérèse. Au cours des dernières décennies, le traitement des EPN n'a connu aucun progrès (Andreiuolo et al., 2013).

Historiquement, les EPN sont classés selon leur grade (II ou III) défini par l'histologie (Louis et al., 2007). En 2016, la classification de l'OMS a introduit un nouveau groupe différencié par sa biologie, les EPN positifs pour la fusion *RELA* (Tableau 1) (Louis et al., 2016). Histologiquement, l'ensemble des EPN présente des spécificités uniques : des pseudo-

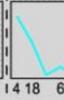
Anatomic Compartment	Posterior Fossa (PF-)			Supratentorial (ST-)		
Molecular Subgroup	SE	EPN-A	EPN-B	SE	EPN-YAP1	EPN-RELA
Histopathology	sub-ependymoma (WHO I)	(anaplastic) ependymoma (WHO II/III)	(anaplastic) ependymoma (WHO II/III)	sub-ependymoma (WHO I)	(anaplastic) ependymoma (WHO II/III)	(anaplastic) ependymoma (WHO II/III)
Genetics	balanced	balanced	CIN	balanced	aberr. 11q	aberr. 11q
Oncogenic Driver	?	?	?	?	YAP1-fusion	Chromothripsis RELA-fusion
Tumor Location						
Age Distribution (years)						
Gender Distribution						
Patient Survival (OS; months)						

Figure 8 : Classification des EPN intracérébraux en six sous-groupes moléculaires selon leur profil de méthylation. (Adaptée de Pajtler et al, 2015)

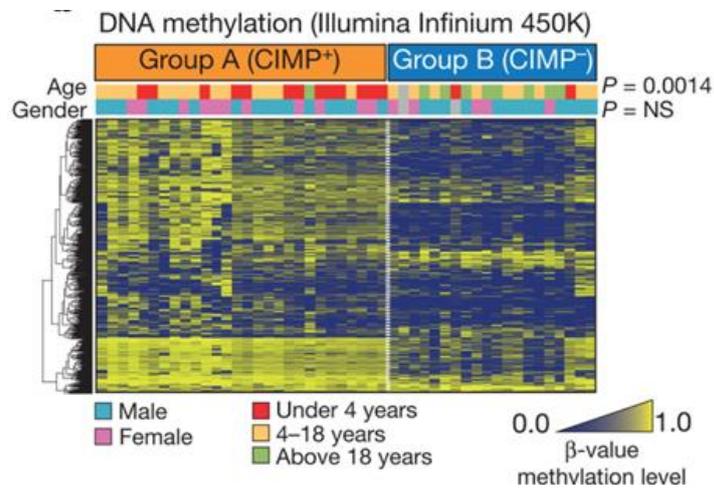


Figure 9 : Profil de méthylation des EPN-PF. Le profil de méthylation des EPN-PF définit deux sous-groupes : le groupe A, des jeunes enfants, qui est plus hyperméthylé que le groupe B, des adolescents et adultes. CIMP : CpG island methylator phenotype. (Mack et al., 2014a)

rosettes périvasculaires et/ou des rosettes épendymaires ; les cellules tumorales s'organisent de façon polaire autour soit d'un vaisseau, soit d'une cavité vide respectivement (Andrieuolo et al., 2013). La caractérisation des cellules souches issues d'EPN a permis de définir comme cellules d'origine, les cellules de la glie radiaire (Taylor et al., 2005).

Plus récemment, il a été montré que selon leurs profils de méthylation, les EPN-PF et les EPN-ST représentent deux sous-groupes présentant des caractéristiques biologiques différentes (Figure 8) (Pajtler et al., 2015).

3.2. Les EPN-PF : signature CIMP, tenascine C et altérations chromosomiques

En 2014, des séquençages de génome et d'exome entier sur une large cohorte d'EPN-PF n'ont révélé aucune mutation, ni aucun polymorphisme nucléotidique récurrents (Mack et al., 2014a). En revanche, des études de méthylation de l'ADN par biopuces permettent de discerner deux sous-groupes possédant des méthylomes très distincts. Le groupe EPN-PFA correspond cliniquement à des jeunes enfants avec un âge médian au diagnostic de 3 ans, présentant une maladie plus agressive à haut risque de récurrence et donc de mauvais pronostic avec une survie sans progression (PFS) à 5 ans de 33%. Ce groupe EPN-PFA présente une hyperméthylation des îlots CpG plus importante en comparaison au groupe EPN-PFB, appelée signature CIMP pour CpG island methylator phenotype (Figure 9) (Mack et al., 2014a). En revanche, le sous-groupe EPN-PFB inclut des tumeurs de bon pronostic avec une PFS à 5 ans de 73% mais qui ne correspond plus cliniquement à des cas de pédiatrie mais d'adolescents et d'adultes avec une médiane de 30 ans.

Une étude de voie de signalisation montre que les gènes éteints par PRC2, requis pour la différenciation cellulaire, sont plus méthylés dans les épendymomes PFA (Mack et al., 2014a). Il est donc supposé qu'une hyperactivité du complexe PRC2 contribue à une extinction des gènes suppresseurs de tumeur par hyperméthylation, cause initiatrice de la cancérogenèse. Cependant, 100% des EPN-PFA présentent une réduction globale de H3K27me3 contrairement aux EPN-PFB (2%) qui pourrait être due à une méthylation aberrante de l'ADN (Panwalkar et al., 2017). La perte de H3K27me3 peut être aisément mise en évidence en routine en immunohistochimie, permettant ainsi de classer rapidement les tumeurs dans leur sous-groupe, pour orienter les patients vers le traitement le plus adapté.

La Tenascine C (TNC), une glycoprotéine exprimée précocement durant le développement du SNC, est associée à un mauvais pronostic dans les EPN-PF : 94% des EPN-PFA expriment la TNC contre seulement 11% pour les EPN-PFB (Witt et al., 2011). L'association TNC et gain du 1q25 peut être utilisée comme biomarqueur d'EPN-PF de

mauvais pronostic et est associée au sous-groupe EPN-PFA dans 95% après analyse du profil de méthylation des tumeurs (Andriuolo et al., 2017)

3.3. L'instabilité génomique des EPN-ST conduit à des fusions de gènes

En 2014, des séquençages de génome entier ont montré que les EPN-ST avaient très peu de modifications génomiques (Parker et al., 2014). Cependant et plus remarquablement, des variations structurales importantes sont observées avec une médiane de 23 variations observées par génome. Il a été mis en évidence une caractéristique unique et très fréquente de ces tumeurs : un chromotrypsis dans le chromosome 11 conduisant à une fusion oncogénique entre deux gènes, *RELA* et *C11orf95* dans 75% des cas. La protéine *RELA*, sous unité catalytique p65 du complexe NF- κ B, est connue pour son rôle dans la translocation nucléaire et l'activation de ce dernier, lui-même impliqué dans la survie cellulaire (Parker et al., 2014). La protéine *C11orf95* n'a pas de fonction connue, mais il apparaît que la perte de son domaine doigt de zinc, éliminé lors de la fusion, semble être l'élément oncogénique essentiel. La fusion de ces deux gènes produit une protéine chimérique qui est transloquée spontanément dans le noyau et active le complexe NF- κ B de manière constitutive (Parker et al., 2014). Il a été mis en évidence 7 transcrits de fusions différents, les plus courants comprennent les deux premiers exons de *C11orf95* et la totalité de la séquence codante de *RELA* à l'exception des deux premiers codons. Ce sous-groupe, nommé EPN-ST-*RELA* retrouvé chez des grands enfants (médiane 8 ans), est associé à un mauvais pronostic avec une survie sans progression à 5 ans de 29%. Dans ce sous-groupe EPN-ST-*RELA*, 16% des tumeurs sont associées à une délétion du gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* régulant le cycle cellulaire, 52% des tumeurs sont associées à une perte du chromosome 9 entier ou de sa partie 9q et 25% des tumeurs ont un gain du chromosome 1q (Pajtler et al., 2015). Une surexpression de la protéine *L1CAM*, mise en évidence par immunohistochimie, associée à une surexpression génique, mise en évidence par RNAseq, corrèle avec la présence de la fusion *RELA* et un mauvais pronostic (Malgulwar et al., 2018). *L1CAM* est une protéine transmembranaire d'adhésion exprimée dans le système nerveux en développement à la surface des neurones. L'analyse de cette protéine par immunohistochimie reste une technique rapide et peu coûteuse permettant de discriminer rapidement des tumeurs EPN-ST-*RELA*.

Moins fréquemment, des fusions du gène *YAP1* avec d'autres gènes, *MAMLD1* ; co-activateur transcriptionnel de NOTCH et *FAM118B* ont été détectées (Parker et al., 2014). Ces tumeurs, nommées EPN-ST-*YAP1*, sont retrouvées chez les très jeunes enfants avec une

médiane de 1,4 ans et associées à un bon pronostic puisqu'aucun patient n'est décédé dans les 5 ans (Pajtler et al., 2015).

4. Modèles précliniques *in vivo*

4.1. Les modèles *in vivo* : nouveaux avatars en cancérologie

Le cancer est une maladie très hétérogène caractérisée par des modifications génétiques et/ou épigénétiques différentes pour chaque type tumoral (Hanahan and Weinberg, 2011). Nous avons vu précédemment qu'il existe pour un même type de cancer plusieurs sous-groupes tumoraux différents. La complexité de cette maladie oblige à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques nécessitant la connaissance de la biologie tumorale. De plus, la variabilité inter-tumorale dans un même sous-groupe rend obligatoire l'établissement de modèles précliniques variés, un seul modèle ne reflétant pas une pathologie (Pearson et al., 2017). En cancérologie, le concept émergent de médecine de précision nécessite d'affiner les stratifications des types tumoraux et pour répondre au mieux à cette stratégie, les modèles précliniques doivent refléter cette médecine personnalisée. C'est pour cela que le développement de modèles précliniques, avatars de la tumeur, est indispensable.

Même si les modèles cellulaires *in vitro* sont largement utilisés du fait d'une part de leur facilité d'utilisation et d'autre part, parce qu'ils constituent une alternative à l'expérimentation animale, ils restent peu représentatifs de la complexité des tumeurs ; particulièrement dans les interactions du microenvironnement avec la cellule tumorale ou encore dans la modélisation de la vie d'un médicament dans l'organisme (pharmacocinétique, toxicité, ...). Le recours à l'animal *in vivo* reste encore le modèle le plus pertinent de différentes études en oncologie (Malaney et al., 2014). Les modèles murins restent le système *in vivo* le plus largement utilisé en cancérologie ; la facilité de manipulation, la période courte de gestation, l'accès à des animaux génétiquement modifiés, ainsi que le faible coût d'entretien restent avantageux.

4.1.1. Les modèles *in vivo* hétérotopiques vs orthotopiques

Le modèle hétérotopique consiste à greffer les cellules tumorales en dehors de leur site d'origine, le plus souvent en sous-cutané, à l'inverse du modèle orthotopique où la tumeur est implantée au site d'origine. Pour les modèles sous-cutanés, le suivi de la croissance tumorale est facilité par l'accès direct au volume tumoral mesuré physiquement à l'aide d'un pied à coulisse contrairement aux modèles orthotopiques où le suivi de la croissance tumorale ne

peut être assurée que si les cellules tumorales sont marquées par fluorescence ou bioluminescence. Ce dernier modèle est intéressant par sa localisation dans le microenvironnement originel de la tumeur qui peut alors interagir avec celui-ci et par exemple modifier la réponse à des traitements (McMillin et al., 2013). L'autre avantage des modèles orthotopiques est de pouvoir modéliser la formation de métastase ce qui est impossible dans des modèles hétérotopiques (Daudigeos-Dubus et al., 2014).

4.1.2. Les modèles génétiquement modifiés (GEM)

Les GEM correspondent à des animaux génétiquement modifiés, créés pour étudier l'effet potentiel d'introduction ou de suppression de modifications germinales ou conditionnelles (mutations,...) sur l'oncogenèse et le développement tumoral dans un microenvironnement intact (Gould et al., 2015). Ces modèles jouent un rôle capital dans la compréhension des cancers et peuvent apporter des éléments importants sur l'origine génétique des tumeurs. Un des autres avantages quant à l'utilisation de ces modèles est de pouvoir étudier les tumeurs dans un contexte immunologique.

4.1.3. Les xénogreffes dérivées de cellules (CDX)

Historiquement, les premiers modèles *in vivo* en cancérologie étaient obtenus par injection de cellules issues de culture de lignées dérivées de tumeurs sur des modèles de souris immunodéprimées. Les CDX restent des modèles faciles à obtenir avec l'avantage de pouvoir contrôler les cellules injectées. Cependant, les lignées cellulaires utilisées couramment en cancérologie cultivées pendant des centaines de générations restent peu représentative des maladies, du fait de leur dérive par rapport aux tumeurs initiales de patients due par exemple à un processus de sélection clonale au cours du temps (Gould et al., 2015). Cependant, des modèles robustes de CDX sont obtenus si à l'origine les cultures cellulaires reflètent l'hétérogénéité inter et intra-tumorale comme par exemple dans le cas des différents sous-types de cancer du sein (Neve et al., 2006) ou des tumeurs gliales de haut grade pédiatriques (Wenger et al., 2017).

4.1.4. Les xénogreffes dérivés de patient (PDX)

Plus récemment, des modèles de xénogreffes PDX sont développés par de nombreux laboratoires publics et privés pour de nombreuses tumeurs (Gould et al., 2015). Pour obtenir ces modèles PDX, une partie de la tumeur du patient obtenue après résection ou biopsie

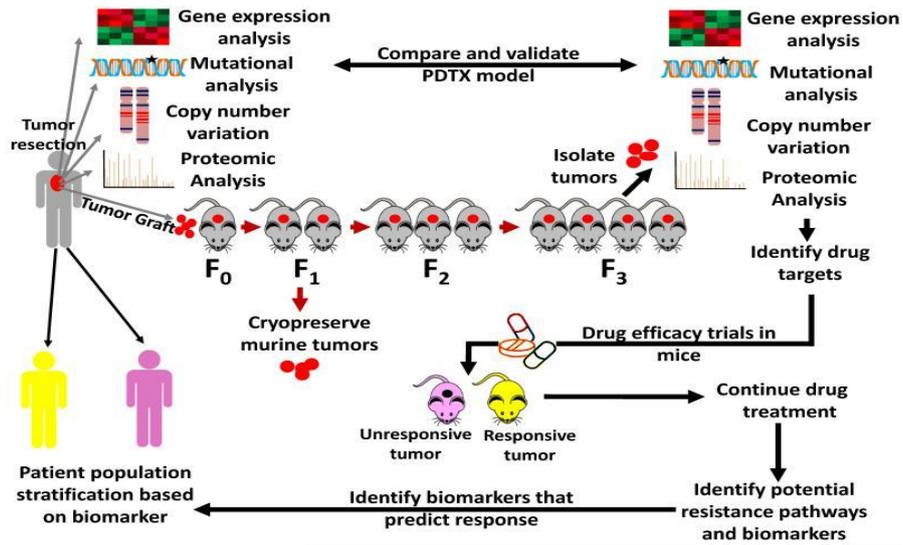


Figure 10 : Établissement, maintien et utilisation de modèles vivo PDX. La xéno greffe est établie à partir d'un fragment tumoral greffé sur les souris F₀, puis elle est transplantée dans les générations suivantes (F₁, F₂,...) pour être cryo-préservée, caractérisée et utilisée pour tester des médicaments. (Malaney et al., 2014)

chirurgicale est implantée chez la souris immunodéprimée. L'intérêt majeur des PDX est de générer des tumeurs sans sélection clonale au préalable en culture, la tumeur mimant ainsi mieux la variabilité cellulaire intra-tumorale (Cassidy et al., 2015).

Une fois la tumeur établie *in vivo* à la primogreffe, elle est transplantée en série par passages successifs afin d'amplifier les cellules tumorales pour les cryo-conserver (Malaney et al., 2014). En parallèle, la xéno greffe est caractérisée : histologie, profil mutationnel, anomalies cytogénétiques,... Ces PDX peuvent alors être le support d'études précliniques pour des thérapies ainsi qu'être utilisées pour étudier la biologie du cancer (Figure 10).

Il a été largement montré dans la littérature que les modèles PDX étaient représentatifs de la tumeur des patients, tant sur l'aspect de la biologie que des caractères cliniques des patients (Némati et al., 2010) (Fichtner et al., 2008). Par exemple, dans le médulloblastome, la tumorigénicité des tumeurs dans les souris corrèle avec le grade tumoral et le mauvais pronostic chez le patient (Vassal et al., 1996).

Cependant, quelques études montrent qu'à mesure des passages en série des PDX, les xéno greffes peuvent dériver de la tumeur humaine dont elle est issue. Une analyse de 1 110 PDX de 24 types de cancers différents montre une augmentation par accumulation d'altération du nombre de copies, le plus souvent due à une sélection sous-clonale de la population tumorale (Ben-David et al., 2017). De plus, un des désavantages majeurs aux PDX est l'utilisation de souris immunodéprimées, or les immunothérapies sont en plein essor dans les cancers (Mount et al., 2018).

De nos jours, le développement et l'accès aux PDX se sont considérablement améliorés, de nombreuses sociétés émergentes, telles que XenTech à Evry ou de société de renommée telle que Charles River, proposent l'utilisation de leurs modèles de PDX. Cependant, dans le cas des cancers très spécifiques et rares, comme le sont les tumeurs cérébrales de l'enfant, le peu d'intérêt du développement de tels modèles demeure une limitation pour l'étude de la biologie de ces tumeurs et l'évaluation de nouvelles thérapies.

4.2. *Les modèles de DIPG existants*

Jusqu'à récemment, le choix des médicaments à évaluer dans les essais cliniques chez les enfants atteints de DIPG reposait sur des études précliniques menées sur des modèles de gliomes adultes ou murins (Caretti et al., 2011). Ceci était principalement dû à l'absence de modèles précliniques pertinents notamment du point de vue des altérations génétiques. La possibilité de recueillir du matériel tumoral biopsique au diagnostic ou à l'autopsie a permis de générer les premiers modèles cellulaires et murins : PDOX (patient derived orthotopic

xenograft) mais aussi CDOX (cell derived orthotopic xenograft), mais aussi de définir les modifications génétiques pouvant permettre le développement de modèle murins génétiquement modifiés (GEM).

4.2.1. Les CDOX de DIPG

Le tout premier modèle *in vivo* de DIPG a été obtenu à partir de cellules de tumeurs de patient à l'autopsie mises en culture sous forme de neurosphères dans des conditions de culture sélectionnant les cellules souches tumorales (Monje et al., 2011). Après xéno greffe de ces cellules dans des souris nouveau-nées à P2, des tumeurs infiltrantes sont observées dans le 4^{ème} ventricule.

Un autre groupe a implanté des cellules issues d'une biopsie après culture en neurosphères et intégration dans leur génome des séquences de la luciférase et de hTERT (human telomerase reverse transcriptase) (Hashizume et al., 2012). La télomérase permet à la cellule d'ajouter à chaque réplication de l'ADN, des séquences hautement répétées, les télomères, en fin de chromosome (Calado and Young, 2009). Conservant ainsi à chaque division la longueur du chromosome, la cellule peut se diviser indéfiniment devenant alors immortelle. Les tumeurs ainsi générées étaient morphologiquement et histologiquement similaires aux DIPG (Hashizume et al., 2012).

4.2.2. Les PDOX de DIPG

Les premières PDOX développées dans le DIPG ont été conçues à partir de cellules issues de tumeur à l'autopsie (Caretti et al., 2014). La greffe stéréotaxique de ces cellules dans le 4^{ème} ventricule de souris néonatales immunodéficientes a permis le développement d'une tumeur infiltrante, comparable aux DIPG d'un point de vue histo-pathologique. Cependant, de manière intrigante, par un mécanisme inconnu, la tumeur induite était d'origine murine.

Un autre laboratoire a cependant réussi à développer des PDOX humaines issues de tumeurs prélevées à l'autopsie (Kambhampati et al., 2015). Pour cela, les cellules ont été directement greffées dans le tronc cérébral de très jeunes souris et des tumeurs humaines se sont développées dans 70% des cas. Ces tumeurs infiltrantes présentent la forme mutée H3K27M ainsi qu'une perte de H3K27me3 en immunohistochimie. Cependant, l'étude de ces PDOX n'est restée qu'histologique, la génomique de ces tumeurs n'étant pas abordée. On peut alors se questionner quant à la pertinence de ces modèles.

La plupart des modèles CDOX et PDOX de DIPG décrits ci-dessus correspondent à des modèles obtenus à partir de tumeurs à l'autopsie. Chez le patient, ces tumeurs ont déjà subi différents traitements et ont notamment été irradiées. Ceci a pu perturber la biologie des cellules tumorales et sélectionner certaines sous-populations tumorales par rapport aux tumeurs naïves de traitement. En effet, en comparaison avec les tumeurs au diagnostic, les tumeurs à l'autopsie présentent de nouvelles mutations et/ou ont des mutations préexistantes dans une proportion différentes (Castel et al., 2015).

4.2.3. Les GEM de DIPG

L'avantage des GEM est de permettre d'étudier les tumeurs dans un microenvironnement naturel chez des animaux immunocompétents. Un premier GEM a été développé en surexprimant *PDGFB* et la forme mutée *H3F3A-K27M*, et en inhibant l'expression de *TP53* avec un shARN spécifiquement dans les progéniteurs présumés du DIPG situés dans le tronc cérébral de souris néonatales (Lewis et al., 2013). L'ensemble de ces trois modifications induit la prolifération ectopique de groupes cellulaires *in vivo* ainsi qu'une perte de H3K27me3 dans ces cellules.

Un autre modèle génétique a été développé en transduisant des cellules souches embryonnaires humaines avec des lentivirus codant une forme constitutivement active de PDGFRA, un shRNA (small hairpin RNA) contre *TP53* et la forme mutée K27M de l'histone H3.3 (Funato et al., 2014). Afin d'obtenir une tumorigénèse caractéristique du DIPG, il faut obligatoirement présence de l'ensemble de ces oncogènes *in vivo*. Cette étude illustre le potentiel de modélisation des facteurs génétiques à induire un DIPG, nécessaire à la compréhension du développement de la maladie.

Très récemment, il a été montré que la combinaison de la forme mutée H3.3-K27M avec une perte de *TP53* était suffisante pour induire une tumeur invasive très proliférative dans un contexte bien précis : l'induction des modifications géniques était réalisée dans des embryons *in utero* (Pathania et al., 2017). Cela souligne le probable développement très précoce de ces tumeurs lors de l'embryogenèse.

4.3. Les modèles *in vivo* d'épendymomes existants

Le manque de disponibilité de modèles *in vitro* et *in vivo* d'épendymome a largement entravé la compréhension de la biologie tumorale ainsi que l'essai de nouvelles thérapies. En effet, les premiers et seuls modèles *in vitro* développés ont été obtenus à partir de résections

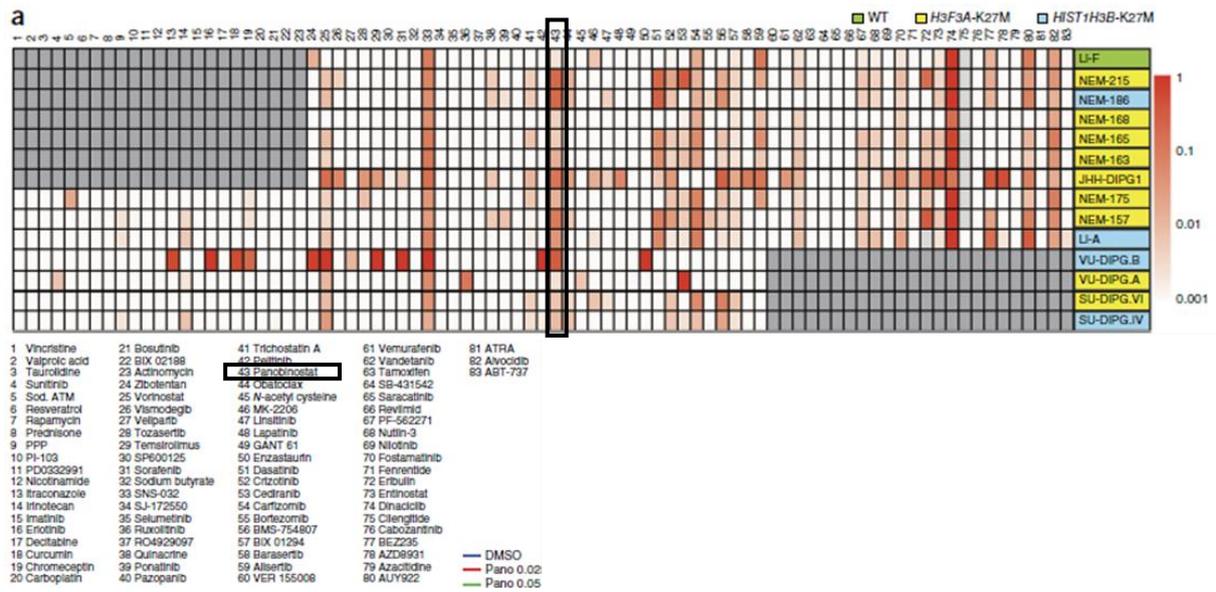


Figure 11 : Résultats du criblage de 80 médicaments sur différentes lignées de DIPG. Les cellules du crible sont sensibles au panobinostat avec un ratio IC50/concentration maximale utilisée (10µM) d'environ 0.1 pour l'ensemble des lignées. (Grasso et al., 2015)

tumorales de patients cultivées à court terme pendant moins de 10 passages, sans qu'aucune lignée cellulaire n'ait pu être établie (Dantas-Barbosa et al., 2015). Très récemment, deux lignées cellulaires d'EPN-PFA présentant un gain du 1q ont été développées en culture 3D (Amani et al., 2017). Ces lignées, regroupant toutes les caractéristiques phénotypique et biologique du patient dont elles dérivent, sont une véritable avancée préclinique de la maladie, cependant il n'a pas été montré que ces cellules soient tumorigènes *in vivo*.

Depuis de nombreuses années, les modèles *in vivo* d'EPN ont été développés dans notre laboratoire sur des souris, où les tumeurs ont été implantées en localisation sous-cutanée, peu représentatif du microenvironnement tumoral (Gaspar et al., 2006). En 2010, un premier modèle de PDOX a été développé à partir d'un épendymome supratentorielle préalablement xéno greffé en sous-cutané (Yu et al., 2010). Ce modèle BXD-1425EPN présente la même histologie et les mêmes signatures génomiques que la tumeur primaire humaine dont il dérive, confirmant sa pertinence.

Une autre approche a consisté à greffer des cultures de cellules à court terme directement dans le cerveau de souris afin d'obtenir des CDOX. Plusieurs modèles ont ainsi été développés : trois épendymomes infratentoriels, E520 (Mack et al., 2014), EPP, EPV, EP1 (Servidei et al., 2012) et un épendymome supratentorielle, nEPN1 (Hussein et al., 2011). La caractérisation de tous ces modèles *in vivo* en regard de la nouvelle classification des différents sous-groupes d'EPN n'a pas été réalisée à ce jour et leur utilisation tant sur l'étude de la biologie de la tumeur que sur l'essai de thérapeutiques n'a jamais été relevé dans la littérature.

5. Thérapeutiques dans les DIPG

5.1. Le panobinostat

Avant la découverte de la forme mutée H3K27M dans le DIPG, avec notre collaboration, un crible comprenant 83 médicaments pré-sélectionnés a été effectué sur 14 lignées cellulaires obtenues à partir de biopsies ou d'autopsies de patients atteints de DIPG, dont 7 lignées dérivées dans notre laboratoire (Grasso et al., 2015). Ce crible a montré que les cellules étaient sensibles au panobinostat, un inhibiteur des histones déacétylases (HDACi) (Figure 11).

L'acétylation des résidus lysine de la queue des histones neutralise les charges positives du résidu ce qui induit un relâchement des interactions entre l'ADN, chargé négativement, et les histones. Cela conduit à un déroulement de la molécule d'ADN, facilitant

ainsi le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. Les HDACs sont des enzymes qui permettent l'élimination des groupements acétyles sur les résidus des histones, et d'autres protéines nucléaires et cytoplasmiques. De ce fait, l'utilisation des HDACi, dont l'effet principal est donc d'activer l'expression des gènes, reste contre-intuitive dans le DIPG. Cependant, *in vitro*, le panobinostat montre une diminution de la survie cellulaire pour une faible IC50 (inhibition de 50% de la survie cellulaire), entre 30-50nM, et restaure H3K27me3 (Grasso et al., 2015). Il est supposé que l'un des effets inattendus du panobinostat serait qu'il bloque l'interaction H3K27M/PRC2 par polyacétylation. Cette interaction perturberait l'inhibition de PRC2 par la forme mutée de l'histone, PRC2 retrouvant son action de triméthylation sur les autres positions K27 des histones H3, permettant ainsi la reprise normale de la transcription des gènes. En effet, sous traitement au panobinostat, des changements transcriptionnels sont observés dont de nouveau l'expression de gènes associés à H3K27M.

In vivo, le panobinostat ne passe spontanément que faiblement la barrière hémato-encéphalique (Grasso et al., 2015). Une stratégie a été d'injecter le médicament par CED (convection-enhanced delivery) directement dans le tronc cérébral de souris xénotransplantées avec une PDOX bioluminescente pour contourner la BHE. Il a été alors observé une diminution de la croissance tumorale 7 jours post-traitement ainsi qu'une augmentation de la survie des animaux. Cependant, des résistances aux traitements sont observées, soulignant l'importance d'étudier des combinaisons de médicaments ou de déterminer de nouvelles stratégies de distribution du panobinostat.

1.1. Médicaments ciblant l'épigénétique dans le DIPG

Depuis la découverte de la mutation H3K27M dans les DIPG, la plupart des études précliniques récentes s'orientent vers une thérapie ciblant l'épigénétique. *In vitro*, il a été montré que EZH2, pourtant inhibé par la forme mutée de l'histone H3-K27M, était nécessaire à la croissance des DIPG et qu'il pouvait constituer une cible thérapeutique intéressante (Mohammad et al., 2017). Ce paradoxe pourrait être expliqué par le fait que malgré une perte globale de H3K27me3 sur le génome, des gains focaux sont présents à certains loci. De même, un modèle de GEM avec une extinction inductible d'*Ezh2* présente une survie plus longue. Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas d'inhibiteurs d'EZH2 qui passent la barrière hémato-encéphalique.

Des analyses par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-seq) dirigée contre H3K27M, ont montré qu'il existe une colocalisation entre la forme mutée de H3 et

l'acétylation de H3K27 (H3K27ac) (Piunti et al., 2017). Les protéines de la famille à bromodomaine BET (Bromodomain and Extra-Terminal motif) reconnaissent la marque H3K27ac et permettent une régulation positive de l'expression des gènes. Ces protéines co-localisent également avec H3K27M sur le génome, ce qui suppose un rôle potentiel de ces protéines dans l'oncogenèse. Deux inhibiteurs de BET montrent *in vitro* et *in vivo* une inhibition de la croissance cellulaire et tumorale ainsi qu'une augmentation de la survie des animaux (Piunti et al., 2017). Une autre alternative au blocage des protéines BET qui a été proposé, est le blocage de CDK7 qui est impliquée dans la régulation de la phosphorylation de la polymérase de type II, nécessaire à l'élongation de la transcription (Nagaraja et al., 2017). Cependant, l'inhibition de cette voie ne montre qu'un effet modeste *in vivo*.

5.2. Le repositionnement d'un anti-helminthique : le mébendazole

Un crible d'environ 80 000 composés chimiques et 3 300 médicaments a été réalisé au DKFZ, en collaboration avec le laboratoire du Pr S. Pfister en Allemagne, sur des cellules de DIPG H3K27M et H3G34R.

Un médicament utilisé en parasitologie, le mébendazole (MBZ), est ressorti de ce crible comme une stratégie thérapeutique prometteuse (Figure 12). Cet antihelminthique, médicament antiparasitaire utilisé pour traiter des infections intracrâniennes car pénétrant suffisamment à travers la BHE, inhibe la polymérisation des microtubules et interfère dans le métabolisme des glucides. Une étude pharmacocinétique réalisée chez la souris montre que la concentration intracérébrale des métabolites actifs du MBZ (MBZ, MBZ-NH₂ et MBZ-OH) est compatible avec une concentration ayant un effet *in vitro* (Bai et al., 2015). De plus, l'efficacité du MBZ a été montrée dans des modèles de glioblastomes de l'adulte. *In vitro*, le MBZ est cytotoxique à des doses faibles : IC₅₀ ≈ 0.1 μM. *In vivo*, pour une dose journalière de 50mg/kg, on observe une diminution de la croissance tumorale ainsi qu'une augmentation de la survie des souris. Il a été rapporté que des enfants pouvaient supporter des doses allant jusqu'à 100-200mg/kg pendant 12 semaines, ce qui nous suggère qu'une utilisation de hautes doses est envisageable (Bai et al., 2011).

6. La barrière hémato-encéphalique

6.1. Découverte et spécificités

En 1885, Paul Ehrlich, neuroanatomiste allemand, remarque que l'injection d'un colorant par voie intra-veineuse marque tous les organes du corps à l'exception du cerveau et

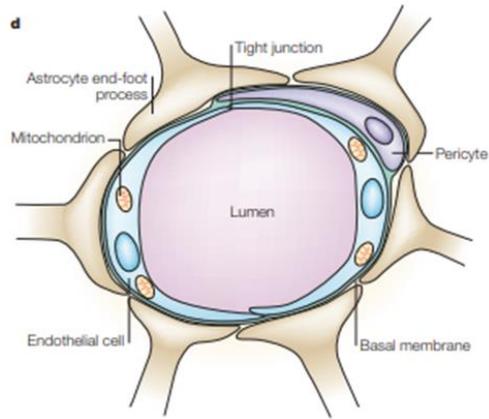


Figure 13 : Illustration schématique d'un capillaire cérébral. Trois éléments composent la BHE : les cellules endothéliales, les pieds astrocytaires et les péricytes. (Löscher and Potschka, 2005)

de la moelle épinière. En 1909, Edwin Goldmann, étudiant du docteur Ehrlich, injecte du bleu Trypan, un autre colorant dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et constate qu'à l'inverse, seul le SNC est coloré. Cela soutient alors l'existence d'une barrière limitant les échanges entre le SNC et la circulation sanguine. En 1967, l'approche par microscopie électronique permet de visualiser pour la première fois la présence de jonctions serrées, ensemble complexe de brins protéiques transmembranaire et cytoplasmiques, au niveau de l'endothélium vasculaire, identifiant ainsi la barrière hémato-encéphalique (BHE). L'intégrité et la perméabilité de la BHE sont aussi assurées par (i) les péricytes qui entourent les cellules endothéliales, (ii) la lame basale qui encercle les péricytes et les cellules endothéliales, ainsi que (iii) par les pieds astrocytaires qui couvrent environ 90% de la surface des cellules endothéliales (Figure 13) (Löscher and Potschka, 2005).

La BHE résulte de la combinaison d'une barrière physique *via* la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales, d'une barrière de transport par des mécanismes de transports spécifiques fluctuant les flux de soluté et d'une barrière métabolique par des enzymes métabolisant des molécules en transit (Ribatti Domenico et al., 2006). Ces fonctions de barrières ne sont pas fixes et peuvent être modulées et régulées physiologiquement ou dans certaines pathologies. La BHE est donc décrite comme une interface dynamique dont la fonction principale est de maintenir l'homéostasie cérébrale nécessaire au fonctionnement des neurones et des cellules gliales.

Le passage d'une substance à travers la BHE se restreint, notamment à cause de la présence des jonctions serrées, à quatre modes : la diffusion passive, la diffusion facilitée, le transport actif et la transcytose (Ribatti Domenico et al., 2006). La plupart des médicaments utilise la transcytose pour traverser la BHE, bien que cette voie soit le transport minoritaire de la BHE. De plus, il existe un transport actif d'efflux des molécules du SNC vers le sang *via* des protéines de la superfamille des transporteurs ABC, principalement la P-glycoprotéine (P-gp/ABCB1), les protéines ABCA et BCRP/ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein) (Dréan et al., 2018). Toutes ces caractéristiques de la BHE en font donc une protection efficace empêchant l'accès des médicaments au SNC. En cela, ces mêmes propriétés font de la BHE un obstacle majeur au développement de médicaments à visée cérébrale (Abbott et al., 2010).

6.2. *Le concept des ultrasons*

Diverses techniques ont déjà été étudiées afin d'augmenter la perméabilité de la BHE : utilisation de fortes doses systémiques d'antinéoplasiques, modifications des propriétés

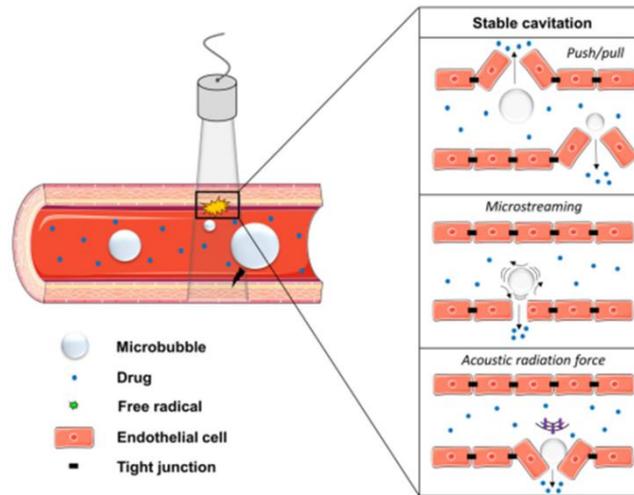


Figure 14 : Mécanismes d'ouverture de la BHE par sonication. Sous l'effet des US, les microbulles voient leur taille augmenter ou diminuer, s'agitent et sont poussées contre la paroi endothéliale. Tout cela conduit principalement à la rupture des jonctions serrées des cellules endothéliales. (Dasgupta et al., 2016)

lipophiles de certaines substances ou association à des transporteurs spécifiques, ou augmentation temporaire de la perméabilité par injection artérielle de solutions hypertoniques (Rapoport and Robinson, 1986) (Hollis et al., 1986). Cependant, ces techniques ont chacune leurs inconvénients tels que les effets indésirables systémiques, l'ouverture diffuse et non ciblée de la BHE ou encore le caractère invasif, qui en limitent l'utilisation en pratique courante. Dans les années 1950, la faculté des ultrasons (US) à ouvrir la BHE a été démontrée, notamment en présence d'agents de contrastes ultrasonores à microbulles composés soit de phospholipides, de protéines ou de polymères (Lehmann and Herrick, 1953). L'association des US et des microbulles permet de diminuer l'énergie requise par les ultrasons afin d'ouvrir la BHE et ainsi diminuer les dommages thermiques causés au tissu cérébral (Dasgupta et al., 2016). En effet, sous l'effet des ultrasons, les microbulles oscillent de manière symétrique : leur compression provoque des invaginations dans la paroi vasculaire et leur expansion sépare la paroi endothéliale entraînant dans les deux cas l'ouverture des jonctions serrées des cellules endothéliales. Un deuxième effet des US est de provoquer l'agitation des microbulles qui poussent alors physiquement l'endothélium vasculaire, conduisant à une perméabilité cellulaire (Figure 14).

Cette technique permet d'ouvrir la BHE de manière non invasive, le champ ultrasonore pouvant s'étendre jusqu'à plusieurs centimètres de profondeur dans les tissus (Dasgupta et al., 2016). L'ouverture de la BHE avec des US couplés aux microbulles reste une perturbation transitoire durant environ 6h, réversible et focale. De nombreuses études chez l'animal (souris, rat, lapin et primates) ont montré que les US focalisés à faible puissance pouvaient permettre une ouverture ciblée de la BHE avec des effets indésirables minimes.

6.3. *Technologie SonoCloud®*

La société CarThera a développé un dispositif médical implantable générant des US non focalisés de faible intensité, le SonoCloud®, qui permet de contourner la barrière osseuse, responsable de l'absorption de 80% de l'énergie ultrasonore et d'une diffraction des ondes. Le SonoCloud® est composé d'un émetteur implantable comprenant un disque piézo-céramique qui se trouve au contact de la dure-mère et du cerveau du patient, une aiguille transcutanée qui permet la connexion de l'émetteur avec le générateur externe programmable qui délivre l'émission ultrasonore. L'émetteur est implanté dans le crâne chez le patient lors de la biopsie tumorale dans le trou de trépan et sa composition en PVC permet le suivi du patient par IRM pendant tout le traitement. Ce dispositif permet d'obtenir un champ ultrasonore dans un volume cylindrique de diamètre équivalent à celui du transducteur (environ 10mm) pour une

profondeur de champs entre 17 et plus de 60mm à partir du transducteur dans l'eau (Beccaria et al., 2013).

Les études précliniques développées pour évaluer ce dispositif ont été réalisées dans un modèle non tumoral de lapin (Beccaria et al., 2015). Il a été observé une ouverture de la BHE, marquée par le marquage du tissu au bleu d'Evans et par imagerie IRM avec du gadolinium en agent de contraste, dans le volume du champ ultrasonore du transducteur. La pression acoustique utilisée a été de 0.3MPa, soit une tension appliquée de 50mV avec une fréquence de 1.05MHz, sans lésions hémorragiques observées. La BHE était ouverte pendant 8h avec un maximum d'ouverture 1h30 après sonication. Il a été montré que des protéines de haut poids moléculaires (70 et 2000 kDa) peuvent traverser la BHE ainsi que deux chimiothérapies, l'irinotécan et le témolozomide.

Un essai clinique de phase 1/2a est actuellement en cours à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière avec ce dispositif, piloté par le Pr Carpentier, chez des patients adultes atteints de glioblastome en récurrence (Carpentier et al., 2016).

OBJECTIFS

A l'initiation de ce projet, une étudiante en thèse avait développé et décrit les premiers modèles *in vitro* de DIPG dans notre laboratoire (Truffaux et al., 2015). Ces modèles, cultivés avec du sérum de veau fœtal, ont permis la réalisation du premier criblage médicamenteux à large échelle, en collaboration avec l'équipe du Pr Keller aux Etats-Unis, auquel j'ai participé (Grasso et al., 2015). Cependant, ces lignées cellulaires n'ont pas la capacité de développer des tumeurs *in vivo*. De plus, ce protocole n'a pas permis d'obtenir des lignées mutées H3.1-K27M (25% des DIPG). Une autre approche cellulaire a alors été mise en place au laboratoire, permettant de sélectionner *in vitro* les cellules souches tumorales des biopsies de patients. C'est dans ce contexte qu'a débuté mon projet. Le premier objectif était de développer des modèles *in vivo* de DIPG pour les deux mutations somatiques décrites, H3.1-K27M et H3.3-K27M. Une fois ces modèles obtenus, il en a découlé deux autres objectifs développés pendant les deux dernières années du projet, l'évaluation thérapeutique d'agents prometteurs et le développement d'une technique d'ouverture de la BHE par des US. La réalisation de ces travaux sur le DIPG a été réalisée en collaboration avec deux étudiants en thèse. Concernant les épendymomes, au début du projet, notre laboratoire, sous ma responsabilité, ne développait que des modèles *in vivo* de greffe sous-cutanée, peu représentatifs du phénotype tumoral. Nous avons donc voulu développer différentes stratégies pour obtenir des modèles *in vitro* et *in vivo* orthotopiques d'épendymomes pour ce projet.

1. Développement et caractérisation de nouveaux modèles *in vivo* de DIPG et d'EPN

Comme développé dans le paragraphe 4 de l'introduction, très peu de modèles précliniques *in vivo* de DIPG et d'EPN étaient disponibles. De plus, pour les DIPG, à l'origine du projet, il n'existait que des modèles obtenus à partir de tumeurs à l'autopsie, peu représentatives des tumeurs au diagnostic. La force de notre laboratoire est d'avoir accès à des biopsies fraîches obtenues au diagnostic des patients. Cette accessibilité nous est permise par l'étroite collaboration avec les neurochirurgiens de l'hôpital Necker-Enfant Malade qui réalisent les gestes chirurgicaux de résection et de biopsie tumorale des enfants suivis à Gustave Roussy.

A partir de ces prélèvements, nous avons pour objectifs de développer des modèles *in vivo* directs et indirects orthotopiques de DIPG et d'épendymomes. Les modèles directs, PDOX, sont obtenus par greffe des tumeurs de patients dissociées dans des souris

immunodéprimées sans étape préalable et les modèles indirects, CDOX, sont obtenus à partir des tumeurs de patients qui ont préalablement été mises en culture *in vitro*. Nous souhaitons obtenir des PDOX et des CDOX de tous les génotypes possibles de DIPG (mutation H3K27M pour H3.3 et H3.1, absence de la mutation d'histone,...), ainsi que des deux sous-types d'épendymomes (EPN-ST et EPN-PF). De plus, nous avons voulu développer ces modèles avec la capacité de pouvoir suivre leur croissance tumorale *in vivo* par une méthode non invasive, la bioluminescence.

La deuxième partie de ce projet est de caractériser la pertinence des différents modèles obtenus, tant sur la biologie des tumeurs que sur leurs caractéristiques phénotypiques. Les études histologiques sont réalisées en collaboration avec l'équipe de neuropathologie de l'hôpital Sainte-Anne, les imageries IRM sont réalisées en collaboration avec Neurospin au CEA de Saclay, les analyses moléculaires sont réalisées au laboratoire.

2. Évaluations thérapeutiques *in vivo* de deux médicaments dans le DIPG

Après avoir obtenus et caractérisés nos premiers modèles *in vivo* de DIPG dans la première partie du projet, nous voulons valider les évaluations thérapeutiques réalisées *in vitro* pour deux molécules dont l'intérêt en médecine translationnelle est important : le panobinostat et le mébendazole.

Dans le laboratoire, les deux différents cribles décrits dans la partie introduction ont été validés *in vitro* sur un plus grand nombre de cultures cellulaires, au moins quatre lignées cellulaires de DIPG (2 lignées H3.3-K27M et 2 lignées H3.1-K27M) pour les deux molécules sélectionnées, le panobinostat et le mébendazole. Il est alors nécessaire de connaître l'activité de ces médicaments dans un contexte *in vivo*, notamment en déterminant (i) leurs concentrations intracérébrales pour vérifier qu'elles soient compatibles avec une concentration efficace observée *in vitro*, ainsi que (ii) en évaluant leur efficacité cytotoxique sur les cellules tumorales sans effet toxique systémique sur l'animal.

Pour réaliser ces évaluations thérapeutiques, le modèle *in vivo* de DIPG dont la croissance tumorale est la plus élevée est utilisé afin d'obtenir une réponse rapide quant à l'efficacité du médicament. Dans le cas d'une réponse tumorale, d'autres modèles seront évalués représentant au maximum la variabilité inter-tumorale.

3. Ouverture de la barrière hémato-encéphalique à l'aide d'ultrasons

Dans la plupart des tumeurs cérébrales solides, l'intégrité de la BHE est compromise avec des réseaux vasculaires inhomogènes. Cependant, dans le cas des DIPG, la nature infiltrante de ces tumeurs dans le stroma cérébral semble permettre une certaine conservation des propriétés de barrière de la BHE. Chez certains patients, le passage des agents de contraste lors des IRM reste très faible ce qui laisse suggérer que la BHE n'est pas perméabilisée. De plus, ces tumeurs restent très peu angiogéniques avec une conservation physique du stroma tumoral. Avec cette BHE fermée, l'accès des médicaments à la tumeur devient donc sélectif et seules les molécules caractérisées par une solubilité lipidique, une taille moléculaire et une charge adéquates peuvent la traverser. De plus, beaucoup de chimiothérapie sont des substrats des transporteurs d'export P-gp et sont alors refoulés du tissu cérébral vers le compartiment sanguin (Löscher and Potschka, 2005).

Tout cela conduit à la nécessité de développer de nouvelles stratégies de distribution des médicaments aux cellules tumorales. Dans notre travail, nous nous sommes intéressés aux US non focalisés, délivrés par un transducteur plan, le SonoCloud®, développé par de la société CarThera, couplés avec des microbulles de polymères dans un modèle *in vivo* de DIPG. Les objectifs de ce travail sont (i) d'adapter le système de sonication aux souris afin d'ouvrir la BHE sans effets indésirables, (ii) de valider la diffusion du panobinostat dans le tissu cérébral après ouverture de la BHE chez des souris saines et des souris porteuses de tumeurs de DIPG et (iii) d'évaluer l'efficacité de la combinaison des US avec le panobinostat dans un modèle *in vivo* de DIPG, développé lors du premier objectif.

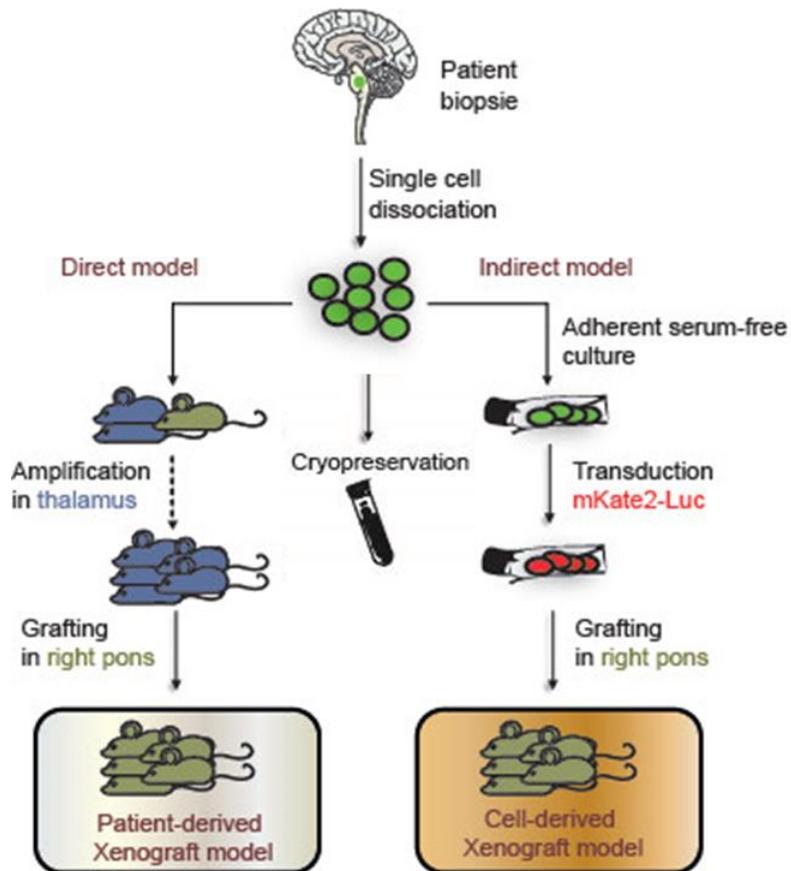


Figure 15 : Génération de modèles *in vivo* direct (PDOX) et indirect (CDOX) à partir d'un échantillon tumoral. Après dissociation mécanique de la tumeur, celle-ci est divisée en trois pour être : 1-mise en culture afin de générer les modèles CDOX après transfection des cellules par la mKate2-luc ; 2-directement greffée dans des souris Nude pour générer les modèles PDOX ; et 3-cryopréservée (modifiée à partir de Plessier et al., 2017).

MATERIELS ET METHODES

1. Echantillons cliniques

Les patients atteints de DIPG ou d'épendymomes sont suivis et traités à l'hôpital Gustave Roussy dans le service d'oncopédiatrie. Suite au diagnostic de DIPG par IRM, une biopsie est réalisée afin de confirmer ce diagnostic par analyse histologique et immunohistochimique et de classer la tumeur. Un fragment frais, d'approximativement 1x4mm, nous est réservé. Concernant les EPN, la résection tumorale permet à la fois de poser le diagnostic et d'explorer une première approche thérapeutique chirurgicale. Nous réceptionnons du matériel tumoral issu d'exérèse de patient au diagnostic et à la rechute. La taille du prélèvement qui nous est réservé dépend de la quantité de matériel tumoral prélevé chez le patient, pouvant varier d'un très gros fragment, d'environ 4cm³, à un petit fragment, sensiblement équivalent à une biopsie de DIPG. Au bloc opératoire, les fragments tumoraux sont directement placés dans du milieu DMEM contenant des antibiotiques (100U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine). Ils nous parviennent à température ambiante dans les heures suivant la chirurgie puis sont conservés à 4°C avant d'être exploités. Les patients sont anonymisés avec un numéro NEM incrémenté à mesure de la réception de nouvelles tumeurs. Entre 4 et 24 heures post-prélèvement, le fragment tumoral est dissocié mécaniquement au scalpel puis par passage successif par aspiration/refoulement dans des cônes de 1ml puis de 200µl dans du milieu DMEM jusqu'à obtention d'une suspension unicellulaire. Dans le cas de gros prélèvements, différentes parties du morceau sont dissociées et mélangées, afin de conserver au maximum la variabilité intratumorale, et les autres fragments sont congelés à l'azote dans du milieu sans sérum contenant 10% DMSO pour une utilisation ultérieure. La suspension tumorale est ensuite divisée en 3 parties : 1/3 est cryoconservée, 1/3 est utilisée pour générer des PDOX et 1/3 est mise en culture pour générer des CDOX (Figure 15).

2. Modèles animaux

Toutes les procédures d'expérimentation animale ont été réalisées selon les protocoles validés par le comité d'éthique CEEA26 et le ministère de l'enseignement supérieur français sous les numéros APAFIS #874 (PDOX), #675 (CDOX), #1116 (Mébendazole), #5705 (SonoCloud®). Les souris immunodéficientes Swiss/Nude utilisées proviennent de l'élevage interne de la plateforme de préclinique de Gustave Roussy. Elles sont issues d'une lignée non

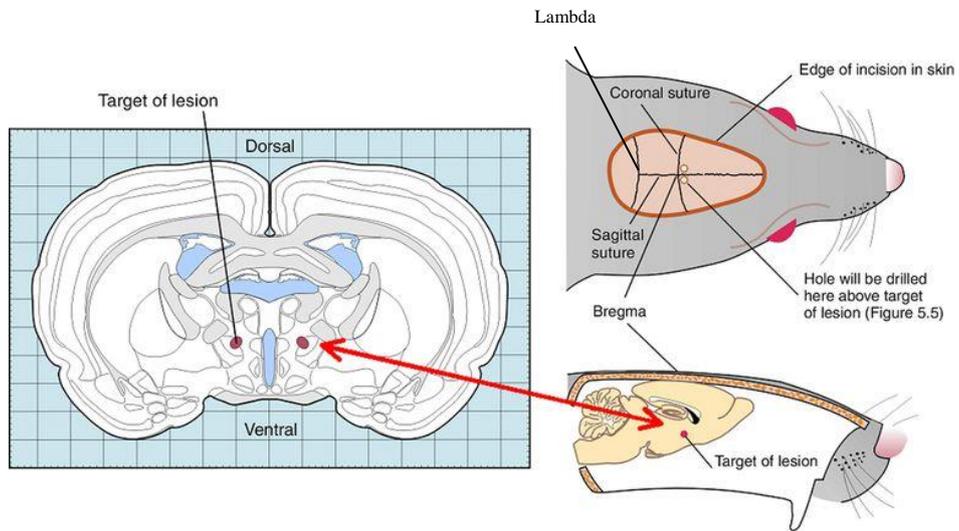


Figure 16 : Utilisation d'un atlas stéréotaxique pour cibler une structure cérébrale. A partir du point d'origine représenté par le bregma, les coordonnées x, y et z sont utilisées pour atteindre la cible (modifié à partir de Leica biosystems).

consanguine présentant une mutation spontanée dans le gène *Foxn1*, générant une absence de thymus fonctionnel, principale source de production des lymphocytes T (Flanagan, 1966). Les souris immunodéficientes NOD scid gamma (NSG) proviennent de l'élevage interne de la plateforme de préclinique de Gustave Roussy. Elles sont issues d'une lignée non consanguine présentant une déficience en lymphocyte T, lymphocyte B et cellules Natural Killer (Shultz et al., 2005). Les différentes greffes cérébrales ont été réalisées chez des animaux d'environ 5 semaines, stade du jeune adulte chez la souris. Elles sont hébergées par groupe dans des isolateurs ou des portoirs ventilés et reçoivent nourriture et eau *ad libitum*.

3. Greffe intracérébrale par stéréotaxie

Les greffes intracérébrales sont réalisées à l'aide d'un cadre stéréotaxique sur des souris anesthésiées à l'isoflurane. La tête de la souris est placée de manière solidaire (barres d'oreilles et barre de gueule) dans le cadre dans une orientation plane, reproductible entre les individus. Les coordonnées d'injection ont été définies à l'aide d'un atlas, représentant l'ensemble des structures cérébrales murines en trois dimensions, définissant à partir d'une origine (le bregma) trois axes de coordonnées, x, y et z (Paxinos and Franklin, 2012). Le bregma est le point anatomique sur le crâne correspondant au croisement perpendiculaire entre la suture coronale et la suture sagittale (Figure 16). La souris anesthésiée est placée en décubitus ventral dans le cadre de stéréotaxie et la peau de son crâne est ouverte sur environ 3mm avec un scalpel afin d'avoir accès au point d'origine (bregma ou lambda). La suspension cellulaire est prélevée dans une aiguille 30G montée sur une seringue Hamilton 10µl elle-même attachée à un pousse-seringue arrimé au bras perpendiculaire du cadre de stéréotaxie. Un trou est réalisé dans le crâne à l'aide d'une aiguille 26G aux coordonnées x, y de la zone cible, puis l'aiguille est introduite dans le cerveau jusqu'à la coordonnée z où elle est remontée de 0,5 mm afin de créer un petit réservoir pour le dépôt de la suspension cellulaire. Les cellules sont injectées selon un débit d'injection de 1µl/min. Après injection, l'aiguille est remontée lentement afin d'éviter de contaminer le chemin d'entrée de celle-ci avec les cellules tumorales.

4. Les modèles PDOX de DIPG et d'épendymomes

4.1. Mise en place du modèle *in vivo* PDOX chez la souris Swiss/Nude

La suspension tumorale du patient est centrifugée puis reprise dans 50µl de milieu NeuroCult NS-A supplémenté (Stem cell) et conservée à 4°C jusqu'à l'implantation cérébrale.

	Localisation	Coordonnées				Volume injecté (µl)	Nombre souris
		Origine	x	y	z		
DIPG	Thalamus	Bregma	-2	-3	-3,5	5	2
	Pons	Lambda	-1	-1	-5	3	1
EPN-PF	V4	Bregma	-0,5	-6	-4	5	2
EPN-ST	Thalamus	Bregma	-2	-3	-3,5	5	2
	Caudoputamen	Bregma	-1.5	+0.5	-3.5	5	2
	Lobe pariétal	Bregma	-2.5	-2	-1	5	2

Tableau 2 : Conditions d'implantation des cellules tumorales pour la primogreffe.

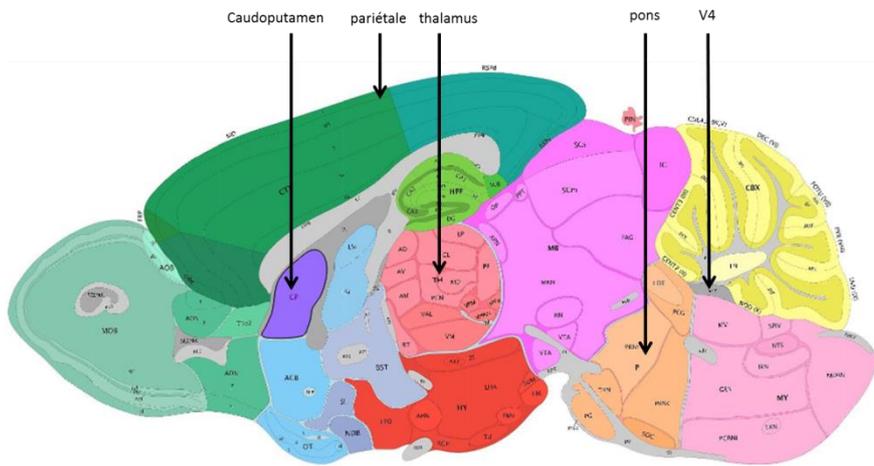


Figure 17 : Représentation schématique des différentes structures cérébrales. (<http://mouse.brain-map.org/static/atlas>)

Pour les DIPG, trois souris sont utilisées pour la primogreffe : deux sont greffées dans le thalamus et une dans le pons. Pour les EPN, deux souris sont greffées soit, pour les EPN-PF dans le 4^{ème} ventricule (V4) soit, pour les EPN-ST le site de greffe correspondra au site de résection chez le patient, ici le thalamus, le caudoputamen ou le lobe pariétal. Le tableau 2 référence les différentes coordonnées et conditions d'injection pour la primogreffe. Pour le pons qui est une structure étroite et fragile, seulement 3µl de suspension cellulaire est injecté, un volume supérieur provoque la mort immédiate de l'animal. Les différentes structures cérébrales ciblées sont représentées schématiquement dans la figure 17. Après la greffe, les souris sont suivies deux fois par semaine afin d'évaluer leur état général, leur poids, et l'apparition de symptômes neurologiques. Si aucun symptôme n'apparaît 12 mois plus tard, la souris est sacrifiée et l'absence de tumeur est confirmée par histologie.

4.2. Entretien de la banque de xénogreffes

Dès lors qu'une souris perd brusquement du poids (20% en moins de 48h) ou présente des symptômes neurologiques caractéristiques : perte de tonicité dans les membres supérieurs ou inférieurs, rotation excessive de la souris, tête penchée, augmentation du volume crânien, prostration de la souris,... celle-ci est euthanasiée par CO₂ et on réalise un passage (P1 jusqu'à P4). Pour cela, le cerveau est extrait de la boîte crânienne, coupé en deux en longitudinal entre les deux hémisphères. La partie gauche est mise dans du formol/Zinc pour fixer le tissu afin de réaliser les études histologiques. Dans la partie droite, la région cérébrale comprenant la tumeur (voir tableau 2) est extraite et dissociée à l'aide d'enzymes (Tumor Dissociation Kit, Miltenyi Biotech). Pour cela, le cerveau est grossièrement coupé au scalpel puis repris dans 5ml de DMEM contenant 250µl d'un mélange d'enzymes pendant 1h à 37°C. La suspension cellulaire obtenue est passée sur un tamis cellulaire de 100µm afin de retirer les derniers morceaux de tumeurs non dissociés. 4/5 de la suspension est cryobanquée dans du milieu 10% DMSO et 1/5 sert à la greffe P+1. Pour la greffe, le culot cellulaire est repris dans 50µl de milieu NeuroCult NS-A puis greffée sur 5 nouvelles souris dans le thalamus pour les DIPG et les EPN-ST ou dans le V4 pour les EPN-FP, structures permettant aux cellules tumorales de se diviser de manière exponentielle sans affecter la survie des animaux. Le reste de cellules dans le tube est centrifugé et conservé à -20°C afin de génotyper les tumeurs. Des passages successifs sont ainsi réalisés jusqu'au P4 où les cellules tumorales sont alors greffées dans le site originel de la tumeur du patient, créant ainsi l'avatar PDOX (Figure 15).

4.3. Développement de modèles PDOX bioluminescents

Après avoir obtenu les modèles PDOX, nous avons envisagé une stratégie pour marquer les cellules tumorales par bioluminescence. A l'occasion d'un passage, la suspension cellulaire contenant les cellules tumorales ainsi que les cellules cérébrales de la souris est successivement appauvrie en cellules myéline positives et souris positives en utilisant des anticorps couplés à des billes magnétiques (kits Myelin Removal et Mouse Cell Depletion, Miltenyi Biotech). Le cerveau contient une quantité très importante de myéline, corps gras recouvrant les axones. Afin de purifier la dissociation enzymatique en cellules viables, nous réalisons tout d'abord une déplétion sélective de la myéline. Après dissociation enzymatique (identique au protocole des PDOX), les cellules sont reprises avec 200µl d'une solution contenant des billes couplées à des anticorps anti-myéline repris dans 1800µl de tampon PBS-0.5% BSA puis incubées pendant 15min à 4°C. Le mélange est passé sur une colonne placée sur un support magnétique qui va retenir les billes sur lesquelles sont fixés des débris de myéline. Les colonnes sont lavées 2 fois avec 1 ml de tampon. Les cellules en sortie de colonne sont comptées et centrifugées. Le culot cellulaire purifié est repris dans 80µl de tampon et 20µl de billes couplées à un cocktail d'anticorps reconnaissant des épitopes murins pour 2 millions de cellules et incubé pendant 15 min à 4°C. Le mélange est à nouveau passé dans des colonnes où les billes sur lesquelles sont fixées les cellules d'origine murine sont retenues. Les colonnes sont lavées 2 fois avec 1 ml de tampon. Les cellules humaines non-retenues sont comptées en sortie de colonne et centrifugées. Le culot cellulaire est repris dans 5ml de milieu NeuroCult NS-A contenant du supplément (Proliferation Supplement), 20ng/ml d'héparine, et un pool de facteur de croissance : 20ng/ml de bFGF, 20ng/ml EGF, 10ng/ml de PDGF-AA et 10ng/ml de PDGF-BB (Milieu qui sera nommé NS-A+ par la suite). Les cellules sont transduites avec un lentivirus intégratif permettant l'expression stable et constitutive de la protéine fluorescente mKate2 et de l'enzyme luciférase isolée chez *Photinus pyralis* (Firefly), luc2. Le vecteur lentiviral pLVX contient les deux séquences codant ces gènes séparées par un peptide autoclivant P2A sous le contrôle du promoteur synthétique CAG (référence PMID2551778). Les particules lentivirales sont produites après transfection de ce plasmide lentiviral et des plasmides codant les protéines d'enveloppe (psPax2 et pMD2.g) dans des cellules HEK293T dans notre équipe. Le lentivirus est mis en contact avec les cellules pendant 4h à 37°C à une MOI (multiplicity of infection) de 4, correspondant à l'intégration de 4 copies par génome en moyenne. Les cellules sont ensuite centrifugées et reprises dans du milieu NS-A+ à une concentration de 100 000 cellules/µl. Elles sont ensuite

greffées dans le cerveau de souris selon les conditions du tableau 1, le nombre de souris greffées variant avec le nombre de cellules obtenues.

Les souris sont suivies par imagerie toutes les 2 à 3 semaines. Une fois que ces souris présentent des symptômes neurologiques, elles sont sacrifiées, la tumeur est dissociée comme précédemment. Les cellules déplétées en cellules murines sont récupérées et centrifugées et reprises dans du milieu complet à une concentration de 100 000 cellules/ μ l pour être greffées. Le modèle de PDOX bioluminescent est ainsi obtenu.

5. Les modèles CDOX de DIPG

5.1. Mise en culture cellulaire des biopsies de DIPG et transduction

Pour cultiver les cellules tumorales *in vitro*, nous nous plaçons dans des conditions cellulaires favorisant la croissance des cellules souches gliales en culture adhérente. Pour cela, la suspension de cellules tumorales de DIPG du patient est mise directement en culture dans deux boîtes de culture préalablement recouvertes de laminine à 10 μ g/ml (incubation de la laminine avec le plastique au minimum 3h à 37°C) dans du milieu NS-A+. Une boîte de culture est mise dans un incubateur classique, 37°C, 5% CO₂, 20% O₂, nommé par la suite *normoxie* et l'autre boîte est mise dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂, 3%O₂, nommé par la suite *hypoxie*, s'approchant d'une condition plus physiologique de la pression partielle en oxygène observée dans le cerveau. Le milieu est renouvelé tous les 2-3 jours et les cellules sont passées lorsqu'elles atteignent environ 70-80% de confluence. Le temps de doublement des cellules est évalué par vidéo-microscopie en utilisant un IncuCyte ZOOM (Essenbioscience). On considère que l'on obtiens une culture cellulaire *in vitro* lorsque les cellules tumorales prolifèrent au minimum jusqu'au passage 10. Après amplification des cellules jusqu'au passage 4-10, les cellules tumorales sont mise en contact avec le lentivirus contenant la mKate2 et la luciférase pendant 4h à 37°C à une MOI de 2 dans du milieu NS-A+, puis le milieu est changé. Après vérification de la fluorescence des cellules en microscopie à épi-fluorescence (mKate2, excitation : 588nm, émission : 633nm), les cellules sont d'abord amplifiées sur 2-3 passages pour être stockées puis utilisées pour obtenir les modèles CDOX.

5.2. Mise en place du modèle vivo CDOX de DIPG chez la souris Swiss/Nude

Les cellules exprimant *luc2-mKate2* sont décollées de leur support à l'aide d'une enzyme de dissociation, l'Accutase (Stem Cell) puis comptées pour être reprises dans du

milieu NS-A+ à une concentration de 100 000 cellules/ μ l. La suspension cellulaire est maintenue à 4°C avant d'être injectée. Cinq souris sont anesthésiées à l'isoflurane et placées dans le cadre de stéréotaxie. L'injection de 3 μ l (soit 300 000 cellules) est réalisée dans la zone du pons dans le tronc cérébral. Les souris sont observées deux fois par semaine et par imagerie IVIS (IVIS50, Perkin Elmer) toutes les 2-3 semaines jusqu'à apparition de symptômes neurologiques. Si au bout d'un an les souris ne présentent ni symptômes ni augmentation de leur bioluminescence, elles sont sacrifiées et l'absence de tumeur est confirmée par histologie. Le modèle CDOX est obtenu dans le cas où les souris développent des tumeurs qui prolifèrent.

Pour deux lignées cellulaires, nous avons voulu connaître le nombre minimum de cellules capables de produire des tumeurs *in vivo*. Pour cela, une gamme de dilution de cellules a été réalisée allant de 100 cellules à 300 000 cellules injectées dans 3 μ l. Une fois la greffe réalisée, la bioluminescence des souris a été évaluée 48h après afin de déterminer le seuil de détection du nombre de cellules vivantes du système d'imagerie, puis les souris ont été suivies comme des CDOX classiques.

5.3. Suivi longitudinal par bioluminescence des modèles

L'intégration dans le génome des cellules tumorales d'un transgène permettant l'expression de la luciférase permet de détecter une bioluminescence (BLI) *in vivo* longitudinalement. La D-luciférine, substrat de la luciférase, est injectée par voie intrapéritonéale aux souris à la concentration de 15mg/ml pour un volume injecté de 10 μ l/g. La dégradation de la luciférine par les cellules vivantes va produire une émission de photons qui peut être captée par une caméra CCD (charged coupled device camera) intégrée au système d'imagerie IVIS. Une première cinétique de dégradation de la luciférine est réalisée lors de la première mesure de BLI d'un modèle. Pour cela, à T0 la souris est injectée et sa BLI est mesurée toutes les minutes pendant 1min à l'IVIS50 (PerkinElmer) pendant 30min. Cette cinétique permet de connaître le temps auquel le plateau d'émission de photons est stable afin d'avoir une mesure reproductible de la BLI entre les souris et entre les différentes mesures dans le temps. La BLI est mesurée pour un temps d'exposition variant de 1 à 5 min en fonction de la charge tumorale afin de ne pas saturer le signal, ni perdre de l'information. Un binning (regroupement de plusieurs pixels) « large » (1*4 pixels) est utilisé pour les petites tumeurs et un binning « small » (1 pixel) est utilisé pour les tumeurs très développées. Le champ de lecture à l'IVIS est le plateau B permettant de zoomer sur la tête de la souris. A l'aide du logiciel Living Image, la mesure quantitative de la BLI est réalisée par un ROI

(region of interest) de taille standard, centré sur l'épicentre du signal localisé au niveau du site d'injection. La valeur de la BLI est normalisée en radiance/p/sec/cm²/sr.

5.4. *Imagerie par fluorescence ex vivo*

L'expression de la *mKate2* par les cellules tumorales des CDOX permet de les visualiser *ex vivo*. Les cerveaux des souris sont observés à l'aide d'une loupe binoculaire à fluorescence (Leica MZFLIII) pour une observation macroscopique et par microscopie confocale à fluorescence (Leica SP8) pour une observation microscopique des cellules tumorales dans le microenvironnement. Pour la loupe, les cerveaux sont imagés entiers. Pour la microscopie confocale, les cerveaux sont placés dans une matrice de cerveau permettant de faire des sections longitudinales parallèles de 1mm d'épaisseur en utilisant des lames de rasoir. Des coupes de 2mm d'épaisseur sont réalisées, placées dans une solution de PBS contenant 10 ng/ml de Hoechst, un colorant qui s'intercale dans l'ADN (excitation : 350nm, émission : 510nm) pendant 50min. Les coupes sont placées sur une boîte de Petri à fond de verre et imagées. Les images sont montées sur le logiciel Fiji afin de reconstruire l'intégralité de la coupe ou du cerveau et de fusionner les différentes couleurs (rouge (*mKate2*), bleu (Hoechst)).

5.5. *IRM de haut champ*

Pour être observé par IRM de haut champ sur un scanner préclinique 11,7T (Bruker), les cerveaux doivent être imagés pendant 24h. Il est alors nécessaire de travailler *ex vivo*. Les souris sont anesthésiées au pentobarbital sodique (100mg/kg) et une perfusion intracardiaque est réalisée : la cage thoracique est ouverte afin d'avoir accès au cœur, l'oreillette droite est coupée afin que le sang puisse s'écouler et une aiguille montée sur une tubulure est introduite dans le ventricule gauche. Une pompe péristaltique délivre 20ml de PBS, nécessaire pour vider l'ensemble du volume sanguin de la souris, et 20ml de formol/Zinc, qui va fixer les tissus, à un débit de 7ml/min. Après la perfusion, la tête de la souris sans la peau est conservée à 4°C dans du formol/Zinc. Avant l'acquisition par IRM, la tête est lavée 48h dans du PBS pour retirer la solution de fixation et placée dans un tube contenant du Fluorinert FC-40, un fluide compatible avec les ondes magnétiques. Les séquences anatomiques T2 sont acquises par 3D TurboRARE et reconstruites selon les algorithmes développés à Neurospin au CEA (Dr S. Mériaux).

	Sens	Anti-sens	Amplicon
<i>HIST1H3B</i>	GCTCTTTCCTTTCCTCCACAGA	AACGGTGAGGCTTTTTCACG	180 pb
<i>H3F3A</i>	TCAATGCTGGTAGGTAAGTAAGGA	GGTTTCTCACCCCTCCAGT	152 pb
<i>Hist2H3A-C</i>	GGTGACTTTAGGACGGGTGA	CTCCGTGGACTTCTGGTAGC	350 pb

Tableau 3 : Liste des amorces pour le séquençage ciblé de la mutation H3K27M.

6. Génotypage des tumeurs

6.1. Mutation H3K27M

Le génotypage de la mutation H3K27M est réalisé sur les cellules de la biopsie tumorale des patients atteints de DIPG, sur les PDOX lors que chaque passage et sur les cellules tumorales en culture avant d'être greffées. L'extraction d'ADN est réalisée selon les instructions du kit QiAmp DNA mini (Qiagen) : les cellules sont resuspendues dans 200µl de tampon RLT contenant 20µl de protéinase K, enzyme dégradant les protéines, pendant 10 min à 56°C. 400µl d'éthanol sont ajoutés afin de précipiter l'ADN, et l'ensemble est mis sur les colonnes qui ne vont retenir que l'ADN. Les colonnes sont lavées 2 fois avec du tampon AW1 et AW2. L'ADN est élué dans 50µl de tampon AE puis dosé par spectrophotométrie d'absorption en utilisant un Nanodrop (Thermoscientific).

Une PCR (polymerase chain reaction) est réalisée sur les ADN extraits à l'aide de la FastStart Taq polymerase (Roche) et d'amorces spécifiques des séquences codants *H3F3A*, *HIST1H3B* et *HIST2H3A* (Tableau 3). Pour cela, 1µl d'ADN, d'une concentration variant entre 10 et 300 ng/µl, est mélangé avec 5µl de tampon 10X contenant du MgCl₂, 1µl de dNTP à 10mM (mélange de dATP (désoxy-adénine tri-phosphate), dCTP (désoxy-cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy-guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy-thymine tri-phosphate)), 1µl d'amorces (mélange des amorces sens et anti-sens) à 10µM et 0.4µl de polymerase (5U/µl) pour un volume final de réaction de 50µl. La PCR est réalisée sur 35 cycles avec une température d'hybridation de 56°C et des phases d'élongation de 1min. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, afin de vérifier la taille des amplicons obtenus, avant d'être envoyés à Eurofins pour être purifiés et séquencés (séquençage Sanger). Les séquences obtenues sont analysées sur le logiciel FinchTV.

6.2. Fusion *RELA/C11orf95*

Chez le patient atteint d'EPN, la fusion *RELA/C11orf95* est recherchée par FISH sur les coupes histologiques des tumeurs par le service de Neuropathologie de l'hôpital Sainte-Anne. Pour les xénogreffes, nous avons recherché l'expression de transcrit portant cette fusion par RT-PCR. L'extraction des ARN a été réalisée selon les instructions du kit All prep DNA/RNA (Qiagen). Les culots de cellules sont repris dans une solution de lyse cellulaire contenant 450µl de tampon RLT+ et 1% de β-mercaptoéthanol. Le lysat est mis sur une colonne ADN, qui va fixer l'ADN (extraction identique au génotypage de la mutation

	Sens	Anti-sens
Fusion 1	C11orf95 exon 2	RELA exon 2
	GGGGGCTGAGGAGGAGGAG	GCTGCTCAATGATCTCCACA
Fusion 2	C11orf95 exon 3	RELA exon 2
	CCTGCACCTGGACGACAT	GCTGCTCAATGATCTCCACA

Tableau 4 : Liste des amorces pour la détermination du point de cassure des fusions 1 et 2 de C11orf95 et RELA.

H3K27M). L'éluat de la colonne est utilisé pour l'extraction des ARN totaux. Il est mélangé à une solution de lyse "TriReagent" contenant du phénol (Trizol LS, Thermo), puis 320µl de chloroforme sont ajoutés afin de séparer deux phases, la phase aqueuse contenant l'ARN et la phase phénolique contenant les protéines. Après 15min d'incubation, le mélange est centrifugé pendant 15min à 12 000g à 4°C. La phase aqueuse est récupérée et l'ARN contenu est précipité avec 1 volume d'isopropanol pendant 10min à température ambiante. Deux lavages successifs sont réalisés avec 1ml d'éthanol 75% après centrifugation, puis le surnageant est jeté et le culot d'ARN est séché à température ambiante pendant quelques minutes. Les ARN sont resuspendus dans 30µl d'eau RNase-free, dosés au Nanodrop et leur intégrité évaluée par électrophorèse capillaire sur un Bioanalyzer (Agilent).

Cinq cents nanogrammes d'ARN sont rétro-transcrits à l'aide de la transcriptase inverse RevertAid (ThermoFisher scientifique). Pour cela, un mix contenant l'ARN, 4.5µl de random primers (100ng/µl, Roche), 0.9µl d'oligodT (500ng/µl, IDT) et 3µl de dNTP (10mM, Roche) est incubé 5 min à 65° afin de dénaturer les séquences d'ADN riches en dinucléotides GC. Puis 4µl de tampon et 1µl de l'enzyme (200U) sont ajoutés et l'ensemble est incubé 10 min à 25°C, 1h à 60°C et 10 min à 70°C afin de synthétiser les ADN complémentaires (ADNc).

Une PCR est réalisée sur les ADNc à l'aide de la Taq polymérase FastStart (Roche) et d'amorces spécifiques pour la fusion 1 et la fusion 2 (Cachia et al., 2015) (Tableau 4; protocole identique à la PCR détectant la mutation H3K27M). Quarante cycles de PCR sont réalisés avec une température d'hybridation de 56°C et des phases d'élongation de 1min. Les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose 2%, afin de vérifier l'amplification des séquences, avant d'être envoyés à Eurofins pour être purifiés et séquencés (séquençage Sanger).

7. Histopathologie des tumeurs

Les analyses histopathologiques des tumeurs sont réalisées pour chaque PDOX et CDOX développées de DIPG. Afin d'avoir une fixation homogène et rapide de l'ensemble des structures cérébrales, les souris sont perfusées avec du PBS puis du formol/Zinc (4%, Diapath). Après perfusion, les cerveaux des souris sont retirés du crâne et conservés dans du formol/Zinc à 4°C au maximum une semaine avant d'être inclus en paraffine. Les coupes sont sectionnées, déparaffinées et les marquages avec les anticorps sont réalisés sur un automate (Ventana, BenchMark XT) au laboratoire de Neuropathologie de l'hôpital Sainte-Anne. Les anticorps utilisés sont : MIB-1 (Dako), GLUT1 (AbCam), OLIG2 (Sigma), Vimentin (Dako),

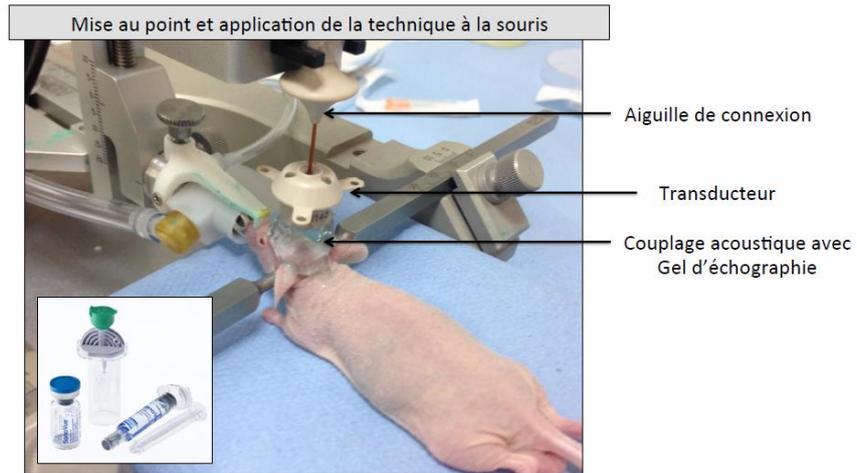


Figure 18 : Application du système SONOCLOUD à la souris. L'émetteur est placé perpendiculairement au cerveau de la souris maintenue dans le cadre de stéréotaxie.

GFAP (Dako), H3K27M (Millipore) et H3K27me3 (Diagenode). Un marquage hématoxyline éosine safran (HES) est réalisé à chaque passage de PDOX afin de vérifier la présence de cellules tumorales. Les lames sont observées par une anatomopathologiste de l'hôpital. Elles sont scannées et modifiées sur le logiciel NDP.view2 (Hamamastu).

8. Perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) avec les ultrasons

8.1. Mise en place du système SONOCLOUD

La société Carthera nous fournit les émetteurs et générateur du système SONOCLOUD. Afin d'adapter le système à la souris de façon reproductible, nous avons choisi de fixer le transducteur sur le bras du cadre de stéréotaxie de manière verticale afin de produire un champ d'ultrasons (US) perpendiculaire au crâne de la souris placée dans le cadre. Le transducteur, relié au générateur par l'aiguille de connexion, est placé à 0,5cm du crâne de la souris, coordonnée calculée à l'aide des vis micrométriques. Du gel acoustique est placé entre le transducteur et la tête de la souris permettant la propagation des ondes (Figure 18). Une injection de 100µl de Sonovue (MB) en intraveineuse (IV) dans la veine de la queue de la souris est réalisée en amont des US. La durée d'application des US utilisée est de 120s, comparable aux expériences précédentes réalisées chez le lapin avec ce système (Beccaria et al., 2013).

8.2. Injections de bleu d'Evans

L'injection en IV du bleu d'Evans reste l'expérience la plus simple et la moins onéreuse permettant de connaître l'intégrité de la BHE à un moment T. Afin d'optimiser l'ouverture de la BHE avec le système SONOCLOUD, nous conduisons donc des expériences préliminaires sur des petits lots de souris, entre 2 et 6 souris par conditions testées. Trois pressions ont été examinées : 0,2 ; 0,3 et 0,4 MPa afin de déterminer celle qui permet d'ouvrir la BHE tout en limitant les effets secondaires, principalement des lésions du système vasculaire, mis en évidence par la présence de pétéchies et/ou d'hémorragies. En pratique, la souris est anesthésiée à l'isoflurane et placée dans le cadre de stéréotaxie. Le transducteur est placé au-dessus de la tête et le gel acoustique est posé de façon à n'avoir aucune bulle d'air emprisonnée entre la souris et le système. La souris reçoit le Sonovue puis les US sont envoyés aux différentes pressions étudiées. La souris est injectée 15min après avec du bleu d'Evans à 100mg/kg pour un volume de 10µl/g en IV dans le sinus rétro-orbitaire. Trente minutes après, la souris est perfusée par voie intracardiaque avec un volume de 20ml de PBS,

afin d'extraire le colorant du système vasculaire et de ne conserver qu'une coloration bleue des tissus perméabilisés. Le cerveau est extrait et coupé longitudinalement entre les deux hémisphères afin d'observer macroscopiquement et qualitativement la présence de colorant et d'éventuelles pétéchies.

9. Evaluations thérapeutiques et pharmacocinétique *in vivo*

9.1. Evaluations précliniques

9.1.1. Les modèles CDOX utilisés

Afin d'évaluer les deux molécules actives, le panobinostat et le mébendazole, dans le DIPG, nous avons tout d'abord utilisé le modèle CDOX NEM292 mKate-luc dont la croissance tumorale est la plus rapide. Ce modèle nous permet aussi d'évaluer plus précocement la réponse tumorale à la thérapie par suivi de bioluminescence plutôt que par mortalité des animaux. Dans le cas du mébendazole, un deuxième modèle, CDOX NEM290, a été évalué afin de confirmer les résultats de la première xénogreffe.

Les différents groupes sont composés de 10 souris, nombre nécessaire et suffisant afin d'avoir des tests statistiques non paramétriques assez puissants pour avoir une réponse significative (test de Kruskal-Wallis pour les comparaisons de plusieurs groupes et de Mann-Whitney pour les comparaisons de groupes deux à deux). Ce nombre a été obtenu en utilisant le logiciel GPower, pour une puissance de 90%, un risque α de 0.05 avec une variabilité (SD) de 20% pour une différence de moyenne de 50%.

Les souris sont greffées avec 200 000 cellules dans un volume de 2 μ l dans le pons. Entre deux et huit semaines après la greffe, la BLI des souris est mesurée afin de randomiser les animaux dans les différents groupes (moyenne et médiane équivalente entre les différents groupes). Les différents traitements démarrent après la randomisation.

9.1.2. Schéma thérapeutique pour l'évaluation du mébendazole

Le mébendazole est stocké sous forme de poudre à -20°C. Les composés provenant de deux fournisseurs Sigma et Cayman Biochemical ont été utilisés et comparés. La poudre est suspendue quotidiennement et avant chaque injection dans un mélange contenant 50% de PBS et 50% d'huile de sésame. Les différentes doses injectées varient de 50mg/kg à 200mg/kg, pour un volume d'injection à 10 μ l/g. Les souris sont gavées 5 fois par semaine à l'aide d'une sonde de gavage 20G. Les animaux sont traités jusqu'à la fin du protocole.

9.1.3. Schémas thérapeutiques pour l'évaluation du panobinostat avec et sans ouverture de la BHE

Le panobinostat est solubilisé dans du DMSO à 50mg/ml puis stocké à -20°C (LC laboratories). Deux formulations ont été évaluées pour injecter aux animaux : 1-dilution dans de l'eau ; 2- dilution dans un mélange contenant 2% DMSO, 60% glucose et 38% PEG400. Chaque formulation est préparée extemporanément avant chaque traitement. Le panobinostat est injecté par voie intrapéritonéale (IP) dans un volume de 10µl/g. Les souris recevant des US sont injectées avec le panobinostat ou le véhicule 15min après la fin des US (120s, 0.3MPa).

Le premier schéma thérapeutique utilisé repose sur un essai clinique chez l'enfant atteint de DIPG en cours aux Etats-Unis : 3 fois par semaine (lundi-mercredi-vendredi) toutes les semaines jusqu'à la fin du protocole. La dose utilisée correspond à la dose maximale tolérée chez la souris, 10mg/kg. En combinaison avec les US, on obtient donc 4 groupes : panobinostat 10mg/kg, contrôle véhicule, US + véhicule, US + panobinostat 10mg/kg. La première formulation du panobinostat a été utilisée.

Le deuxième schéma thérapeutique découle de la toxicité des US observée au cours de la première évaluation thérapeutique avec le premier schéma. Les souris sont traitées 1 fois par semaine jusqu'à la fin du protocole. La dose du panobinostat a été diminuée à 5mg/kg afin de s'affranchir de la toxicité de la molécule. On obtient 4 groupes : contrôle véhicule, panobinostat 5mg/kg, US + véhicule, US + panobinostat 5mg/kg. La deuxième formulation du panobinostat a été utilisée, rendant le produit plus soluble avant injection.

9.1.4. Suivi des animaux

Les souris sont observées quotidiennement et leur BLI est mesurée à l'IVIS tous les 15 jours. Elles sont pesées 2 fois par semaine et reçoivent un antalgique, de la buprénorphine, dans le cas où elles présentent des signes de douleur. Les protocoles s'arrêtent dès lors que l'animal présente des signes neurologiques où il est euthanasié. Son cerveau est prélevé et fixé dans du formol/Zinc pour d'éventuelles études ultérieures.

9.2. Pharmacocinétiques

9.2.1. Mébendazole

Deux pharmacocinétiques (PK) sont réalisées avec les poudres venant des deux fournisseurs (Sigma et Cayman Biochemical) aux doses de 100mg/kg et 200mg/kg pour la poudre "Sigma" et 200mg/kg pour la poudre "Cayman". Les voies d'injection et les volumes sont identiques à l'évaluation thérapeutique. Les prélèvements de sang et de tissus cérébraux sont réalisés aux temps 1h, 6h et 15h après injection. Pour cela, les souris sont anesthésiées à l'isoflurane au temps déterminé, puis un prélèvement intracardiaque est réalisé à l'aide d'une aiguille 26G montée sur une seringue contenant 3.2% de sodium citrate utilisé comme anticoagulant. Le maximum de sang est prélevé puis centrifugé 3min à 10 000rpm à 4°C afin de récupérer le surnageant correspondant au sérum. La souris est ensuite perfusée avec du PBS afin de bien retirer tout le sang circulant dans le tissu cérébral. Le cerveau est extrait et divisé en 4 morceaux : tronc, cervelet, hémisphère droit et hémisphère gauche. Le tissu est congelé directement dans de la carboglace et conservé à -20°C. Les prélèvements sont envoyés chez nos collaborateurs au DKFZ où le mébendazole et ses deux métabolites, 5-OH-mebendazole et mebendazole-amine sont dosés au spectromètre de masse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

9.2.2. Panobinostat avec et sans ouverture de la BHE

La PK du panobinostat est réalisée en combinaison avec les US : deux groupes sont traités, le groupe US- et le groupe US+. Chacun des groupes reçoit du panobinostat préparé avec la deuxième formulation à la dose de 10mg/kg en IP pour un volume de 10µl/g. Au temps T0, les souris du groupe US+ reçoivent les ultrasons (120s, 0,3MPa), celles du groupe US- reçoivent une injection de 100µl de Sonovue en IV, afin de diluer le volume sanguin dans les mêmes proportions. 15min après T0, toutes les souris reçoivent le panobinostat. Les temps de prélèvements sont ensuite de 30min, 1h, 3h, 6h et 24h. Les prélèvements sont réalisés comme pour la PK du mébendazole. Le sang est recueilli sur de l'héparine. Les prélèvements sont envoyés au service de pharmacocinétique de Gustave Roussy où le panobinostat est dosé au spectromètre de masse par HPLC.

Numéro NEM	Mutation Histone H3	Patient					Survie (jour)	In Vitro	Modèle PDOX		Modèle CDOX
		Mutation TP53	Mutation ACVRI	Sexe	Age	Thalamus			Pons	Pons	
						Prise tumorale (souris avec tumeur/total)			Prise tumorale (souris avec tumeur/total)	Prise tumorale (souris avec tumeur/total)	
NEM270	H3.3-K27M	R273C	WT	M	10.2	313	O	-	-	0/10	
NEM271	H3.1- K27M	WT	Q207E	F	4.4	499	O	-	-	0/10	
NEM273	H3.1- K27M	WT	G328 E	M	4.6	279	O	-	-	3/4	
NEM276	H3.3-K27M	N.D.	N.D.	F	6.2	287	O	-	-	0/10	
NEM284	H3.3-K27M	N.D.	N.D.	F	9.3	105	N	0/2	-	-	
NEM285	H3.3-K27M	A159V	WT	M	7.1	241	O	20/22	3/3	14/14	
NEM289	H3.2- K27M	W146*	WT	M	4.7	262	O	27/29	8/8	13/13	
NEM290	H3.3-K27M	R175H	WT	F	11.6	81	O	39/40	10/12	65/66	
NEM292	H3.3-K27M	P151T	WT	F	5.1	152	O	-	-	71/76	
NEM293	H3.1- K27M	WT	WT	M	4.3	805	O	-	-	4/14	
NEM323	H3.3-K27M	C135Y	N.D.	M	5.8	269	O	0/2	-	-	
NEM324	H3.1- K27M	N.D.	N.D.	M	1.4	L.O.F.	O	0/2	0/1	-	
NEM325	H3.3-K27M	WT	WT	F	5.5	101	O	4/7	9/9	0/5	
NEM328	H3.1- K27M	WT	G328V	F	3.5	289	O	11/12	9/12	22/22	
NEM335	H3.3-K27M	R248Q	WT	M	6.2	575	O	10/13	3/6	0/5	
NEM336	H3.1- K27M	WT	N.D.	M	4.1	536	O	0/2	0/1	-	
NEM341	H3.3-K27M	WT	WT	F	8.3	L.O.F.	O	0/2	0/1	-	
NEM347	H3.3-K27M	WT	WT	M	9.1	294	O	5/5	4/4	0/4	
NEM353	H3.3-K27M	WT	WT	F	6.5	649	O	2/2	1/1	3/5	
NEM375	H3.3-K27M	G134R	N.D.	M	6.2	394	O	7/8	7/7	5/5	
NEM380	H3.3-K27M	H179R	WT	F	12,5	780	O	5/5	3/3	-	
NEM395	H3.3-K27M	R273C	WT	F	7,0	160	O	0/7	0/1	-	
NEM401	H3.3-K27M	C135Y	WT	M	11,2	L.O.F.	O	7/7	1/1	-	
NEM403	H3.3-K27M	R108W	WT	F	11,2	450	O	2/2	1/1	-	
NEM405	H3.3-K27M	I123F	WT	M	6,7	372	O	6/6	-	-	
NEM409	H3.1- K27M	WT	WT	F	9,4	L.O.F.	O	6/7	2/2	0/5	
NEM411	H3.3-K27M	R175H	WT	M	10,3	L.O.F.	O	3/7	1/1	-	

Tableau 5 : Caractéristiques cliniques et moléculaires des patients atteints de DIPG et tumorigénicité observée *in vivo*. Pour chaque patient, la partie gauche correspond aux données cliniques ; âge, survie, sexe ; et aux statuts mutationnels de l'histone H3, TP53 et ACVRI. La partie droite correspond aux données expérimentales ; la tumorigénicité observée *in vivo* après xénogreffe dans les modèles PDOX et CDOX est déterminée par le nombre de souris présentant une tumeur sur le nombre total de souris greffées. Les cellules initiatrices de tumeurs (TIC) correspondent à l'obtention de cultures cellulaires pour un passage supérieur à 10 *in vitro* à partir des biopsies de patient. O/N : Oui/Non, WT : sauvage, N.D : non déterminé, L.O.F : perdu de vue.

RESULTATS

1. Développement de modèles PDOX et CDOX de DIPG

1.1. Description de la cohorte de DIPG

De 2014 à 2017, nous avons reçu de l'hôpital Necker 27 biopsies tumorales de patients atteints de DIPG au diagnostic (Tableau 5). Cette cohorte a une répartition équilibrée entre les deux sexes avec 14 garçons et 13 filles. L'âge moyen est de 9,3 ans et 91% (20/22) des enfants sont décédés dans les 2 ans post-diagnostic. Les tumeurs présentent toutes la mutation H3K27M évaluée en IHC et par séquençage (100% des cas) ainsi qu'une perte de H3K27me3 dans les cellules tumorales mesurée par IHC (100% des cas). 70% (19/27) des tumeurs présentent la forme mutée H3.3-K27M, 26% (7/27) des tumeurs présentent la forme mutée H3.1-K27M (26%) et 4% (1/27) des tumeurs présentent la forme mutée H3.2-K27M. Les mutations associées dans *TP53* et *ACVR1* sont exposées dans le tableau 5 : 70% (19/27) des tumeurs avec la forme mutée H3.3-K27M ont une mutation dans *TP53* et 60% (3/5) des tumeurs avec la forme mutée H3.1-K27M ont une mutation dans *ACVR1*.

1.2. Tumorigénicité des modèles PDOX

A la réception de la biopsie du patient, celle-ci est dissociée et une partie est directement greffée dans des souris (description dans le matériel et méthode). Cette primogreffe à P0, a été réalisée pour 21/27 tumeurs (Tableau 5). Nous avons obtenu des tumeurs *in vivo* dans 71% des cas (15/21) pour les trois différentes formes mutées de H3-K27M : 50% (2/4) pour la forme mutée H3.1-K27M, 75% (12/16) pour la forme mutée H3.3-K27M et 100% (1/1) pour la forme mutée H3.2-K27M.

Lorsque l'animal présente un symptôme neurologique ou une perte de poids, son cerveau est divisé en deux; la partie gauche est fixée afin de vérifier la présence de cellules tumorales, la partie droite est dissociée pour être greffée dans une nouvelle génération de souris P1 (voir matériel et méthode). Ces transplantations sériées sont répétées jusqu'au P4. Les tumeurs obtenues dans le thalamus présentent un volume tumoral beaucoup plus important que les tumeurs obtenues dans le tronc cérébral. Cela s'explique par le fait que le tronc cérébral est une structure complexe étroite contenant de nombreuses connexions nerveuses essentielles à l'intégrité sensorielle et moteur du système nerveux. Les greffes dans le thalamus permettent ainsi d'étendre de manière conséquente *in situ* le pool initial de cellules tumorales pour les stocker. Les greffes dans le tronc cérébral permettent de refléter *in*

	Localisation	P0		P0 Post- décongélation		P1		P1 Post- décongélation		P2		P3		P3 Post-freezing		P4	
		Taux prise de greffe	Survie (jours)	Taux prise de greffe	Survie (jours)	Taux prise de greffe	Survie (jours)	Taux prise de greffe	Survie (jours)	Taux prise de greffe	Survie (jours)	Taux prise de greffe	Survie (jours)	Taux prise de greffe	Survie (jours)	Taux prise de greffe	Survie (jours)
NEM285	Thalamus	2/2	142	-	-	4/5	216 ±10	4/5	216 ±10	10/10	163 ±17	-	-	-	-	-	-
	Pons	-	-	-	-	3/3	123 ±6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NEM289	Thalamus	2/2	142	-	-	4/5	144 ±10	4/5	144 ±10	12/12	140 ±22	5/5	118	-	-	-	-
	Pons	-	-	-	-	3/3	105 ±18	-	-	-	-	5/5	100 ±4	-	-	-	-
NEM290	Thalamus	2/2	171 ±5	-	-	9/9	89 ±8	5/5	145 ±8	9/9	81 ±7	9/9	90 ±2	5/6	110 ±16	-	-
	Pons	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/3	81 ±3	4/4	74	3/5	87 ±20
NEM325	Thalamus	2/2	294	-	-	2/3	228	1/2	474	2/2	333 ±5	-	-	4/5	126 ±9	-	-
	Pons	1/1	145	-	-	2/2	286 ±3	3/3	308	2/2	279	-	-	-	-	-	-
NEM328	Thalamus	2/2	274	-	-	5/5	201 ±23	-	-	4/5	182 ±21	3/3	162 ±39	-	-	-	-
	Pons	1/1	223	-	-	5/5	157 ±8	-	-	3/6	215 ±16	2/2	145 ±8	5/5	176 ±32	-	-
NEM335	Thalamus	2/2	163	-	-	2/3	150	-	-	4/5	165 ±3	3/3	75 ±6	-	-	-	-
	Pons	1/1	139	-	-	1/2	133	-	-	1/3	127	-	-	-	-	5/5	50 ±4
NEM347	Thalamus	3/3	155	2/2	178 ±14	2/2	123	-	-	2/2	119 ±40	-	-	-	-	-	-
	Pons	2/2	145 ±31	-	-	2/2	121 ±4	-	-	-	-	1/1	285	-	-	-	-
NEM353	Thalamus	2/2	224	-	-	2/2	196 ±59	-	-	2/2	172 ±13	-	-	5/5	134 61	-	-
	Pons	1/1	81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NEM375	Thalamus	2/2	291 ±35	-	-	1/2	154	-	-	4/4	124 ±19	5/5	121 ±10	-	-	-	-
	Pons	-	-	-	-	2/2	147	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NEM380	Thalamus	2/2	286 ±26	-	-	3/3	316 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pons	1/1	231	-	-	2/2	341 ±6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NEM401	Thalamus	2/2	333 ±154	-	-	5/5	134 ±20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pons	1/1	87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NEM403	Thalamus	2/2	287 ±21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pons	1/1	198	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NEM405	Thalamus	2/2	237	-	-	4/4	101 ±22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pons	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NEM409	Thalamus	3/3	317 ±45	-	-	3/4	158 ±57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pons	1/1	344	-	-	1/1	203	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NEM411	Thalamus	2/2	193	-	-	1/5	216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pons	1/1	125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 6 : Prise tumorale et survie des PDOX de DIPG au fil des passages. La prise de greffe correspond au nombre d'animaux développant une tumeur sur le nombre total d'animaux greffés. La survie est exprimée en nombre de jours moyen ± SEM. La survie des animaux est plus longue à P0 puis reste stable à partir du P1. La prise de greffe est supérieure à 80%. La décongélation des cellules tumorales à la biopsie ou à chaque passage n'affecte pas la prise tumorale (passage annoté post-décongélation).

vivo le phénotype initial de la tumeur chez le patient, le microenvironnement étant le même que chez le patient.

Pour 100% (21/21) des tumeurs obtenues à la primogreffe, il a été possible de générer des tumeurs aux passages suivants. De façon homogène, l'ensemble des PDOX obtenues ont une prise de greffe supérieure à 80% pour l'ensemble des passages, et 100% de prise à P0, indépendamment de la localisation de la greffe (Tableau 6). La différence de prise de greffe peut s'expliquer par des erreurs commises lors de la greffe d'un nombre plus important d'animaux lors des transplantations sériées. La survie des animaux est toujours plus élevée à P0 que pour les passages supérieurs, la biopsie du patient contenant probablement moins de cellules tumorales que le pool de cellules cérébrales issue d'une xéngreffe. Pour chaque modèle, la survie des animaux est identique pour tous les passages de P1 à P4 selon la localisation de la greffe. Cela renforce la reproductibilité de nos modèles. En revanche, la survie des animaux est dépendante de la tumeur du patient dont elle est issue. Par exemple, le temps de survie le moins élevé correspond à la PDOX NEM290 qui est d'environ 3 mois, à l'opposé la survie la plus longue correspond à la PDOX NEM325 qui est d'environ 10 mois. Il n'a pas été possible de corréler les résultats observés en clinique qui montrent une différence de survie entre les tumeurs suivant la forme mutée H3.1 ou H3.3 car nous n'avons obtenu qu'un nombre très restreint de modèles avec la forme mutée H3.1, uniquement 2 PDOX (Castel et al., 2015). En revanche, il n'a pas non plus été possible d'établir une relation significative entre la survie de 12 PDOX développés avec celle des patients ($r=0.2642$, $P=0.43$, test de corrélation de Pearson) (Figure 19).

Nous avons obtenu des tumeurs à partir de pools de cellules issues d'un passage congelé pour 6 xéngreffes différentes (Tableau 6). Il a également été possible d'obtenir une PDOX à partir d'une biopsie de patient congelée lors de sa réception. Après décongélation et greffe des cellules tumorales, le temps de survie des animaux est augmenté pour le premier passage puis se réajuste au passage suivant sans affecter la prise tumorale.

1.1. Développement des modèles CDOX

1.1.1. Obtention des modèles cellulaires mkate2-luc *in vitro*

A la réception de la biopsie du patient, celle-ci est dissociée et une partie est mise en culture cellulaire (voir matériel et méthode). Il a été possible de dériver 26/27 biopsies tumorales en cultures de cellules *in vitro* (Tableau 5). 6 lignées cellulaires ont pu être

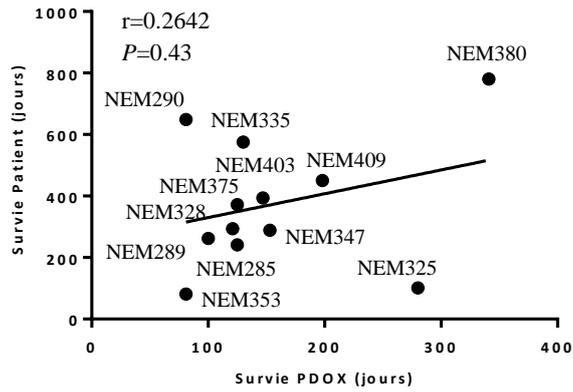


Figure 19 : Corrélation entre la survie des patients et la survie des PDOX. La droite correspond à la ligne de régression linéaire.

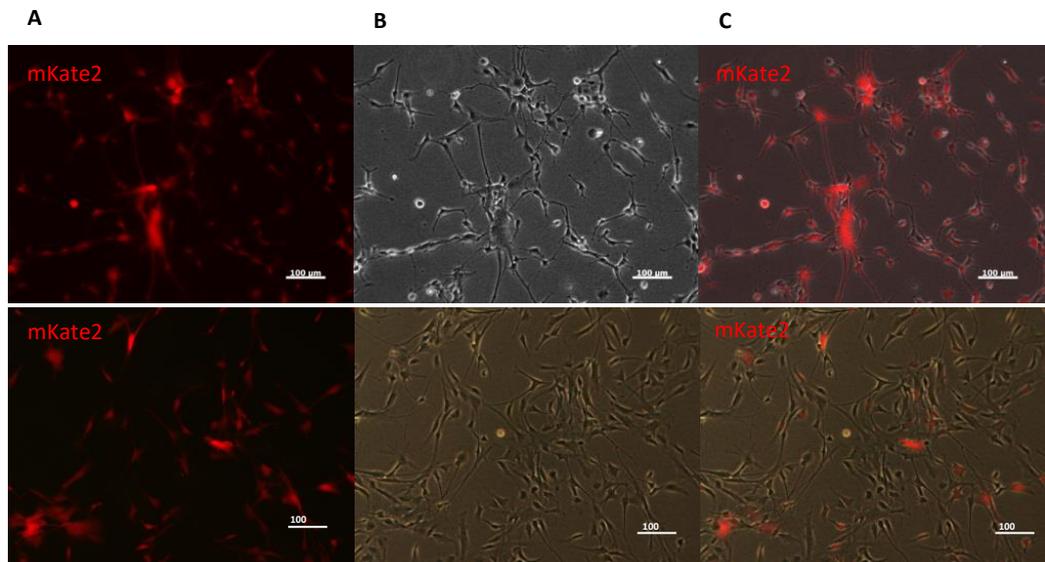


Figure 20 : Exemple de mesure qualitative de la fluorescence pour deux lignées cellulaires de DIPG *in vitro* 5 jours post transduction avec le lentivirus. A. fluorescence mKate2, B. contraste de phase, C. Superposition du contraste de phase et de la fluorescence mKate2. NEM292 mKate2-luc correspond à une lignée mutée H3.3-K27M et NEM328 mKate2-luc à une lignée mutée H3.1-K27M. Entre 70 et 100% des cellules sont marquées en rouge, marqueur d'une intégration de la séquence apportée par le lentivirus.

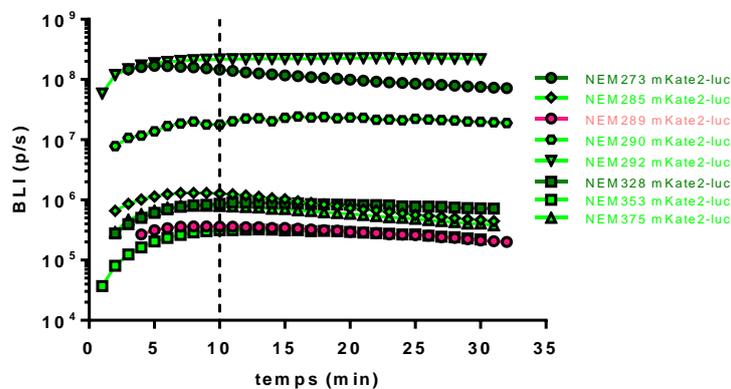


Figure 21 : Cinétique de bioluminescence après injection de luciférine dans les modèles de CDOX de DIPG. La bioluminescence maximum est atteinte 10 min après injection pour tous les modèles de CDOX.

cultivées jusqu'à passage 50, démontrant le caractère immortel de ces lignées cellulaires (données non montrées).

16 cultures de cellules *in vitro* ont été transduites avec le lentivirus contenant les gènes codant les protéines mKate2 et luciférase (voir matériel et méthode). 72h post-transduction, les cultures cellulaires *in vitro* montrent une fluorescence pour plus de 90% des cellules, correspondant au nombre de cellules ayant intégré le transgène (Figure 20). La transduction n'affecte pas le temps de doublement ni la morphologie des cellules *in vitro* (données non montrées).

La greffe intracérébrale de ces cellules modifiées a permis de dériver 8/16 CDOX (50%), qu'il est possible de suivre longitudinalement par bioluminescence (Tableau 5). On n'observe pas de différence de tumorigénicité selon les différentes formes mutées de H3.1K27M : 60% (3/5) de prise tumorale pour les tumeurs H3.1K27M, 50% (5/10) de prise tumorale pour les tumeurs H3.3K27M et 100% (1/1) pour les tumeurs H3.2K27M.

1.1.1. Suivi par bioluminescence

Avec l'introduction de la luciférase, les cellules tumorales ont la capacité de produire de la lumière après réaction enzymatique avec la luciférine. *In vivo*, la production de photon est dépendante de la localisation de la tumeur, de la quantité de production de luciférase par les cellules elle-même dépendante du nombre d'intégration du lentivirus, ainsi que de l'accès des cellules tumorales à la luciférine. C'est pour cela qu'il est nécessaire d'établir le temps auquel la production de photon est la plus haute et est stable pour chaque modèle, afin d'être reproductible lors de chaque mesure de bioluminescence (BLI) pendant le suivi longitudinal de la souris et, entre chaque expérience indépendante.

Les 8 CDOX obtenues présentent toutes le même profil d'émission de BLI en fonction du temps, soit la BLI maximum atteinte à environ 10 min post-injection de luciférine, avec une BLI stable les 20 min suivantes (Figure 21). Pour la suite des expériences, les mesures de BLI seront donc réalisées 10 min post-injection.

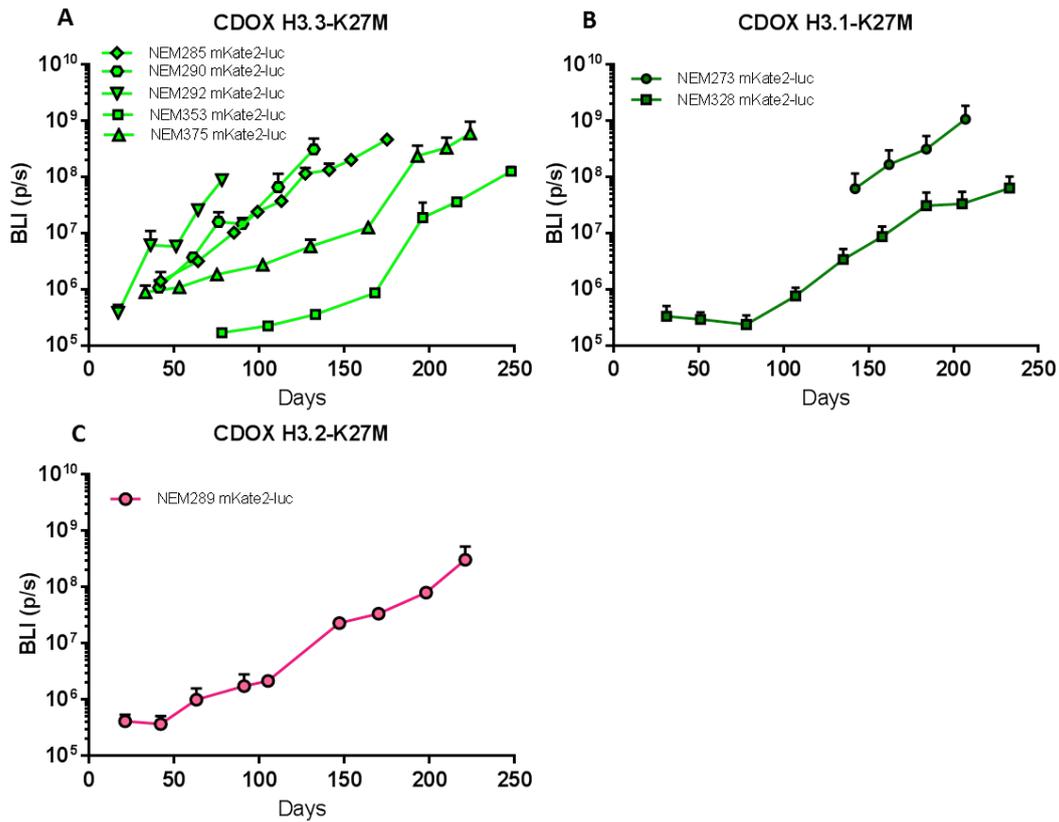


Figure 22 : Suivi longitudinal de la croissance tumorale par mesure de la bioluminescence dans la région du tronc cérébral des modèles CDOX de DIPG. Les différents modèles montrent toutes une croissance exponentielle de la BLI dont la vitesse de croissance est indépendante du variant muté H3-K27M. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM. NEM285, NEM292, NEM375 n=5; NEM289, NEM290, NEM328 n=4; NEM273 n=3; NEM353 n=2.

CDOX	Statut mutation Histone H3	Temps doublement (jours)	Temps survie (jours)
NEM273	HIST1H3B K27M	11.7 \pm 1	239 \pm 19
NEM285	H3F3A K27M	15.2 \pm 1.1	199 \pm 25
NEM289	HIST2H3A K27M	19.1 \pm 1.1	249 \pm 21
NEM290	H3F3A K27M	10.9 \pm 1.4	135 \pm 4
NEM292	H3F3A K27M	7.4 \pm 0.4	67 \pm 6
NEM328	HIST1H3B K27M	19.4 \pm 4.4	267 \pm 28
NEM353	H3F3A K27M	18.8 \pm 1.3	357 \pm 116
NEM375	H3F3A K27M	19.8 \pm 4.6	247 \pm 16

Tableau 7 : Caractéristiques cliniques des modèles CDOX. Les temps de doublement ont été calculés entre deux mesures de BLI dont la croissance est exponentielle. Les temps de doublement et survie sont exprimés en moyenne \pm écart type.

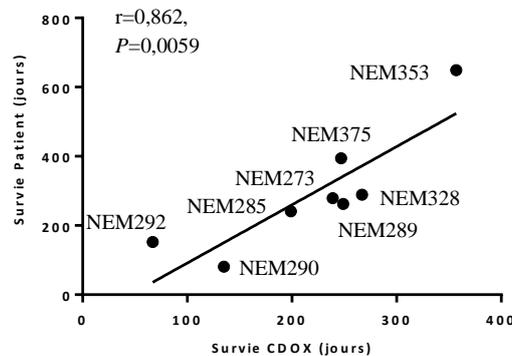


Figure 23 : Corrélation entre la survie du patient et de sa CDOX associée. La droite correspond à la courbe de régression linéaire.

Le suivi longitudinal des CDOX a été réalisé à partir de 15 jours post-greffe jusqu'au sacrifice des animaux après maximum 1 an, sauf pour la CDOX NEM273 où le suivi longitudinal a été initié 140 jours post-injection (Figure 22). Pour les 16 cultures de cellules marquées mKate2-luc, seulement 8 ont présenté une BLI qui a augmentée au cours du temps *in vivo*, les 7 autres n'ont pas eu de BLI détectable post-greffe, ou alors leur BLI est restée stable jusqu'à 1 an post-greffe (données non montrées).

On observe que les temps de doublement ainsi que la survie des animaux diffèrent pour chaque CDOX développée, sans différence selon la forme mutée qu'elles comportent (Figure 22, Tableau 7). Deux CDOX H3.3K27M ont un temps de doublement moins élevé que les autres, NEM292 et NEM290, de 11 et 7 jours respectivement. On observe que pour toutes les CDOX obtenues, les souris présentent des symptômes neurologiques lorsque la BLI est supérieure à 10^8 rad/p/sec/cm²/sr, signifiant qu'indépendamment des différents sous-groupes tumoraux, le nombre de cellules tumorales nécessaires pour envahir le cerveau des souris de manière symptomatique semble similaire. Le temps de survie des souris varie entre 2 mois et demi pour NEM292 et 1 an pour NEM353. Il a été observé une corrélation significative entre le temps de survie du patient et les temps de survie des souris pour les 8 CDOX ($r=0,862$, $P=0,0059$, test de corrélation de Pearson) (Figure 23).

1.2. Présence de la mutation H3K27M dans les modèles *in vitro* et *in vivo*

Pour chaque culture de cellules, chaque transplantation de PDOX et chaque CDOX obtenues, le séquençage ciblé du variant de l'histone H3 muté a été réalisé (Figure 24). La substitution de la lysine par une méthionine est retrouvée dans les gènes *HIST1H3B* et *H3F3A* à environ 40% dans les tumeurs des patients. Les tumeurs étant de types infiltrantes, le nombre de cellules tumorales mutées est probablement dilué dans les cellules du microenvironnement cérébral. En revanche, on retrouve bien 50% de substitution de lysine par une méthionine dans les gènes *HIST1H3B* et *H3F3A* pour les PDOX et CDOX, correspondant à une mutation hétérozygote pour une amplification des gènes strictement d'origine humaine. Pour la mutation hétérozygote dans le gène *HIST2H3A/C* dans les modèles PDOX et CDOX, la substitution est présente à 25%, ce gène étant dupliqué dans le génome humain.

La mutation H3K27M est donc bien conservée dans nos différents modèles, relevant ainsi la pertinence de nos modèles. De plus, l'analyse des « Short Tandem Repeat » (STR) dans les différents modèles *in vivo* obtenus, PDOX et CDOX, montre que les tumeurs possèdent les mêmes marques génétiques que celles des patients dont elles dérivent (données en annexe 1),

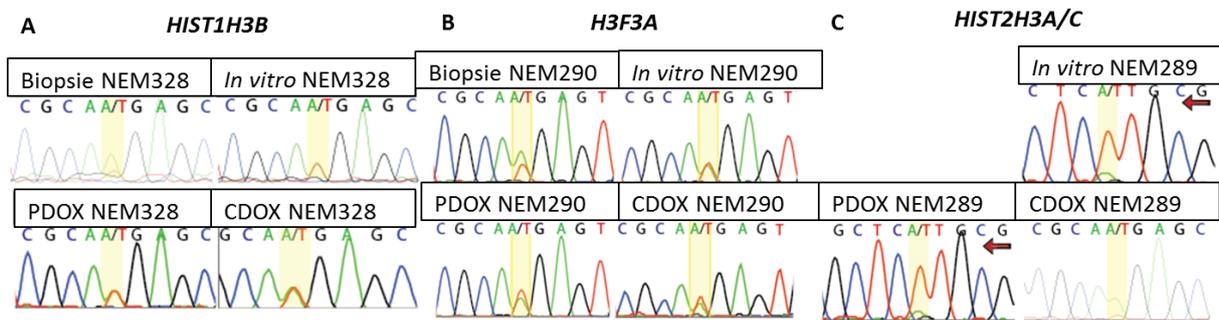


Figure 24 : Conservation de la mutation de l'histone H3 dans les modèles *in vitro* et *in vivo* de DIPG mise en évidence par séquençage Sanger. La substitution du A par un T est surlignée en jaune. A. Mutation dans *H1ST1H3B* pour NEM328, B. Mutation dans *H3F3A* pour NEM290, C. Mutation dans *H1ST2H3A/C* pour NEM289, la culture cellulaire et la PDOX ont été séquençées avec l'amorce en aval (flèche rouge). La mutation *H1ST2H3A/C* chez le patient NEM289 a été confirmée par séquençage de l'exome.

	Nude		NSG	
	Prise tumorale	Survie (jours)	Prise tumorale	Survie (jours)
CDOX NEM270	0/5	-	0/5	-
CDOX NEM271	0/5	-	0/4	-
CDOX NEM276	0/4	-	0/5	-
CDOX NEM290	4/4	131	4/4	148

Tableau 8 : Prise tumorale et survie des animaux chez les souris Nude et NSG pour 4 lignées cellulaires de DIPG. La prise tumorale correspond au nombre de souris ayant développées une tumeur sur le nombre total de souris greffées.

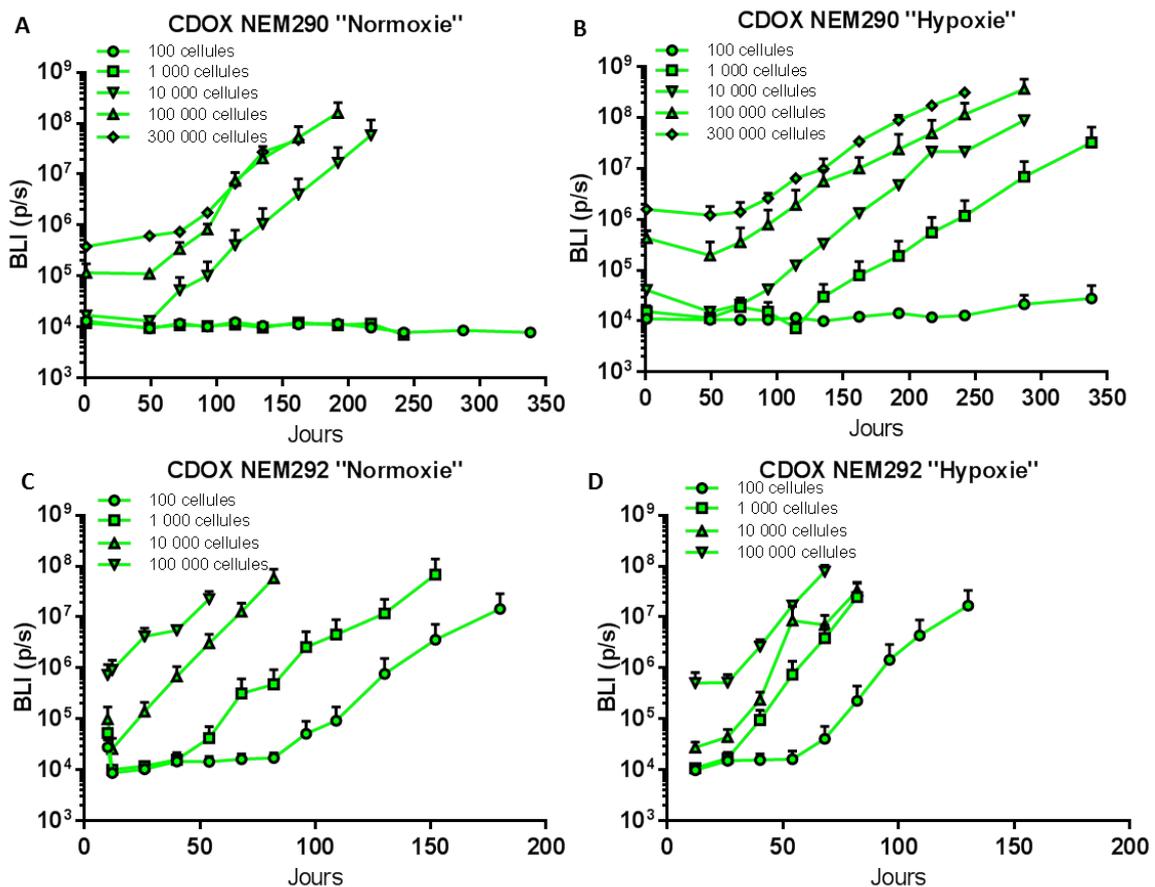


Figure 25 : Suivi longitudinal de la croissance tumorale par quantification de la BLI dans la région du tronc cérébral des CDOX développés à partir de dilutions de cellules préalablement cultivées *in vitro* en condition « Normoxie » et « Hypoxie ». Pour chaque dilution cellulaire, n=3. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM.

confirmant l'identité génétique unique des différentes xéno greffes. De plus, ces analyses nous permettent de confirmer la présence de tumeurs humaines et non murines.

1.1. Greffes tumorales chez la souris Nude et NSG

Nous avons comparé la prise de greffe dans la souris NSG, en parallèle des souris Nude pour 4 lignées cellulaires dans l'hypothèse où une immunodéficience plus complète permettrait une meilleure prise tumorale, le rejet de la greffe par le système immunitaire étant moins important. Nous n'avons observé aucune différence ni dans le pourcentage de prise de greffe, ni dans le temps de survie des souris (Tableau 8). La déficience de lymphocyte T mature est donc suffisante pour permettre aux cellules tumorales de se développer dans un modèle murin.

1.2. Conditions de culture des cellules *in vitro*

Lors de la réception de la tumeur du patient, celle-ci est mise en culture *in vitro* en condition « normoxie » et « hypoxie » (voir matériel et méthode). La condition « hypoxie » étant plus physiologiquement proche de la pression partielle en oxygène dans le cerveau, nous avons supposé que l'expansion *in vitro* et la prise de greffe *in vivo* serait meilleure. Nous avons donc greffé en parallèle des cellules issues du même patient mais dérivées dans les deux conditions de culture différentes pour différentes quantités cellulaires, variant de 100 cellules à 300 000 cellules pour NEM290 et NEM292 (Figure 25).

On observe que pour la CDOX NEM290, il n'a pas été possible de développer une tumeur pour une quantité de cellules inférieures à 10 000 cellules dans la condition « normoxie », contrairement à la condition « hypoxie » où il a été possible d'obtenir 1 tumeur pour l'injection de 1 000 cellules. En revanche pour la CDOX NEM292, il a été possible d'obtenir des tumeurs à partir de 100 cellules dans les deux conditions de cultures. Pour les deux CDOX, le temps de doublement des cellules tumorales n'est pas significativement différent pour chaque quantité de cellules injectées quelle que soit la condition de culture au préalable (test de Student, $P=0.973$ pour NEM290 et $P=0.451$ pour NEM292) (Tableau 9). Il n'a pas été possible de corrélérer la survie des animaux avec le nombre de cellules injectées ($P>0,3$, test de corrélation de Pearson). En dehors de la différence « normoxie » vs. « hypoxie », cela nous montre que les cellules *in vitro* possèdent une des propriétés des cellules souches qui est de développer des tumeurs à partir d'un très faible nombre de cellules (Reya et al., 2001).

NEM290	Normoxie			Hypoxie		
Nombre cellules injectées	Prise tumorale	Temps doublement (jours)	Survie (jours)	Prise tumorale	Temps doublement (jours)	Survie (jours)
100 000	3/3	16,7 ±10	192	2/2	15,9 ±4,9	287
10 000	1/3	15	217	1/1	9,7	287
1 000	0/3	-	-	1/2	19,7	338
100	0/3	-	-	0/3	-	-
NEM292	Normoxie			Hypoxie		
Nombre cellules injectées	Prise tumorale	Temps doublement (jours)	Survie (jours)	Prise tumorale	Temps doublement (jours)	Survie (jours)
100 000	4/4	9,5 ±6,3	76	5/5	7,1 ±1	76
10 000	3/5	5,9 ±2,3	82	4/4	6,7 ±3,4	82
1 000	2/5	11,9	152	2/5	15,3 ±11,5	82
100	1/5	7,8	180	1/4	9,9	130

Tableau 9 : Suivi de la croissance tumorale des CDOX NEM290 et NEM292 après injection de différentes quantités de cellules tumorales. La prise tumorale correspond au nombre de souris ayant développées une tumeur sur le nombre total de souris greffées.

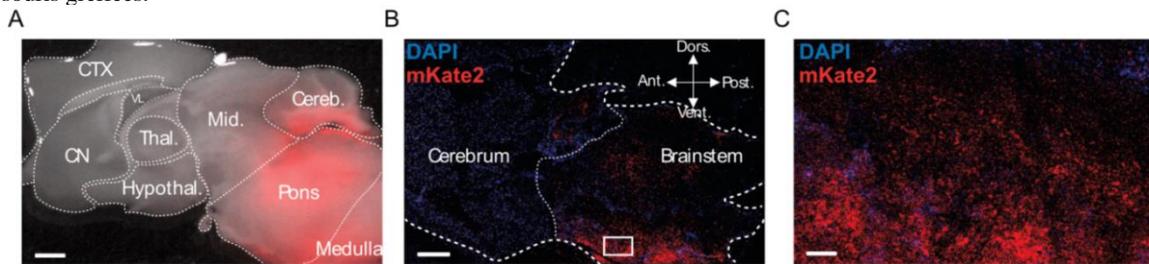


Figure 26 : Imagerie *ex vivo* d'un cerveau de CDOX NEM 292 par macroscopie et microscopie. Les cellules tumorales sont marquées en rouge (mKate2), les noyaux cellulaires en bleu (Hoechst). A. Superposition du contraste de phase et de la fluorescence de la mKate2 sur une section sagittale de cerveau au grossissement 5X. B. Image d'une coupe sagittale obtenue par microscopie confocale au grossissement 10X, C. au grossissement 20X. La barre d'échelle correspond à 1mm pour A et B et 250µm pour C. CTX: cortex; CN: cerebral nuclei; Thal.: thalamus; Hypothal.: hypothalamus; Mid.: midbrain; Cereb.: cerebellum; VL: lateral ventricle; Ant.: anterior; Vent.: ventral; Dors.: dorsal; Post.: posterior.

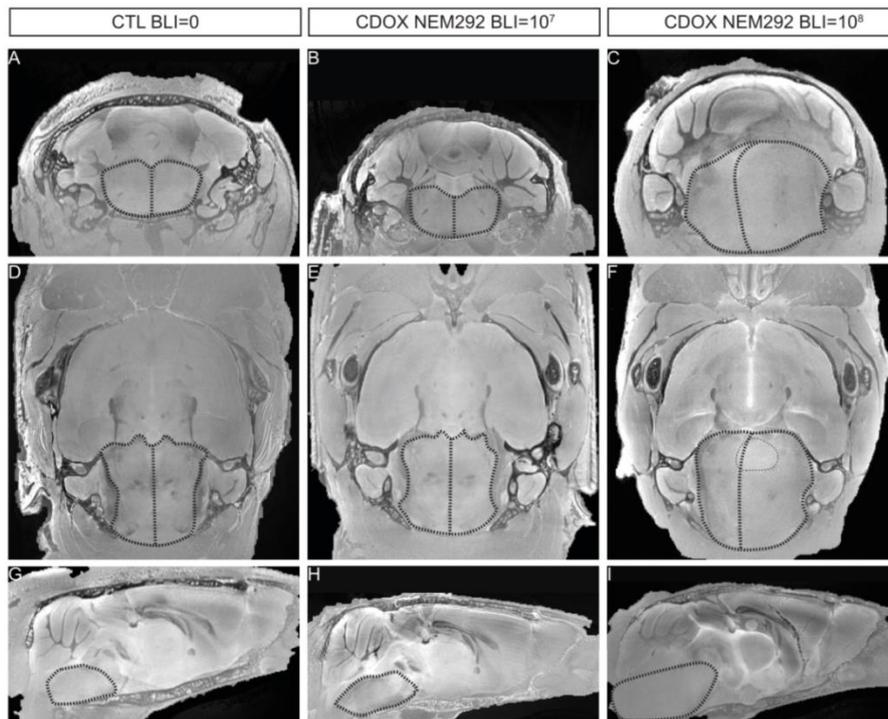


Figure 27 : Séquence IRM à 11.7T en T2 de la CDOX NEM292 à deux stades d'évolution de la maladie et d'une souris contrôle obtenue *ex vivo*. Les pointillés entourent le tronc cérébral de la souris et les petits pointillés entourent l'hypersignal.

En plus de cette expérience, nous avons voulu voir si la culture en « hypoxie » favorisait la prise de greffe pour une CDOX avec un faible pourcentage d'obtention de tumeur, CDOX NEM293 (Tableau 5). Cependant, que ce soit en condition « hypoxie » ou « normoxie », seule 30% des souris présentent des tumeurs avec une BLI croissante 1 an post-greffe (données non montrées).

Il apparait donc d'après ces expériences que la culture des cellules tumorales en condition « hypoxique » ne favorise ni la prise de greffe, ni l'agressivité des cellules tumorales *in vivo*.

1.3. *Suivi ex vivo par fluorescence des cellules tumorales*

Ex vivo, il est possible d'observer par microscopie en fluorescence les cellules tumorales grâce à l'expression de la protéine fluorescente mKate2 visible à l'aide d'une loupe ou par microscopie confocale pour une résolution unicellulaire (Figure 26). On peut alors observer que les cellules tumorales migrent en avant du cerveau en dehors du tronc cérébral, dans le cervelet mais aussi dans les hémisphères cérébraux *via* la ligne médiane (A, Figure 26). Les cellules ne forment pas de masse tumorale et l'on observe bien en microscopie confocale l'infiltration des cellules tumorales à l'intérieur du tissu cérébral sain (B, C, Figure 26).

1.4. *Suivi ex vivo de la croissance tumorale par IRM*

Nous avons voulu voir comment l'infiltration tumorale *in vivo* impacte les images IRM et s'il était possible de suivre l'évolution tumorale par IRM. Classiquement chez un patient atteint de DIPG, cette méthode non invasive permet de délimiter un gonflement du tronc cérébral, conséquence de la présence d'un œdème important provoqué par un nombre important de cellules tumorales, et d'observer une infiltration tumorale le long des fibres nerveuses. Une acquisition IRM à 11,7T a été réalisé pour la CDOX NEM292 à deux stades de développement de la tumeur : (i) à la moitié de la phase exponentielle de la croissance tumorale, 28 jours post-greffe pour une BLI de 10^7 , et (ii) à un stade tumoral très avancé, 77 jours post-greffe pour une BLI de 10^8 , en comparaison avec une souris non greffée. Il est seulement observé un changement anatomique chez la souris au stade avancé avec un décalage de la ligne médiane vers la gauche dans les vues coronale et axiale (C, F, Figure 27). Le gonflement du tronc cérébral est aussi observé sur la vue sagittale où la masse tumorale est observée jusque dans la partie postérieure du cortex (I, Figure 27). Un hypersignal dans la

A, D, G. souris contrôle ; B, E, H. CDOX NEM292 BLI 10⁷ ; C, F, I. CDOX NEM292 BLI 10⁸ ; A, B, C. plan coronal; D, E, F. plan axial ; G, H, I. plan sagittal. F.

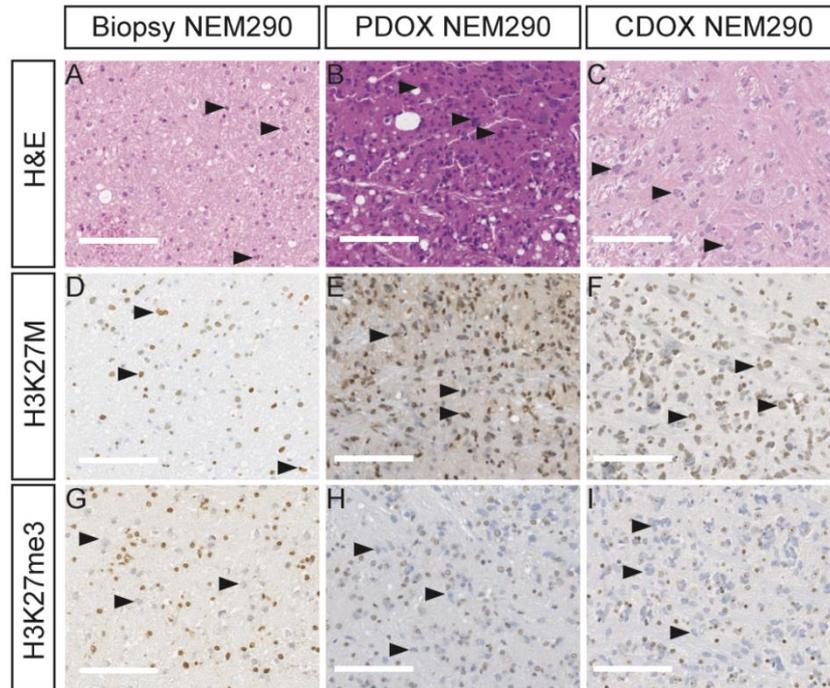


Figure 28 : Profils immunophénotypiques pour la forme mutée H3K27M et de la triméthylation de H3K27 dans les modèles PDOX et CDOX de NEM290 en comparaison avec la tumeur du patient. Les images proviennent de la région du tronc cérébral pour les modèles de xénogreffes. A-C, coloration Hématoxyline & Eosine; D-F, anticorps anti-H3K27M; G-I, anticorps anti-H3K27me3. Les flèches indiquent des cellules tumorales caractéristiques. La barre d'échelle correspond à 125µm.

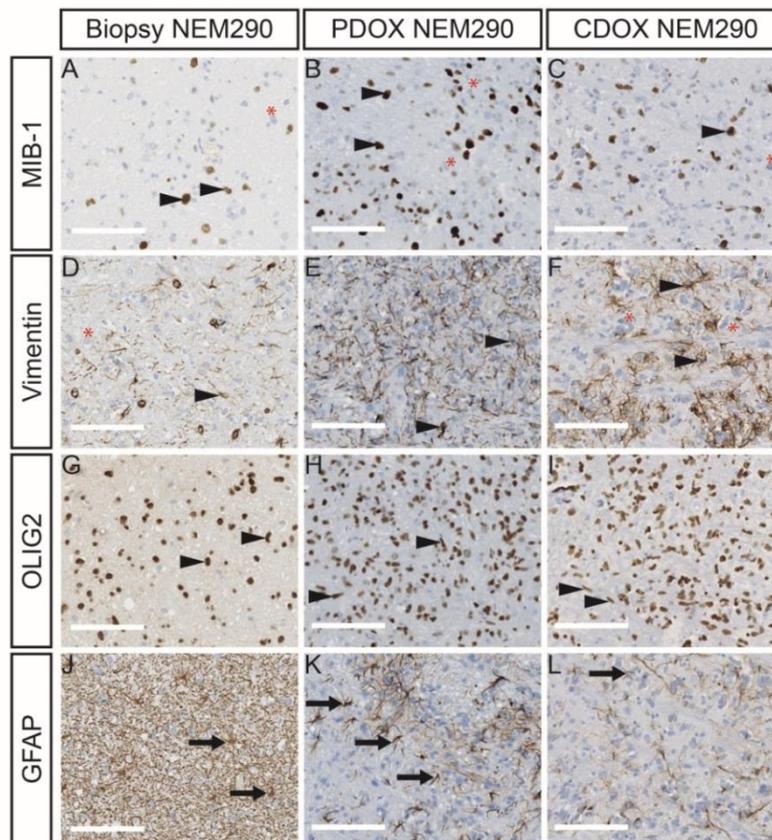


Figure 29 : Profils immunophénotypiques des modèles PDOX et CDOX de NEM290 en comparaison avec la tumeur du patient. Marquage des coupes avec des anticorps anti- A-C, MIB-1 ; D-F, vimentine ; G-I, OLIG2 ; J-L, GFAP. Les pointes de flèches indiquent les cellules tumorales, les étoiles représentent les cellules négatives et les flèches indiquent les cellules stromales. La barre d'échelle correspond à 125µm.

région droite du tronc cérébral est observé aussi uniquement chez la souris avec une tumeur au stade avancé, qui correspond au site d'injection des cellules tumorales (F, Figure 27).

1.5. Caractéristiques histologiques

1.5.1. Marqueurs histologiques

La coloration par HES permet de mettre en évidence les cellules tumorales qui présentent un noyau dense et irrégulier, marqué par l'hématoxyline en bleu/violet. Les xénogreffes de souris présentent un œdème extracellulaire modéré à élevé, tel qu'observé dans la tumeur primaire, péricellulaire ou le long du flux axonal (A, B et C, Figure 28). L'immunomarquage de H3K27M mutée permet de détecter les cellules tumorales qui sont marquées en marron (D, E et F, Figure 28), contrairement au marquage de la H3K27me3 où les seules cellules non marquées en rose, correspondent aux cellules tumorales où la triméthylation est perdue (G, H et I, Figure 28). On observe, dans le tronc cérébral des souris, la présence de cellules tumorales dont les propriétés du DIPG sont conservées : mutation H3K27M et perte de H3K27me3 tout comme chez le patient dont elles dérivent. Cette étude immuno-histologique a été réalisée pour l'ensemble de nos modèles *in vivo* (données non montrées). De manière plus importante, ces colorations et marquages soulignent la présence de tumeurs entremêlées aux cellules stromales normales, confirmant ainsi que les modèles CDOX et PDOX récapitulent la principale caractéristique histologique du DIPG avec une infiltration extensive du parenchyme cérébral par les cellules tumorales sans formation de masse tumorale et sans néovascularisation. Cependant, les patients à un stade avancé présentent une tumeur avec de la nécrose et de la néoangiogenèse, ce que l'on ne retrouve jamais dans nos modèles *in vivo*.

Nous avons vérifié que nos xénogreffes présentent les mêmes caractéristiques immunophénotypiques que les tumeurs des patients dont elles dérivent. Le marquage de la vimentine, un marqueur connu des cellules souches neurales (NSC) et des précurseurs gliaux précoces, également détecté dans les gliomes et les astrocytes réactifs, mais à peine exprimé dans le cerveau normal, montre un marquage hétérogène des cellules tumorales autant dans la tumeur du patient que dans les xénogreffes, confirmant le phénotype glial de ces tumeurs tout en démontrant une hétérogénéité intra-tumorale des tumeurs développées (D, E et F, Figure 29). Le marqueur précurseur d'oligodendrocytes OLIG2, qui est commun à tous les DIPG, est détecté de manière robuste dans la plupart sinon toutes les cellules tumorales dans les tumeurs de patient ainsi que dans nos xénogreffes (G, H et I, Figure 29). La GFAP, marqueur du

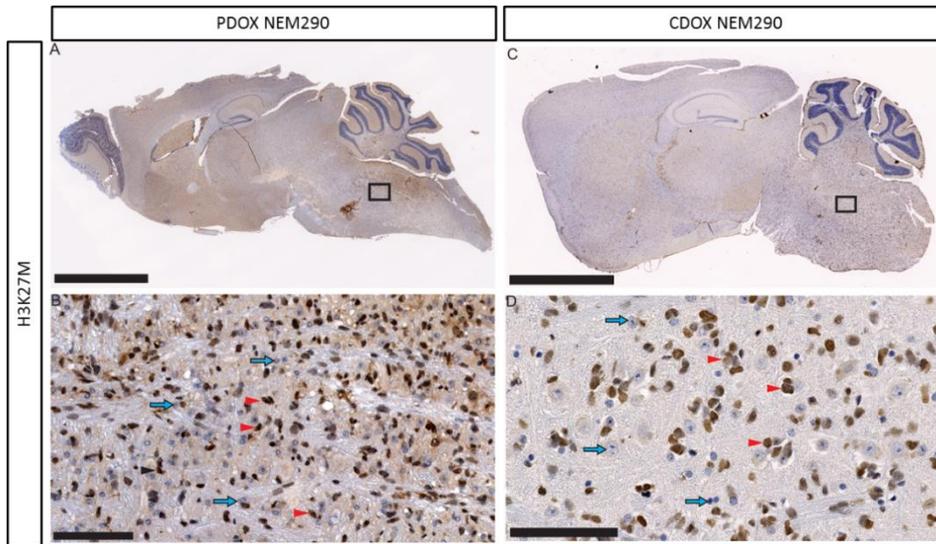


Figure 30 : Invasion et dissémination dans le cerveau des cellules tumorales mises en évidence par le marquage de la forme mutée H3K27M des modèles PDOX et CDOX de NEM290. La section encadrée correspond à un agrandissement X30 de la zone. Les flèches rouges indiquent les cellules tumorales et les flèches bleues indiquent les cellules stromales. Les barres d'échelles correspondent à A, C. 2.5mm et B, D. 100µm.

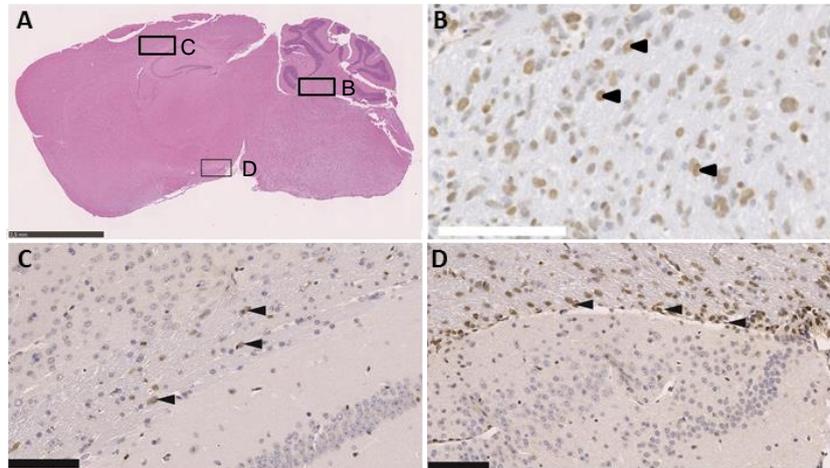


Figure 31 : Infiltration des cellules tumorales dans le parenchyme cérébral à distance du site d'injection de la CDOX NEM290. A. coloration H&E, les rectangles représentent les zones de grossissement. La barre d'échelle correspond à 2.5mm. B-D. marquage anti-H3K27M. Les flèches indiquent les cellules tumorales. B. agrandissement de la zone du cervelet ; C. agrandissement de la zone du néocortex ; D. agrandissement de la zone sub-ventriculaire et du pédoncule cérébral. B. La barre d'échelle correspond à 100µm et C, D. à 125µm.

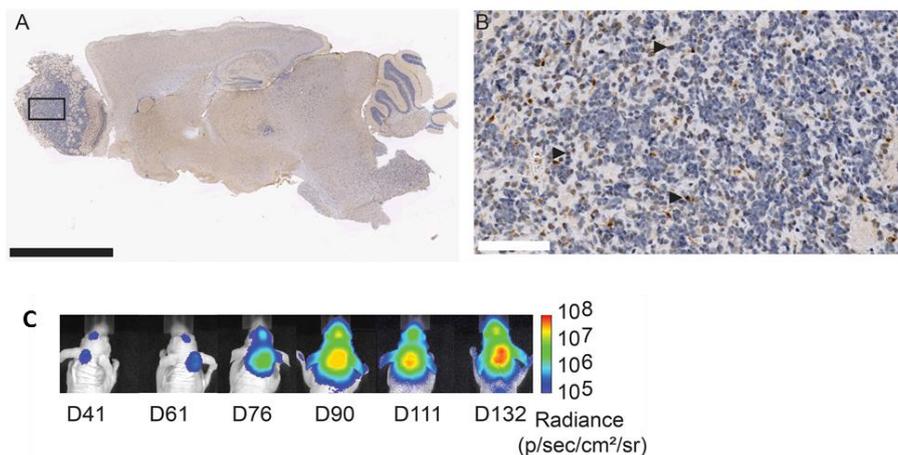


Figure 32 : Invasion des cellules tumorales dans le bulbe olfactif dans le modèle CDOX de NEM290 mise en évidence par BLI et IHC. A, B. Marquage immunohistochimique de H3K27M, la section encadrée correspond à un agrandissement X20 de la zone. La barre d'échelle correspond à A. 2.5mm et B. 100µm ; C. Suivi longitudinal par bioluminescence de la croissance tumorale.

filament intermédiaire astrocytaire marque tous les astrocytes réactifs du stroma dans la biopsie. En raison de l'affinité d'anticorps plus élevée pour la protéine humaine, elle détecte seulement des cellules exprimant fortement la GFAP, c'est-à-dire des astrocytes réactifs de souris, dans le parenchyme infiltré. En dehors de ces zones, la coloration était principalement négative (J, K et L, Figure 29)

Tous ces marquages nous montrent que les xénogreffes sont histologiquement similaires aux tumeurs des patients dont elles dérivent et que l'on récapitule le stroma réactif environnant la tumeur. Dans l'ensemble, toutes ces colorations confirment le caractère infiltrant d'une tumeur oligo-astrocytaire d'origine humaine sans formation de masse tumorale, présentant des caractéristiques identiques de différenciation, d'hétérogénéité de biomarqueurs et d'astrogliose réactive dans le DIPG primaire.

Le marquage de MIB-1 nous permet d'estimer le nombre de cellules prolifératives qui avoisinent ici environ 20% dans les modèles *in vivo* comme dans la tumeur du patient (A, B et C, Figure 29). De plus, l'anticorps MIB-1 étant spécifique à la protéine humaine, cela nous permet de confirmer ici encore la présence de cellules humaines dans nos modèles.

1.5.1. Infiltration et dissémination des cellules tumorales dans les modèles *in vivo*

Le marquage IHC de la protéine H3-K27M sur des coupes sagittales nous a permis d'étudier l'emplacement des cellules tumorales dans le cerveau entier (Figure 30). Les cellules positives H3-K27M ont été détectées dans le tronc cérébral entier, au-delà du site d'injection, mélangées avec des cellules normales non marquées à la fois dans les modèles PDOX et CDOX. Il y a une expansion des cellules tumorales sans aucune formation de masse tumorale mettant ainsi en évidence un couplage du processus d'infiltration avec la croissance tumorale.

On peut également observer que les cellules tumorales positives ne se limitent pas au tronc cérébral, mais s'infiltrent massivement vers l'axe rostral du cerveau, du cervelet, de l'espace sous-pial, du cortex et du thalamus (Figure 31).

De plus, nous observons, à l'aide des données de BLI, une infiltration dans la moelle épinière dans une moindre mesure (données non montrées), ainsi que dans le bulbe olfactif (C, Figure 32). En effet, dans environ 30% des souris injectées pour les modèles CDOX NEM290, NEM292 et NEM328, les cellules tumorales migrent également dans les bulbes olfactifs par un chemin ventral le long des méninges dans les zones de flux hypothalamique et olfactive latérales, observées par IHC (A, B, Figure 32).

Numéro	Localisation	Diagnostic/ rechute	Gain 1q	TNC	FISH	Sexe	Age	Survie (mois)	Patient		Modèle PDOX		Gain 1q
									In vitro	Modèle PDOX			
										Infratentorial	Supratentorial		
									Prise tumorale	Prise tumorale			
NEM296	EPN-PF	diagnostic	+	+	N/D	F	2,1	5.8	Non	2/2	N/D	+	
NEM297	EPN-PF	rechute	-	+	N/D	F	3,3	LOF	Non	0/2	N/D	N/D	
NEM332	EPN-PF	diagnostic	+	+	N/D	M	2,6	Vivante	Non	0/2	0/1	N/D	
NEM333	EPN-PF	rechute	-	+	N/D	F	10,2	Vivant	Non	0/3	N/D	N/D	
NEM344	EPN-ST	diagnostic	-	+	N/D	M	3	LOF	Non	0/2	0/1	N/D	
NEM348	EPN-ST	rechute	+	-	N/D	M	9,2	Vivant	Non	N/D	0/2	N/D	
NEM382	EPN-ST	diagnostic	-	-	réarrangement C11ORF95	M	9,1	Vivant	Non	N/D	N/D	N/D	
NEM386	EPN-PF	rechute	+	+	N/D	M	9	9.1	Non	20/20	N/D	+	
NEM390	EPN-PF	diagnostic	-	+/-	N/D	M	2,4	Vivant	Non	0/2	N/D	N/D	
NEM392	EPN-PF	rechute	+	+	N/D	F	3,8	5.8	Non	4/4	N/D	+	
NEM396	EPN-PF	diagnostic	+	+	N/D	F	2,5	Vivante	-	0/2	N/D	N/D	
NEM398	EPN-ST	rechute	-	-	réarrangement RELA	F	18,2	Vivante	-	N/D	0/2	N/D	
NEM404	EPN-PF	diagnostic	-	+	N/D	F	3,9	LOF	-	0/1	N/D	N/D	
NEM406	EPN-PF	rechute	+	-	N/D	M	19,3	Vivant	-	0/2	N/D	N/D	
NEM415	EPN-ST	diagnostic	+	-	réarrangement RELA	M	7,2	Vivant	-	2/2	6/6	+	

Tableau 10 : Caractéristiques cliniques et moléculaires des patients atteints d'EPN et tumorigénicité *in vivo*. Pour chaque patient, la partie gauche correspond aux données cliniques ; âge, survie, sexe ; et aux caractéristiques de la tumeur : présence d'un gain de 1q, d'une forte expression de TNC et de la fusion RELA. La partie droite correspond aux données expérimentales ; la tumorigénicité des modèles *in vivo* PDOX est déterminé par le nombre de souris présentant une tumeur sur le nombre total de souris greffées en fonction de la localisation de la greffe. La colonne *in vitro* correspondent à l'obtention de cultures cellulaires à partir des biopsies de patient. N/D : non déterminé, L.O.F : perdu de vue, EPN-PF : épendymome infratentorial ; EPN-ST : épendymome supratentorial.

Localisation	P0		P1		P2		P3		P3 Post-décongélation		P4 Post-décongélation		
	Prise tumorale	Survie (jours)	Prise tumorale	Survie (jours)	Prise tumorale	Survie (jours)							
NEM296	V4	2/2	178	2/2	191 ±17	-	-	-	-	-	-	-	
NEM386	V4	1/1	76	4/4	57 ±11	2/2	67 ±10	5/5	60 ±3	3/3	101 ±2	5/5	157 ±35
NEM392	V4	1/1	197	3/3	121 ±17	5/5	109 ±11	1/1	177	-	-	4/5	118
NEM415	V4	2/2	91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Caudoputamen	-	-	1/1	133	5/5	78 ±8	-	-	-	-	-	-

Tableau 11 : Prise tumorale et survie des PDOX d'EPN à mesure des passages. La prise tumorale correspond au nombre d'animaux développant une tumeur sur le nombre total d'animaux greffés. La survie est exprimée en nombre de jours moyen ± SEM. La prise de greffe est en grande majorité à 100%. La décongélation des cellules tumorales lors d'un passage n'affecte pas la prise tumorale.

2. Développement de modèles PDOX d'EPN

2.1. Tumorigénicité

De 2014 à 2017, nous avons obtenus 15 résections tumorales de patients atteints de d'EPN au diagnostic ou à la rechute (Tableau 10). La cohorte est composée de 10 EPN-PF et 5 EPN-ST. Elle a une répartition équilibrée entre les deux sexes avec 8 garçons et 7 filles. L'âge moyen est de 6 ans pour les EPN-PF et 9 ans pour les EPN-ST. Pour une patiente, nous avons pu obtenir sa tumeur au diagnostic mais aussi sa tumeur lors de sa première rechute, NEM296 et NEM392, respectivement. Toutes les tumeurs à la rechute sont issues de patients traités avec de la radiothérapie avec ou sans chimiothérapie associée. Deux enfants sont décédés rapidement après réception de la tumeur, notamment NEM296/NEM392 où la tumeur s'est montrée très agressive, la patiente décédant seulement 6 mois post diagnostic. Les autres patients sont encore en vie, correspondant à la survie globale retrouvée dans les EPN.

En histologie, les tumeurs montrent toutes la présence de rosettes périvasculaires (Figure 34) et sont classée comme EPN anaplasique de grade III. Pour l'ensemble des tumeurs, le gain de 1q est recherché par FISH et l'expression de la TNC par IHC. Le gain du 1q est retrouvé dans 8/15 cas (53%). La fusion *RELA/C11ORF95*, mise en évidence par FISH dans les tumeurs ST, est positive dans 3/3 cas (100%).

A la réception de la tumeur, celle-ci est dissociée et une partie est directement greffée dans des souris Nude soit dans l'aire infratentorielle pour les EPN-PF, soit dans l'aire supratentorielle pour les EPN-ST (voir matériel et méthode). Nous avons obtenu des tumeurs *in vivo* dans 4/15 des cas (27%) pour les différents sous-groupes ; 3/10 pour les EPN-PF et 1/5 pour les EPN-ST (Tableau 10). Tout comme pour les DIPG, lorsque l'animal présente un symptôme neurologique ou une perte de poids, son cerveau est divisé en deux suivant le plan sagittal afin de garder la partie gauche pour les études immunohistochimique et la partie droite est dissociée pour être cryo-conservée et greffée dans une nouvelle génération de souris P1 (voir matériel et méthode). Ces transplantations sériées sont répétées jusqu'au P4.

Pour 100% (4/4) des tumeurs obtenues à la primogreffe, il a été possible de générer des tumeurs aux passages suivants. (Tableau 11). De façon homogène, l'ensemble des PDOX obtenues ont une prise de greffe de 100% pour l'ensemble des passages, indépendamment du sous-groupe tumoral. La survie des animaux est dépendante de la tumeur du patient dont elle est issue variant de 60 jours pour la PDOX NEM386 à 180 jours pour la PDOX NEM296. La PDOX NEM296 a une survie beaucoup plus longue que la PDOX NEM386 issue de la rechute de la même patiente. Pour chaque modèle, la survie des animaux est identique pour

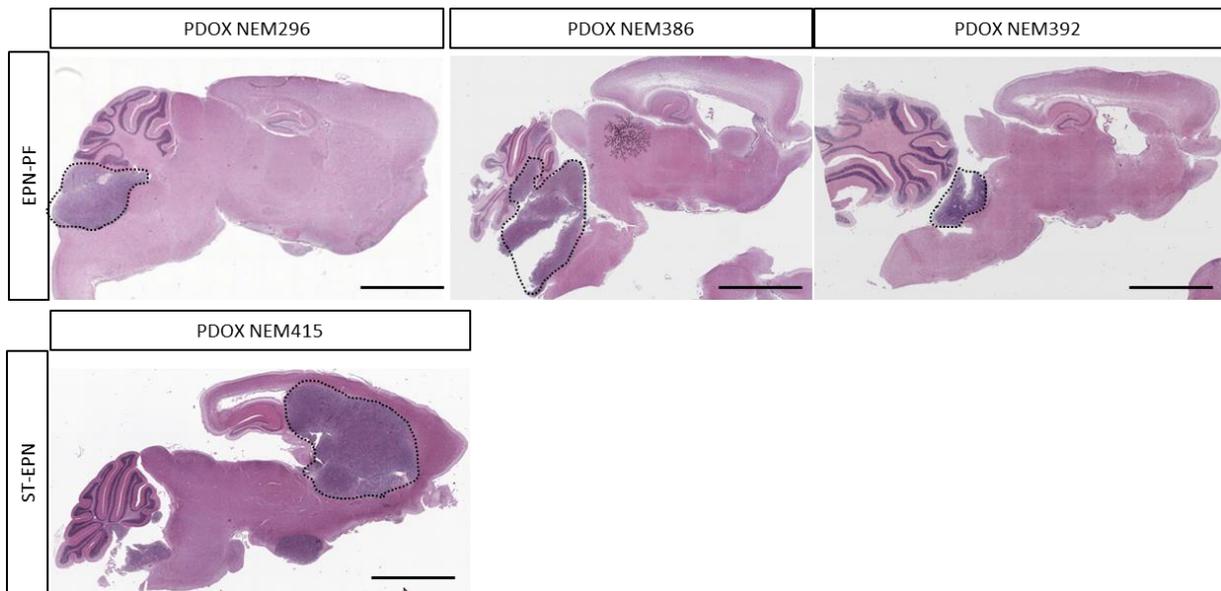


Figure 33 : Localisation intracérébrale des PDOX d'EPN-PF et ST-EPN. Les tumeurs sont délimitées en pointillées. La barre d'échelle correspond à 2mm.

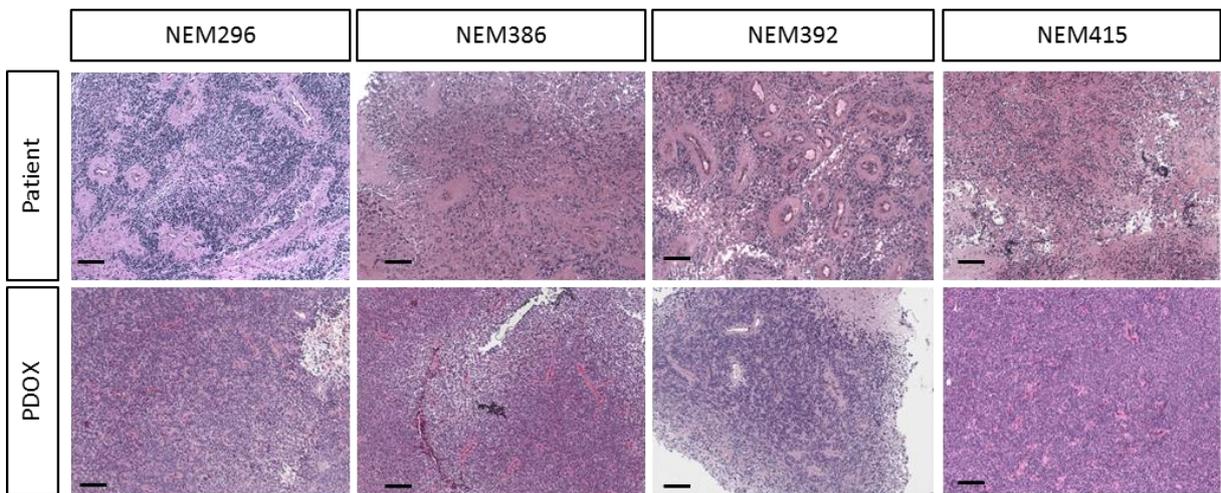


Figure 34 : Organisation morphologique des cellules tumorales d'EPN dans les tumeurs des patients et des PDOX associées. Colorations HES. La barre d'échelle représente 250µM.

tous les passages de P0 à P4 selon la localisation de la greffe. Cela renforce la reproductibilité de nos modèles.

Il a été possible d'obtenir des tumeurs à partir de pools de cellules issues d'un passage congelé dans deux modèles différents. Cependant, le temps de survie des animaux est augmenté lors de la décongélation.

Pour trois modèles, NEM386, NEM392 et NEM415 nous avons pu valider leur identité génétique unique par analyse des STR (données en annexe 2). Pour la PDOX NEM296, il n'a pas été possible d'obtenir du matériel suffisant pour réaliser l'analyse.

2.2. Caractéristiques histologiques des PDOX

Le marquage des coupes sagittales de la partie gauche des PDOX par HES permet de mettre en évidence les cellules tumorales qui forment une masse tumorale extrêmement dense et bien délimitée (Figure 33). Pour les EPN-PF, la tumeur est localisée à son site d'injection dans le 4^{ème} ventricule. On observe une extension tumorale en direction du rachis à l'arrière du cervelet, comme ce qui est observé chez le patient. Pour les EPN-ST, on observe aussi une masse tumorale au niveau du site d'injection dans le caudoputamen avec une extension vers les ventricules latéraux. Dans la coupe de la PDOX NEM415, on observe une masse tumorale au niveau sous-pial, probablement une métastase intracérébrale comme retrouvé chez certains patient à un stade avancé de la maladie.

Microscopiquement, on observe la présence de pseudo-rosettes pour l'ensemble des tumeurs tout comme retrouvé dans les tumeurs des patients (Figure 34). Autant chez le patient que dans sa PDOX associée, il n'est pas observé d'œdème mais en revanche une importante néovascularisation avec la présence de nombreux capillaires orientés de manière anarchique. Contrairement à ce qui est fréquemment retrouvé dans les tumeurs de patient, on n'observe jamais dans la PDOX de zone de nécrose ou de calcification.

Le gain du 1q a été étudié par FISH dans nos modèles *in vivo* et est retrouvé pour les 4 PDOX étudiées (Tableau 10). Nous n'avons pu dériver uniquement des PDOX d'EPN possédant un gain du 1q, facteur d'agressivité reconnu chez les patients. Les analyses IHC complètes réalisées lors du diagnostic chez le patient sont en cours d'analyse dans nos modèles *in vivo*.

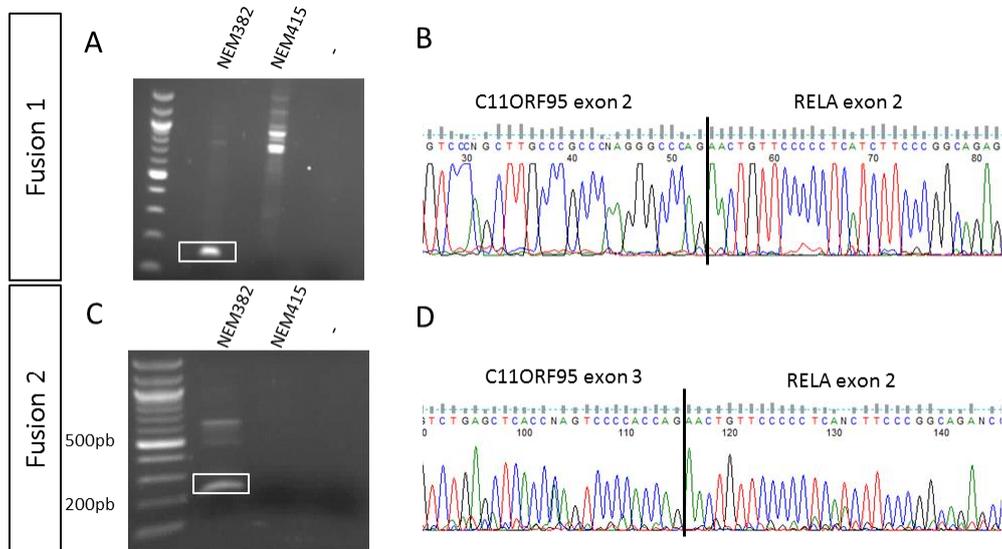


Figure 35 : Mise en évidence des fusions 1 et 2 RELA/C11ORF95 dans les tumeurs des patients atteints d'EPN-ST par PCR et séquençage Sanger. A, C. Migration sur gel d'agarose des produits de PCR, le rectangle blanc correspond à l'amplicon séquençé en B et D respectivement. B, D. La barre sur les chromatogrammes correspond au site de fusion entre les deux gènes.

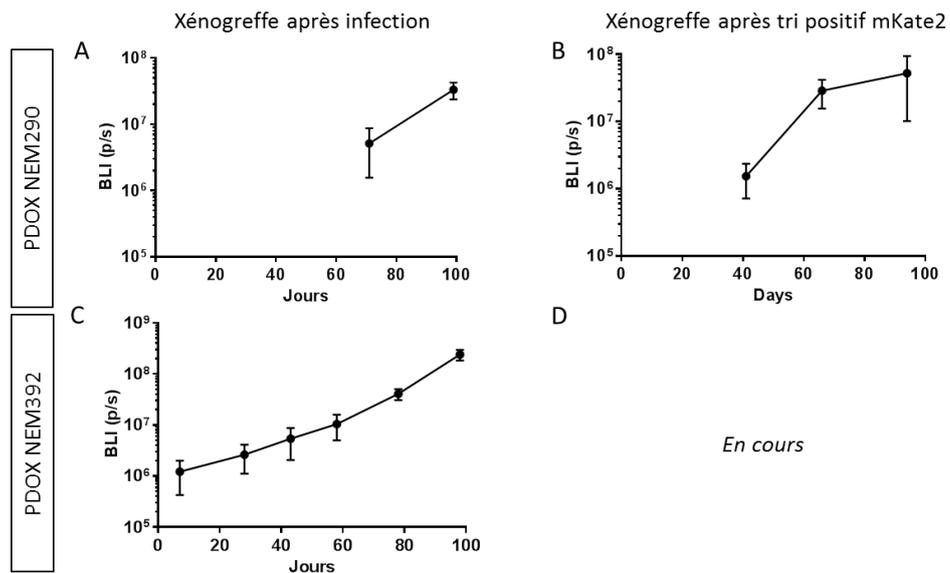


Figure 36 : Suivi longitudinal par bioluminescence des modèles de PDOX NEM290 et NEM392 après infection et après le premier passage avec les cellules sélectionnées mKate2 positives. A, C. Suivi des xénogreffes issues des premières xénogreffes bioluminescentes, n=2 et n=5 respectivement. B, D. Suivi des xénogreffes issues de la deuxième génération de xénogreffes après sélection des cellules mKate2 positives, n=3.

2.3. Fusion *RELA/C11orf95*

Pour la PDOX NEM415, la tumeur du patient dont elle est issue présente un remaniement *RELA* ou *C11ORF95* observé en FISH. Nous avons voulu retrouver cette fusion par PCR chez le patient. Nous nous sommes tout d'abord focalisé sur les deux fusions les plus fréquentes décrites dans la littérature en utilisant NEM382 comme contrôle positif (voir introduction). Il a été possible de détecter les deux types de fusion dans la tumeur du patient NEM382 par séquençage ciblé (B, D, Figure 35). En revanche, les deux types de fusion n'ont pas été amplifiés par PCR pour le patient NEM415 (A, C, Figure 35). La FISH de ce patient étant positive pour le gène *RELA*, la tumeur possède donc un remaniement soit avec *C11orf95* comme partenaire mais avec un point de cassure différent des fusions 1 et 2, soit avec un autre partenaire. Pour répondre à cela, un séquençage du transcriptome est en cours de réalisation dans la tumeur de ce patient.

3. Développement de modèles PDOX bioluminescents

L'un des désavantages quant à l'utilisation des PDOX est de ne pas pouvoir suivre *in vivo* la croissance tumorale et de ne se restreindre qu'à l'étude de survie. C'est pour cela que nous avons voulu développer des modèles de PDOX bioluminescents. Lors d'un passage classique de PDOX de DIPG ou d'EPN, les cellules tumorales sont marquées avec la luciférase (voir matériel et méthode). Une fois infectées, les cellules sont greffées directement et la BLI est mesurée tous les 15-25 jours. Lors de la première greffe après infection des cellules, on observe pour les 2 modèles développés, une augmentation croissante de la BLI avec un temps de survie des animaux semblables au PDOX non marquées : 3,5 mois pour la PDOX NEM290 et la PDOX NEM290 mKate2-luc ; 3,5 mois pour la PDOX NEM392 et la PDOX NEM392 mKate2-luc (A, C, Figure 36). L'infection ne semble donc modifier ni la tumorigénicité, ni l'agressivité des cellules tumorales.

Lorsque ces souris deviennent symptomatiques, la tumeur est à nouveau dissociée et les cellules tumorales mKate2 positives sont triées par FACS afin d'obtenir une population stable en cellules marquées (voir matériel et méthode). Les xéno greffes obtenues à partir de ces cellules présentent aussi une augmentation de BLI avec un temps de survie identique au passage précédent (B, D, Figure 36). De même, les souris présentent des signes neurologiques pour une BLI de 10^8 comme pour les PDOX avant le tri au FACS. On peut alors ici supposer que la quasi-totalité des cellules tumorales sont infectées. En effet, nous avons pu mettre en

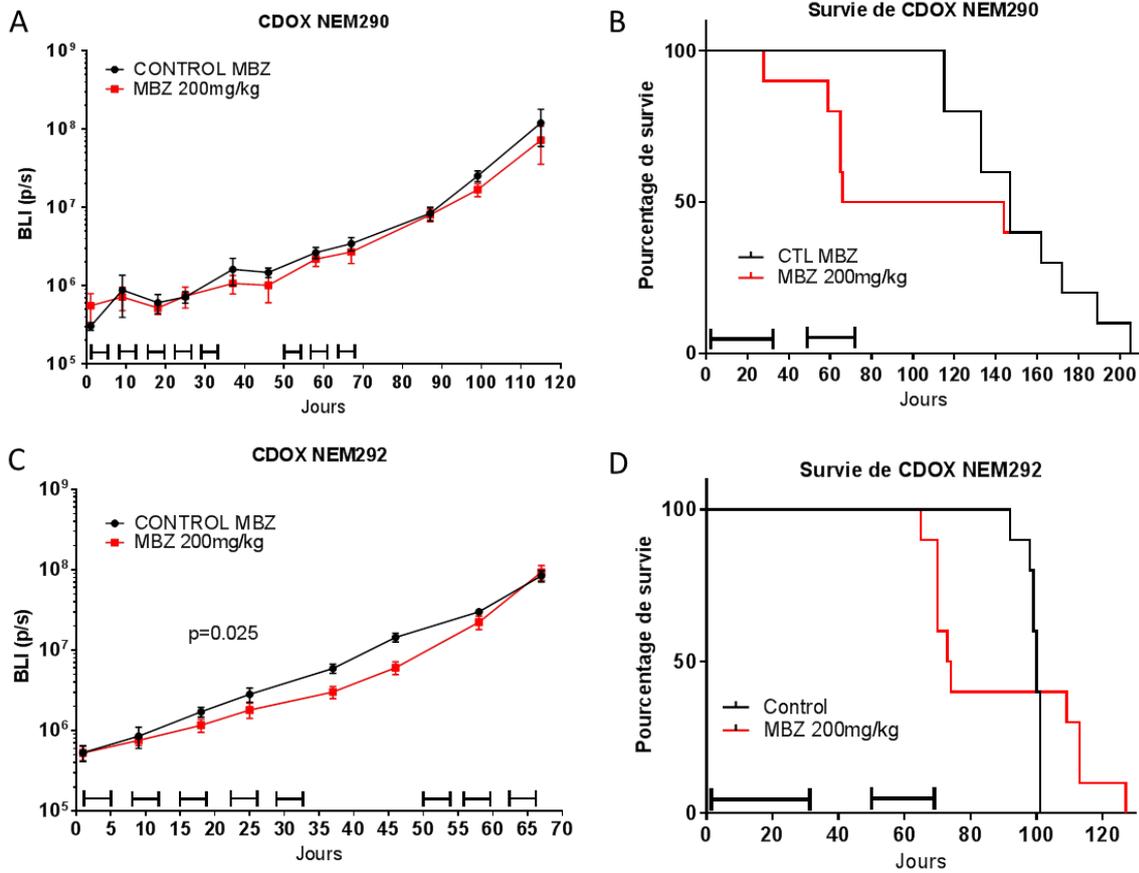


Figure 37 : Évaluation préclinique *in vivo* de l'activité du MBZ « Sigma » sur la croissance tumorale et la survie des animaux dans les modèles CDOX NEM290 et NEM292 de DIPG. A, C. Suivi longitudinal de la croissance tumorale par BLI au niveau du tronc cérébral après injection du véhicule (A, n=10 ; B, n=10) ou du MBZ (A, n=5 ; D, n=10). Les BLI sont exprimées en moyenne \pm écart type. B, D. Suivi de la mortalité des animaux après injection du véhicule (A, n=10 ; B, n=10) ou du mébendazole (A, n=9 ; D, n=10). Les barres correspondent aux semaines de traitement.

culture ces cellules tumorales, juste après infection, et plus de 90% de ces cellules expriment la protéine fluorescente mKate2 (données non montrées).

4. Évaluations thérapeutiques du Mébendazole dans le DIPG

4.1. Evaluation de la poudre « sigma »

In vitro, le MBZ a montré une cytotoxicité importante pour de faible IC50, inférieure au micromolaire. Ce médicament, possédant déjà une autorisation de mise sur le marché, pourrait très rapidement être transféré en clinique. Nous avons voulu confirmer son efficacité *in vivo* sur nos modèles de CDOX. Deux modèles de CDOX, NEM290 et NEM292, ont été traités 5 fois par semaine, schéma thérapeutique ayant montré une efficacité anti-tumorale dans un modèle de gliome (Bai et al., 2011) (Figure 37). Dans cette étude, la dose utilisée, 50 mg/kg, n'induisait qu'une faible diminution de la croissance tumorale. Pour obtenir une meilleure réponse dans nos modèles, nous avons décidé d'utiliser une dose supérieure, 200 mg/kg qui n'a montré aucun signe de toxicité en clinique. Après 5 semaines de traitements sans aucun signes de toxicité systémique, nous avons arrêté le traitement pendant 2 semaines. Nous avons ensuite poursuivi le traitement et étonnement nous avons observé une toxicité systémique lors ces dernières semaines. En effet, les souris présentaient un état général dégradé, une perte de poids et de tonus liés à une anémie. La reprise du MBZ a induit une très forte morbidité, non liée à la croissance tumorale, puisque plus de la moitié de l'effectif décède avec des BLI inférieures à 10^7 (B, D, Figure 37). Nous avons donc arrêté la prise du médicament afin d'observer un éventuel effet antitumoral.

Si l'on compare les courbes de suivi de BLI, pour la CDOX NEM290, on n'observe aucune différence ni dans la croissance tumorale ($P=0.644$, test statistique de permutation), ni dans le temps de survie des animaux ($P=0.586$, Logrank-test) (A, B, Figure 37). En revanche, pour la CDOX NEM292, on observe une diminution significative de la croissance tumorale entre J25 et J50 dans le groupe traité au MBZ ($P=0,025$, test statistique de permutation) mais qui est suivie d'une reprise très rapide de la croissance tumorale. La survie des animaux traités au MBZ comparativement au groupe contrôle est augmentée mais reste non significative aux vues de la toxicité du médicament ($P=0.700$, test Logrank) (C, D, Figure 37).

Le MBZ administré de façon chronique induit une toxicité systémique mortelle chez la souris Nude pour une dose de 200mg/kg. Le profil des courbes de croissance tumorale chez

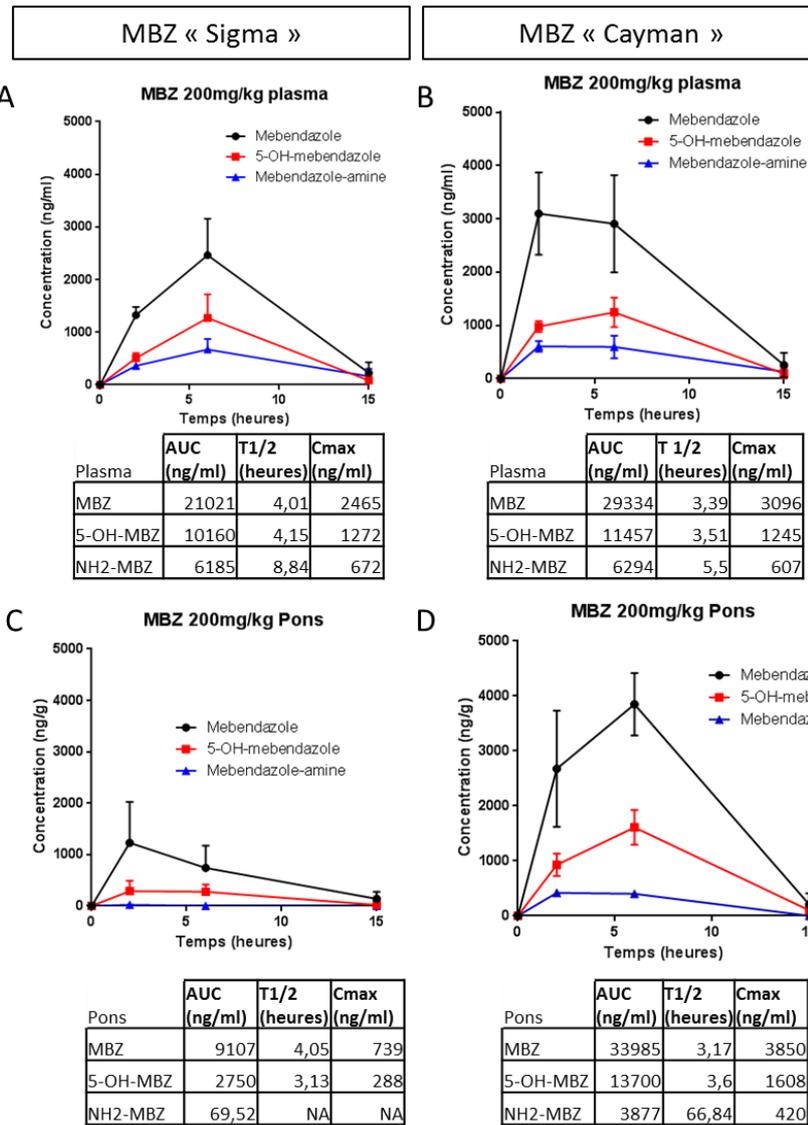


Figure 38 : Pharmacocinétique et distribution du MBZ et de ses métabolites dans le sang et le tronc cérébral chez la souris Nude dosés par spectrométrie de masse. A, B. Dosage dans le plasma ; C, D. Dosage dans le tronc cérébral ; A, C. Poudre « Sigma » ; B, D. Poudre « Cayman ». AUC : Aire sous la courbe, T1/2 : temps de demi vie, Cmax : concentration maximum.

les animaux survivants ne permet pas d'affirmer statistiquement une réponse anti-tumorale du MBZ avec une amélioration de la survie dans nos deux modèles de DIPG testés.

4.2. Pharmacocinétique et distribution intracérébrale du mébendazole

A la vue des résultats peu satisfaisants de l'évaluation préclinique du MBZ sur nos deux modèles (Figure 37), nous nous sommes demandé si la quantité de MBZ et de ses deux métabolites actifs était suffisante dans le tissu cérébral pour atteindre la concentration cytotoxique observée *in vitro*. Pour cela, nous avons réalisé un dosage du MBZ sanguin et intracérébral à différents points après injection (A, C, Figure 38). On observe une très bonne absorption du produit dans le sang, la concentration plasmatique maximale étant d'environ 2500 ng/ml. En revanche, le passage intracérébral reste modéré puisque moins de 800ng/g de MBZ est retrouvé dans le tronc cérébral avec une très faible concentration de ses métabolites actifs, 2h post traitement. Malgré cela, la concentration tissulaire reste suffisante puisque 800ng/g équivaut à environ 3 μ M, dose cytotoxique en comparaison aux données *in vitro*. Cependant, *in vitro*, les cellules sont exposées durablement aux molécules, équivalent au temps de demi dans un milieu aqueux. Ici, *in vivo*, le temps de demi-vie du médicament est d'environ 4h, le MBZ n'est plus retrouvé 15h après le traitement ni dans le sang, ni dans le tissu cérébral (A, C, Figure 38). La fréquence d'administration du MBZ n'est donc peut-être pas suffisante *in vivo* pour que son effet soit durable sur les cellules tumorales et induise la mort cellulaire.

Il a été montré que le MBZ se présente sous trois différentes formes cristallines : les polymorphes A, B et C. Cependant, seul le polymorphe C passe la BHE et présente un effet anti-tumoral (Bai et al., 2015). Nous avons analysé la poudre « sigma », utilisée lors de l'évaluation thérapeutique, par spectrométrie Raman (donnée non montrée). Cette analyse nous a permis de mettre en évidence que cette poudre ne contenait quasiment pas de polymorphe C. L'accès à la poudre contenant uniquement le polymorphe C étant impossible pour des études *in vivo*, nous nous sommes intéressé à la poudre vendue par Cayman Biochemical utilisée dans l'étude *in vivo* sur les modèles de gliome (Bai et al., 2011). Nous avons tout d'abord réalisé la même pharmacocinétique afin de vérifier que le médicament est plus adapté à une utilisation intracérébrale. On observe qu'avec la poudre « Cayman », le MBZ pénètre de manière plus importante le tissu cérébral et est de plus, mieux absorbé au niveau sanguin (B, D, Figure 38). Le dosage sanguin montre une concentration plasmatique supérieure à 3000 ng/ml et le dosage tissulaire montre une concentration dans le tronc cérébral d'environ 4000 ng/g, soit plus de 4X la concentration retrouvée dans la poudre

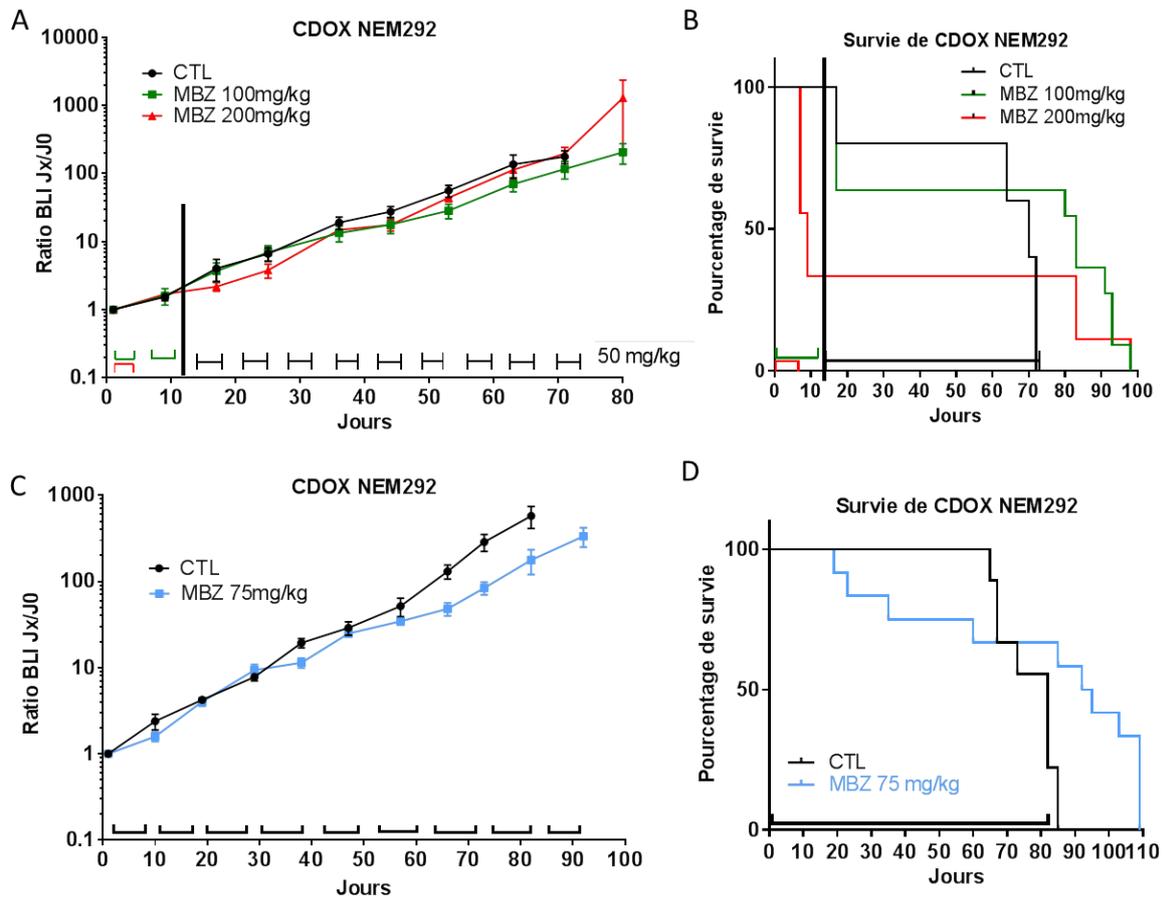


Figure 39 : Evaluation préclinique *in vivo* de l'activité du MBZ « Cayman » sur la croissance tumorale et la survie des animaux dans les modèles CDOX NEM290 et NEM292 de DIPG. A, C. Suivi longitudinal de la croissance tumorale par bioluminescence au niveau du tronc cérébral après injection du véhicule (A, n=8; C, n=8) ou du mébendazole 100 mg/kg (n=6), 200mg/kg (n=4) ou 75mg/kg (n=6). Les BLI sont exprimées en moyenne \pm SEM. B, D. Suivi de la mortalité des animaux après injection du véhicule (A, n=10; B, n=9) ou du mébendazole 100 mg/kg (n=10), 200mg/kg (n=10) ou 75mg/kg (n=10). Les barres correspondent aux semaines de traitement.

« sigma ». Il est en de même pour les deux métabolites actifs du MBZ, le 5-OH-MBZ et le NH₂-MBZ. Le temps de demi-vie du médicament reste le même, ainsi que sa concentration nulle 15h post-traitement, la cinétique d'élimination du médicament étant la même pour les deux différentes poudres. La poudre « Cayman » semble donc plus adaptée dans nos modèles tumoraux intracrâniens.

4.3. Evaluation de la poudre « Cayman »

Nous avons évalué l'effet thérapeutique de la poudre « Cayman » sur le modèle de CDOX NEM292 qui semble être plus sensible au MBZ d'après la première étude (Figure 37). Au début de l'étude, nous avons choisi les doses 100 et 200 mg/kg avec un schéma thérapeutique de deux semaines de traitement sur trois afin de permettre aux souris de pouvoir récupérer. Cependant, ces deux doses sont apparues comme extrêmement toxique dès la première semaine de traitement pour la dose 200 mg/kg et dès la deuxième semaine pour la dose 100 mg/kg (B, Figure 39). La dose administrée a alors été baissée à 50 mg/kg dès la troisième semaine de traitement pour les souris survivantes.

Concernant l'effet anti-tumoral du MBZ, on observe une légère diminution de la croissance tumorale pour les souris traitées au MBZ mais qui n'est pas significative ($P=0.256$, test statistique de permutation) avec une augmentation de la survie des souris qui passe d'environ 70 jours à 100 jours ($P=0.160$, test logrank non significatif à cause de la mortalité des souris due à la toxicité du MBZ). Pour la dose de 50mg/kg, les souris ne présentent pas de signes de toxicité liés à la molécule, mais elle ne permet pas d'induire un effet net sur la croissance tumorale.

Nous avons donc réalisé la même étude pour une dose légèrement supérieure, 75mg/kg (C, D, Figure 39). De nouveau, nous nous sommes confrontés à une toxicité de la molécule utilisée chroniquement, puisque 40% animaux traités au MBZ sont décédés au long du traitement. Nous avons décidé de ne pas diminuer la dose injectée car les animaux survivants ne présentaient aucun signe de toxicité et nous aurions dû nous rapprocher de la dose utilisée précédemment et donc répliquer une même expérience. On observe une diminution significative de la croissance tumorale à partir de la 6^{ème} semaine de traitement ($P=0.0267$, test statistique de permutation) et une augmentation significative de la survie d'environ 25 jours ($P=0.0443$, test Logrank).

Chez la souris Nude, le traitement chronique quotidien du MBZ à une dose supérieure à 50 mg/kg induit une toxicité systémique mortelle. L'effet thérapeutique du MBZ à une dose non toxique n'est que très léger. L'index thérapeutique du MBZ, correspondant au rapport

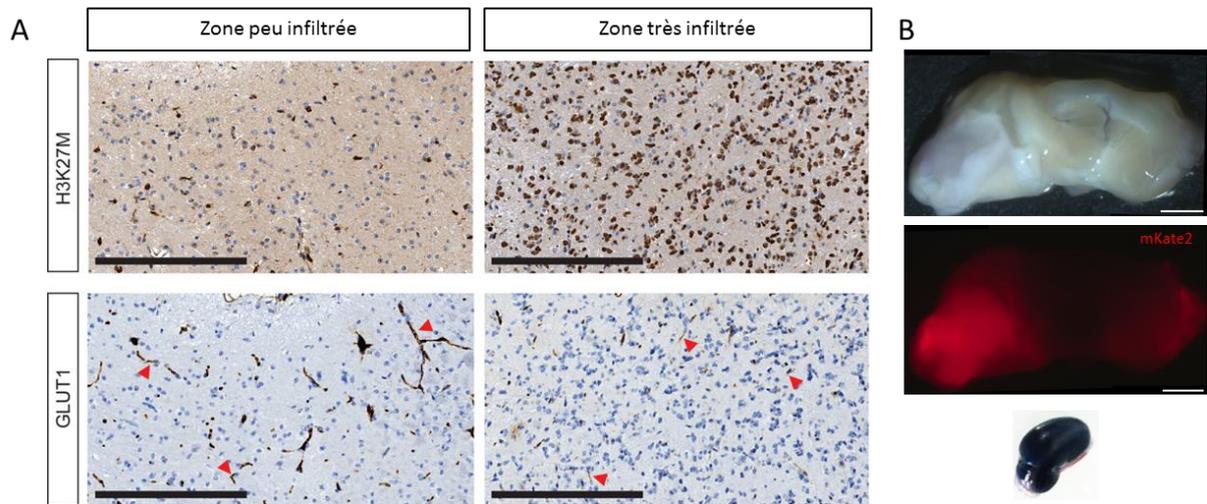


Figure 40 : Conservation des propriétés barrières de la BHE dans le modèle CDOX NEM292. A. Marquage GLUT1 de coupes histologiques dans une zone peu infiltrée par les cellules tumorales et dans une zone densément infiltrée. Les flèches rouges correspondent aux cellules endothéliales positives. La barre d'échelle correspond à 250 μ m. B. Coupe sagittale d'un cerveau de la CDOX NEM292 après injection intraveineuse de bleu d'Evans. Les cellules tumorales sont marquées en rouge en fluorescence et le bleu d'Evans colore le tissu en bleu en contraste de phase. Le rein coloré en bleu sert de contrôle positif. La barre d'échelle correspond à 1mm.

entre la dose létale pour 50% des effectifs et la dose efficace pour un effet désiré observé dans 50% de la population, apparaît donc extrêmement faible dans nos modèles.

5. Potentialisation de l'effet thérapeutique du panobinostat après ouverture de la BHE

5.1. Conservation de la BHE dans nos modèles CDOX et PDOX

Plusieurs rapports ont montré qu'une proportion de tumeurs de DIPG au moment du diagnostic présentait une BHE relativement intacte et fonctionnelle (voir introduction). Nous avons donc vérifié l'état de la BHE dans nos modèles de CDOX. Tout d'abord, en regardant la coloration HES, nous n'observons pas de prolifération microvasculaire dans les zones denses en cellules tumorales dans le tissu ou de zones nécrotiques, même au stade tardif du développement de la tumeur (Figure 28). De plus, nous avons évalué l'expression de GLUT1, transporteur du glucose, pour laquelle la perte d'expression dans les cellules endothéliales peut accompagner la rupture de la BHE. Dans la CDOX NEM292, nous observons une coloration des cellules endothéliales composant les vaisseaux et les capillaires dans le parenchyme cérébral. Cependant, la région du cerveau infiltrée avec des cellules tumorales montre une coloration beaucoup moins intense (A, Figure 40). Compte tenu de ces différences, nous avons vérifié l'existence d'une perturbation fonctionnelle de la BHE en évaluant l'extravasation du colorant bleu Evans après injection intraveineuse dans la CDOX NEM292 (B, Figure 40). On observe bien que le cerveau est resté non coloré, sans évidence de diffusion du colorant bleu dans le cerveau et en particulier dans le tronc cérébral infiltré, contrairement à d'autres organes périphériques, tel que le rein. Ces expériences ont aussi été réalisées chez la souris saine et dans la CDOX NEM290 (données non montrées). Nos CDOX de DIPG constituent donc de bons modèles pour étudier l'intérêt thérapeutique lié à l'ouverture de la BHE par des US.

5.2. Validation de l'ouverture de la BHE avec les US

5.2.1. Ouverture de la BHE chez la souris saine

Dans un premier temps, nous avons adapté le système SonoCloud aux souris Nude de manière reproductible entre les animaux. Pour cela, le transducteur est placé à 0,5 mm au-dessus de la souris placée dans le cadre stéréotaxique (voir matériel et méthode). Un gel de couplage lie les deux éléments afin que les US puissent se propager de manière homogène.

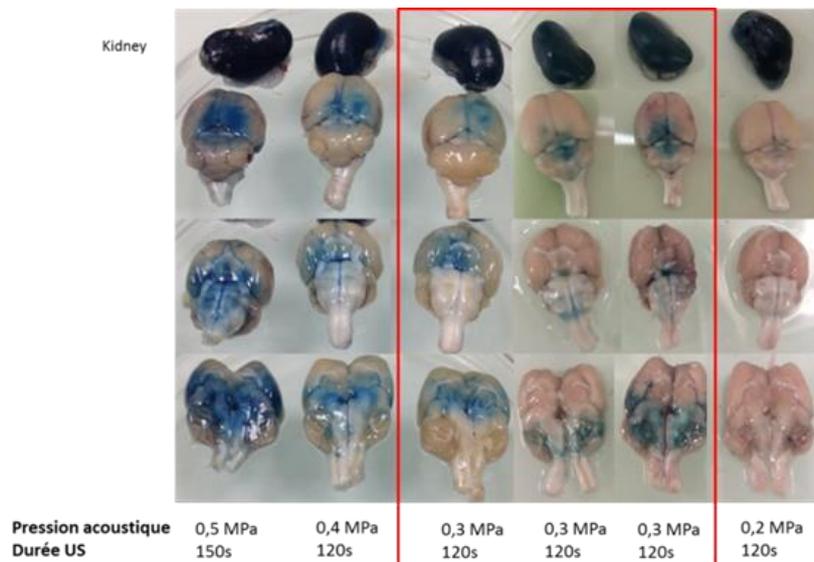


Figure 41 : Impact de la pression acoustique des US sur l'ouverture de la BHE chez la souris saine. Les reins servent de contrôles positifs d'injection de bleu d'Evans dans la circulation sanguine. Les cerveaux sont photographiés du dessus, du dessous et coupés en deux en longitudinal. La zone où apparaît le bleu correspond à la zone d'ouverture de la BHE. Les cerveaux encadrés correspondent à des répliques techniques.

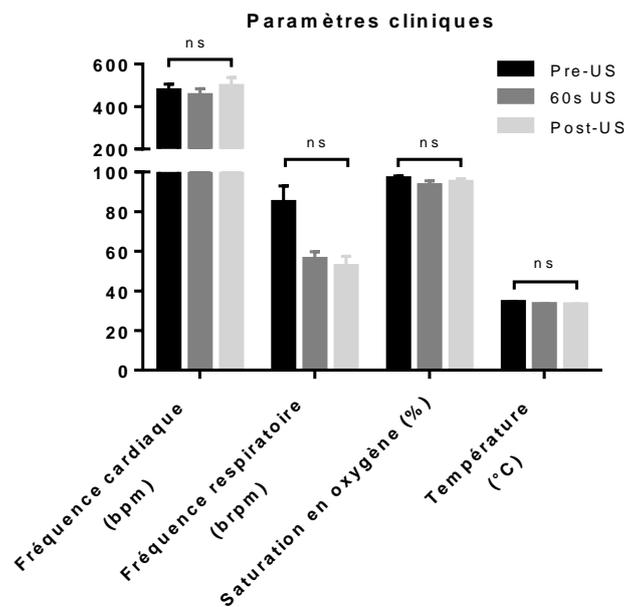


Figure 42 : Suivi de différents paramètres cliniques avant, pendant et après une sonication de 0.3MPa pendant 120s chez la souris saine. Les différentes variations des paramètres sont non significatives entre les différents temps (test de Tukey). Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, n=13.

Nous avons observé qu'une pression de 0,5 MPa provoquait une détresse générale de la souris nécessitant l'euthanasie. A l'autopsie, une forte intensité de bleu d'Evans est observée dans la zone couverte par le transducteur mais aussi la présence d'hémorragie intracérébrale (Figure 41). Pour une pression de 0,4 MPa, les souris se réveillent tardivement après l'anesthésie avec un temps de réveil supérieur à 10 min contrairement à des souris non-traitées où le temps de réveil est de quelques secondes, et restent prostrées. A l'autopsie, la présence de coloration est associée à des pétéchies sur la zone traitée avec les US. Pour une pression de 0,3 MPa, les souris se réveillent normalement et ne présentent pas d'effets secondaires. A l'autopsie, les cerveaux sont colorés en bleu dans la zone traitée sans présence d'anomalies vasculaires macroscopiques. Pour une pression de 0,2 MPa, les souris se réveillent normalement et ne présentent pas d'effets secondaires. En revanche, à l'autopsie, la présence de colorant est très faible et limitée à quelques structures riches en substances blanches.

Dans le tronc cérébral, on retrouve des structures nécessaires au maintien du rythme cardiaque, de la pression sanguine et de la fréquence respiratoire. Des lésions tissulaires de ces zones peuvent affecter ces fonctions vitales. C'est pour cela que pour vérifier la sûreté du SonoCloud dans le tronc cérébral, nous avons suivi quelques paramètres cliniques pendant la sonication de la souris pour une pression de 0,3 MPa (Figure 42). On n'observe aucune variation pour les différents paramètres étudiés ; fréquence cardiaque d'environ 450 bpm, fréquence respiratoire variant de 50 à 90 bpm, saturation en oxygène d'environ 98% et température d'environ 35°; avant, pendant et après la sonication chez la souris anesthésiée. On observe une légère hausse de la fréquence respiratoire avant les US qui s'explique par le fait que les animaux sont tout juste anesthésiés et par conséquent leur fréquence respiratoire n'est pas encore stabilisée.

A partir de ces résultats obtenus chez la souris saine, l'ouverture de la BHE a été permise pour une pression de 0,3 MPa sans effets indésirables à court terme.

5.2.2. Ouverture de la BHE chez la souris porteuse d'une tumeur de DIPG

Nous avons ensuite vérifié que les US permettaient d'ouvrir la BHE dans nos modèles CDOX de DIPG au niveau des zones tumorales. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles de CDOX NEM290 et NEM292 à un stade terminal dans l'évolution de la maladie. On observe autant dans la souris saine que dans les deux modèles de CDOX une coloration du tissu cérébral pour le bleu d'Evans dans l'axe transversal des ondes produites par le transducteur (Figure 43). Selon les coupes sagittales, on observe une coloration bleue dans le cervelet, l'arrière du cortex cérébral, la ligne médiane et le tronc cérébral avec une coloration

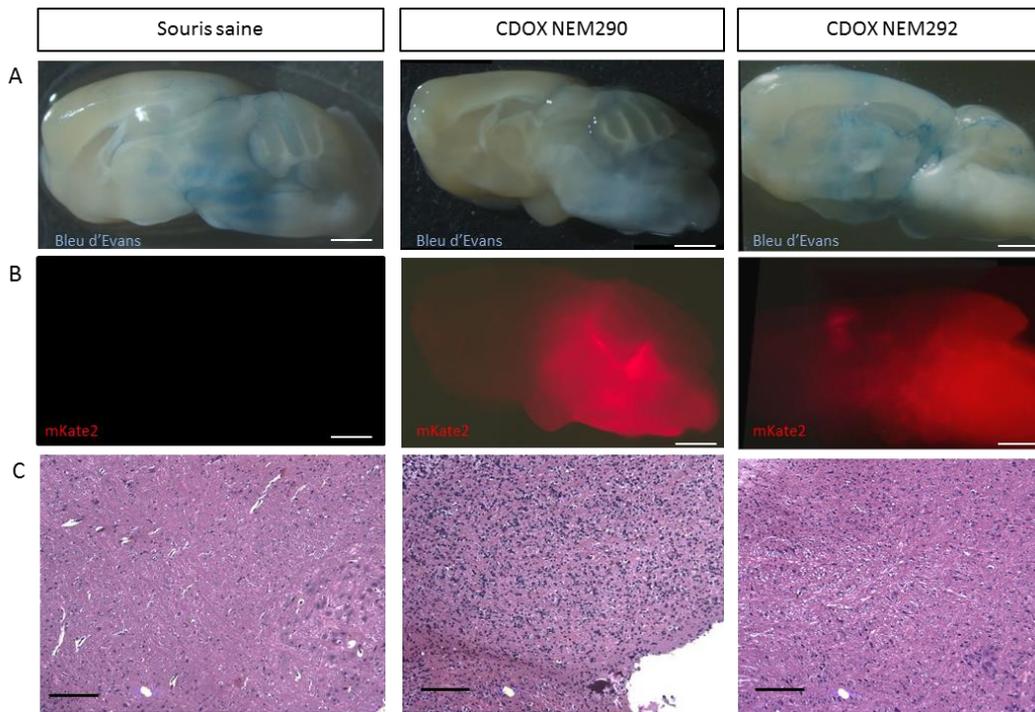


Figure 43 : Mise en évidence de l'ouverture de la BHE par l'effet des US à l'aide de la coloration au bleu Evans chez la souris saine et dans les modèles CDOX NEM290 et NEM292 et de son impact histologique. Coupe sagittale de cerveau observée à la loupe par A. Contraste de phase ; B. Fluorescence ; C. marquage HES. La barre d'échelle correspond à A. B. 1mm ; C. 200µM.

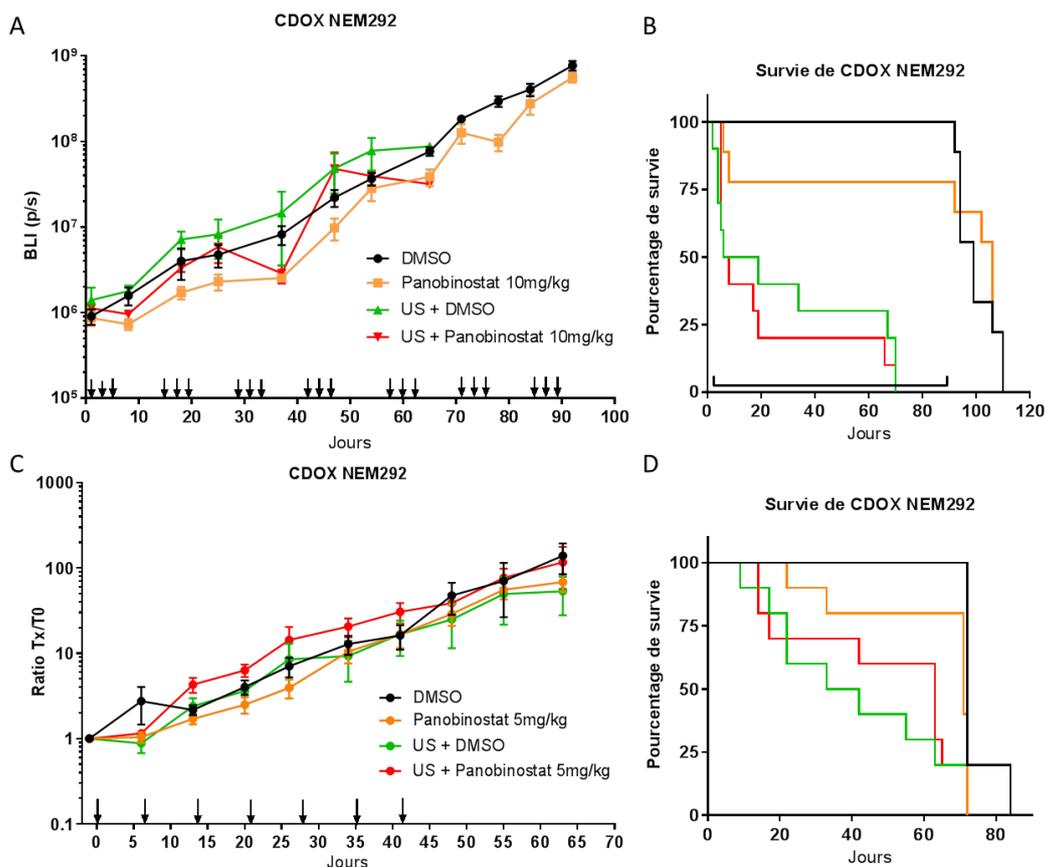


Figure 44 : Évaluation préclinique *in vivo* de l'activité du panobinostat sur la croissance tumorale et la survie des animaux avec et sans ouverture de la BHE par US dans le modèle CDOX NEM292. A, C. Suivi longitudinal de la croissance tumorale par bioluminescence au niveau du tronc cérébral après injection du véhicule sans US (A, n=9; C, n=10) et avec US (A, n=3; C n=6) ou du panobinostat à 10 mg/kg sans US (A, n=7) et avec US (A, n=2) ou 5 mg/kg sans US (C, n=10) et avec US (n=6). Les BLI sont exprimées en moyenne \pm SEM. B, D. Suivi de la mortalité des animaux après injection du véhicule (B, DMSO ; D, PEG/Glucose/DMSO ; ou du panobinostat 10 mg/kg ou 5mg/kg (n=10 pour tous les groupes). Les flèches correspondent aux jours de traitement.

hétérogène. En effet, les zones riches en matière blanche semblent être plus colorées. Plus important, la zone cérébrale contenant les cellules tumorales est marquée par le colorant, signifiant qu'une perturbation de la BHE existe dans la zone tumorale (A, B, Figure 43). De plus, l'histologie du tronc cérébral de ces souris après US ne présente pas de lésions tissulaires microscopiques, pétéchies ou de déstructuration tissulaire (C, Figure 43). Les US couplés aux microbulles permettent donc l'ouverture de la BHE dans la zone tumorale sans perturbations organisationnelles du tissu.

5.3. *Evaluation thérapeutique du panobinostat dans un modèle CDOX de DIPG avec et sans US*

Après avoir validé les différents paramètres d'ouverture de la BHE dans nos modèles de CDOX, nous avons voulu potentialiser l'effet du panobinostat *in vivo*, agent thérapeutique prometteur *in vitro* mais passant très faiblement la BHE. Pour cela, une première approche a été de traiter les animaux 3 fois par semaine toutes les deux semaines (A, B, Figure 44). Ce schéma thérapeutique correspond au premier essai clinique de phase I du panobinostat utilisé chez les enfants atteints de DIPG aux États-Unis (NCT02717455). Nous observons que les souris ayant reçu les US avec le placebo décèdent très rapidement lors des premiers traitements, pour une mortalité de 50% des animaux après la première semaine de traitement seulement. La répétition des US semble donc être un élément majeur quant à la toxicité observée ; le passage du DMSO, solvant du panobinostat, dans le cerveau pouvant être aussi une seconde cause de la nocivité observée. Nous avons donc, parallèlement à cette expérience, tester la répétition de 3 séries d'ultrasons par semaine sur des animaux sains sans injecter de produits en parallèle. Nous n'avons observé aucune toxicité.

Dans cette première évaluation préclinique du panobinostat dans notre laboratoire, nous avons observé une légère toxicité du panobinostat seul à 10mg/kg, les animaux présentant des troubles gastro-intestinaux importants provoquant une grave déshydratation parfois fatale. Ces souris traitées seulement au panobinostat présentent une évolution tumorale significativement diminuée entre le premier jour du traitement et 4 semaines post-traitement ($P=0,032$, test statistique de permutation). Malgré tout, elles ne présentent pas d'allongement du temps de survie, probablement expliqué par une réponse anti-tumorale qui ne reste que transitoire.

A la vue de ces premiers résultats, nous avons réalisé une autre évaluation thérapeutique en diminuant le nombre de traitement afin de limiter la toxicité liée à la fréquence des US et en diminuant la dose du panobinostat injectée, réduisant ainsi la toxicité systémique du produit. De plus, une nouvelle formulation permet de mieux dissoudre le panobinostat dans

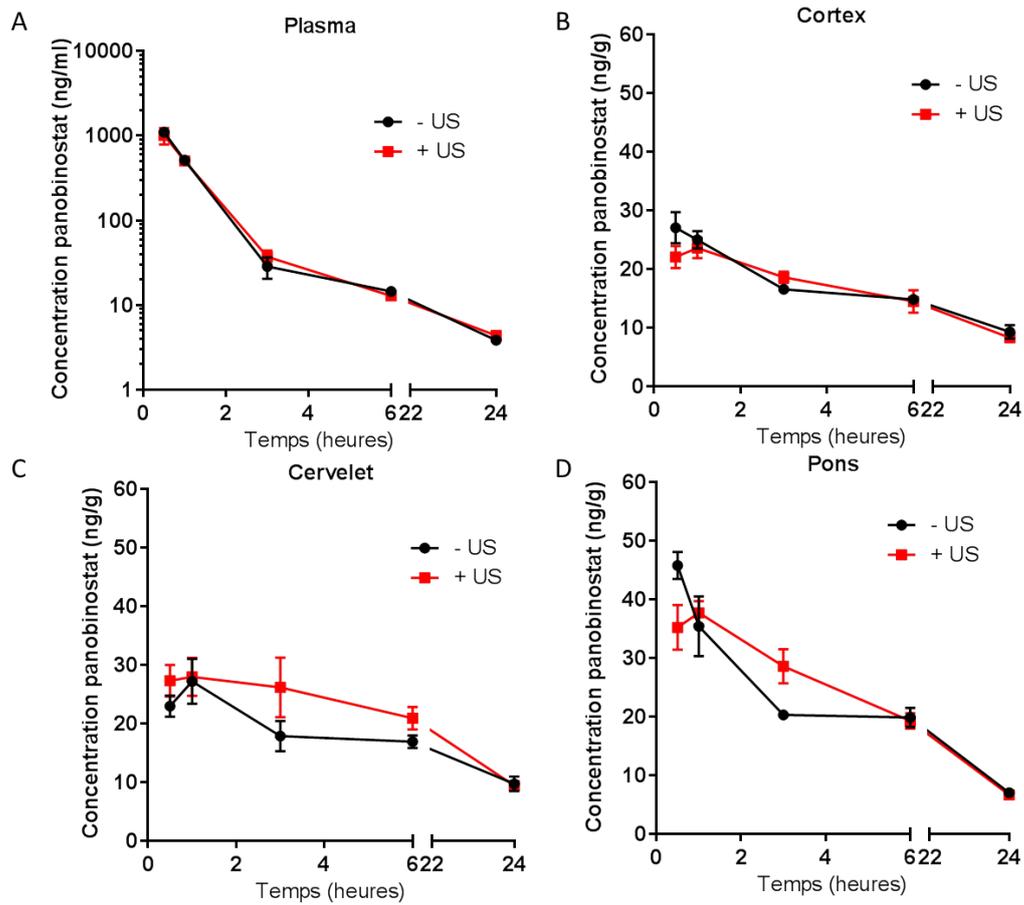


Figure 45 : Pharmacocinétique et distribution du panobinostat dans le sang et le cerveau chez la souris ayant reçue ou non des ultrasons au niveau du cervelet et du tronc cérébral. Dosage par spectrométrie de masse dans A, le plasma ; B, les hémisphères cérébraux ; C, le cervelet ; D, le tronc cérébral. En rouge la courbe correspond aux souris ayant reçues des US couplés aux microbulles et la courbe noire correspond aux souris ayant reçues uniquement les microbulles (n=5 animaux par point de cinétique).

l'excipient composé de 2% DMSO, 60% glucose et 38% PEG400 ; rendant ainsi le produit moins toxique au niveau intestinal et permettant une meilleure absorption sanguine (données non montrées). Les animaux ont été traités une fois par semaine toutes les semaines en supposant qu'une fois le panobinostat entré dans le cerveau, sa disponibilité à la cellule tumorale serait plus grande mais aussi plus longue, la BHE se refermant environ 6h après les US, emprisonnant ainsi la molécule dans le tissu cérébral.

Malgré l'allègement du schéma thérapeutique, nous observons à nouveau une mortalité très élevée des souris ayant reçu les US avec le placebo, 50% des animaux décédant après seulement 5 semaines de traitements (D, Figure 44). Cette toxicité s'est avérée fortuite puisqu'une seule souris n'est décédée lors de chaque semaine de traitement, ce qui nous a poussé à continuer l'étude, supposant des problèmes techniques liés à la génération des US, les souris décédant pendant ou très rapidement après le traitement. Nous observons la même toxicité chez les animaux ayant reçu les ultrasons avec le panobinostat. De plus, nous n'observons aucune différence significative quant à l'évolution tumorale dans les différents groupes traités avec le panobinostat avec ou sans US en comparaison avec les souris non traitées (C, Figure 44). Sous réserve d'une toxicité due à la fréquence répétée des US, le traitement par US ne potentialise pas l'effet du panobinostat sur la croissance tumorale et la survie des animaux qui reste très limité en agent thérapeutique seul.

5.1. Pharmacocinétique et distribution intracérébrale du panobinostat chez la souris saine avec et sans US

Suite aux résultats d'évaluation anti-tumorale *in vivo* non concluant, nous avons voulu connaître la cinétique de distribution du panobinostat dans le tissu cérébral avec et sans US afin de vérifier que l'on potentialise bien l'entrée du médicament dans le cerveau avec les US. Le dosage sanguin du panobinostat ne montre aucune différence entre les deux groupes, signifiant que l'absorption sanguine est identique (A, Figure 45). De même, le dosage tissulaire dans le cortex ne montre aucune différence entre les deux groupes, la BHE n'étant pas ouverte dans cette région (B, Figure 43). En revanche, la position du transducteur permet l'ouverture de la BHE dans le cervelet et le tronc cérébral comme nous l'avons montré précédemment (Figure 43). Le dosage dans ces deux structures ne montre qu'une très faible augmentation significative de la concentration tissulaire du panobinostat 3h post-injection dans le cervelet ($P=0.0442$, test ANOVA) ; et le tronc cérébral ($P=0.0461$, test ANOVA) (C, D, Figure 45). Pour les autres temps, il n'y a aucune différence dans la concentration de panobinostat avec et sans US.

Les US couplés aux microbulles ne potentialisent donc pas l'entrée du panobinostat dans le tissu cérébral.

CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Développement et caractérisation de modèles *in vivo* de tumeurs gliales pédiatriques

1.1. Dérivation de modèles PDOX et CDOX de DIPG

Nous avons montré ici qu'il est possible de dériver des xénogreffes stéréotaxiques à partir de biopsies de DIPG réalisées au diagnostic avec deux méthodes distinctes, basées soit sur l'implantation directe de cellules tumorales juste après la biopsie, soit après culture pendant quelques passages *in vitro* (PDOX ou CDOX, respectivement). Le comportement clinique des souris reproduit l'histoire naturelle de la maladie, avec des symptômes similaires aux patients qui apparaissent brutalement après une longue période silencieuse (Robison and Kieran, 2014).

Les taux de prise des greffes pour les deux différents modèles sont élevés, environ 50-70% pour PDOX et CDOX, même après la congélation des cellules tumorales, ce qui est beaucoup plus élevé que le taux de prise d'autres tumeurs pédiatriques malignes que nous étudions en parallèle (Vassal et al., 1996) (Gaspar et al., 2006). Nos résultats de greffe utilisant des souris NSG sont cependant trop limités pour conclure fermement que le taux de prise n'est pas supérieur aux souris nude, en particulier pour le développement de PDOX. Nous n'observons pas de différences de tumorigénicité entre les méthodes de xénogreffe directes et indirectes ($P=0.305$, test exact de Fisher). De plus, le taux de prise de xénogreffe n'est pas lié au type d'histone H3 muté.

Nous avons trouvé une corrélation significative entre la survie du patient et de sa CDOX associée, non retrouvée chez le patient en comparaison à sa PDOX. Cette différence pourrait s'expliquer par le nombre distinct de cellules tumorales injectées entre les modèles PDOX qui ne peut pas être contrôlé avant l'injection contrairement aux modèles CDOX. En outre, nous avons observé que le temps de survie des PDOX tend à être plus court que des CDOX, ce qui pourrait refléter un impact du stroma et du microenvironnement injectés avec les cellules tumorales, ou au contraire une modification des cellules apporté par la culture *in vitro*. Il existe peu de publications décrivant des modèles de xénogreffes de DIPG et seules des informations limitées sont disponibles dans la littérature sur la meilleure façon de générer ces modèles. La plupart des groupes de recherche injectent les cellules tumorales à partir d'autopsies et non de biopsies stéréotaxiques chez des souris nouveau-nés NSG ou nude, ou chez des souris adultes NOD-scid (Monje et al., 2011) (Kambhampati et al., 2015) (Caretti et

al., 2014). Cependant, la plupart des informations sur les transplantations en série ne sont pas fournies, limitant ainsi la possibilité de comparer les différentes stratégies.

Les analyses par immunohistochimie détaillées ont démontré que les tumeurs PDOX et CDOX se ressemblent, ce qui indique que la sélection *in vitro* des cellules tumorales ne modifie pas le phénotype des xénogreffes et que ces cellules souches neurales issues de ces cultures cellulaires sont capables de se différencier et de récapituler une tumeur dans sa complexité et diversité. De plus, seules des tumeurs d'origine humaine ont été observées dans nos modèles PDOX issus de biopsies naïves de tout traitement contrairement aux rapports publiés précédemment utilisant des échantillons autopsiques (Caretto et al., 2014). L'analyse des tumeurs a montré que les xénogreffes conservent le phénotype de la tumeur du patient en particulier les principales caractéristiques de DIPG, à savoir un phénotype infiltrant sans masse tumorale, l'absence de néovascularisation, une barrière hémato-encéphalique fonctionnelle pour la moitié des patients atteints de DIPG, la conservation de la mutation H3-K27M identifiée chez les patients et la perte de H3K27me3. En outre, nous avons observé une étroite conservation de l'expression des gènes de différenciation embryonnaire et neurale (GFAP, OLIG2 ou vimentine), ainsi que des indices de prolifération similaires entre les modèles et les tumeurs primaires. L'hétérogénéité phénotypique observée dans le DIPG primaire, plus nettement définie par la présence ou l'absence d'expression de vimentine, est aussi retrouvée dans les modèles *in vivo*. De la même manière, dans nos modèles *in vivo*, on identifie des cellules tumorales cyclantes et non-cyclantes (c'est-à-dire négatives pour MIB-1) tout comme observé dans la tumeur du patient. L'influence de la tumeur sur le parenchyme cérébral est récapitulée chez la souris, comme le montre la présence d'une astrogliosie réactionnelle et d'un œdème péricellulaire. Une évolution commune de la maladie est l'invasion des cellules tumorales dans les structures cérébrales voisines, ou même des extensions plus éloignées dans le système nerveux central. Dans les modèles *in vivo* à un stade avancé, nous avons trouvé une invasion cellulaire dans le tronc cérébral, le cervelet et le thalamus et, dans une moindre mesure, dans la moelle épinière. L'observation du cerveau entier de nos modèles identifie également la migration à longue distance par des voies préférentielles telles que les zones sous-piales et ventriculaires, ainsi que la présence de métastases dans les bulbes olfactifs. Cependant, aucune différence immuno-phénotypique particulière n'a pu être observée entre ces cellules en migration et les cellules tumorales restées dans le tronc cérébral.

Les séquences d'IRM anatomiques n'ont pas permis un suivi adéquat de ces modèles infiltrants sauf à un stade terminal. À cet égard, les modèles CDOX sont des outils puissants

permettant le suivi *in vivo* par bioluminescence seulement quelques semaines après les injections. La robustesse de l'augmentation de la bioluminescence permet de connaître précisément le stade de développement de la maladie. De même, le rapporteur fluorescent supplémentaire, la mKate2, est également particulièrement pratique pour identifier les cellules tumorales et les métastases dans le tissu frais, et permet le tri en cytométrie de flux des cellules tumorales vivantes pour une étude ultérieure. Enfin, ces modèles CDOX constituent une plate-forme puissante, car les cellules *in vitro* peuvent être modifiées à l'aide de lentivirus avant leur injection afin d'évaluer les conséquences *in vivo* de la modulation d'un gène (surexpression ou extinction). Plus récemment, nous avons réussi à développer les premiers modèles de PDOX bioluminescents de DIPG. Ces modèles pourraient être plus proches biologiquement des tumeurs des patients car aucune sélection n'a été effectuée *in vitro*. Cependant, pour valider cette hypothèse, la caractérisation de ces modèles doit être approfondie.

Un séquençage de l'exome a été réalisé au laboratoire pour comparer les tumeurs des patients à leurs modèles de CDOX et PDOX afin de voir si les mêmes mutations somatiques sont retrouvées dans les modèles et/ou si des mutations ont disparu ou sont apparues, ce qui pourrait être la conséquence d'une sélection clonale *in vitro* et/ou *in vivo*. Les analyses sont en cours. A plus long terme, un « barcoding » sera réalisé sous la forme d'insertion dans le génome des cellules tumorales d'une séquence nucléotidique unique et de plusieurs séquences nucléotidiques codant des protéines fluorescentes à réception de la biopsie (Porter et al., 2014). Cette étude nous permettra de déterminer les différents clones qui seront sélectionnés *in vitro* dans les cultures de cellules *in vitro* et *in vivo* dans les PDOX.

Nous n'avons cependant montré aucune différence entre nos PDOX et CDOX selon le sous-groupe de tumeur muté H3.3-K27M ou H3.1-K27M, que ce soit du point de vue du temps de survie des animaux dans les deux types de modèles ou du temps de doublement des tumeurs dans les CDOX, contrairement à ce que le laboratoire a décrit chez les patients (Castel et al., 2015). Les études par IHC ne révèlent pas non plus de différences phénotypiques entre les deux sous-groupes. Tout cela pourrait s'expliquer par le fait que nous n'avons à l'heure actuelle qu'une petite cohorte de modèles du sous-groupe H3.1-K27M, composée que de 2 PDOX et 2 CDOX, ce qui pourrait ne pas refléter complètement la diversité interindividuelle observée dans les DIPG. Le développement de modèles dans ce sous-groupe est donc à poursuivre. De plus, il a été montré que les deux sous-groupes de patients présentent une réponse différente à la radiothérapie, observation validée *in vitro* dans nos cultures de cellules *in vitro* (article du laboratoire en soumission). Nous sommes donc

actuellement en cours d'optimisation des conditions d'irradiation *in vivo* afin d'étudier les phénomènes de radiorésistance dans les DIPGs.

L'un des avantages de nos deux modèles *in vivo* de DIPG par rapport aux modèles génétiquement modifiés (GEM) est l'utilisation de cellules cancéreuses présentant dès le début les conséquences épigénétiques des modifications génétiques, telles que la perte globale de triméthylation résultant de l'altération H3-K27M qui nécessite un nombre important de divisions avant d'être observée, ainsi que la présence des mutations associées notamment de *TP53*, *ACVR1*, ... (Bender et al., 2013). En effet, il est difficile de récapituler dans les GEM la succession temporelle des altérations génétiques survenant au cours de l'oncogenèse. Les xénogreffes générées à partir d'échantillons au diagnostic (naïfs de traitement) peuvent utilement compléter celles générées par les autopsies. La première représente les étapes initiales de la maladie, c'est-à-dire la situation idéale pour tester de nouveaux médicaments à incorporer dans la prise en charge au diagnostic des patients. Les derniers représentent les étapes finales de la maladie, c'est-à-dire les modèles qui présentent habituellement des altérations supplémentaires résultant des premières lignes de traitement et de la progression, avec un comportement potentiellement plus agressif reflété par des taux de croissance plus rapides (Mackay et al., 2017; Nikbakht et al., 2016; Taylor et al., 2014). En effet, il a été observé une différence dans les altérations secondaires à la mutation H3-K27M : l'amplification de *PDGFRA* est deux fois plus fréquente à l'autopsie, les mutations dans *ATRX* sont principalement présentes à l'autopsie et les mutations dans *ACVR1* ne sont pas toujours présentes dans les tumeurs du sous-groupe H3.1-K27M lors du diagnostic alors qu'elles sont toujours retrouvées à l'autopsie. Les modèles d'autopsies semblent donc plus appropriés pour tester les mécanismes de résistance et comprendre l'évolution de la maladie par comparaison avec les modèles issus des biopsies réalisées au moment du diagnostic. Selon la question biologique posée, les différents types de modèles actuellement disponibles se complètent de façon intéressante pour faciliter la compréhension de la maladie et le développement de thérapeutiques efficaces. Nos modèles de PDOX et CDOX restent un très bon support d'étude car ils sont pertinents, reproductibles et reflètent la diversité inter et intra-tumorale du DIPG.

Le développement et la caractérisation de ces modèles *in vivo* de DIPG a été publiée en 2017 dans *Oncotarget* (Plessier et al., 2017).

1.2. Dérivation de modèles PDOX d'épendymomes

Nous avons montré qu'il est possible de dériver des xénogreffes stéréotaxiques à partir de prélèvements chirurgicaux d'épendymomes infratentoriels et d'épendymomes supratentoriels réalisés au diagnostic et à la rechute par la méthode directe générant des PDOX. Le comportement clinique des souris est similaire à celui observé chez le patient : les souris présentent des symptômes neurologiques à un stade tumoral très avancé avec de volumineuses tumeurs. Le taux de prise des greffes reste très faible, inférieur à 30%, comparable au taux de prise de ces tumeurs en greffe sous-cutanée chez la souris nude (Gaspar et al., 2006). Cependant, il y aurait une tendance à une corrélation entre l'agressivité de la tumeur chez le patient avec la tumorigénicité *in vivo* comme déjà observé dans nos modèles de xénogreffes sous-cutanées dans le médulloblastome (Vassal et al., 1996). Tout comme pour le DIPG, la greffe de cellules tumorales congelées est possible. Compte tenu de la difficulté d'avoir accès à des jeunes souris NSG lors de la réception des échantillons tumoraux frais, il n'a pas été possible d'étudier la prise tumorale sur ces modèles fonctionnellement plus immunodéprimés. Cependant, le cerveau ne possède que très peu de cellules de l'immunité adaptative avec uniquement quelques lymphocytes T. La principale immunité du système nerveux central réside dans l'immunité innée apportée par les cellules microgliales, et ainsi le rejet des cellules tumorales par l'hôte dans nos modèles de xénogreffes stéréotaxiques doit rester faible (Filiano et al., 2015). La faible prise tumorale de ces modèles n'en est donc potentiellement pas la conséquence. De plus, le pourcentage de prise tumorale lors de la primogreffe est la même pour les épendymomes (EPN) au diagnostic et à la rechute. Une analyse génomique différentielle de tumeur au diagnostic et à la rechute montre qu'il y a très peu de variation dans l'altération du nombre de copies (Hoffman et al., 2014). De même, les profils transcriptomiques sont en partie conservés lors de la rechute. Les profils de méthylation des tumeurs au diagnostic et à leur rechute sont identiques, les tumeurs restant ainsi dans le même sous-groupe comme décrit par Pajter en 2015 (Ritzmann, 2018). Toutes ces données nous suggèrent que l'agressivité est semblable entre les tumeurs au diagnostic et à la rechute, ce qui explique que nous n'observons pas de différences dans nos xénogreffes. Cependant, en 2009, notre laboratoire a pu montrer que les tumeurs d'EPN à la rechute présentaient plus fréquemment un gain du chromosome 1q ainsi qu'une augmentation de l'expression de la tenascine C par rapport aux tumeurs au diagnostic. Ces deux marqueurs étant associés à un mauvais pronostic, les tumeurs à la rechute sont donc considérées ici comme plus agressives.

Les analyses par IHC nous montrent que nos xénogreffes conservent le phénotype des tumeurs primaires d'EPN, à savoir la présence de pseudo-rosettes périvasculaires, d'une néoangiogenèse anarchique et la présence d'une masse tumorale très densément cellulaire. Pour les EPN-PF, les tumeurs ont tendance à envahir entièrement le 4^{ème} ventricule avec une extension dans l'espace sous-arachnoïdien. Pour l'EPN-ST, la tumeur semble envahir complètement le 3^{ème} ventricule avec une extension métastatique à distance du site d'injection. La possibilité d'avoir des PDOX marquées avec la luciférase nous a permis d'observer des métastases dans le rachis comme occasionnellement retrouvées chez les patients ainsi que des métastases intra-hémisphériques à l'aide de la fluorescence.

La difficulté d'obtention de modèles cellulaires *in vitro* pour les EPN est un vrai frein dans la connaissance biologique et préclinique de ces tumeurs, ainsi que pour le développement de CDOX. Historiquement, nous n'avons pu développer que des cultures *in vitro* à court terme avec l'utilisation de milieu contenant du sérum (Dantas-Barbosa et al., 2015). Cependant, il est reconnu que la culture de cellules tumorales dans du sérum induit une dérivation des cellules tumorales de la tumeur initiale du patient. Par exemple, dans le cas du glioblastome, l'utilisation de sérum pendant plusieurs passages successifs *in vitro* conduit à une perte d'hétérozygotie de la mutation dans *TP53* ainsi que la présence d'anomalies dans le caryotype, contrairement aux cellules cultivées uniquement avec les facteurs de croissance EGF et FGF (Lee et al., 2006). De plus, ces cultures à court terme ne nous ont jamais permis de générer des modèles *in vivo* que ce soit en greffe sous-cutanée ou en greffe intracérébrale, les cellules n'étant pas tumorigènes.

Il a été montré que les EPN sont issus des cellules de la glie radiaire, progéniteurs des cellules souches neurales (NSC) (Taylor et al., 2005). Nous avons donc voulu cultiver *in vitro* ces cellules dans les mêmes conditions de culture que les NSC en neurosphères ou en culture monocouche sur de la laminine. Pour cela, du milieu sans sérum est complété en facteurs de croissance EGF et FGF. Ces conditions permettent de sélectionner uniquement les cellules présentant des caractéristiques de cellules souches tout en exprimant des marqueurs gliaux (Fael Al-Mayhany et al., 2009). Cependant, ces conditions de culture adaptées à la croissance des cellules souches gliales n'ont pas permis d'obtenir des lignées d'EPN stables. Très récemment, une équipe a réussi à obtenir des lignées d'EPN-ST issues de métastases à la rechute en culture 3D dans du milieu contenant du sérum sous forme d'agrégats multicellulaires non adhérents, mais interconnectés les uns aux autres (Amani et al., 2017). Ces cultures ont pu être maintenues jusqu'à un passage supérieur à 10. Histologiquement, les agrégats cellulaires présentent les mêmes structures avec des rosettes périvasculaires que les

tumeurs de patient. Il apparaît alors comme essentiel pour maintenir la prolifération cellulaire que les cellules d'EPN soient en contact très étroites les unes des autres afin de former une architecture tridimensionnelle leur permettant de se différencier et/ou de sécréter des facteurs solubles nécessaires.

2. Evaluations thérapeutiques *in vivo* dans le DIPG

2.1. Le mébendazole, reconversion d'un antihelminthique

Nous avons préalablement montré que le mébendazole (MBZ) a un effet cytotoxique *in vitro* sur nos cultures de cellules *in vitro* de DIPG pour de faibles IC50 (données non publiées). Ici, nous avons montré qu'*in vivo*, le mébendazole n'a qu'un léger effet en inhibant faiblement la croissance tumorale tout en augmentant de quelques semaines la survie des animaux.

Nous avons pu constater qu'en fonction des poudres provenant de différents fournisseurs, le passage intracérébral du médicament et de ses métabolites actifs est différent. Ceci est probablement dû à la variation du pourcentage du polymorphe C dans la composition des différentes poudres (Bai et al., 2015). Cependant, nous avons montré que la distribution du MBZ dans le tronc cérébral était suffisante pour atteindre une concentration cytotoxique *in vitro*. Afin de vérifier que la quantité de MBZ absorbé par les cellules tumorales est suffisante pour obtenir une réponse cellulaire, nous pourrions étudier les différentes cibles modulées par le médicament. Cependant, le mécanisme d'action qui se cache derrière son activité anticancéreuse reste peu clair. Il est connu que les antihelminthiques de la classe du MBZ sont capables de se lier aux sous-unités de la tubuline dans l'épithélium du parasite empêchant ainsi sa polymérisation et inhibant ainsi la croissance des parasites (Köhler, 2001). Dans le cas des cellules cancéreuses issues de gliome, *in vitro* le MBZ induit une destruction de la structure des microtubules (Bai et al., 2015). D'autres études sur d'autres types tumoraux ont identifié d'autres mécanismes d'action, dont par exemple l'inactivation de Bcl-2 dans le mélanome ou de la voie Sonic-hedgehog dans le médulloblastome (Doudican et al., 2008; Larsen et al., 2015). Il serait intéressant d'explorer dans nos cellules de DIPG quelles modulations dans l'expression génique ou/et protéique sont engendrées par le traitement au MBZ afin de mieux comprendre le mécanisme d'action.

Dans nos différentes évaluations, nous nous sommes confronté à une très forte toxicité du MBZ lorsque celui-ci était donné de manière chronique sur une très longue période. Chez l'homme, cette toxicité n'est pas retrouvée car le médicament ingéré sous forme de comprimé

a été développé afin d'être très bien absorbé tout en limitant les effets secondaires gastro-intestinaux. En revanche, chez l'animal, afin de pouvoir le donner par voie orale et d'être mieux solubilisé, nous sommes obligés de suspendre la poudre dans un mélange visqueux gras inhomogène qui potentiellement provoque des douleurs digestives à l'animal le conduisant à cesser de s'alimenter. Pour passer outre cette toxicité liée à la faible solubilité du MBZ, une équipe a pu générer une prodrogue très soluble dans un milieu aqueux (Zimmermann et al., 2018). Cette prodrogue permet d'augmenter de 24 fois la biodistribution du MBZ dans le plasma et le tissu cérébral que pour le polymorphe C suspendu dans une solution grasse chez la souris. Une autre équipe développe une forme encapsulée du MBZ ce qui permettra une meilleure solubilisation du produit ainsi qu'une distribution plus ciblée du médicament vers les cellules tumorales (données non publiées).

Afin de limiter la toxicité du MBZ lié à l'utilisation de forte dose et d'obtenir une réponse thérapeutique beaucoup plus prononcée, il serait intéressant de le combiner avec d'autres agents thérapeutiques de manière synergique. Il a été montré que les médicaments ciblant les microtubules induisent un arrêt du cycle cellulaire en phase M suivi d'une activation de la cascade apoptotique conduisant à la mort cellulaire (Jordan et al., 1992). Les cellules ainsi bloquées deviennent plus sensibles aux dommages à l'ADN car elles ne sont plus régulées par les points de contrôle appelant les différents mécanismes de réparation de l'ADN. L'irradiation induit des dommages à l'ADN tels que des cassures double-brin. Il a été montré que dans des cellules métastatique de mélanome et de cancer du poumon, le traitement avec de l'albendazole (antihelminthique de la classe des benzimidazolés tout comme le MBZ) induit une sensibilisation des cellules à l'irradiation (Patel et al., 2011). Il a été observé le même phénomène dans le glioblastome où les cellules tumorales prétraitées avec du MBZ deviennent plus sensibles à l'irradiation (Markowitz et al., 2017). L'évaluation de la combinaison du MBZ avec l'irradiation est actuellement en cours sur nos modèles *in vitro* de DIPG.

2.2. HDAC : résistance du DIPG au panobinostat

Nous avons participé au crible cellulaire qui a permis d'identifier le panobinostat comme stratégie thérapeutique potentiellement efficace (Grasso et al., 2015). Dans cette étude, il a été mis en évidence un effet antiprolifératif *in vitro* et antitumoral *in vivo*. Cependant, l'effet antitumoral du panobinostat *in vivo* est resté très modeste pour un traitement systémique contrairement au traitement par convection-enhanced delivery (CED) (Grasso et al., 2015). La même étude a été réalisée par un autre groupe et a confirmé l'effet

modéré du panobinostat en traitement systémique sur leurs modèles de GEM et de PDX de DIPG, tout en validant l'effet cytotoxique sur l'ensemble des sous-types des DIPG, H3.3-K27M, H3.1-K27M et WT-K27M (Hennika et al., 2017).

Dans notre étude, nous observons aussi une inhibition faible de la croissance tumorale chez les animaux traités uniquement avec le panobinostat. La force de nos modèles *in vivo* est la possibilité de suivre la croissance tumorale au cours du traitement alors que les études faites par Hennika n'ont été réalisées qu'en comparant la survie des animaux. En cela, nous avons pu mettre une évidence une réponse tumorale mais qui est suivie d'un phénomène de résistance. En effet, la croissance lente de nos modèles traités avec le panobinostat sur une longue période, 7 semaines consécutives, nous a permis de mettre en évidence un possible phénomène de résistance des cellules tumorales au médicament, les tumeurs ayant repris une croissance tumorale équivalente aux tumeurs non traitées après 5 semaines de traitement. Ce même phénomène de résistance a déjà été observé sur des cellules de DIPG *in vitro* : lorsque celles-ci sont traitées de manière chronique au panobinostat à faible dose, concentration observée dans nos dosages tissulaire *in vivo*, les cellules deviennent résistantes lorsqu'elles sont mises en contact avec une dose supérieure à l'IC50 (Grasso et al., 2015). Ce phénomène souligne l'importance quant à l'utilisation de combinaisons thérapeutiques. Une étude a mis en évidence la combinaison synergique du panobinostat avec un inhibiteur de CDK7 impliquée dans la régulation de la phosphorylation de l'ARN polymérase 2, THZ1 (Nagaraja et al., 2017). De plus, il a été montré que les cellules rendues résistantes *in vitro* au panobinostat sont très sensibles au THZ1. Cependant, la synergie des deux molécules n'a pas été démontrée *in vivo*. A l'heure actuelle, il n'existe pas de composé analogue au THZ1 qui passe la BHE et qui est développé pour la clinique.

Nous avons aussi été confrontés à une toxicité très importante suivant l'injection du panobinostat. Cette toxicité a aussi été retrouvée dans les autres études *in vivo* (Grasso et al., 2015; Hennika et al., 2017). La toxicité digestive a pu être contrée par le changement de formulation du médicament en modifiant les excipients. En revanche, la toxicité systémique n'a pas pu être diminuée. Chez l'homme, les études cliniques montrent qu'il existe une importante thrombocytopenie qui nécessite l'arrêt du traitement (Ibrahim et al., 2016).

Le passage intracérébral du panobinostat dans nos souris saines correspond à ce qui est retrouvé dans la littérature, soit un passage extrêmement faible avec une concentration tissulaire inférieure à 500ng/g (Grasso et al., 2015; Hennika et al., 2017). Nous avons donc eu comme stratégie d'augmenter la pénétration à travers la BHE de ce médicament à l'aide

d'ultrasons (US) afin de majorer l'effet du panobinostat, et tentant de retrouver l'effet observé *in vitro*.

3. Ouverture de la BHE à l'aide d'US non focalisés

Dans notre étude, nous avons démontré qu'il était possible d'ouvrir la BHE au niveau du tronc cérébral chez la souris en utilisant des ultrasons non focalisés couplés à des microbulles. L'ouverture de la BHE de manière diffuse est localisée uniquement dans le plan focal du transducteur pour une profondeur couvrant l'épaisseur du cerveau murin. Nous avons aussi montré que cette ouverture n'engendre pas de lésions tissulaires, ni de déficit fonctionnel dans une courte période suivant l'émission des ultrasons. Cependant, dans les études d'efficacité du panobinostat, nous avons observé une très forte toxicité des US lorsque ceux-ci sont combinés à des injections de molécules. Cette nocivité n'est probablement pas due à l'ouverture physique de la BHE, les cerveaux des souris ne présentant pas de lésions tissulaires, mais à l'entrée chronique de molécules toxiques dans le SNC. En effet, nous avons pu observer que chez la souris naïve de tout traitement et ne possédant pas de tumeur, il a été possible de réaliser une série de trois US toutes les 48h sans que ces dernières ne présentent de déficits moteurs ou une perte de poids. Dans la littérature, il n'existe que très peu d'études précliniques quant à l'injection consécutive de molécules hautement toxiques en association avec les US. En effet, il est en général démontré qu'une augmentation du passage intracérébral par dosage tissulaire ou il n'est réalisé qu'un seul traitement pour valider la potentialisation d'entrée de leurs molécules (Alli et al., 2018) (Beccaria et al., 2015) (Liu et al., 2010) (Treat et al., 2012). De plus, certains constituants des deux excipients du panobinostat, comme le DMSO et le PEG, sont connus pour être neurotoxiques ; il apparaît donc important de correctement valider la molécule sélectionnée en amont (Bakar et al., 2012) (Windrum and Morris, 2003). Dans notre étude, cette trop grande toxicité n'a pas permis d'étudier la potentialisation de l'effet du panobinostat à l'aide des US.

Nous avons évalué la pénétration dans le tissu cérébral du panobinostat *in vivo* en combinaison avec les US. Cet agent thérapeutique prometteur *in vitro*, ne passe que faiblement la BHE (Grasso et al., 2015). L'ouverture de la BHE sous l'effet des US aurait dû permettre un passage plus important de la molécule, ce qui a déjà été démontré avec le même système ultrasonore pour deux autres molécules chez le lapin (Beccaria et al., 2015). Cependant, nous n'avons pas montré de différence notable dans la concentration tissulaire entre les souris naïves et les souris ayant reçus les US. En effet, l'absorption du panobinostat par les cellules cérébrales n'a pas été augmentée. Dans le sang, le panobinostat, toute petite

molécule, est lié à l'albumine, grosse protéine d'environ 65 kDa, tout comme le bleu Evans. L'ouverture de la BHE permet de faire passer des grosses molécules supérieures à 70 kDa (Beccaria et al., 2015). Avec tous ces arguments, nous pouvons admettre que la taille du panobinostat et son affinité avec l'albumine ne sont pas un obstacle à son passage dans le tissu lorsque la BHE est ouverte. En revanche, le panobinostat est un substrat des pompes d'efflux Pgp (ou ABCB1), nous pourrions alors supposer que l'entrée et l'efflux de la molécule se déroulent simultanément, ce qui explique qu'à un instant T nous n'observons pas de médicament dans le tissu (Robey et al., 2011). Cependant, il a récemment été montré que les pompes Pgp des cellules endothéliales étaient diminuées jusqu'à 24h après les US (Aryal et al., 2017). Il serait intéressant de vérifier dans notre système si l'on observe aussi cette perte des pompes. De même, l'utilisation *in vivo* d'un inhibiteur des pompes Pgp, comme la ciclosporine A, ou de souris déficientes en Pgp pourraient permettre de s'affranchir de ce phénomène de résistance.

Au regard des résultats insatisfaisants sur l'étude du panobinostat, nous avons comme perspective l'étude d'un autre médicament, l'irinotécan, qui a déjà montré une potentialisation de son entrée dans le tissu cérébral avec le système Sonocloud (Beccaria et al., 2015). *In vitro*, nous avons démontré son action cytotoxique sur les cultures de cellules *in vitro* de DIPG pour des IC50 d'environ 0.5µM pour la molécule mère et inférieure à 1nM pour son métabolite actif le SN038. La fréquence d'administration de l'irinotécan chez l'enfant est le plus souvent un seul traitement par semaine sur plusieurs cycles, et de plus son excipient est composé uniquement de NaCl, ce qui en fait un bon candidat pour les évaluations *in vivo*. Une pharmacocinétique a déjà été réalisée, les dosages sont en cours. Dans le cas où nous observerons une augmentation significative du médicament dans le tissu cérébral chez les souris ayant reçu des ultrasons, nous engagerions une évaluation thérapeutique avec un schéma d'un traitement par semaine afin de limiter au maximum la toxicité.

En conclusion, j'ai montré au cours de mon projet dans le cadre du Diplôme qu'il était possible d'obtenir des modèles *in vivo* de DIPG (i) de manière directe en greffant directement les cellules tumorales en orthotopique chez la souris immunodéprimée pour obtenir des modèles PDOX, et (ii) de manière indirecte en cultivant *in vitro* les cellules tumorales avant injection *in vivo* pour obtenir des modèles de CDOX. Ces deux différents modèles récapitulent les caractéristiques phénotypiques et génétiques des tumeurs dont ils dérivent chez le patient. J'ai aussi montré qu'il était possible d'obtenir des modèles PDOX d'EPN possédant les caractéristiques histologiques typiques de cette maladie. Ces modèles originaux

et innovants sont un excellent support à la compréhension biologique *in vivo* pour ces deux types de tumeurs gliales pédiatriques ainsi que pour l'évaluation de nouveaux agents thérapeutiques afin de mieux prendre en charge et guérir ce cancer chez l'enfant. Dans le cas des EPN, la faible prise tumorale *in vivo* ainsi que l'impossibilité d'obtenir des modèles *in vitro* nous conduisent à raffiner nos méthodologies de greffe et de culture cellulaire. De plus, j'ai pu montrer que malgré l'effet promoteur *in vitro* du mébendazole, il n'a pas été observé d'effet antitumoral *in vivo* car j'ai dû limiter les doses injectées à cause d'une forte toxicité. En revanche, il m'a été possible d'ouvrir de manière localisée la barrière hémato-encéphalique des souris à l'aide d'ultrasons couplés à des microbulles. Cependant, je n'ai pas pu potentialiser l'effet cytotoxique du panobinostat avec ce système car la perméabilisation tissulaire de ce médicament n'a pas été augmentée. Pour cette technique, nous sommes en cours d'étude d'un autre médicament candidat, l'irinotécan.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37, 13–25.
- Alli, S., Figueiredo, C.A., Golbourn, B., Sabha, N., Wu, M.Y., Bondoc, A., Luck, A., Coluccia, D., Maslink, C., Smith, C., et al. (2018). Brainstem blood brain barrier disruption using focused ultrasound: A demonstration of feasibility and enhanced doxorubicin delivery. *J. Controlled Release* 281, 29–41.
- Amani, V., Donson, A.M., Lummus, S.C., Prince, E.W., Griesinger, A.M., Witt, D.A., Hankinson, T.C., Handler, M.H., Dorris, K., Vibhakar, R., et al. (2017). Characterization of 2 Novel Ependymoma Cell Lines With Chromosome 1q Gain Derived From Posterior Fossa Tumors of Childhood. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 76, 595–604.
- Andrieuolo, F., Ferreira, C., Puget, S., and Grill, J. (2013). Current and evolving knowledge of prognostic factors for pediatric ependymomas. *Future Oncol.* 9, 183–191.
- Andrieuolo, F., Le Teuff, G., Bayar, M.A., Kilday, J.-P., Pietsch, T., von Bueren, A.O., Witt, H., Korshunov, A., Modena, P., Pfister, S.M., et al. (2017). Integrating Tenascin-C protein expression and 1q25 copy number status in pediatric intracranial ependymoma prognostication: A new model for risk stratification. *PLoS ONE* 12.
- Aryal, M., Fischer, K., Gentile, C., Gitto, S., Zhang, Y.-Z., and McDannold, N. (2017). Effects on P-Glycoprotein Expression after Blood-Brain Barrier Disruption Using Focused Ultrasound and Microbubbles. *PloS One* 12, e0166061.
- Bai, R.-Y., Staedtke, V., Aprhys, C.M., Gallia, G.L., and Riggins, G.J. (2011). Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncol.* 13, 974–982.
- Bai, R.-Y., Staedtke, V., Wanjiku, T., Rudek, M.A., Joshi, A., Gallia, G.L., and Riggins, G.J. (2015). Brain Penetration and Efficacy of Different Mebendazole Polymorphs in a Mouse Brain Tumor Model. *Clin. Cancer Res.* 21, 3462–3470.
- Bakar, B., Kose, E.A., Balci, M., Atasoy, P., Sarkarati, B., Alhan, A., Kilinc, K., and Keskil, I.S. (2012). Evaluation of the neurotoxicity of the polyethylene glycol hydrogel dural sealant. *Turk. Neurosurg.*
- Beccaria, K., Canney, M., Goldwirt, L., Fernandez, C., Adam, C., Piquet, J., Autret, G., Clément, O., Lafon, C., Chapelon, J.-Y., et al. (2013). Opening of the blood-brain barrier with an unfocused ultrasound device in rabbits. *J. Neurosurg.* 119, 887–898.
- Beccaria, K., Canney, M., Goldwirt, L., Fernandez, C., Piquet, J., Perier, M.-C., Lafon, C., Chapelon, J.-Y., and Carpentier, A. (2015). Ultrasound-induced opening of the blood-brain barrier to enhance temozolomide and irinotecan delivery: an experimental study in rabbits. *J. Neurosurg.* 124, 1602–1610.
- Ben-David, U., Ha, G., Tseng, Y.-Y., Greenwald, N.F., Oh, C., Shih, J., McFarland, J.M., Wong, B., Boehm, J.S., Beroukhim, R., et al. (2017). Patient-derived xenografts undergo murine-specific tumor evolution. *Nat. Genet.* 49, 1567–1575.

- 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.
- Buczkwicz, P., Bartels, U., Bouffet, E., Becher, O., and Hawkins, C. (2014). Histopathological spectrum of paediatric diffuse intrinsic pontine glioma: diagnostic and therapeutic implications. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 128, 573–581.
- Cachia, D., Wani, K., Penas-Prado, M., Olar, A., McCutcheon, I.E., Benjamin, R.S., Armstrong, T.S., Gilbert, M.R., and Aldape, K.D. (2015). C11orf95-RELA fusion present in a primary supratentorial ependymoma and recurrent sarcoma. *Brain Tumor Pathol.* 32, 105–111.
- Calado, R.T., and Young, N.S. (2009). Telomere Diseases. *N. Engl. J. Med.* 361, 2353–2365.
- Caretti, V., Zondervan, I., Meijer, D.H., Idema, S., Vos, W., Hamans, B., Bugiani, M., Hulleman, E., Wesseling, P., Vandertop, W.P., et al. (2011). Monitoring of Tumor Growth and Post-Irradiation Recurrence in a Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Mouse Model. *Brain Pathol.* 21, 441–451.
- Caretti, V., Sewing, A.C.P., Lagerweij, T., Schellen, P., Bugiani, M., Jansen, M.H.A., van Vuurden, D.G., Navis, A.C., Horsman, I., Vandertop, W.P., et al. (2014). Human Pontine Glioma Cells Can Induce Murine Tumors. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 127, 897–909.
- Carpentier, A., Canney, M., Vignot, A., Reina, V., Beccaria, K., Horodyckid, C., Karachi, C., Leclercq, D., Lafon, C., Chapelon, J.-Y., et al. (2016). Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Sci. Transl. Med.* 8, 343re2-343re2.
- Cassidy, J.W., Caldas, C., and Bruna, A. (2015). Maintaining Tumour Heterogeneity in Patient-Derived Tumour Xenografts. *Cancer Res.* 75, 2963–2968.
- Castel, D., Philippe, C., Calmon, R., Le Dret, L., Truffaux, N., Boddaert, N., Pagès, M., Taylor, K.R., Saulnier, P., Lacroix, L., et al. (2015). Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 130, 815–827.
- Chan, K.-M., Fang, D., Gan, H., Hashizume, R., Yu, C., Schroeder, M., Gupta, N., Mueller, S., James, C.D., Jenkins, R., et al. (2013). The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev.* 27, 985–990.
- Coutel, Y. (1959). [Infiltrating glioblastoma of the brain stem in an 8-year-old child; normalization of the pneumoencephalogram after radiotherapy]. *Rev. Otoneuroophthalmol.* 31, 119–123.
- Dantas-Barbosa, C., Bergthold, G., Daudigeos-Dubus, E., Blockus, H., Boylan, J.F., Ferreira, C., Puget, S., Abely, M., Vassal, G., Grill, J., et al. (2015). Inhibition of the NOTCH pathway using γ -secretase inhibitor RO4929097 has limited antitumor activity in established glial tumors: *Anticancer. Drugs* 26, 272–283.

- Dasgupta, A., Liu, M., Ojha, T., Storm, G., Kiessling, F., and Lammers, T. (2016). Ultrasound-mediated Drug Delivery to the Brain: Principles, Progress and Prospects. *Drug Discov. Today Technol.* *20*, 41–48.
- Daudigeos-Dubus, E., LE Dret, L., Rouffiac, V., Bawa, O., Leguerney, I., Opolon, P., Vassal, G., and Geogerger, B. (2014). Establishment and characterization of new orthotopic and metastatic neuroblastoma models. *Vivo Athens Greece* *28*, 425–434.
- Doudican, N., Rodriguez, A., Osman, I., and Orlow, S.J. (2008). Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells. *Mol. Cancer Res. MCR* *6*, 1308–1315.
- Dréan, A., Rosenberg, S., Lejeune, F.-X., Goli, L., Nadaradjane, A.A., Guehenec, J., Schmitt, C., Verreault, M., Bielle, F., Mokhtari, K., et al. (2018). ATP binding cassette (ABC) transporters: expression and clinical value in glioblastoma. *J. Neurooncol.* 1–8.
- Fael Al-Mayhani, T.M., Ball, S.L.R., Zhao, J.-W., Fawcett, J., Ichimura, K., Collins, P.V., and Watts, C. (2009). An efficient method for derivation and propagation of glioblastoma cell lines that conserves the molecular profile of their original tumours. *J. Neurosci. Methods* *176*, 192–199.
- Fichtner, I., Rolff, J., Soong, R., Hoffmann, J., Hammer, S., Sommer, A., Becker, M., and Merk, J. (2008). Establishment of Patient-Derived Non-Small Cell Lung Cancer Xenografts as Models for the Identification of Predictive Biomarkers. *Clin. Cancer Res.* *14*, 6456–6468.
- Filiano, A.J., Gadani, S.P., and Kipnis, J. (2015). Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function. *Brain Res.* *1617*, 18–27.
- Flanagan, S.P. (1966). ‘Nude’, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res.* *8*, 295–309.
- Frappaz, D., Vasiljevic, A., Beuriat, P.-A., Alapetite, C., Grill, J., Szathmari, A., and Faure-Contier, C. (2016). [Pediatric ependymomas: Current diagnosis and therapy]. *Bull. Cancer (Paris)* *103*, 869–879.
- Funato, K., Major, T., Lewis, P.W., Allis, C.D., and Tabar, V. (2014). Use of human embryonic stem cells to model pediatric gliomas with H3.3K27M histone mutation. *Science* *346*, 1529–1533.
- Gaspar, N., Grill, J., Geogerger, B., Lellouch-Tubiana, A., Michalowski, M.B., and Vassal, G. (2006). p53 pathway dysfunction in primary childhood ependymomas. *Pediatr. Blood Cancer* *46*, 604–613.
- Goberdhan, D.C.I., and Wilson, C. (2003). PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. *Hum. Mol. Genet.* *12*, R239–R248.
- Gould, S.E., Junttila, M.R., and de Sauvage, F.J. (2015). Translational value of mouse models in oncology drug development. *Nat. Med.* *21*, 431–439.
- Grasso, C.S., Tang, Y., Truffaux, N., Berlow, N.E., Liu, L., Debily, M.-A., Quist, M.J., Davis, L.E., Huang, E.C., Woo, P.J., et al. (2015a). Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Med.* *21*, 555–559.

Grasso, C.S., Tang, Y., Truffaux, N., Berlow, N.E., Liu, L., Debily, M.-A., Quist, M.J., Davis, L.E., Huang, E.C., Woo, P.J., et al. (2015b). Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Med.* *21*, 827.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.

Hashizume, R., Smirnov, I., Liu, S., Phillips, J.J., Hyer, J., McKnight, T.R., Wendland, M., Prados, M., Banerjee, A., Nicolaides, T., et al. (2012). Characterization of a diffuse intrinsic pontine glioma cell line: implications for future investigations and treatment. *J. Neurooncol.* *110*, 305–313.

Hennika, T., Hu, G., Olaciregui, N.G., Barton, K.L., Ehteda, A., Chitranjan, A., Chang, C., Gifford, A.J., Tsoli, M., Ziegler, D.S., et al. (2017). Pre-Clinical Study of Panobinostat in Xenograft and Genetically Engineered Murine Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Models. *PLOS ONE* *12*, e0169485.

Hoffman, L., Donson, A.M., Nakachi, I., Griesinger, A.M., Birks, D.K., Amani, V., Hemenway, M.S., Liu, A.K., Wang, M., Hankinson, T.C., et al. (2014). Molecular Sub-Group Specific Immunophenotypic Changes are Associated with Outcome in Recurrent Posterior Fossa Ependymoma. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *127*, 731–745.

Hollis, P.H., Zappulla, R.A., Spigelman, M.K., Feuer, E.J., Johnson, J., Holland, J.F., and Malis, L.I. (1986). Physiological and electrophysiological consequences of etoposide-induced blood-brain barrier disruption. *Neurosurgery* *18*, 581–586.

Hussein, D., Punjaruk, W., Storer, L.C.D., Shaw, L., Othman, R.T., Peet, A., Miller, S., Bandopadhyay, G., Heath, R., Kumari, R., et al. (2011). Pediatric brain tumor cancer stem cells: cell cycle dynamics, DNA repair, and etoposide extrusion. *Neuro-Oncol.* *13*, 70–83.

Ibrahim, N., Buchbinder, E.I., Granter, S.R., Rodig, S.J., Giobbie-Hurder, A., Becerra, C., Tsiaras, A., Gjini, E., Fisher, D.E., and Hodi, F.S. (2016). A phase I trial of panobinostat (LBH589) in patients with metastatic melanoma. *Cancer Med.* *5*, 3041–3050.

Institut National du Cancer Les spécificités des cancers des enfants et des adolescents - Cancérologie pédiatrique | Institut National Du Cancer.

Jordan, M.A., Thrower, D., and Wilson, L. (1992). Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J. Cell Sci.* *102 (Pt 3)*, 401–416.

Kambhampati, M., Perez, J.P., Yadavilli, S., Saratsis, A.M., Hill, A.D., Ho, C.-Y., Panditharatna, E., Markel, M., Packer, R.J., and Nazarian, J. (2015). A standardized autopsy procurement allows for the comprehensive study of DIPG biology. *Oncotarget* *6*, 12740–12747.

Kebudi, R., and Cakir, F.B. (2013). Management of Diffuse Pontine Gliomas in Children: Recent Developments. *Pediatr. Drugs* *15*, 351–362.

Köhler, P. (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int. J. Parasitol.* *31*, 336–345.

- Lacour, B., and Clavel, J. (2014). [Epidemiological aspects of childhood cancer]. *Rev. Prat.* *64*, 1264–1269.
- Larsen, A.R., Bai, R.-Y., Chung, J.H., Borodovsky, A., Rudin, C.M., Riggins, G.J., and Bunz, F. (2015). Repurposing the antihelminthic mebendazole as a hedgehog inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* *14*, 3–13.
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N.M., Pastorino, S., Purow, B.W., Christopher, N., Zhang, W., et al. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* *9*, 391–403.
- Lehmann, J.F., and Herrick, J.F. (1953). Biologic reactions to cavitation, a consideration for ultrasonic therapy. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* *34*, 86–98.
- Lewis, P.W., Müller, M.M., Koletsy, 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.
- Liu, H.-L., Hua, M.-Y., Chen, P.-Y., Chu, P.-C., Pan, C.-H., Yang, H.-W., Huang, C.-Y., Wang, J.-J., Yen, T.-C., and Wei, K.-C. (2010). Blood-Brain Barrier Disruption with Focused Ultrasound Enhances Delivery of Chemotherapeutic Drugs for Glioblastoma Treatment. *Radiology* *255*, 415–425.
- Lobon-Iglesias, M.J., Giraud, G., Castel, D., Philippe, C., Debily, M.A., Briandet, C., Fouyssac, F., Carli, E. de, Dufour, C., Valteau-Couanet, D., et al. (2018). Diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) at recurrence: is there a window to test new therapies in some patients? *J. Neurooncol.* *137*, 111–118.
- Löscher, W., and Potschka, H. (2005). Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 591–602.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *114*, 97–109.
- 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. (Berl.)* *131*, 803–820.
- Ludwig, P.E., and Bhimji, S.S. (2017). Histology, Glial Cells. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Mack, S.C., Witt, H., Piro, R.M., Gu, L., Zuyderduyn, S., Stütz, A.M., Wang, X., Gallo, M., Garzia, L., Zayne, K., et al. (2014a). Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy. *Nature* *506*, 445–450.
- Mack, S.C., Witt, H., Piro, R.M., Gu, L., Zuyderduyn, S., Stütz, A.M., Wang, X., Gallo, M., Garzia, L., Zayne, K., et al. (2014b). Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy. *Nature* *506*, 445–450.

- Mackay, A., Burford, A., Carvalho, D., Izquierdo, E., Fazal-Salom, J., Taylor, K.R., Bjerke, L., Clarke, M., Vinci, M., Nandhabalan, M., et al. (2017). Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* 32, 520-537.e5.
- Malaney, P., Nicosia, S.V., and Davé, V. (2014). ONE MOUSE, ONE PATIENT PARADIGM: NEW AVATARS OF PERSONALIZED CANCER THERAPY. *Cancer Lett.* 344, 1–12.
- Malgulwar, P.B., Nambirajan, A., Pathak, P., Faruq, M., Rajeshwari, M., Singh, M., Suri, V., Sarkar, C., and Sharma, M.C. (2018). *C11orf95-RELA* fusions and upregulated NF-KB signalling characterise a subset of aggressive supratentorial ependymomas that express LICAM and nestin. *J. Neurooncol.* 1–11.
- Markowitz, D., Ha, G., Ruggieri, R., and Symons, M. (2017). Microtubule-targeting agents can sensitize cancer cells to ionizing radiation by an interphase-based mechanism. *OncoTargets Ther.* 10, 5633–5642.
- McMillin, D.W., Negri, J.M., and Mitsiades, C.S. (2013). The role of tumour–stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 217–228.
- Mohammad, F., Weissmann, S., Leblanc, B., Pandey, D.P., Højfeldt, J.W., Comet, I., Zheng, C., Johansen, J.V., Rapin, N., Porse, B.T., et al. (2017). EZH2 is a potential therapeutic target for H3K27M-mutant pediatric gliomas. *Nat. Med.* 23, 483.
- Monje, M., Mitra, S.S., Freret, M.E., Raveh, T.B., Kim, J., Masek, M., Attema, J.L., Li, G., Haddix, T., Edwards, M.S.B., et al. (2011). Hedgehog-responsive candidate cell of origin for diffuse intrinsic pontine glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4453–4458.
- Mount, C.W., Majzner, R.G., Sundaresh, S., Arnold, E.P., Kadapakkam, M., Haile, S., Labanieh, L., Hulleman, E., Woo, P.J., Rietberg, S.P., et al. (2018). Potent antitumor efficacy of anti-GD2 CAR T cells in H3-K27M+ diffuse midline gliomas. *Nat. Med.* 24, 572–579.
- Nagaraja, S., Vitanza, N.A., Woo, P.J., Taylor, K.R., Liu, F., Zhang, L., Li, M., Meng, W., Ponnuswami, A., Sun, W., et al. (2017). Transcriptional Dependencies in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* 31, 635-652.e6.
- Némati, F., Sastre-Garau, X., Laurent, C., Couturier, J., Mariani, P., Desjardins, L., Piperno-Neumann, S., Lantz, O., Asselain, B., Plancher, C., et al. (2010). Establishment and Characterization of a Panel of Human Uveal Melanoma Xenografts Derived from Primary and/or Metastatic Tumors. *Clin. Cancer Res.* 16, 2352–2362.
- Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.-P., Tong, F., et al. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10, 515–527.
- Nikbakht, H., Panditharatna, E., Mikael, L.G., Li, R., Gayden, T., Osmond, M., Ho, C.-Y., Kambhampati, M., Hwang, E.I., Faury, D., et al. (2016). Spatial and temporal homogeneity of driver mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Commun.* 7.

Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J.S. (2015). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncol.* 17, iv1–iv62.

Pajtler, K.W., Witt, H., Sill, M., Jones, D.T.W., Hovestadt, V., Kratochwil, F., Wani, K., Tatevossian, R., Punchihewa, C., Johann, P., et al. (2015). Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. *Cancer Cell* 27, 728–743.

Panwalkar, P., Clark, J., Ramaswamy, V., Hawes, D., Yang, F., Dunham, C., Yip, S., Hukin, J., Sun, Y., Schipper, M.J., et al. (2017). Immunohistochemical analysis of H3K27me3 demonstrates global reduction in group-A childhood posterior fossa ependymoma and is a powerful predictor of outcome. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 134, 705–714.

Parker, M., Mohankumar, K.M., Punchihewa, C., Weinlich, R., Dalton, J.D., Li, Y., Lee, R., Tatevossian, R.G., Phoenix, T.N., Thiruvengatam, R., et al. (2014). C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF- κ B signaling in ependymoma. *Nature* 506, 451–455.

Patel, K., Doudican, N.A., Schiff, P.B., and Orlow, S.J. (2011). Albendazole sensitizes cancer cells to ionizing radiation. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 6, 160.

Pathania, M., De Jay, N., Maestro, N., Harutyunyan, A.S., Nitarska, J., Pahlavan, P., Henderson, S., Mikael, L.G., Richard-Londt, A., Zhang, Y., et al. (2017). H3.3K27M Cooperates with Trp53 Loss and PDGFRA Gain in Mouse Embryonic Neural Progenitor Cells to Induce Invasive High-Grade Gliomas. *Cancer Cell* 32, 684-700.e9.

Paugh, B.S., Qu, C., Jones, C., Liu, Z., Adamowicz-Brice, M., Zhang, J., Bax, D.A., Coyle, B., Barrow, J., Hargrave, D., et al. (2010). Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 3061–3068.

Paxinos, G., and Franklin, K. (2012). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 4th edition. (Academic Press).

Pearson, A.D.J., Pfister, S.M., Baruchel, A., Bourquin, J.-P., Casanova, M., Chesler, L., Doz, F., Eggert, A., Geoerger, B., Jones, D.T.W., et al. (2017). From class waivers to precision medicine in paediatric oncology. *Lancet Oncol.* 18, e394–e404.

Piunti, A., Hashizume, R., Morgan, M.A., Bartom, E.T., Horbinski, C.M., Marshall, S.A., Rendleman, E.J., Ma, Q., Takahashi, Y., Woodfin, A.R., et al. (2017). Therapeutic targeting of polycomb and BET bromodomain proteins in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Nat. Med.* 23, 493–500.

Plessier, A., Le Dret, L., Varlet, P., Beccaria, K., Lacombe, J., Mériaux, S., Geffroy, F., Fiette, L., Flamant, P., Chrétien, F., et al. (2017). New in vivo avatars of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) from stereotactic biopsies performed at diagnosis. *Oncotarget* 8, 52543–52559.

Porter, S.N., Baker, L.C., Mittelman, D., and Porteus, M.H. (2014). Lentiviral and targeted cellular barcoding reveals ongoing clonal dynamics of cell lines in vitro and in vivo. *Genome Biol.* 15, R75.

- Puget, S., Blauwblomme, T., and Grill, J. (2012). Is biopsy safe in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma? *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book ASCO Am. Soc. Clin. Oncol. Meet.* 629–633.
- Puget, S., Beccaria, K., Blauwblomme, T., Roujeau, T., James, S., Grill, J., Zerah, M., Varlet, P., and Sainte-Rose, C. (2015). Biopsy in a series of 130 pediatric diffuse intrinsic Pontine gliomas. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* 31, 1773–1780.
- Rapoport, S.I., and Robinson, P.J. (1986). Tight-Junctional Modification as the Basis of Osmotic Opening of the Blood-Brain Barrier. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 481, 250–267.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells.
- Ribatti Domenico, Nico Beatrice, Crivellato Enrico, and Artico Marco (2006). Development of the blood-brain barrier: A historical point of view. *Anat. Rec. B. New Anat.* 289B, 3–8.
- Ritzmann, T. (2018). Recurrent Paediatric Ependymoma: A multicentre Analysis of Clinical Features and tumor Biology in the Molecular Era.
- Robey, R.W., Chakraborty, A.R., Basseville, A., Luchenko, V., Bahr, J., Zhan, Z., and Bates, S.E. (2011). Histone deacetylase inhibitors: emerging mechanisms of resistance. *Mol. Pharm.* 8, 2021–2031.
- Robison, N.J., and Kieran, M.W. (2014). Diffuse intrinsic pontine glioma: a reassessment. *J. Neurooncol.* 119, 7–15.
- Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.-Y., Jones, D.T.W., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A.M., Quang, D.-A.K., Tönjes, M., et al. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 482, 226–231.
- Segal, D., and Karajannis, M.A. (2016). Pediatric Brain Tumors: An Update. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care* 46, 242–250.
- Servidei, T., Meco, D., Trivieri, N., Patriarca, V., Vellone, V.G., Zannoni, G.F., Lamorte, G., Pallini, R., and Riccardi, R. (2012). Effects of epidermal growth factor receptor blockade on ependymoma stem cells in vitro and in orthotopic mouse models. *Int. J. Cancer* 131, E791–E803.
- Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S.D., King, M., Mangada, J., et al. (2005). Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 6477–6489.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *403*, 7.
- Taylor, K.R., Mackay, A., Truffaux, N., Butterfield, Y.S., Morozova, O., Philippe, C., Castel, D., Grasso, C.S., Vinci, M., Carvalho, D., et al. (2014). Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Genet.* 46, 457–461.

- Taylor, M.D., Poppleton, H., Fuller, C., Su, X., Liu, Y., Jensen, P., Magdaleno, S., Dalton, J., Calabrese, C., Board, J., et al. (2005). Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell* 8, 323–335.
- Treat, L.H., McDannold, N., Zhang, Y., Vykhodtseva, N., and Hynynen, K. (2012). Improved Anti-Tumor Effect of Liposomal Doxorubicin After Targeted Blood-Brain Barrier Disruption by MRI-Guided Focused Ultrasound in Rat Glioma. *Ultrasound Med. Biol.* 38, 1716–1725.
- Truffaux, N., Philippe, C., Paulsson, J., Andreiuolo, F., Guerrini-Rousseau, L., Cornilleau, G., Le Dret, L., Richon, C., Lacroix, L., Puget, S., et al. (2015). Preclinical evaluation of dasatinib alone and in combination with cabozantinib for the treatment of diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro-Oncol.* 17, 953–964.
- Vassal, G., Terrier-Lacombe, M.-J., Lellouch-Tubiana, A., Valery, C.A., Sainte-Rose, C., Morizet, J., Ardouin, P., Riou, G., Kalifa, C., and Gouyette, A. (1996). Tumorigenicity of cerebellar primitive neuro-ectodermal tumors in athymic mice correlates with poor prognosis in children. *Int. J. Cancer* 69, 146–151.
- Wenger, A., Larsson, S., Danielsson, A., Elbæk, K.J., Kettunen, P., Tisell, M., Sabel, M., Lannering, B., Nordborg, C., Schepke, E., et al. (2017). Stem cell cultures derived from pediatric brain tumors accurately model the originating tumors. *Oncotarget* 8, 18626–18639.
- Windrum, P., and Morris, T.C.M. (2003). Severe neurotoxicity because of dimethyl sulphoxide following peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 31, 315.
- Witt, H., Mack, S.C., Ryzhova, M., Bender, S., Sill, M., Isserlin, R., Benner, A., Hielscher, T., Milde, T., Remke, M., et al. (2011). Delineation of Two Clinically and Molecularly Distinct Subgroups of Posterior Fossa Ependymoma. *Cancer Cell* 20, 143–157.
- Wu, G., Broniscer, A., McEachron, T.A., Lu, C., Paugh, B.S., Beckfort, J., Qu, C., Ding, L., Huether, R., Parker, M., et al. (2012). Somatic Histone H3 Alterations in Paediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas and Non-Brainstem Glioblastomas. *Nat. Genet.* 44, 251–253.
- Yu, L., Baxter, P.A., Voicu, H., Gurusiddappa, S., Zhao, Y., Adesina, A., Man, T.-K., Shu, Q., Zhang, Y.-J., Zhao, X.-M., et al. (2010). A clinically relevant orthotopic xenograft model of ependymoma that maintains the genomic signature of the primary tumor and preserves cancer stem cells in vivo. *Neuro-Oncol.* 12, 580–594.
- Zimmermann, S.C., Tichý, T., Vávra, J., Dash, R.P., Slusher, C.E., Gadiano, A.J., Wu, Y., Jančařík, A., Tenora, L., Monincová, L., et al. (2018). N-Substituted Prodrugs of Mebendazole Provide Improved Aqueous Solubility and Oral Bioavailability in Mice and Dogs. *J. Med. Chem.* 61, 3918–3929.

ANNEXES

Identifiant	Marqueurs	D1S1656	D6S1043	Penta E	D2S1338	D8S1179
NEM273	Biopsie	13, 15	12, 19	11, 13	23, 25	13, 14
	CDOX	13, 15	12, 19	11, 13	23, 25	13, 14
NEM285	Biopsie	11, 15	11, 11	10, 13	18, 23	13, 14
	PDOX	11, 15	11, 11	10, 13	18, 23	13, 14
	CDOX	11, 15	11, 11	10, 13	18, 23	13, 14
NEM289	Biopsie	11, 15.3	12, 12	5, 14	23, 25	10, 11
	PDOX	11, 15.3	12, 12	5, 14	23, 25	10, 11
	CDOX	11, 15.3	12, 12	5, 14	23, 25	10, 11
NEM290	Biopsie	12, 14	13, 19	10, 11	17, 23	10, 14
	PDOX	12, 14	13, 19	10, 11	17, 23	10, 14
	CDOX	12, 14	13, 19	10, 11	17, 23	10, 14
NEM292	Biopsie	15.3, 17	10, 17	11, 12	22, 24	10, 15
	CDOX	15.3, 17	10, 14	11, 12	22, 24	10, 15
NEM325	Biopsie	15, 17.3	12, 20	10, 13	19, 24	13, 13
	PDOX	15, 17.3	12, 20	10, 13	19, 24	13, 13
NEM328	Biopsie	16, 16.3	13, 13	13, 13	17, 18	11, 11
	PDOX	16, 16.3	13, 13	13, 13	17, 18	11, 11
	CDOX	16, 16.3	13, 13	13, 13	17, 18	11, 11
NEM335	Biopsie	14, 16.3	11, 12	5, 7	18, 24	12, 13
	PDOX	14, 16.3	11, 12	5, 7	18, 24	12, 13
NEM347	Biopsie	12, 12	11, 12	12, 12	17, 23	10, 12
	PDOX	12, 12	11, 12	12, 12	17, 23	10, 12
NEM353	Biopsie	12, 15	14, 20	7, 11	17, 24	12, 14
	PDOX	12, 15	14, 20	7, 11	17, 24	12, 14

Annexe 1 : Profils des « short tandem repetition » (STR) des tumeurs primaires et des xénogreffes de DIPG.

Identifiant	Marqueurs	D1S1656	D6S1043	Penta E	D2S1338	D8S1179
NEM386	Biopsie	16, 16	11, 12	11, 12	19, 25	15, 16
	PDOX	16, 16	11, 12	11, 12	19, 25	15, 16
NEM392	Biopsie	11, 15	12, 12	11, 17	17, 20	13, 13
	PDOX	11, 15	12, 12	11, 17	17, 20	13, 13
NEM415	Biopsie	16, 16	12, 17	11, 13	16, 22	15, 15
	PDOX	16, 16	12, 17	11, 13	16, 22	15, 15

Annexe 2 : Profils des « short tandem repetition » (STR) des tumeurs primaires et des xénogreffes d'épendymomes.

New *in vivo* avatars of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) from stereotactic biopsies performed at diagnosis

Alexandre Plessier^{1,*}, Ludivine Le Dret^{1,*}, Pascale Varlet², Kévin Beccaria³, Joëlle Lacombe², Sébastien Mériaux⁴, Françoise Geffroy⁴, Laurence Fiette⁵, Patricia Flamant⁵, Fabrice Chrétien^{2,5}, Thomas Blauwblomme³, Stéphanie Puget³, Jacques Grill^{1,6}, Marie-Anne Debily^{1,7,**} and David Castel^{1,6,**}

¹UMR8203 "Vectorologie & Thérapeutiques Anticancéreuses", CNRS, Gustave Roussy, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Villejuif, France

²Department of Neuropathology, Hôpital Sainte-Anne, Université Paris V Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

³Department of Pediatric Neurosurgery, Hôpital Necker-Enfants Malades, Université Paris V Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁴UNIRS, Neurospin, I2BM, Direction de la Recherche Fondamentale, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Gif-sur-Yvette, France

⁵Institut Pasteur, Histopathology and Animal Models, Université Paris V Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁶Département de Cancérologie de l'Enfant et de l'Adolescent, Gustave Roussy, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Villejuif, France

⁷Université d'Evry-Val d'Essonne, Evry, France

*These two co-authors contributed equally to the work

**Co-senior authors

Correspondence to: David Castel, **email:** david.castel@gustaveroussy.fr

Marie-Anne Debily, **email:** marie-anne.debily@gustaveroussy.fr

Keywords: brain tumor model, child, tumor-initiating cell, infiltrative midline glioma with histone H3-K27M mutation, bioluminescence

Received: August 04, 2016

Accepted: January 10, 2017

Published: February 02, 2017

Copyright: Plessier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Diffuse Intrinsic Pontine Glioma is the most aggressive form of High Grade Gliomas in children. The lack of biological material and the absence of relevant models have hampered the development of new therapeutics. Their extensive infiltration of the brainstem renders any surgical resection impossible and until recently biopsies were considered not informative enough and therefore not recommended. Thus, most models were derived from autopsy material. We aimed to develop relevant *in vivo* DIPG models that mimic this specific disease and its molecular diversity from tumor material obtained at diagnosis. Eight patient-derived orthotopic xenograft models were obtained after direct stereotactic injection of a mixed cell suspension containing tumor cells and stromal cells in the brainstem or thalamus of nude mice and serially passaged thereafter. In parallel, we developed 6 cell-derived xenograft models after orthotopic injection of tumor-initiating cells cultured from stereotactic biopsies. Cells were modified to express luciferase to enable longitudinal tumor growth monitoring, and fluorescent reporter proteins to trace the tumor cells in the brain.

These models do not form a tumor mass, they are invasive, show the H3K27 trimethylation loss *in vivo* and the tumor type diversity observed in patients in terms of histone H3 mutations and lineage markers. Histological and MRI features at 11.7 Tesla show similarities with treatment naïve human DIPG, and in this respect, both direct and indirect orthotopic xenograft looked alike. These DIPG models will therefore constitute valuable tools for evaluating new therapeutic approaches in this devastating disease.

INTRODUCTION

Brain tumors are the leading cause of cancer-related mortality and morbidity in children, adolescents and young adults. With the refinement of the diagnostic criteria, gliomas now represent the most frequent type of malignant brain tumors [1]. Diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG) is one of the most frequent pediatric high-grade glioma. The peak of onset is between 6 and 9 years of age although adolescents and young adults may be affected [2], and the median overall survival of DIPG patients is below 1 year after diagnosis [3]. Because of its infiltrative phenotype and location in an eloquent area of the brainstem, the tumor is unresectable. Diagnosis is usually made on a typical magnetic resonance imaging (MRI) appearance associated with a short clinical history (<6 months). Radiation therapy is only transiently efficient and classical chemotherapy is generally not effective [4, 5].

The recent identification in midline pediatric glioma and in particular in DIPG, of a specific point mutation in *H3F3A*, *HIST1H3B/C*, *HIST2H3A/C* histone genes – leading to the replacement of a lysine by a methionine at position 27, has set the basis for a molecular definition of these gliomas [6–8]. This H3-K27M mutation impairs the function of polycomb repressive complex 2 and leads to a global decrease of H3K27 trimethylation in 95% of DIPG samples, reflecting a profound change in the epigenetic landscape of the tumor cells [9–11]. This alteration was chosen to define a new tumor entity in the WHO 2016 classification of brain tumor corresponding to *Midline infiltrative tumors with H3-K27M mutation*, and the associated loss of H3K27 trimethylation could be considered as a driving oncogenic event [12].

If autopsies and stereotactic biopsies of DIPG have recently shed some light on the possible driver mutations, the lack of biological material from DIPG also hampered the development of relevant models mimicking the disease that are crucial to better understand the underlying biology and to evaluate potential new therapeutics [6, 7, 9]. This led some research groups to study the *in vivo* oncogenesis of the tumor through different genetically-engineered mouse models (GEMM) [13, 14]. However, these models are based on the introduction of a limited number of alterations, which are not always found in primary DIPG tumor as for example *PDGFB* overexpression to mimic *PDGFRA* amplification that is especially observed at autopsy. Consequently, it can be questioned whether these models would best recapitulate the disease or if alternative models have to be generated to complete the set of tools to explore DIPG biology.

An alternative to the aforementioned mouse models is the development of cell-derived orthotopic xenograft (CDOX) and patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) from patient material. CDOX models were generated by stereotactic injections of cultured cells carrying the histone H3-K27M driver mutation established

from DIPG autopsies [15]. More recently, a group successfully developed one PDOX model after direct injection of autopsy DIPG tumor cells [16]. Both types of models showed an infiltrative phenotype, an important characteristic of these neoplasms. However, the biology of the tumor at autopsy may have been substantially altered by the treatment, especially radiotherapy, as shown by the accumulation of new mutations in comparison with biopsy samples, precluding its relevance compared to the tumor at diagnosis. Indeed, genomic alterations in DIPG are more abundant and qualitatively different at diagnosis and at autopsy. The average mutation rate detected at the time of the autopsy is 3.12 somatic mutations per megabase [17] while it is 0.76 at diagnosis [18]. With respect to the type of genomic aberrations, *PDGFRA* gain/amplification are twice more frequent in autopsy samples [17, 19, 20] than they are at diagnosis [18, 21]. Similarly, *ATRX* mutations are rare at diagnosis (absent from the sequencing data of Taylor *et al.* [18]) while they are more common at the time of the autopsy [17]. *ACVR1* mutations were described in all autopsy H3.1-K27M tumors [7] while they were not present in every H3.1-K27M tumors at diagnosis [8]. Such pre-clinical models might thus have a distinct resistance to drugs compared to a treatment-naïve tissue, as well as a potentially altered invasive and migratory phenotypes.

Systematic stereotactic biopsies were re-introduced as a part of the histopathological and molecular diagnosis of DIPG [3]. We took advantage of this treatment-naïve biological material for pre-clinical model establishment representing the disease at the earliest stages possible. The aim of our study was to establish a variety of DIPG xenografts to cover the heterogeneity of DIPG encountered in patients. This is crucial to be able to understand the behavior of the different subtypes of DIPG and generalize the findings from new therapeutics testing. Two methods, direct or indirect xenografting, were tested. Biopsies were either directly xenografted in the thalamus or pons of nude mice, or in parallel cultured *in vitro*, labeled and subsequently injected in the pons of nude mice. These 2 types of pre-clinical models are valuable tools to assess new approaches in this incurable disease as they reflect the primary biopsy in terms of histologic features and expression of classical histopathology markers as well as they reflect the inter-biological differences between patients.

RESULTS

Description and processing of the stereotactic biopsy samples

During the course of the study, eighteen patients diagnosed with DIPG were biopsied by stereotaxy (Table 1). This cohort of DIPG has a balanced sex distribution with 9 males and 9 females, a median age at diagnosis of 6 years, and 14/16 children died within

the first 2 years after diagnosis (1 patient still alive and 1 was lost to follow-up). Moreover, in all primary tumors, immunohistochemistry analysis showed the expression of a histone H3-K27M mutated protein and the H3K27 trimethylation loss as previously defined as hallmarks of DIPG [8].

Sanger sequencing or Whole Exome Sequencing identified a histone H3 gene mutated in the codon of Lysine 27 in all the tumor samples, resulting in a Lysine to Methionine substitution in either H3F3A for 13/18 of cases (72%), HIST1H3B for 4/18 cases (22%), or HIST2H3A/C for the remaining case (6%) (Table 1 and Supplementary Figure 1).

Establishment of cell-derived orthotopic xenograft models in the brain of Swiss/nude mice

Half of the dissociated primary tumor was used to develop *in vitro* cellular models (Figure 1). All eighteen biopsies but one led to primary cell proliferation under these conditions (Table 1). The resulting tumor-initiating cells (TICs) were transduced and xenografted around passage 10 into the pons of 5 nude mice, to establish CDOX. Transduction did not alter the proliferation rate and morphology of TICs (data not shown). For the 4 initial TICs grafting experiments, we injected tumor cells in parallel in five distinct NOD scid gamma (NSG) and nude mice. The take rates were similar in both mice strains with only 1/4 TICs that was tumorigenic.

In total, 11 distinct TICs were xenografted, leading to tumor development in 6 cases and no tumor growth in 5 cases. Consequently, the success rate of CDOX model development can be currently evaluated around 54.5%. Among the six CDOX models that gave rise to tumor, the overall take rate was 90% (n=64/71), taking into account all the injected mice at all passages.

Successful establishment and long-term maintenance by *in vivo* serial transplantation of patient-derived orthotopic xenograft models in the brain of Swiss/Nude mice

In parallel to the indirect model, as of NEM284, the second half of the single-cell suspension obtained from the patient biopsy was directly grafted into the thalamus of several nude mice to allow the expansion of the tumor *in vivo* (Figure 1). For the 8 most recent samples, the tumor cell suspension was also injected in the pons. Once a tumor developed, as suspected when mice became symptomatic, brains were dissected and divided in two following the sagittal plane. Tumor transplantation and banking were performed using the injected side containing most of tumor cells. Histological plus immunohistochemical analyses were performed on the contralateral side to confirm the presence of tumor cells on the same brain. These serial transplantations were repeated until passage

3 in order to significantly amplify *in situ* the initial pool of cancer cells and allow for sample banking. For subsequent passages, cells were xenografted into the right part of the pons of nude mice (Supplementary Table 1).

In total, 8 out of 13 (61.5%) DIPG biopsies were successfully xenografted. In these cases, all replicate mice showed a tumor at first passage. Efficient transplantation from mouse to mouse was achieved, and the rate of tumorigenicity for subsequent passages remained high (91% and 84% for thalamic and pontine injection, respectively). Also, transplanting frozen cells did not significantly decrease the take rate after injection in both locations (85,7% with n=21 and 100% with n=7 for thalamic and pontine xenograft, respectively). However, the survival time was increased in 3 out 5 cases ($P<0.01$, T-test; Supplementary Table 1).

Survival time comparison between patients and CDOX / PDOX models

Survival time of mice xenografted in the pons varied greatly between the different models, from 80 ± 12 days to 299 ± 12 days for PDOX, and from 67 ± 6 days to 267 ± 28 days in the case of CDOX (Table 2). However, CDOX were highly reproducible with respect to the time to symptoms outbreak in a given model (Table 2). Also, the time to reach end-points tended to be more similar from mouse to mouse for a particular model at a given passage in the case of PDOX models (Supplementary Table 1). Moreover, survival data were overall similar between the subsequent passages of PDOX, with the exception of the first grafting (P0) in several cases.

We then thought to compare the survival time in mouse models and corresponding patients. Interestingly, we observed a statistically significant correlation between patients and the six CDOX presenting tumors ($r=0.839$; $P=0.037$; Pearson correlation test). In contrast, neither a correlation nor a trend was found for PDOX models ($r=-0.24$, $P=0.61$). Lastly, comparing the two kinds of models on the four available pairs, we noticed that the survival time was always shorter for PDOX than for CDOX models from one particular patient. This however appeared statistically significant only for NEM290 (Table 2).

PDOX and CDOX models display hallmarks of primary human DIPG

For all type of xenografts that showed tumor development, mice presented brutal weight loss ($>20\%$ in few days) and/or neurological symptoms onset such as limb weaknesses, impaired motility or tilted head.

First, we assessed the maintenance of histone H3-K27M mutation –present in the human primary tumor, in cultured TICs before transplantation and in murine tumors by Sanger sequencing (Supplementary Figure 1). Single Tandem Repeats (STR) analyses performed in

Table 1: Summary of the molecular & clinical characteristics of DIPG patients and observed tumorigenicity in the corresponding murine models

Patient ID	Histone H3 mutation status	TP53 mutation status	ACVR1 mutation status	Patient			TIC	PDOX model		CDOX model
				Gender	Age	Survival (days)		Thalamus	Pons	Pons
NEM270	H3F3A K27M	R273C	WT	M	10.2	313	Y	-	-	0/10
NEM271	HIST1H3B K27M	WT	Q207E	F	4.4	499	Y	-	-	0/10
NEM273	HIST1H3B K27M	WT	G328E	M	4.6	279	Y	-	-	3/4
NEM276	H3F3A K27M	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	F	6.2	287	Y	-	-	0/10
NEM284	H3F3A K27M	W91*	WT	F	9.3	105	N	0/2	-	-
NEM285	H3F3A K27M	A159V	WT	M	7.1	241	Y	20/22	3/3	5/5
NEM289	HIST2H3A K27M	W146*	WT	M	4.7	262	Y	27/29	8/8	5/5
NEM290	H3F3A K27M	R175H	WT	F	11.6	81	Y	39/40	10/12	25/26
NEM292	H3F3A K27M	P151T	WT	F	5.1	152	Y	-	-	21/26
NEM323	H3F3A K27M	C96Y	WT	M	5.8	269	Y	0/2	-	-
NEM324	HIST1H3B K27M	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	M	1.4	<i>Alive</i>	Y	0/2	0/1	-
NEM325	H3F3A K27M	WT	WT	F	5.5	101	Y	4/7	9/9	0/5
NEM328	HIST1H3B K27M	WT	G328V	F	3.5	289	Y	11/12	9/12	5/5
NEM335	H3F3A K27M	R248Q	WT	M	6.2	575	Y	10/13	3/6	0/5
NEM336	HIST1H3B K27M	WT	G328V	M	4.1	536	Y	0/2	0/1	-
NEM341	H3F3A K27M	WT	WT	F	8.3	<i>L.T.F.</i>	Y	0/2	0/1	-
NEM347	H3F3A K27M	R273C	WT	M	9.1	294	Y	5/5	4/4	-
NEM353	H3F3A K27M	WT	WT	F	6.5	385	Y	2/2	1/1	-

For each DIPG patient, the Histone H3, TP53 and ACVR1 mutation status are displayed, together with the demographic and survival data. In the right part of the table, xenografting data are summarized for both direct (PDOX) and indirect (CDOX) strategies. The tumorigenicity is presented as the number of mice presenting tumors over the total number of injected mice. Tumor initiating cells (TICs) that could be successfully cultured from patient biopsies are indicated. N.D: not determined; L.T.F: lost to follow-up; WT: wild-type; Y/N: yes/no.

parallel on patient blood samples and on the corresponding mouse tumors confirmed the unique genetic identity of all xenografts (Supplementary Table 2) and the human origin of the tumors that developed in mice.

Additionally, the H&E staining allowed the detection of tumor cells with dense and irregular nuclei in the brainstem both of the patient and mice samples (Figure 2A-2C and Supplementary Figure 2). Moreover, the detection of the K27M-mutated histone H3 by IHC showed a strong positivity throughout the pons in the

12 xenograft models we could test (Figure 2D-2F, Supplementary Figures 3A-3B and 4), as well as the associated H3K27 trimethylation loss (Figure 2G-2I and Supplementary Figure 3C-3D). The use of a human-specific MIB-1 antibody confirmed the presence of proliferating cells of human origin in all tested xenograft samples (10/14 models) in the same area as K27M mutated cells. We observed a mixture of tumor positive-cells and normal negative-cells in mice brains (Figure 3A-3C and Supplementary Figure 5). Of note, the mitotic

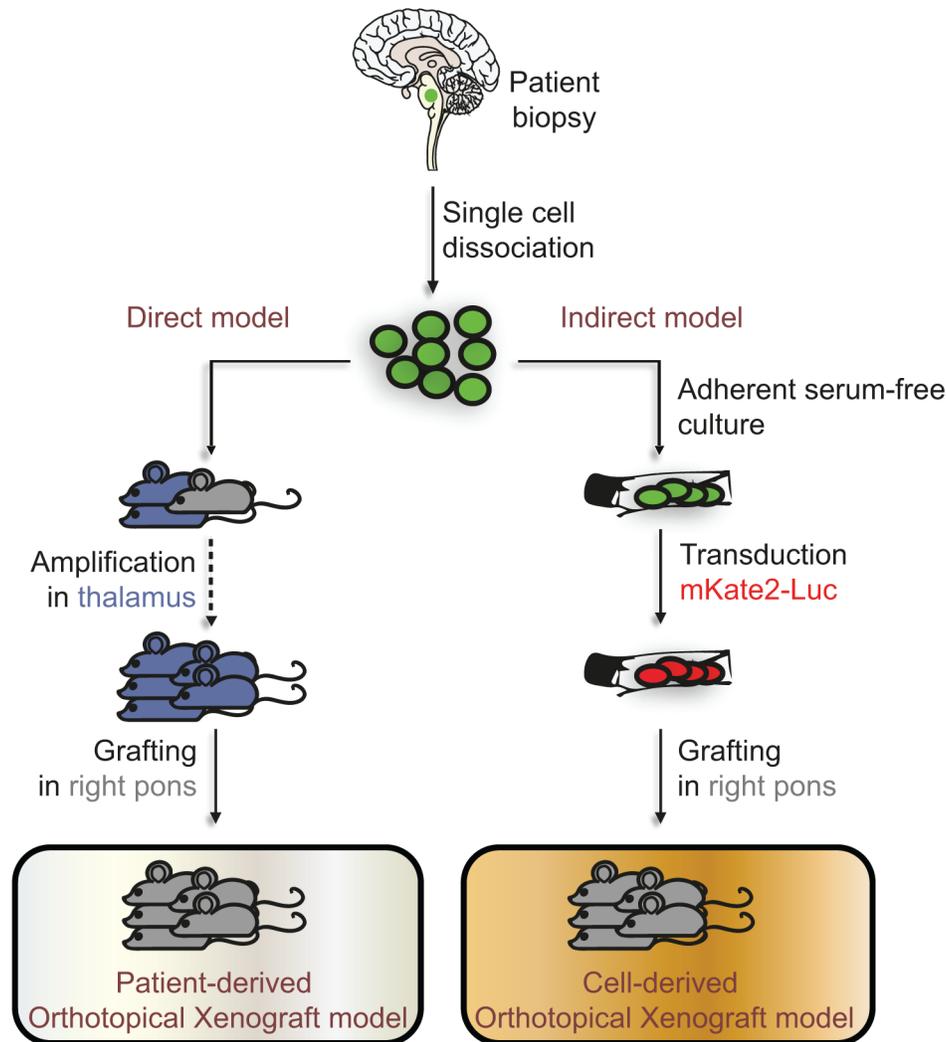


Figure 1: Direct and indirect models developed to study DIPG *in vivo*. Tumors originating from the pons of DIPG patients were biopsied and dissociated into a single-cell suspension. Whenever possible, half of the cells were used in the direct model for xenografting into the thalamus of 2 nude mice (in blue), and for latest sample also in the pons of one nude mouse (in grey), constituting the patient-derived orthotopical xenograft models (PDOX). Once a mouse developed neurological symptoms or lost weight, it was sacrificed and the dissociated tumor re-implanted into the thalamus of several other mice to allow the amplification of the tumor cell pool. This method allows the *in vivo* expansion of cancer cells as well as their banking. After 3 successive passages, mice are grafted in the pons. In parallel to the direct injection into the brain, the remaining half of the cell suspension obtained from biopsies was cultured in adherent serum-free conditions. After several passages required for banking, the resulting tumor-initiating cells (TICs) were transduced to express the mKate2 and Firefly Luciferase proteins, and then grafted into the pons of nude mice. These indirect models constitute the cell-derived orthotopical xenografts (CDOX). Green-colored and red-colored cells on the scheme represent the mutated cells found in the biopsy and the mutated cells after transduction of the mKate2-Luc construct, respectively.

Table 2: Biological properties and histologic features of primary tumor and corresponding *in vitro* and *in vivo* models

Patient ID	Sample Type	Histone H3 mutation status	Mitotic index	Extracellular edema		Doubling time (days)	Max. passage reached	Survival time (days)	Comparison of CDOX and PDOX survival
				Location	Grading				
NEM273	Patient	H3.1-K27M	43.7 ±8.3	Pericellular & along axons	2	-	-	279	-
	TICs	H3.1-K27M	N.D.	-	-	2.79	10	-	
	CDOX	H3.1-K27M	25.9 ±4.2	Along axons	3	11.7 ±1	3	239 ±19	
NEM285	Patient	H3.3-K27M	24.5 ±0.10	Along axons	1	-	-	241	-
	TICs	H3.3-K27M	N.D.	-	-	2.39 ±0.2	10	-	
	CDOX	H3.3-K27M	N.D.	N.D.	N.D.	15.2 ±1.1	N.D.	199 ±25	N.S (<i>P</i> =0.25)
	PDOX	H3.3-K27M	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4	123 ±6	
NEM289	Patient	H3.2-K27M	16.8 ±1.9	Pericellular & along axons	2	-	-	262	-
	TICs	H3.2-K27M	N.D.	-	-	2.15 ±0.17	10	-	
	CDOX	H3.2-K27M	19.6 ±4.5	Pericellular	1	19.1 ±1.1	N.D.	249 ±21	N.S (<i>P</i> =0.0625)
	PDOX	H3.2-K27M	N.D.	Pericellular	2	N.D.	4	102 ±9	
NEM290	Patient	H3.3-K27M	18.7 ±5.9	Pericellular	2	-	-	81	-
	TICs	H3.3-K27M	N.D.	-	-	2.06 ±0.36	15	-	
	CDOX	H3.3-K27M	20.2 ±4.4	Pericellular	1	10.9 ±1.4	1	135 ±4	** (<i>P</i> =0.0058)
	PDOX	H3.3-K27M	20.6 ±9.4	Along axons	1	N.D.	5	80 ±12	
NEM292	Patient	H3.3-K27M	24.7 ±17.9	Pericellular	1	-	-	152	-
	TICs	H3.3-K27M	N.D.	-	-	1.92 ±0.06	15	-	
	CDOX	H3.3-K27M	27.4 ±4.8	Pericellular & along axons	3	7.4 ±0.4	N.D.	67 ±6	
NEM325	Patient	H3.3-K27M	25.0 [#]	Pericellular & along axons	3	-	-	102	-
	TICs	H3.3-K27M	N.D.	-	-	3.57 ±0.08	4	-	
	PDOX	H3.3-K27M	24.4 ±4.7	Pericellular & along axons	2	N.D.	1	299 ±12	
NEM328	Patient	H3.1-K27M	50.0 [#]	Pericellular	3	-	-	289	-
	TICs	H3.1-K27M	N.D.	-	-	2.66 ±0.33	10	-	
	CDOX	H3.1-K27M	N.D.	Pericellular & along axons	3	19.4 ±4.4	N.D.	267 ±28	N.S (<i>P</i> =0.125)
	PDOX	H3.1-K27M	17.1 ±5	Pericellular	2	N.D.	3	179 ±32	
NEM335	Patient	H3.3-K27M	30.0 [#]	N.D.	N.D.	-	-	575	-
	TICs	H3.3-K27M	N.D.	-	-	3.6	4	-	
	PDOX	H3.3-K27M	28.3 ±5.1	Pericellular	2	N.D.	3	130 ±4	
NEM347	Patient	H3.3-K27M	40.0 [#]	Along axons	2	-	-	294	-
	TICs	H3.3-K27M	N.D.	-	-	3.42	2	-	
	PDOX	H3.3-K27M	N.D.	Pericellular & along axons	2	N.D.	2	121 ±4	
NEM353	Patient	H3.3-K27M	14.7 ±3.5	Pericellular & along axons	3	-	-	385	-
	TICs	H3.3-K27M	N.D.	-	-	1.97 ±0.48	4	-	
	PDOX	H3.3-K27M	N.D.	Pericellular	2	N.D.	1	81 (P0)	

Genotypes of H3 genes resulting from either Sanger or WES sequencing was summarized for all samples. Mitotic indexes were computed using the percentage of MIB-1 positive cells over total nuclei. When scans were not available for primary tumors, data were extracted from the pathologist reports. The extracellular localization of edema was indicated and its magnitude was graded by the pathologist using a scale ranging from 0 to 3. The maximum passage reached with TICs in culture was indicated, as well as the maximum serial transplant performed in mice. Survival time of xenografted mice was estimated only after pontine injection. Differences in survival time between CDOX & PDOX for each model and tumor location were statistically tested (***P*<0.01, T-test).

N.D: not determined; N.S: not significant.

indexes appeared mostly similar in the xenograft models as compared to the primary biopsies (Table 2).

More importantly, these staining highlighted the presence of intermingled tumor and normal stromal cells, thus confirming that CDOX and PDOX models recapitulate the main histological hallmark of DIPG with an extensive infiltration of the brain parenchyma by tumor cells without formation of a tumor mass and without neovascularization. Likewise, mouse xenografts displayed moderate to high extracellular edema, as observed in the primary tumor, pericellular or along the axonal stream (Table 2 and Supplementary Figure 2).

The immunophenotype of the human tumor is conserved in mouse xenograft models

The additional labeling of proteins currently used for DIPG diagnostic purposes were performed in parallel on primary tumors and both NEM290 and NEM292 xenograft models. We first stained the intermediate filament Vimentin, a known marker of neural stem cells and early glial progenitors, also detected in gliomas and reactive astrocytes, but barely expressed in the normal

brain [22] (Figure 3D-3F). We observed in the models an expression of Vimentin in tumor cells recapitulating the primary tumor and confirming the glial phenotype of the cancer cells. Strikingly, not all tumor cells expressed the marker both in the primary tumor and the models, pointing to a phenotypical intra-tumor heterogeneity. The oligodendrocyte precursor marker OLIG2, which is common to all DIPG, was robustly detected in most if not all tumor cells in primary human and mouse xenograft DIPG samples (Figure 3G-3I). Lastly, the staining of the astrocytic intermediate filament GFAP antibody labeled all reactive and stromal astrocytes in the biopsy. Because of the higher antibody affinity for the human protein, it only detected cells highly expressing GFAP, *i.e.* mouse reactive astrocytes, in the infiltrated parenchyma (Figure 3J-3L). Outside of these areas, the staining was mostly negative (except in the subpial space; data not shown). These results indicate that we could recapitulate the reactive stroma in the xenograft model as observed in primary human tumors. Similar results were obtained in the case of NEM292 (Supplementary Figure 3). Overall, all these staining confirmed the infiltrative nature of an oligo-astrocytic neoplasm of human origin without

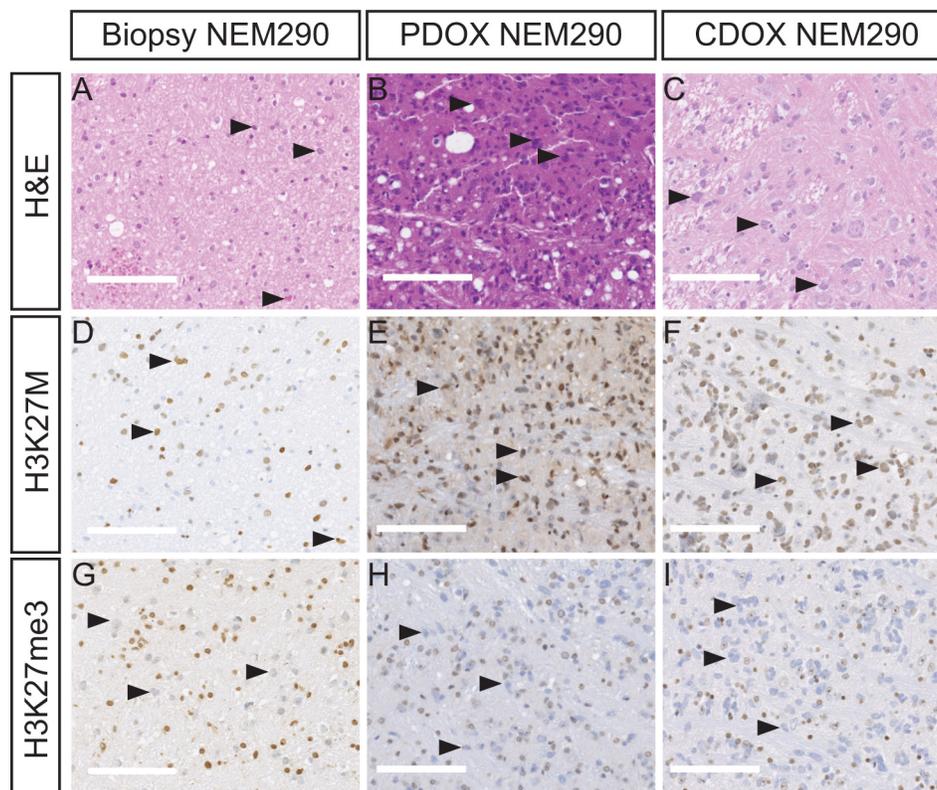


Figure 2: PDOX and CDOX NEM290 models display DIPG hallmarks. Representative results of Hematoxylin & Eosin colorations A-C. and IHC staining for H3-K27M D-F. or H3K27 trimethylation mark G-I. in the tumor biopsy NEM290 and the corresponding PDOX and CDOX. In all three cases, H&E and IHC allowed the detection of abnormally-shaped nuclei, tumor cells positive for the histone mutation K27M as well as cells losing the trimethylation marks at position 27 of histone H3, thus showing the conservation of the DIPG hallmarks in the PDOX and CDOX mouse models. Arrowheads in the different panels highlight example of characteristic tumor cells. (Scale bars: 125 μ m).

tumor mass formation, that showed identical features of differentiation, biomarker heterogeneity and reactive astrogliosis found in the primary DIPG. Also, all staining showed identical results for both direct (PDOX) and indirect (CDOX) NEM290 xenografting approaches.

Infiltration of the brain parenchyma and dissemination of DIPG tumor cells

IHC labeling of H3-K27M protein on sagittal sections allowed us to investigate the location of tumor cells in the whole brain. Indeed, H3-K27M positive-cells were detected in the entire pons – beyond the injection site, mixed with unlabeled normal cells in both PDOX and

CDOX models (Figure 2D-2F and Figure 4). There was an expansion of the cancer cells without any tumor mass formation thus highlighting a pairing of the infiltration process with the tumor growth.

The full sagittal sections showed that H3-K27M positive-cells were not restricted to the pons but infiltrated massively toward the rostral axis of the brain, the cerebellum, the subpial space, the cortex and the thalamus (Figure 4, Supplementary Figures 6-9). We observed to a lesser extent infiltration in the spinal cord (data not shown). Interestingly, in approximately 30% of injected mice, tumor cells also migrated in the olfactory bulbs through a ventral path along the meninges in lateral

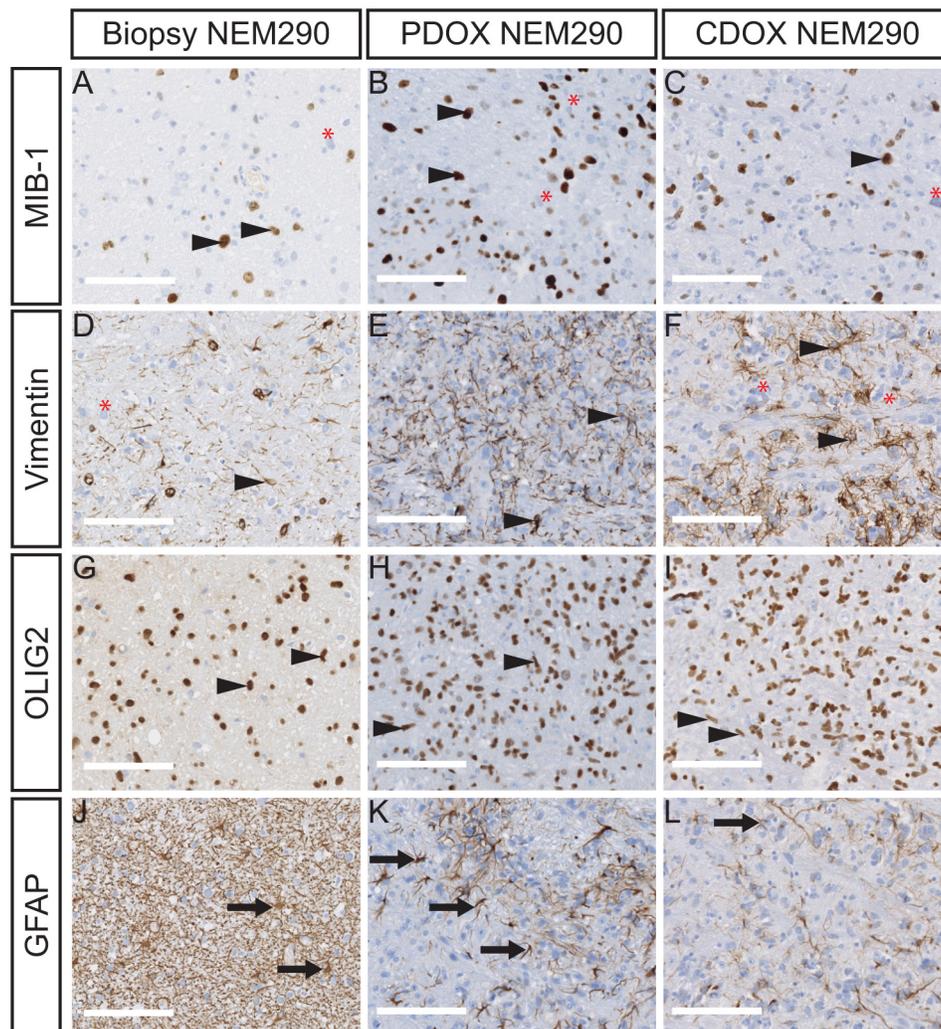


Figure 3: PDOX and CDOX NEM290 models harbor consistent histopathological features of the DIPG tumor of origin.

Representative microphotograph of NEM290 tumor biopsy and sagittal sections of PDOX & CDOX corresponding models labelled for MIB-1 **A-C.**, Vimentin **D-F.**, OLIG2 **G-I.** and GFAP **J-L.** The staining for MIB-1 and Vimentin show both positive and negative tumor cells in all samples, reflecting the phenotypic tumor heterogeneity. OLIG2 positivity is pervasive in both normal and tumor cell compartments. High GFAP levels were mainly detected in reactive astrocytes in all samples, but a stronger staining on basal human stromal cells was observed in the biopsy sample. Arrowheads indicate positive tumor cells. Red asterisks indicate negative tumor cells. Arrows indicate normal parenchymal cells. (Scale bars: 125 μ m).

hypothalamic and olfactory stream areas (Supplementary Figures 6 and 7).

Bioluminescence, fluorescence of CDOX models

A major advantage of CDOX models over PDOX is the possibility to longitudinally monitor disease progression by bioluminescence and fluorescence imaging. We consequently assessed the *in vivo* tumor growth kinetics by recording the bioluminescence (BLI) signal every 15-25 days. The models tested showed an increase of the signal with a doubling time around 10.9 ± 1.4 days ($n=3$ mice) in the case of NEM290, and 7.4 ± 0.4 days ($n=5$ mice) in the case of NEM292 (Figure 5A-5D and Table 2). The bioluminescence curves for the 4 others CDOX models are presented in Supplementary Figure 10.

The proliferation rate *in vivo* was always lower compared to *in vitro* TICs, which doubled approximately every 2 or 3 days (Table 2). For CDOX NEM290 and NEM292, the models with the most important number of biological replicates, we observed the appearance of clinical symptoms, and thus the terminal stage of the disease, at the same BLI level (around 10^8 p/s/cm²/sr) in several distinct experiments. Besides, the additional CDOX models showed mostly equivalent BLI at end-stage (10^8 - 10^9 p/s/cm²/sr; Supplementary Figure 10).

Moreover, red fluorescence of cells in CDOX models allowed for the detection of the tumor location after brain excision by using macroscopic imaging of the whole brain, highlighting the extensive infiltration of the mouse brain (Figure 5E; Supplementary Figure 11). The tracking of tumor invasion at single cell resolution on slices by confocal microscopy highlighted the migratory stream of tumor cells in the brain (Figure 5F-5G). Also, dissociated tumor cells could be retrieved from the animal samples by FACS for subsequent analyses thanks to their fluorescence.

In order to demonstrate the value of these models to conduct preclinical drug evaluation by bioluminescence monitoring of tumor growth, we performed an *in vivo* evaluation of the effect of panobinostat, a drug known to be effective in DIPG [23]. We could confirm a moderate but statistically significant effect of panobinostat on CDOX NEM292 tumor growth (Figure 5H).

Blood-brain barrier integrity of CDOX models

Several reports have shown that a proportion of DIPG tumors at diagnosis present a relatively intact and functional blood-brain barrier (BBB) as assessed by MRI contrast enhancement [8, 24]. We thus tried to check the status of the BBB in the DIPG xenograft models. First, looking at hematoxylin & eosin staining, we did not observe a microvascular proliferation that would go along with compact tumor tissue or necrotic areas even at late stage of tumor development (Figure 2 and

Supplementary Figure 12). Still, we probed the expression of GLUT1, which loss of expression in endothelial cells can accompany BBB disruption in several different pathophysiological conditions [25]. In both CDOX NEM290 and NEM292, we observed a staining of endothelial cells from vessels and capillaries in the brain parenchyma. However, the region of the brain infiltrated with tumor cells (pons) showed much less intense staining (Supplementary Figure 12). Given these discrepancies, we finally checked for a functional disruption of the BBB by assessing Evans blue dye extravasation after intravenous injection in normal and tumor bearing mice [26, 27]. As expected for control mice, the brain remained unstained, as opposed to other peripheral organs (such as kidney; Supplementary Figure 13A-13M). The same experiment conducted on CDOX NEM290 and NEM292 led to identical results, without evidence of blue dye diffusion in the brain and in particular in the infiltrated pons (Supplementary Figure 13).

Implanted tumors are detectable by ultra-high field MR-imaging

We finally investigated how MR-imaging modalities of DIPG were recapitulated in CDOX models. Indeed, T2-weighted MRI is one of the only non-invasive methods for DIPG diagnosis, showing an infiltration respecting the pontine fiber tracts and an inflated brainstem in patients. We performed *ex-vivo* T2-RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) MR acquisition at 11.7 Tesla in 3 different animals: the first showing an intermediate bioluminescence radiance signal at 10^7 (28 days post-graft), the second in a mouse reaching 10^8 (77 days post-graft) that we characterized as advanced stage of the disease, and a last non-injected control mouse. Only anatomical changes were observed due to the highly infiltrative nature of the tumor with a shift of the midline to the left in coronal and axial view, much more pronounced in the 10^8 BLI-positive mouse than in the 10^7 (Figure 6C, 6F vs. 6B, 6E). The inflation of the pons was also more prominent at higher BLI signal on sagittal panels (Figure 6H vs. 6I). We also noticed a slight hyperintensity in the right side of the brainstem corresponding to the site of injection on the axial panel (Figure 6F).

DISCUSSION

We show here that it is possible to derive xenografts from DIPG stereotactic biopsies performed at diagnosis with two distinct methods based either on the direct implantation of tumor cells right after the biopsy or after few passages *in vitro* (PDOX or CDOX, respectively). Tumor behavior in mice recapitulated the natural history of the disease with similar symptoms and a rapid onset after a long silent period [28]. The take rates of the different models using adult nude mice were high –even

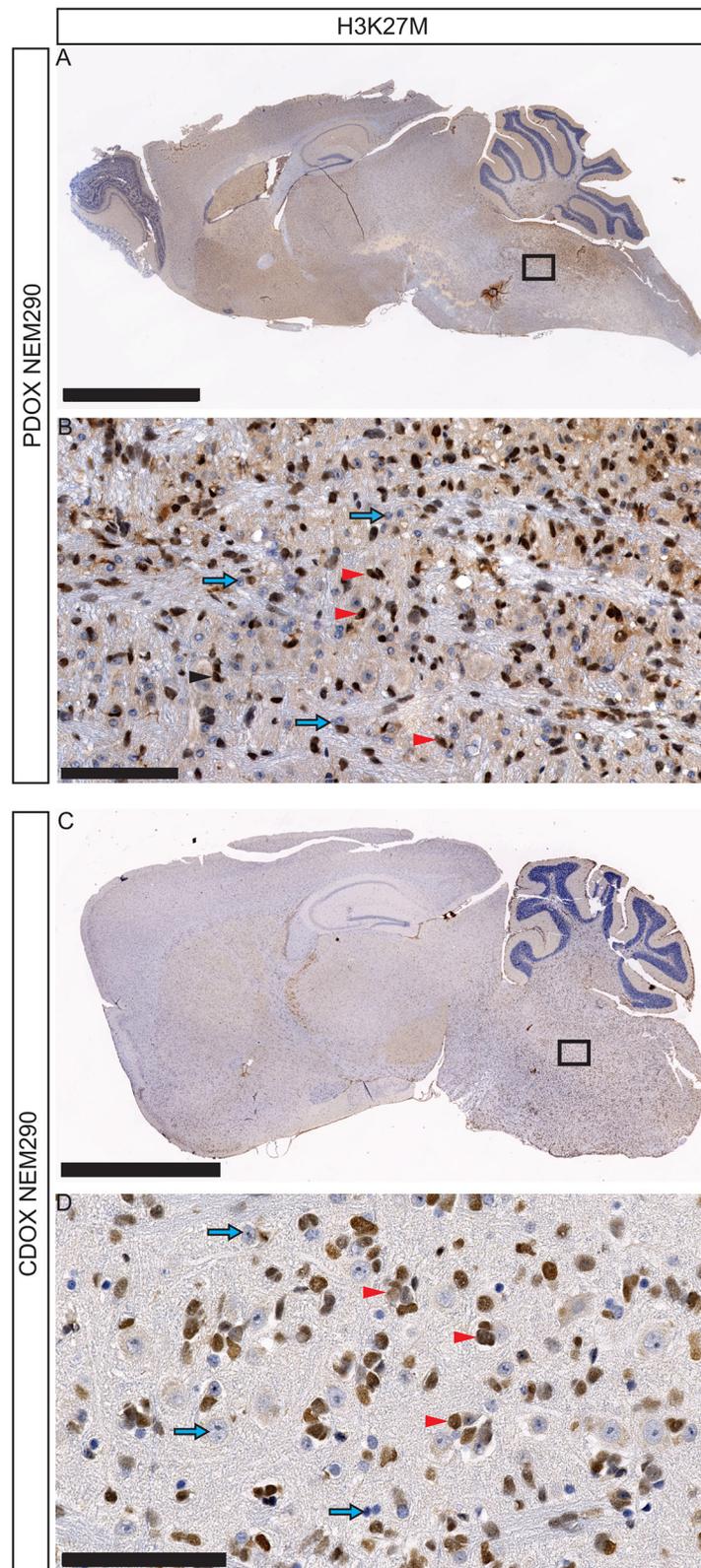


Figure 4: Invasion and dissemination of tumor cells within PDOX and CDOX models of NEM290. A. Representative low magnification microphotograph of a sagittal section of PDOX NEM290 stained for H3-K27M mutation (brown nuclei) and B. 30X close-up from the square region. C. H3-K27M immunostaining of a sagittal section of CDOX NEM290 and D. corresponding 30X magnification. An invasion around the injection point in the pons, toward the cerebellum and the rostral axis is observed in both cases, as well as subpial and subventricular dissemination. (Scale bars: A and C, 2.5 mm; B and D, 100 μ m). Red arrowheads indicate positive tumor cells; blue arrows indicate negative non-tumor cells.

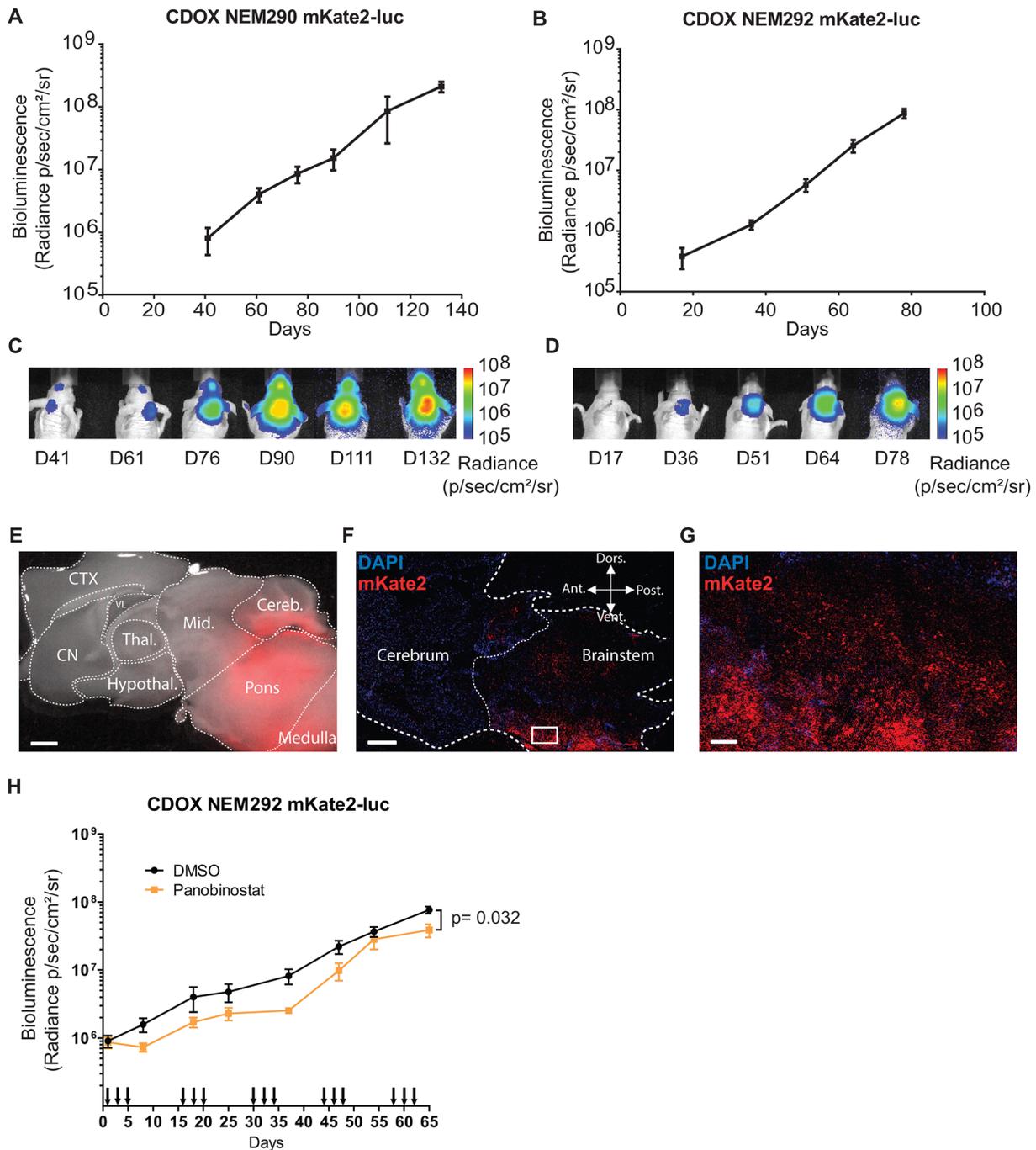


Figure 5: *In vivo* tumor growth can be monitored by bioluminescence and fluorescence. A-B. Longitudinal follow-up of tumor growth by quantification of the luciferase activity in the pontine region of CDOX NEM290 mKate2-luc and CDOX NEM292 mKate2-luc, respectively. Both models show a robust exponential growth of BLI. Results are represented as mean \pm SEM (n=3 and n=5 replicate experiments). C-D. Corresponding representative images of bioluminescence in the aforementioned CDOX models. E. Overlay of bright-field and mKate2 fluorescence (red) microphotographs of a brain sagittal section of CDOX NEM292 at 5X magnification. Note the extensive infiltration and invasion towards the cerebellum and midbrain. (Scale bar: 1 mm). F. Confocal micrograph of a sagittal section of CDOX NEM292 with Hoechst (blue) and mKate2 (red) fluorescence at 10X magnification. (Scale bar: 1mm). G. 20X magnification of the square region highlighted in F, showing the infiltration of the parenchyma by tumor cells. (Scale bar: 100 μ m). H. Preclinical evaluation of the activity of the panobinostat on DIPG tumor growth by longitudinal quantification of the luciferase activity in the pontine region of CDOX NEM292 mKate2-luc after panobinostat (n=7 mice) or DMSO (control vehicle, n=9 mice) injections. Panobinostat was administered I.P., three times a week at 10 mg/kg, every other week. Injections are indicated by arrows on the x-axis. Results are represented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; Statistical permutation test (see methods). CTX: cortex; CN: cerebral nuclei; Thal.: thalamus; Hypothal.: hypothalamus; Mid.: midbrain; Cereb.: cerebellum; VL: lateral ventricle; Ant.: anterior; Vent.: ventral; Dors.: dorsal; Post.: posterior.

post-freezing of tumor cells, around 55-60% for both PDOX and CDOX, which is much higher than the take rate of other malignant pediatric tumors in our hands [29, 30]. Our xenografting results using NSG mice are however too limited to firmly conclude that these are not superior to nude mice in terms of take rate – especially for PDOX development. We did not observe differences in tumorigenicity between the direct and indirect xenografting methods ($P=1$; Fisher exact test). Also, xenograft take rate was not linked to the type of histone H3 mutated. We found a significant correlation between patient and CDOX survival, not retrieved in the comparison patient vs. PDOX. This discrepancy could originate from distinct number of injected cells between models that could not be controlled before

injection in contrast with CDOX models. Besides, we observed that PDOX survival time tend to be shorter than CDOX which could reflect an impact of the stroma and microenvironment injected together with the tumor cells. There are few publications describing xenograft models of DIPG and only limited information is available in the literature on the best way to generate these models [15, 16, 31]. Most research groups inject the tumor cells from autopsies and not from stereotactic biopsies in NSG or nude mouse pups or NOD-scid adult mice, but most take rates and information about serial transplantations are not provided, thus limiting the possibility to compare the different strategies.

Detailed histo-pathological analyses demonstrated that PDOX and CDOX tumors look alike, indicating

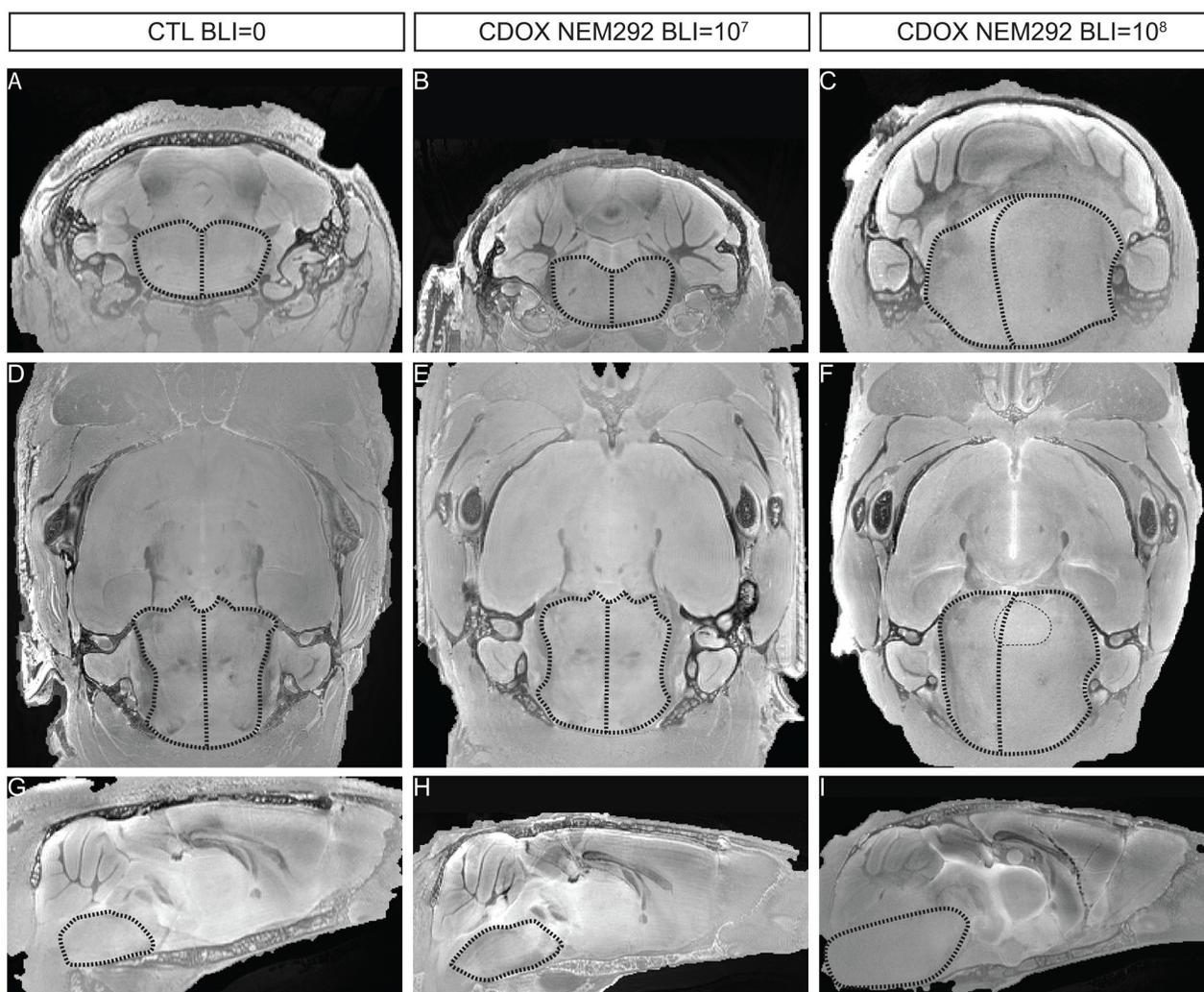


Figure 6: T2-sequence MRI modalities of DIPG are recapitulated in the brainstem of end-stage CDOX models. Anisotropic T2-sequence MR-Imaging at 11.2T of a non-grafted control mouse **A, D, and G.**, CDOX NEM292 showing a 10⁷ BLI level **B, E, and H.** and CDOX NEM292 showing a 10⁸ BLI level **C, F, and I.** For visualization, images were focalized on the pons according to the coronal plane **A, B, and C.**, the axial plane **D, E, and F** and the sagittal plane **G, H, and I.** sections. Anatomical changes with a midline shift and pons hypertrophy were observed for the 10⁸ BLI mouse only. A hyperintensity could also be observed in the pontine region (highlighted with dots in F). Brainstem and midline are depicted by dashed lines.

that *in vitro* selection of tumor-initiating cells (TICs) does not modify the phenotype of the xenografts and that TICs can recapitulate the entire tumor. Remarkably, only tumors of human origin were observed in our PDOX nude models from pre-treatment biopsies, contrary to previous published reports using autopsy samples [31].

In depth analysis of the resulting tumors showed that the xenografts retained the phenotype of the patient's tumor in particular the main hallmarks of DIPG, *i.e.* a mostly infiltrative phenotype without any tumor mass, the absence of neovascularization, a functional BBB and the conservation of the H3-K27M mutation identified in patients and the characteristic H3K27 trimethylation loss. In addition, we observed a close conservation in the expression of embryonal and neural differentiation genes (GFAP, OLIG2 or Vimentin), as well as similar proliferation indexes between the models and primary tumors. The phenotypic heterogeneity observed in primary DIPG, more strikingly defined by the presence or absence of Vimentin expression, was recapitulated. Similarly, both cycling and non-cycling tumor cells (*i.e.* MIB-1 negative) were identified in the models as in the patient tumor. Interestingly, the influence of the tumor on brain parenchyma was recapitulated in the mouse as shown by the presence of a reactive astrogliosis and pericellular edema.

A common evolution of the disease is the extensive invasion of DIPG cells in neighboring brain structures, or even in distant location. In late-stage xenograft models, we found such invasion of the pons, cerebellum and thalamus and to a lesser extent the spinal cord. Whole brain observation of our models identified also long distance migration in preferential routes such as subpial and ventricular zones, or metastasis in the olfactory bulbs. However, no particular immuno-phenotypic differences could be observed between invading cells and pontine "resident" tumor cells.

MRI did not allow a proper follow-up of these infiltrative models except at end-stage. In this regards, CDOX models are powerful tools allowing the *in vivo* follow-up by bioluminescence only few weeks after injections. The robustness of BLI increase permits to precisely analyze distinct stage of disease development. Likewise, the additional fluorescent reporter is also particularly convenient to identify the tumor cells and metastases in the fresh tissue, and allows for FACS sorting of the living tumor cells from the animal for further study. Finally, these CDOX models constitute a potent platform, as TICs can be modified using lentiviruses prior to their injection in order to assess the *in vivo* consequences of gene modulation (overexpression or knock-down).

One of the advantage of our models in comparison with the GEMMs is the use of cancer cells presenting from start the genetic consequences of the epigenetic modifications, such as the global trimethylation loss resulting from the H3-K27M alteration that needs a

significant number of division before it can be observed, together with the associated mutations landscape [9]. Indeed, it is difficult to recapitulate in GEMMs the temporal succession of genetic alterations occurring during oncogenesis.

Xenografts generated from treatment-naïve diagnostic samples may usefully complement those generated from the autopsies. The former represents the initial stages of the disease, *i.e.* the ideal situation to test new drugs to be incorporated in the initial management of patients. The later represent the end stages of the disease, *i.e.* models that usually display additional alterations resulting from treatments and progression, with potentially more aggressive behavior mirrored by faster growth rates [23]. Autopsy models thus appear more appropriate to test for resistance mechanisms and understand the evolution of the disease by comparison with models derived from biopsies performed at diagnosis. Depending on the biological question, the different types of models now available in the field would interestingly complement each other in order to ease the understanding of the disease and the development of efficient therapeutics.

MATERIALS AND METHODS

Tissue collection

All DIPG tumor samples were stereotactically biopsied at diagnosis in Necker-Enfants malades hospital (Paris, France). Informed consent for the translational research program was obtained from the parents or guardian according to the IRB approved protocol (CNIL 1176643). Patient's clinical characteristics are summarized in Table 1. Blood DNA extracted from the blood of patients was banked under the same informed consent.

Immediately in the operating room, one core biopsy sample of the tumor was transferred into DMEM with 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco). Within 24-hours after surgery, biopsies measuring approximately 1 x 4 mm were mechanically dissociated by pipetting into serum-free medium in order to obtain a single-cell suspension. Another sample was directly snap frozen in dry ice and processed later for DNA extraction.

Tumor-initiating cells (TIC) culture

The dissociated tumor cells suspension was cultured as an adherent monolayer in laminin-coated flask (Sigma) with a medium consisting of NeuroCult NS-A with proliferation supplement (Stemcell technologies), heparin (2 µg/mL, Stemcell technologies), human-basic FGF (20 ng/ml, Peprotech), human-EGF (20 ng/ml, Peprotech), PDGF-AA (10 ng/ml, Peprotech), and PDGF-BB (10 ng/ml, Peprotech). Medium was renewed every 2-3 days and passaging was performed when cells reached a

confluence around 70-80%. Doubling time of TICs was evaluated based on proliferation assay recorded by video-microscopy.

Patient-derived orthotopic xenograft and serial transplant

Single-cell suspension from biopsy was centrifuged and resuspended into 50 μ l of serum-free supplemented culture-medium. Female Swiss athymic nude mice were purchased at age 4-6 weeks from the Preclinical Evaluation Platform of Gustave Roussy. Mice were kept under sterile conditions in insulators and received food and water *ad libitum*. For tumor cells implantation, mice were anesthetized by 2.5% isoflurane (1.5 L O₂/min) and placed into a stereotactic frame. For the first graft, 5 μ l of cell suspension was injected into the thalamus of two mice, and for more recent biopsies 3 μ l of cell suspension was also injected into the pons of a third mouse. After appearance of neurological symptoms or more than 20% body weight loss, mice were sacrificed by CO₂ inhalation. Brain was removed under sterile conditions and divided in two parts following the sagittal plane. The injected side of thalamus or pons (according to injection coordinates) was isolated and cut to obtain 1mm³ pieces using a sterile scalpel, and then enzymatically dissociated using the Tumor Dissociation Kit following the manufacturer instructions (Milestone, Germany) and the cell suspension was passed through 100 μ m strainers. Thereafter, cells were centrifuged and washed with 1X PBS prior to be resuspended in serum-free supplemented-medium. One fifth of the resulting cell suspension was xenografted into the thalamus or pons of several recipient mice, corresponding to passage 1. Each mouse was injected with the equivalent of 1/20th of the dissociated tumor in 5 μ l for thalamic injections and 3 μ l for pontine injections. The remaining cells (4/5th) were frozen in serum free medium supplemented with 10% DMSO to allow for biobanking. The procedure was repeated until passage 3. At this time, the cells were grafted into the pons of mice in 3 μ l of medium. The remaining half of the brain was fixed in Formol/Zinc overnight at room temperature and then processed for IHC.

Stereotactic coordinates used to target the thalamus or the pons were: 3 mm posterior, 2 mm lateral to bregma, 3.5 mm deep, or 1 mm posterior, 1mm lateral to lambda and 5 mm deep, respectively. All *in vivo* experiments were performed under conditions established by the European Community and approved by the CEEA26 Ethic Committee and the French Ministry (approval number: APAFIS#675 and APAFIS#1141).

Lentiviral transduction

The coding sequences of the fluorescent protein mKate2 [32] and *Photinus pyralis* (Firefly) luciferase were cloned in frame downstream of a synthetic CAG promoter

in a pLVX lentiviral vector (Clontech) with a P2A autocleavable peptide between them. Lentiviral particles were produced in HEK293T cells using psPax2 and pMD2.g second-generation packaging plasmids (Addgene #12260 and #12259). TICs were transduced around passage 7 for 4 hours with concentrated virus at a multiplicity of infection about 2 and the medium was then renewed.

Development of cell-derived orthotopic xenograft

TICs within the two passages subsequent to lentiviral transduction were harvested with accutase and resuspended in serum-free supplemented-medium. Three hundred thousand cells were injected into the pons of adult mice in a total volume of 3 μ L (*i.e.* 100,000 cells/ μ l) as described above. Mice were kept under specific pathogen-free conditions in air-filtered cages and received food and water *ad libitum*. Tumor growth was monitored using an IVIS 50 system with charge-coupled device (CCD) camera (PerkinElmer) every 2-3 weeks. Mice were anesthetized as described previously and imaged 10 min after intraperitoneal injection of luciferin (150 mg/kg body weight, Promega). Radiance signal intensity (normalized photon counts in photons/second/cm²/steradian) in the pons region was quantified using Living Image software (Perkin Elmer). Doubling time of the CDOX models was estimated based on bioluminescence exponential curves.

***In vivo* administration of Panobinostat**

Administration of Panobinostat was performed by intraperitoneal (I.P.) injections of 10 mg/kg at day 1, 3 and 5, every other week, up to 62 days post xenograft. Control mice were injected with identical concentration of vehicle (DMSO). Panobinostat was dissolved as described by Grasso *et al.*, [23] at 70 mg/ml in DMSO, then serially diluted in water to a concentration of 1 mg/ml such that 10 μ l per gram of weight (or ~200 μ l total) were injected I.P. at each administration. Longitudinal tumor growth monitoring was performed by bioluminescence measurement as aforementioned. A statistical permutation test with the 'compareGrowthCurves' function of the statmod software package for R (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/compareCurves>) was used to evaluate the significance of differences in the rate of tumor development between the two groups and 10,000 permutations were performed [33, 34]. The initial *P*-values were adjusted for multiple testing correction using Holm's method.

Immunohistochemical staining

Intracardiac perfusion with 10 mL of 1X PBS was performed in mice to remove blood from the brain and subsequent perfusion of 10 mL Formalin/Zinc (formol 5%; Zinc 3 g/L; sodium chloride 8 g/L; MM-France)

was performed for brain fixation with an osmotic pump delivering 7 mL/min. Brains were extracted and fixed for an additional 24 hours in Formalin/Zinc solution at room temperature prior to paraffin-embedding.

Representative formalin-zinc fixed sections were deparaffinized and subjected to a Ventana autostainer (BenchMark XT, Ventana Medical system, Tucson, USA) with routine protocols. Antigen retrieval was performed either with a standard pretreatment protocol including CC1 buffer for MIB-1 (Ki67, 1/100, Dako) and GLUT1 (1/100, ab652 AbCam) or in a semi-automatized system using a microwave antigen retrieval (MicroMED T/T Mega; Hacker Instruments & Industries, Inc., Winnsboro, SC) for 30 minutes at 98°C for OLIG2 (1/500, Sigma), Vimentin (1/750, Dako), GFAP (1/200, Dako), H3K27M (1/1000, Millipore) and H3K27me3 (1/1250, Diagenode). Staining used the RTU Vectastain Universal detection system (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA). Slides were scanned on a NanoZoomer Digital Slide Scanner (Hamamatsu, Japan).

Tumor histology was reviewed by a neuropathologist (P.V.). Tumors were classified and graded according to the 2007 WHO classification. The quantification of MIB-1 positive cells in PDOX and CDOX models as well as biopsies (when available), was performed on scanned slides. To facilitate the quantification, the whole pons and medulla were sectioned into approximately 20 pictures of 20X magnification. Then, a macro was developed on Fiji (2.0.0) to specifically quantify the number of blue nuclei (negative cells) and the number of brown (positive) nuclei. The ratio of positive cells among the total number of nuclei found was then calculated for each picture and results are given as mean +/- SD. When MIB-1 staining of patient tumors were not available, data were extracted from the pathologist report.

Genotyping and STR analysis

Tumor DNA was extracted either from TICs, excess of ungrafted cells during PDOX transplant and FFPE tissue sections for CDOX using the QIAamp DNA Mini kit following manufacturer instructions (Qiagen). Histone H3 genes were amplified by PCR as previously described [8]. PCR products were analyzed by direct Sanger sequencing. Short tandem repeats (STR) analyses on patient blood, xenografted tumor or TICs DNA were outsourced to Eurofins Genomics (Germany).

Fluorescence microscopy

After dissection and fixative perfusion, brains were placed onto a sagittal brain matrix and a 2 mm-slice was cut from the middle line using razor blades. This slice was placed in a 1X PBS solution containing 10 ng/mL of Hoechst for 50 min. Thereafter, the slice was washed in a 1X PBS solution and put either on a dish for macroscopic

imaging (Leica MZFLIII) or in a glass-bottom dish for confocal imaging (Leica SP8).

Serial images taken on the fluorescent microscope were stitched with MosaicJ on Fiji to allow for the reconstruction of the whole brain. Thereafter, red channel corresponding to the mKate2 fluorescence, and bright-light channel were merged with Fiji to allow for the detection of tumor infiltrated structures.

Ex vivo Magnetic Resonance Imaging (MRI) of mouse brains

Mice were anesthetized with sodium pentobarbital (100–150 mg/kg, intraperitoneally), followed by intracardiac perfusion with Formol/Zinc solution (see above). After perfusion, each mouse head was harvested while maintaining brain integrity into the skull, and stored in Formol/Zinc solution at 4°C. Before MRI acquisition, the head was washed into PBS for 48 hours to remove the fixation solution, and then placed into a custom-built MRI compatible tube filled with Fluorinert FC-40, a magnetic susceptibility-matching fluid (3M, Saint Paul, USA).

Ex-vivo MRI acquisitions were performed on an 11.7T preclinical scanner (Bruker, Ettlingen, Germany) equipped with a cryo-coil dedicated to mouse brain. T₂-weighted anatomical images were acquired using a 3D TurboRARE (Rapid Acquisition with Refocused Echoes) sequence: TR = 2 000 ms, TE = 6.75 ms, RARE factor = 8, effective TE = 20.25 ms, number of averages = 6, acquisition time = 23 h. The images dimension was set to 328 x 288 x 168 voxels, with a field-of-view of 16.4 x 14.4 x 8.4 mm³, which provided a high isotropic spatial resolution of 50 x 50 x 50 μm³ for the mouse brain. Such very high isotropic spatial resolution should limit partial volume effects and increase the sensibility to detect morphometric changes. T₂-weighted anatomical images were reconstructed from raw data using homemade routines written in Matlab (Mathworks, Natick, USA). A specific algorithm was used to correct signal heterogeneities induced by the surface coil [35] and 3D visualization of images was obtained with Anatomist software (CEA NeuroSpin, Gif-sur-Yvette, France, <http://brainvisa.info>).

Evaluation of the blood-brain barrier function

Evans Blue dye was diluted in saline solution and administered by retro-orbital injection in CDOX NEM290, CDOX NEM292 and Control non-xenografted mice at 100mg/kg (10ml/kg such as 100μl were injected per 10g of weight). Whole brains were harvested 30 minutes later and imaged under a fluorescent microscope before they were sectioned in 1 mm thick slices in a brain matrix to precisely observe Evans blue dye extravasation (bright-field) and tumor infiltration (red fluorescence). As a

positive control, peripheral organs were checked for their blue coloration. The kidney of the control mouse was harvested and imaged such as described above.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the use of the bioresources of the Necker Imagine DNA biobank (BB-033-00065) and the Tumor Bank of Necker-Enfants malades Hospital, Paris (Pr Thierry Molina and Gisèle Le Gall); We thank Marianne Hütt-Cabezas, Estelle Daudigeos-Dubus, the Plateforme d'évaluation préclinique (Olivia Bawa) and Plateforme d'imagerie et cytométrie (Dr Valérie Rouffiac and Sophie Salomé-Desnoullez) at Gustave Roussy for technical support.

CONFLICTS OF INTEREST

None.

FINANCIAL SUPPORT

This project was funded by Programme STROMAD PL-BIO 14-253 de l'Institut National du Cancer (INCa). DC, MAD, JG and AP also acknowledge supports from Charities "L'Etoile de Martin", "Lemos Family & friends", "Le Défi de Fortunée", Association "K Valentin" and "Du ciel bleu pour Matthieu". SP acknowledges support from the Association pour la Recherche en Neurochirurgie Pédiatrique

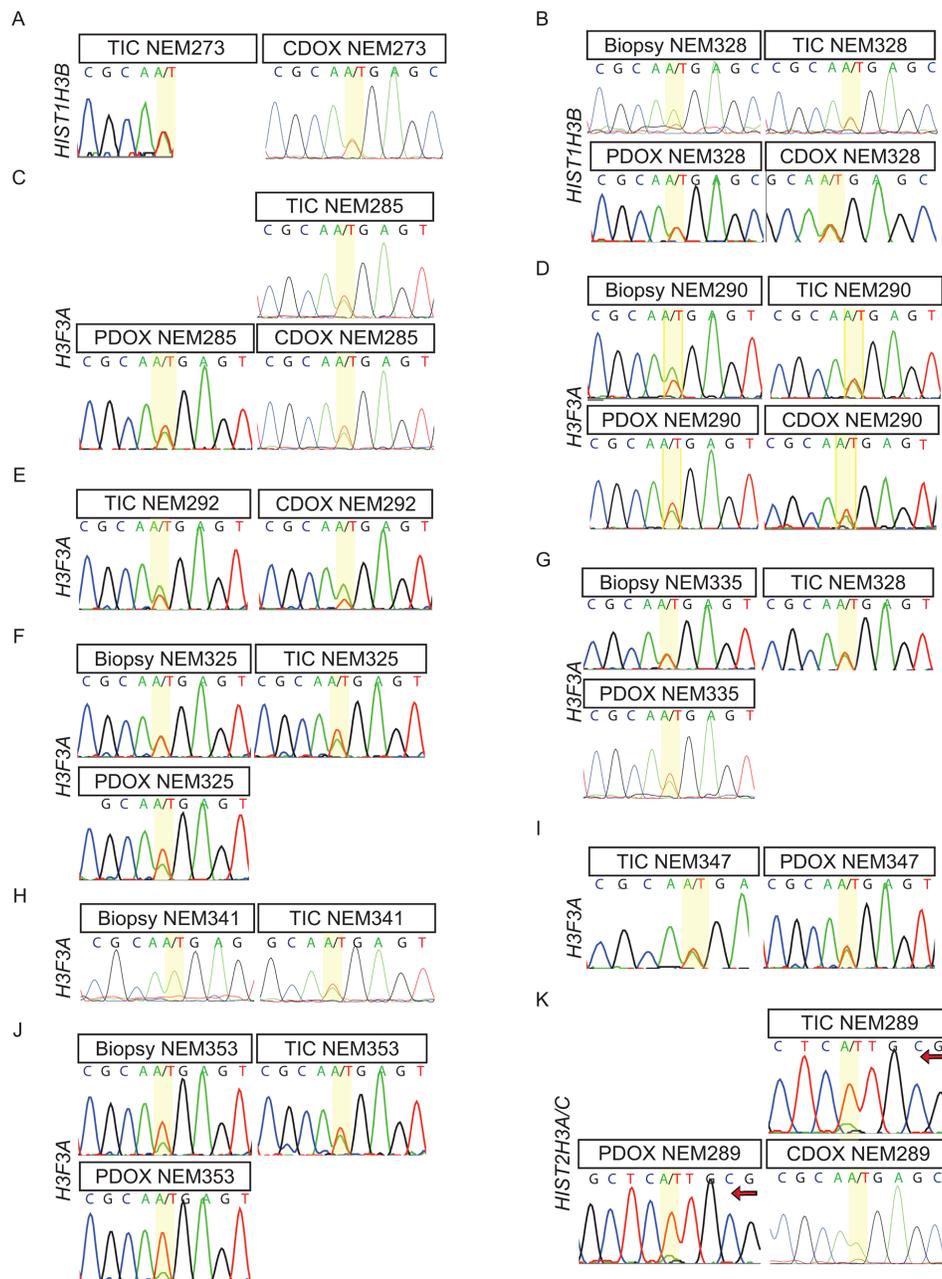
REFERENCES

1. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, Pfaff E, Tönjes M, Sill M, Bender S, Kool M, Zapatka M, Becker N, et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell*. 2012; 22: 425–37. doi: 10.1016/j.ccr.2012.08.024.
2. Reyes-Botero G, Giry M, Mokhtari K, Labussière M, Idbaih A, Delattre JY, Laigle-Donadey F, Sanson M. Molecular analysis of diffuse intrinsic brainstem gliomas in adults. *J Neurooncol*. 2013; 116: 405–11. doi: 10.1007/s11060-013-1312-2.
3. Puget S, Beccaria K, Blauwblomme T, Roujeau T, James S, Grill J, Zerah M, Varlet P, Sainte-Rose C. Biopsy in a series of 130 pediatric diffuse intrinsic Pontine gliomas. *Childs Nerv Syst*. 2015; 31: 1773–80. doi: 10.1007/s00381-015-2832-1.
4. Warren KE. Diffuse intrinsic pontine glioma: poised for progress. *Front Oncol*. 2012; 2: 205. doi: 10.3389/fonc.2012.00205.
5. Robison NJ, Kieran MW. Diffuse intrinsic pontine glioma: a reassessment. *J Neurooncol*. 2014; 119: 7–15. doi: 10.1007/s11060-014-1448-8.
6. Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Quang DA, Tönjes M, Hovestadt V, Albrecht S, Kool M, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*. 2012; 482: 226–31. doi: 10.1038/nature10833.
7. Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfort J, Qu C, Ding L, Huether R, Parker M, Zhang J, Gajjar A, Dyer MA, et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet*. 2012; 44: 251–3. doi: 10.1038/ng.1102.
8. Castel D, Philippe C, Calmon R, Le Dret L, Truffaux N, Boddaert N, Pagès M, Taylor KR, Saulnier P, Lacroix L, Mackay A, Jones C, Sainte-Rose C, et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol*. 2015; 130: 815–27. doi: 10.1007/s00401-015-1478-0.
9. Bender S, Tang Y, Lindroth AM, Hovestadt V, Jones DT, Kool M, Zapatka M, Northcott PA, Sturm D, Wang W, Radlwimmer B, Højfeldt JW, Truffaux N, et al. Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell*. 2013; 24: 660–72. doi: 10.1016/j.ccr.2013.10.006.
10. Chan KM, Fang D, Gan H, Hashizume R, Yu C, Schroeder M, Gupta N, Mueller S, James CD, Jenkins R, Sarkaria J, Zhang Z. The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev*. 2013; 27: 985–90. doi: 10.1101/gad.217778.113.
11. Lewis PW, Müller MM, Koletsky MS, Cordero F, Lin S, Banaszynski LA, Garcia BA, Muir TW, Becher OJ, Allis CD. Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science*. 2013; 340: 857–61. doi: 10.1126/science.1232245.
12. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016; 131: 803–20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
13. Becher OJ, Hambardzumyan D, Walker TR, Helmy K, Nazarian J, Albrecht S, Hiner RL, Gall S, Huse JT, Jabado N, MacDonald TJ, Holland EC. Preclinical evaluation of radiation and perifosine in a genetically and histologically accurate model of brainstem glioma. *Cancer Res*. 2010; 70: 2548–57. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2503.
14. Misuraca KL, Hu G, Barton KL, Chung A, Becher OJ. A novel mouse model of diffuse intrinsic pontine glioma initiated in Pax3-expressing cells. *Neoplasia*. 2016; 18: 60–70. doi: 10.1016/j.neo.2015.12.002.
15. Monje M, Mitra SS, Freret ME, Raveh TB, Kim J, Masek M, Attema JL, Li G, Haddix T, Edwards MS, Fisher PG, Weissman IL, Rowitch DH, et al. Hedgehog-responsive

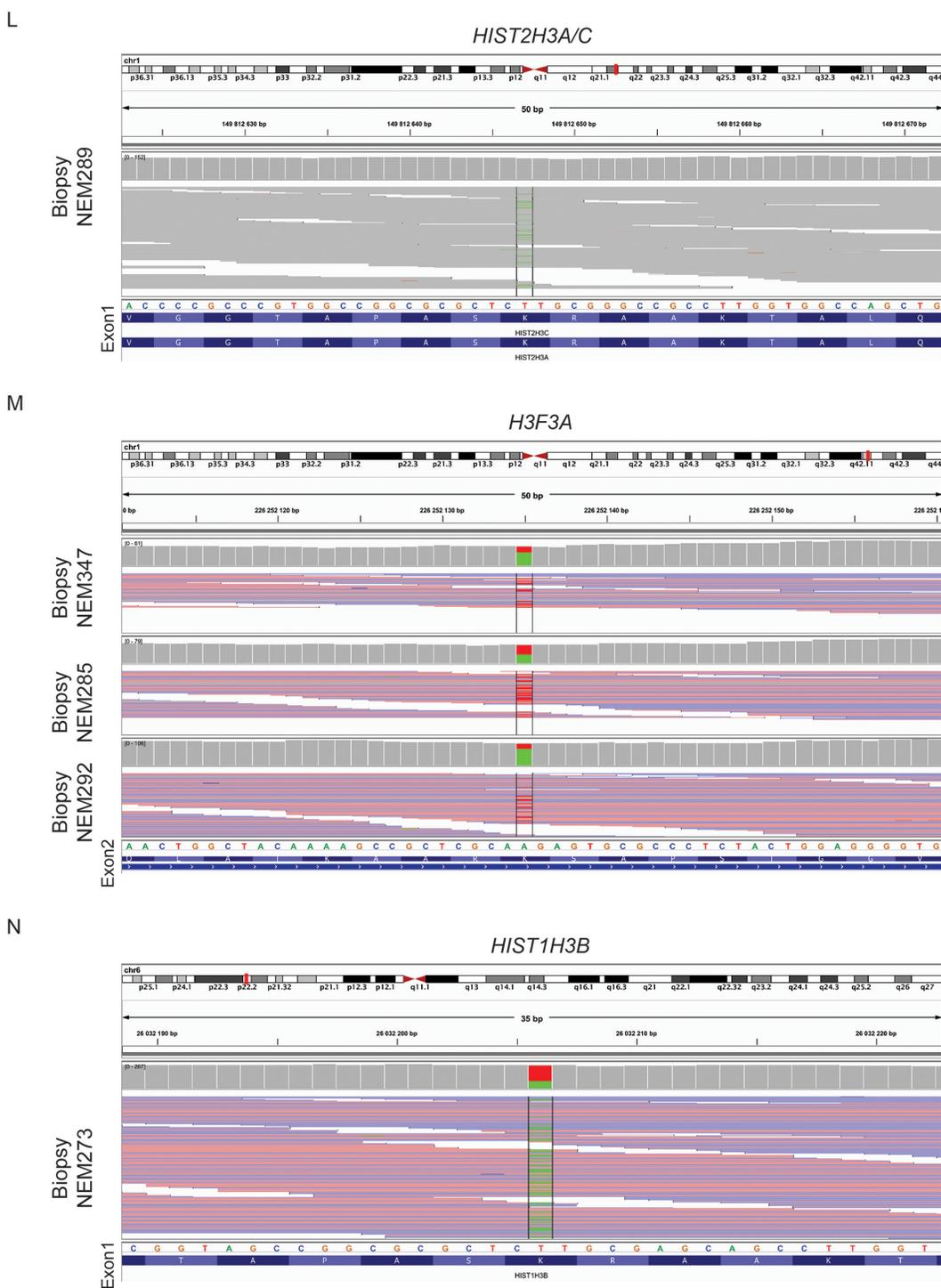
- candidate cell of origin for diffuse intrinsic pontine glioma. *PNAS*. 2011; 108: 4453–8. doi: 10.1073/pnas.1101657108.
16. Kambhampati M, Perez JP, Yadavilli S, Saratsis AM, Hill AD, Ho CY, Panditharatna E, Markel M, Packer RJ, Nazarian J. A standardized autopsy procurement allows for the comprehensive study of DIPG biology. *Oncotarget*. 2015; 6: 12740–7. doi: 10.18632/oncotarget.3374.
 17. Buczkowicz P, Hoeman C, Rakopoulos P, Pajovic S, Letourneau L, Dzamba M, Morrison A, Lewis P, Bouffet E, Bartels U, Zuccaro J, Agnihotri S, Ryll S, et al. Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nat Genet*. 2014; 46: 451–6. doi: 10.1038/ng.2936.
 18. Taylor KR, Mackay A, Truffaux N, Butterfield YS, Morozova O, Philippe C, Castel D, Grasso CS, Vinci M, Carvalho D, Carcaboso AM, de Torres C, Cruz O, et al. Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Genet*. 2014; 46: 457–61. doi: 10.1038/ng.2925.
 19. Zarghooni M, Bartels U, Lee E, Buczkowicz P, Morrison A, Huang A, Bouffet E, Hawkins C. Whole-genome profiling of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas highlights platelet-derived growth factor receptor α and poly (ADP-ribose) polymerase as potential therapeutic targets. *JCO*. 2010; 28: 1337–44. doi: 10.1200/JCO.2009.25.5463.
 20. Paugh BS, Broniscer A, Qu C, Miller CP, Zhang J, Tatevossian RG, Olson JM, Geyer JR, Chi SN, da Silva NS, Onar-Thomas A, Baker JN, Gajjar A, et al. Genome-wide analyses identify recurrent amplifications of receptor tyrosine kinases and cell-cycle regulatory genes in diffuse intrinsic pontine glioma. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 3999–4006. doi: 10.1200/JCO.2011.35.5677.
 21. Puget S, Philippe C, Bax DA, Job B, Varlet P, Junier MP, Andreiuolo F, Carvalho D, Reis R, Guerrini-Rousseau L, Roujeau T, Dessen P, Richon C, et al. Mesenchymal transition and PDGFRA amplification/mutation are key distinct oncogenic events in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *PLoS One*. 2012; 7: e30313. doi: 10.1371/journal.pone.0030313.
 22. Yamada T, Kawamata T, Walker DG, McGeer PL. Vimentin immunoreactivity in normal and pathological human brain tissue. *Acta Neuropathol*. 1992; 84: 157–62.
 23. Grasso CS, Tang Y, Truffaux N, Berlow NE, Liu L, Debily MA, Quist MJ, Davis LE, Huang EC, Woo PJ, Ponnuswami A, Chen S, Johung TB, et al. Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Med*. 2015; 21: 555–9. doi: 10.1038/nm.3855.
 24. Bradley KA, Pollack IF, Reid JM, Adamson PC, Ames MM, Vezina G, Blaney S, Ivy P, Zhou T, Krailo M, Reaman G, Mehta MP. Motexafin gadolinium and involved field radiation therapy for intrinsic pontine glioma of childhood: a Children's Oncology Group phase I study. *Neuro Oncol*. 2008; 10: 752–8. doi: 10.1215/15228517-2008-043.
 25. Guo X, Geng M, Du G. Glucose transporter 1, distribution in the brain and in neural disorders: its relationship with transport of neuroactive drugs through the blood-brain barrier. *Biochem Genet*. 2005; 43: 175–87.
 26. Beccaria K, Canney M, Goldwirth L, Fernandez C, Adam C, Piquet J, Autret G, Clément O, Lafon C, Chapelon JY, Carpentier A. Opening of the blood-brain barrier with an unfocused ultrasound device in rabbits. *J Neurosurg*. 2013; 119: 887–98. doi: 10.3171/2013.5.JNS122374.
 27. Uyama O, Okamura N, Yanase M, Narita M, Kawabata K, Sugita M. Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans blue fluorescence. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1988; 8: 282–4. doi: 10.1038/jcbfm.1988.59.
 28. Jansen MH, Veldhuijzen van Zanten SE, Sanchez Aliaga E, Heymans MW, Warmuth-Metz M, Hargrave D, van der Hoeven EJ, Gidding CE, de Bont ES, Eshghi OS, Reddingius R, Peeters CM, Schouten-van Meeteren AY, et al. Survival prediction model of children with diffuse intrinsic pontine glioma based on clinical and radiological criteria. *Neuro Oncol*. 2015; 17: 160–6. doi: 10.1093/neuonc/nou104.
 29. Vassal G, Terrier-Lacombe MJ, Lellouch-Tubiana A, Valery CA, Sainte-Rose C, Morizet J, Ardouin P, Riou G, Kalifa C, Gouyette A. Tumorigenicity of cerebellar primitive neuro-ectodermal tumors in athymic mice correlates with poor prognosis in children. *Int J Cancer*. 1996; 69: 146–51. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19960422)69:2<146::AID-IJC14>3.0.CO;2-7.
 30. Gaspar N, Grill J, Georger B, Lellouch-Tubiana A, Michalowski MB, Vassal G. p53 Pathway dysfunction in primary childhood ependymomas. *Pediatr Blood Cancer*. 2006; 46: 604–13. doi: 10.1002/pbc.20532.
 31. Caretti V, Sewing AC, Lagerweij T, Schellen P, Bugiani M, Jansen MH, van Vuurden DG, Navis AC, Horsman I, Vandertop WP, Noske DP, Wesseling P, Kaspers GJ, et al. Human pontine glioma cells can induce murine tumors. *Acta Neuropathol*. 2014; 127: 897–909. doi: 10.1007/s00401-014-1272-4.
 32. Shcherbo D, Merzlyak EM, Chepurnykh TV, Fradkov AF, Ermakova GV, Solovieva EA, Lukyanov KA, Bogdanova EA, Zaraisky AG, Lukyanov S, Chudakov DM. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat Methods*. 2007; 4: 741–6. doi: 10.1038/nmeth1083.
 33. Elso CM, Roberts LJ, Smyth GK, Thomson RJ, Baldwin TM, Foote SJ, Handman E. Leishmaniasis host response loci (*lmr1-3*) modify disease severity through a Th1/Th2-independent pathway. *Genes Immun*. 2004; 5: 93–100. doi: 10.1038/sj.gene.6364042.
 34. Baldwin T, Sakthianandeswaren A, Curtis JM, Kumar B, Smyth GK, Foote SJ, Handman E. Wound healing response is a major contributor to the severity of cutaneous leishmaniasis in the ear model of infection. *Parasite Immunol*. 2007; 29: 501–13. doi: 10.1111/j.1365-3024.2007.00969.x.
 35. Mangin JF. Entropy minimization for automatic correction of intensity nonuniformity. *IEEE*. 2000: 162–69. doi: 10.1109/MMBIA.2000.852374.

New *in vivo* avatars of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) from stereotactic biopsies performed at diagnosis

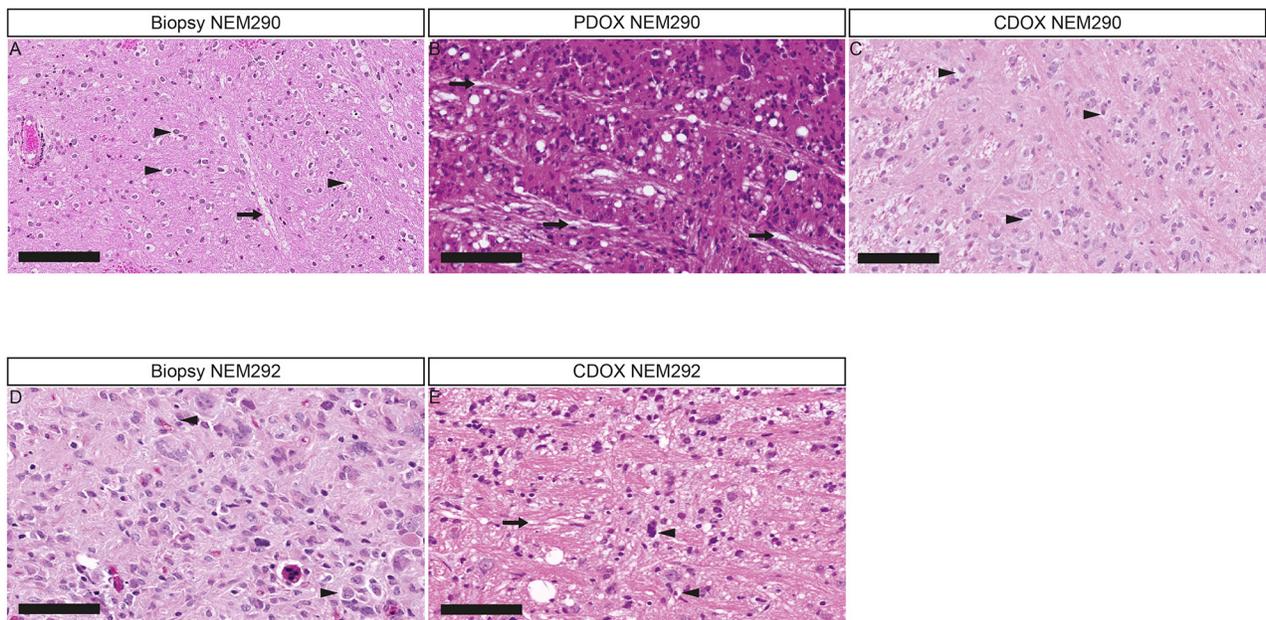
SUPPLEMENTARY MATERIALS



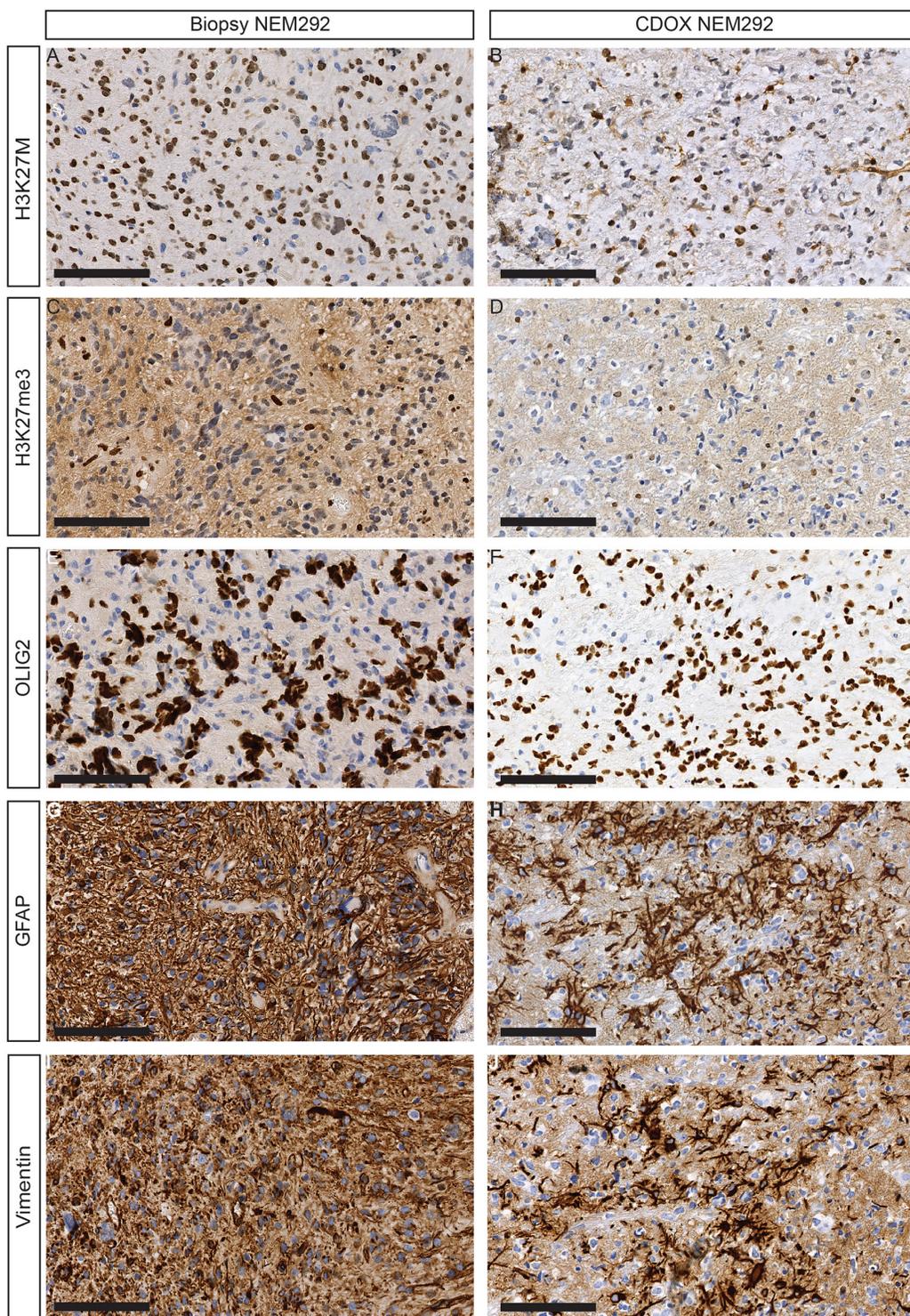
Supplementary Figure 1: Conservation of histone H3 mutation at position K27 in *in vitro* and *in vivo* DIPG models. Sanger sequencing of the *HIST1H3B* A-B., *H3F3A* C-J. and *HIST2H3A/C* K. genes in the primary tumor and corresponding tumor initiating cells (TIC), PDOX and CDOX models. The A to T transversions are highlighted in yellow. The sequence alignments of Whole Exome Sequencing data of *HIST2H3A/C* (Continued)



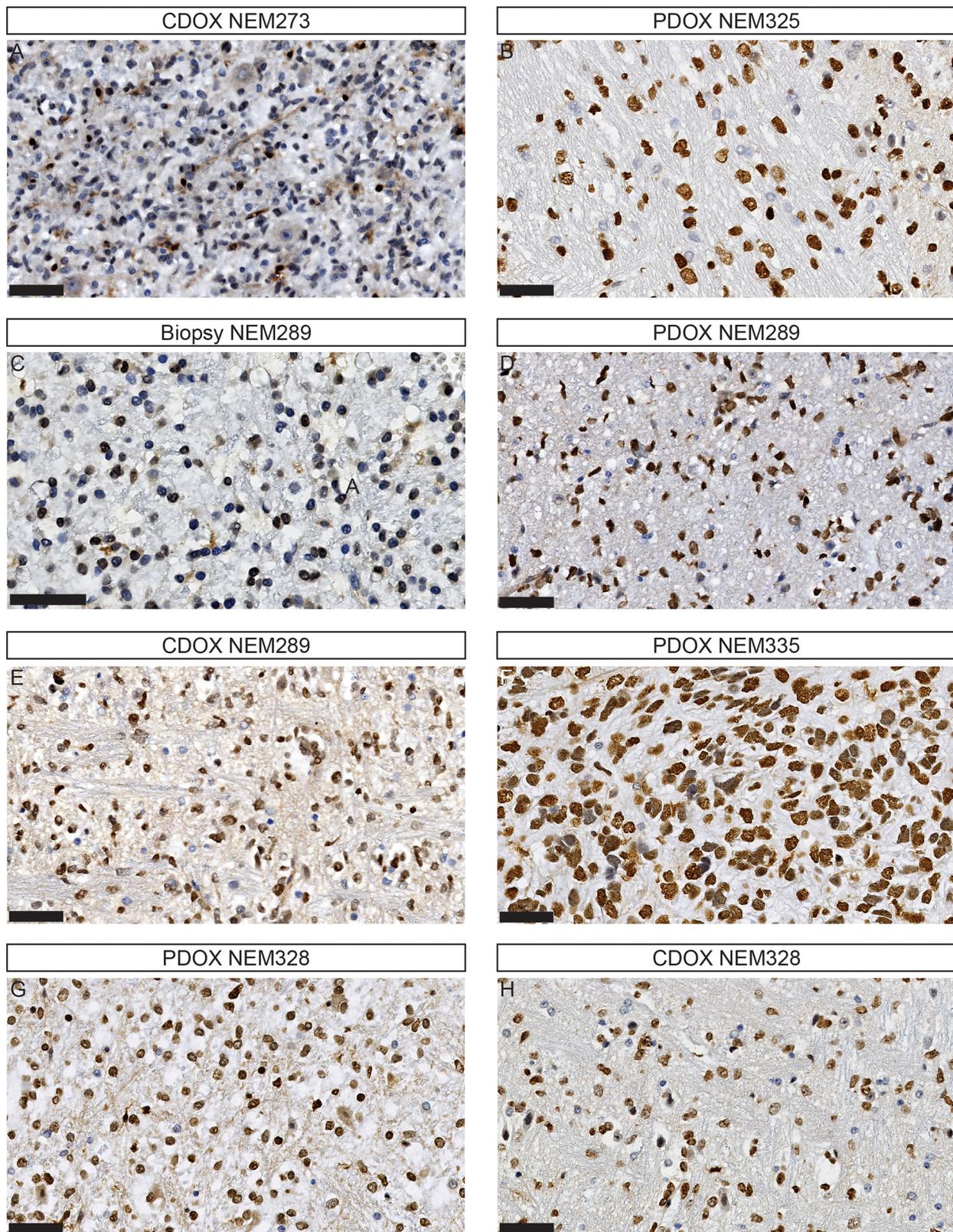
Supplementary Figure 1: (Continued) Conservation of histone H3 mutation at position K27 in *in vitro* and *in vivo* DIPG models. L., *H3F3A* M. and *HIST1H3B* N. genes were viewed using the Integrative Genomics Viewer (IGV) for 5 distinct biopsies. NEM289 biopsy is mutated in *HIST2H3A* at position K27 as shown by green bases. The variant allele frequency is estimated at 20% (reads appear in grey due to multiple alignment since the locus is duplicated in the genome). *H3F3A* K27M mutation was confirmed in NEM347, NEM285 and NEM292 biopsies as the mutation was found in reads at a frequency of 30%, 50% and 24%, respectively (wild-type and mutated bases are shown in green and red, respectively). *HIST1H3B* K27M was detected in 65 % of the reads (wild-type and mutated bases are shown in green and red, respectively).



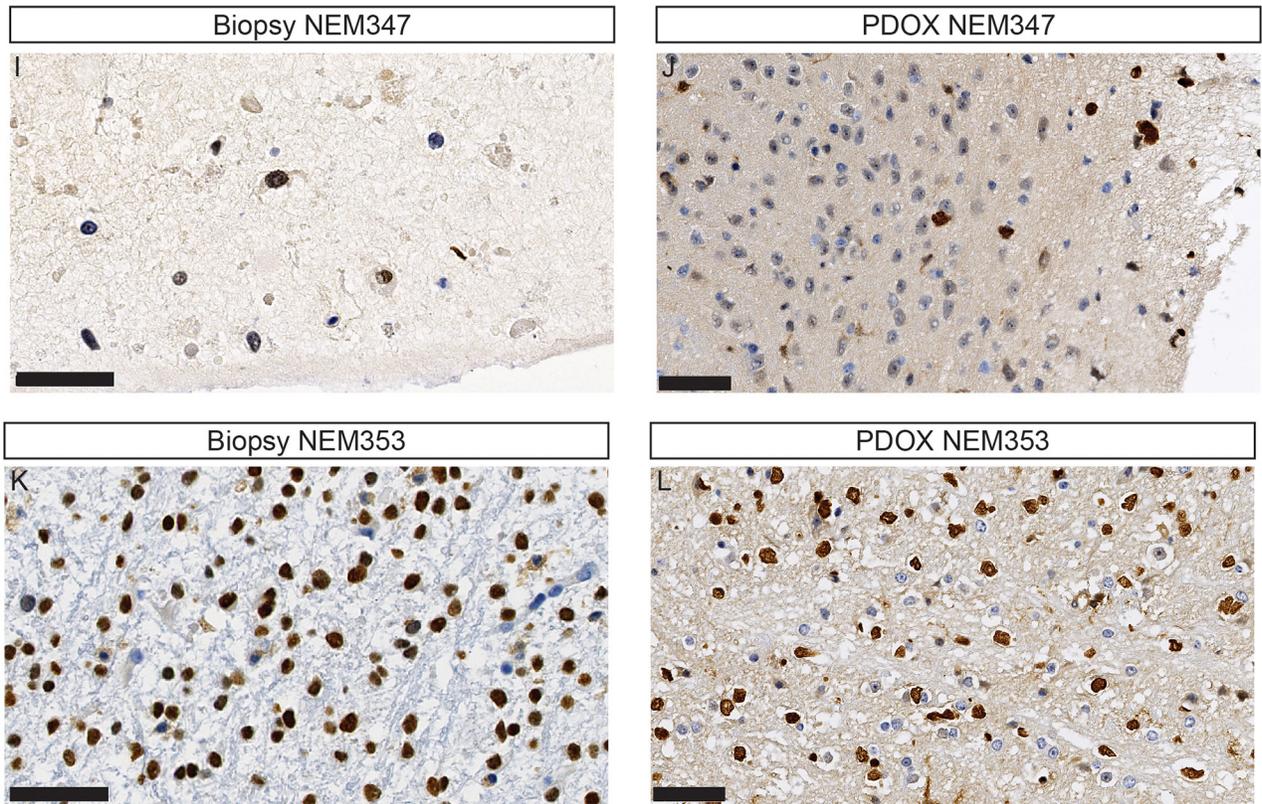
Supplementary Figure 2: Extracellular edema and edema along axonal stream in PDOX and CDOX models in regards to the primary tumor. Hematoxylin and Eosin coloration for NEM290 biopsy, PDOX NEM290 & CDOX NEM290 **A-C.**, and NEM292 biopsy & CDOX NEM292 **D and E.**, respectively. The three models harbor extracellular edema as observed in the primary tumors, even if more pronounced in the case of NEM292. Some edema following axonal streams is also observed in most cases. (Arrowheads indicate pericellular edema. Arrows indicate edema following axonal streams. Scale bars: 125 μ m).



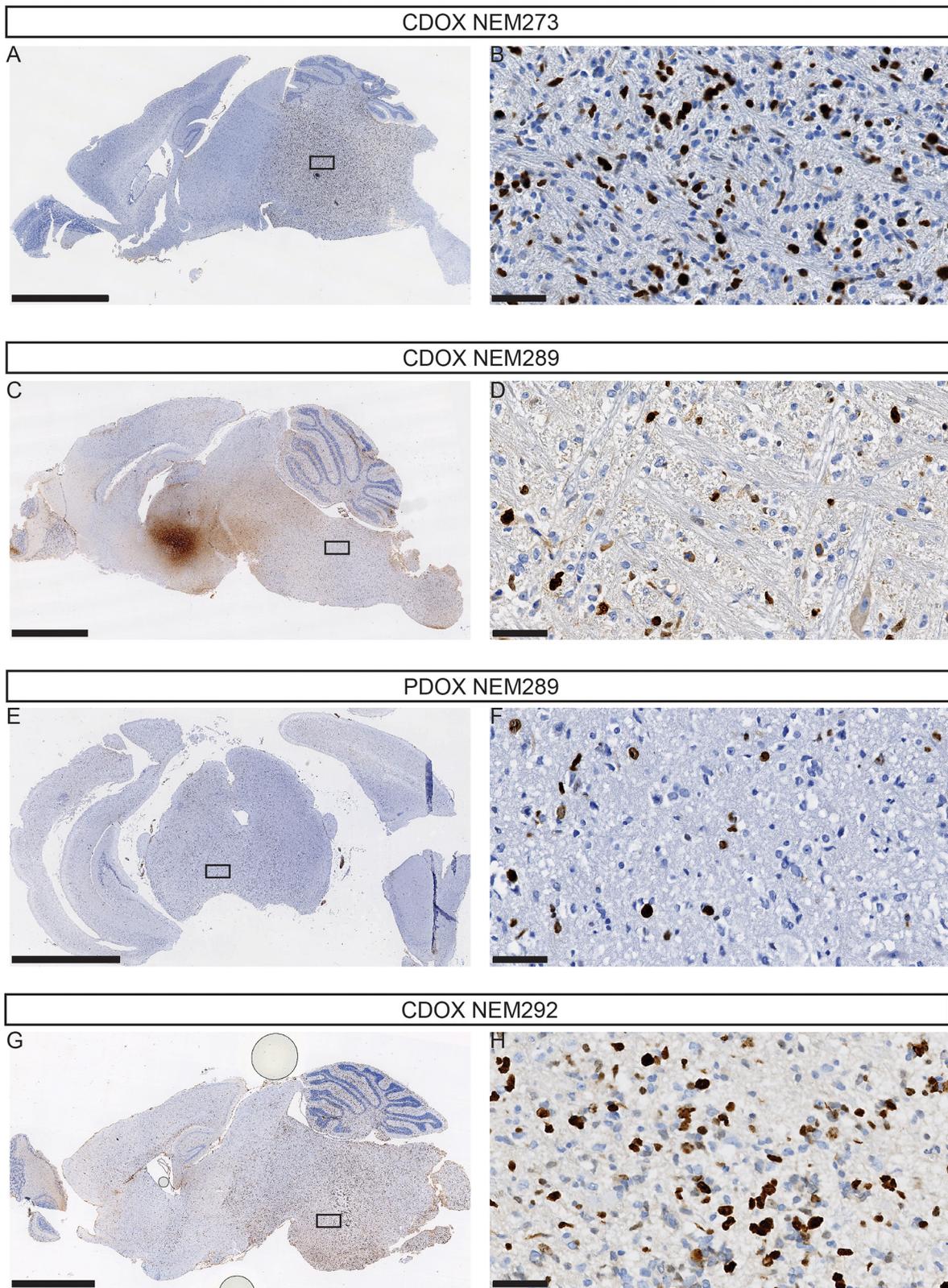
Supplementary Figure 3: CDOX NEM292 model displays DIPG hallmarks and consistent histopathological features with the tumor of origin. Representative results of immunohistochemistry for H3-K27M A-B., H3K27me3 C-D., OLIG2 E-F., GFAP G-H. and Vimentin I-J. in the primary tumor biopsy NEM292 and sagittal sections of the corresponding CDOX model. The model recapitulates the histopathological profile of the human tumor of origin with the presence of infiltrative DIPG cells showing a loss of H3K27 trimethylation together with the expression of the mutated histone H3-K27M. OLIG2 detects most tumor cells in the pons, whereas Vimentin, GFAP and MIB-1 are only labelling a subset of the tumor compartment. As for NEM290 (cf. Figure3), the reactive astrogliosis is recapitulated with a strong detection of intermediate filament expression in mouse stromal cells. (Scale bars: 50 μ m).



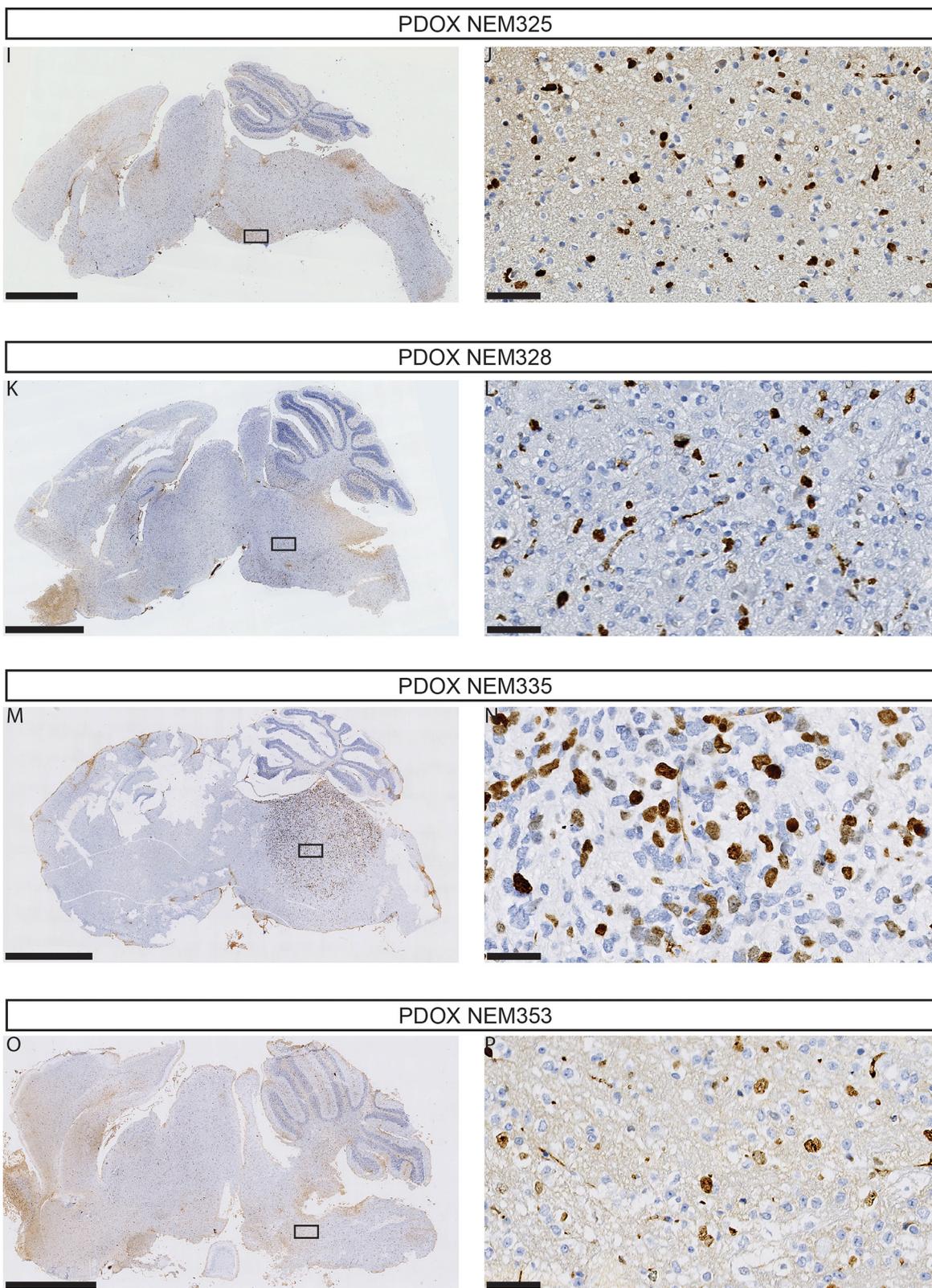
Supplementary Figure 4: CDOX and PDOX models retain H3-K27M mutation. Representative results of immunohistochemistry for H3-K27M (brown nuclei) for 9 CDOX/PDOX models and 3 corresponding biopsies (when available). Scale bars indicate 50 μm . (Continued)



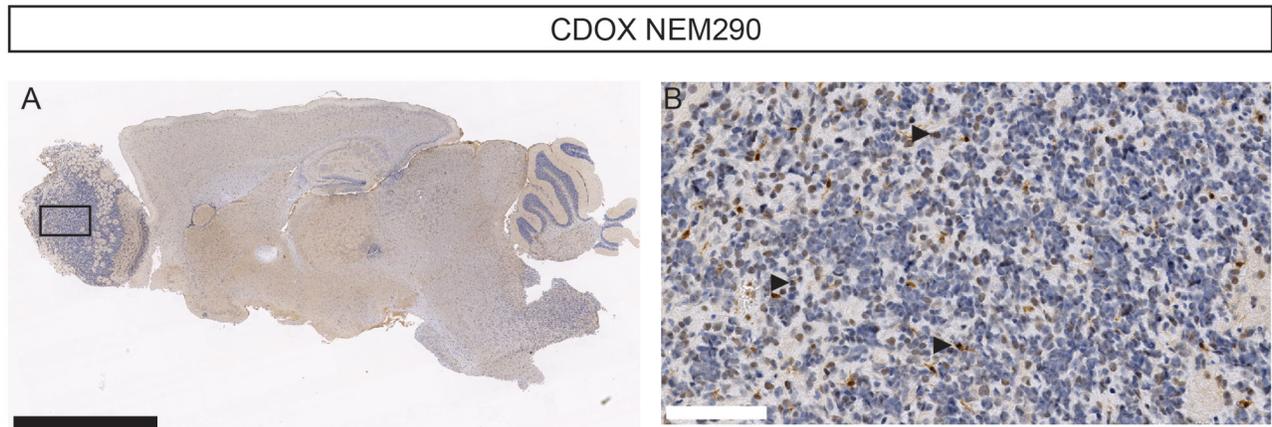
Supplementary Figure 4: (Continued) CDOX and PDOX models retain H3-K27M mutation. Representative results of immunohistochemistry for H3-K27M (brown nuclei) for 9 CDOX/PDOX models and 3 corresponding biopsies (when available). Scale bars indicate 50 μ m.



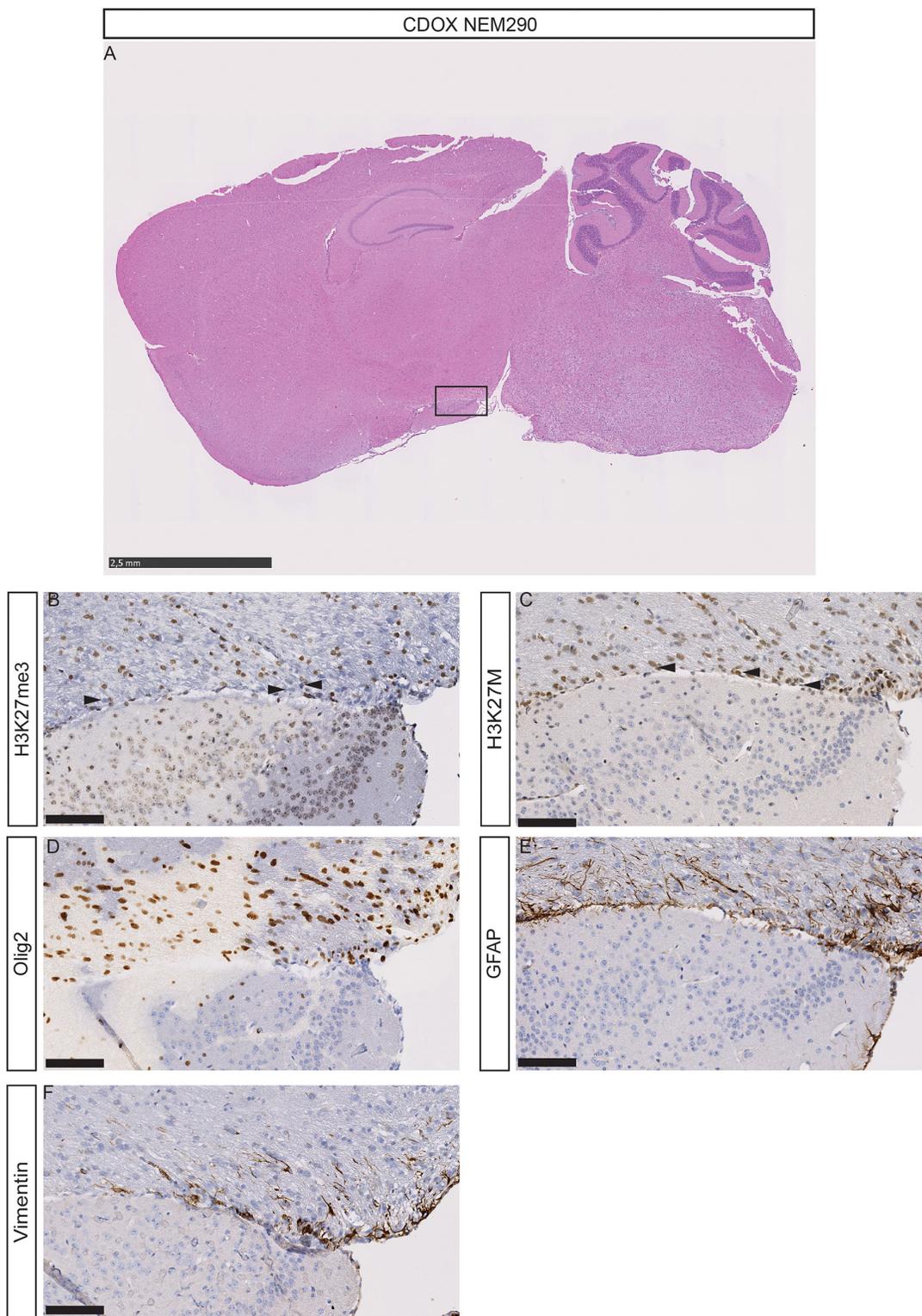
Supplementary Figure 5: MIB-1 staining identifies proliferating cells of human origin in DIPG xenografts. Left: Full sagittal sections of brains stained for MIB-1 (brown nuclei) are represented for 8 distinct xenografts A, C, E, G (*Continued*)



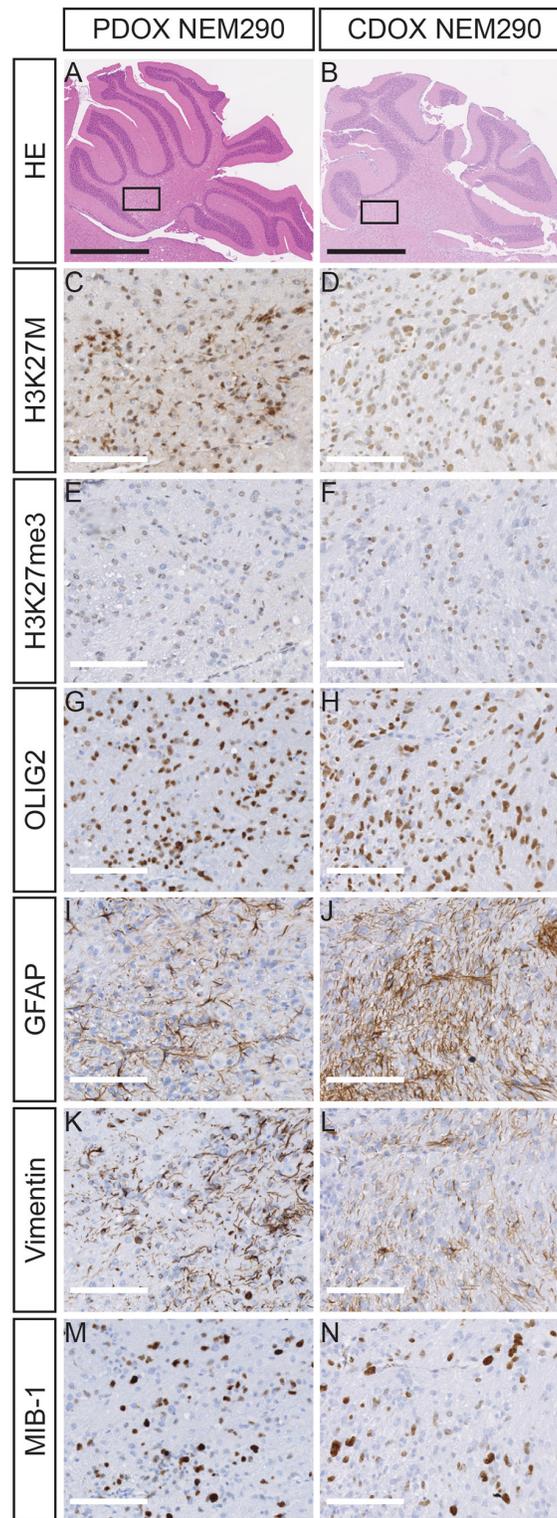
Supplementary Figure 5: (Continued) MIB-1 staining identifies proliferating cells of human origin in DIPG xenografts. I, K, M, and O. Right: 40X magnification of the square regions highlighted in the corresponding left panels B, D, F, H, J, L, N, and P. Scale bars indicate 50 μ m.



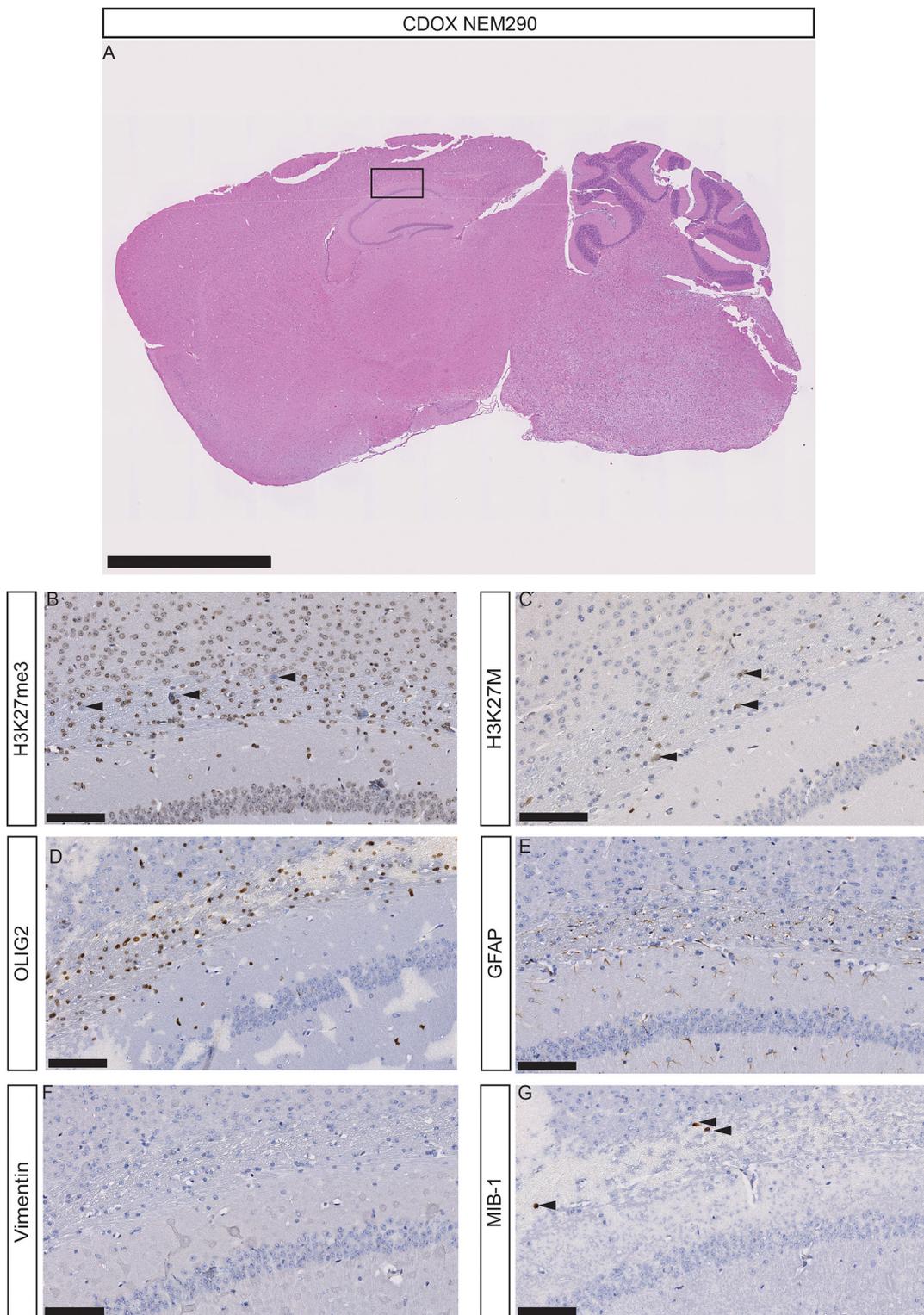
Supplementary Figure 6: Extensive DIPG cells invasion toward the olfactory bulbs in CDOX NEM290. A. Full sagittal view of H3-K27M staining in CDOX NEM290 model (brown nuclei) and B. Olfactory bulb region corresponding to a 20X magnification of the highlighted rectangle in A. Arrowheads indicate tumor cells. Scale bars indicate 2.5 mm and 100 μ m, respectively.



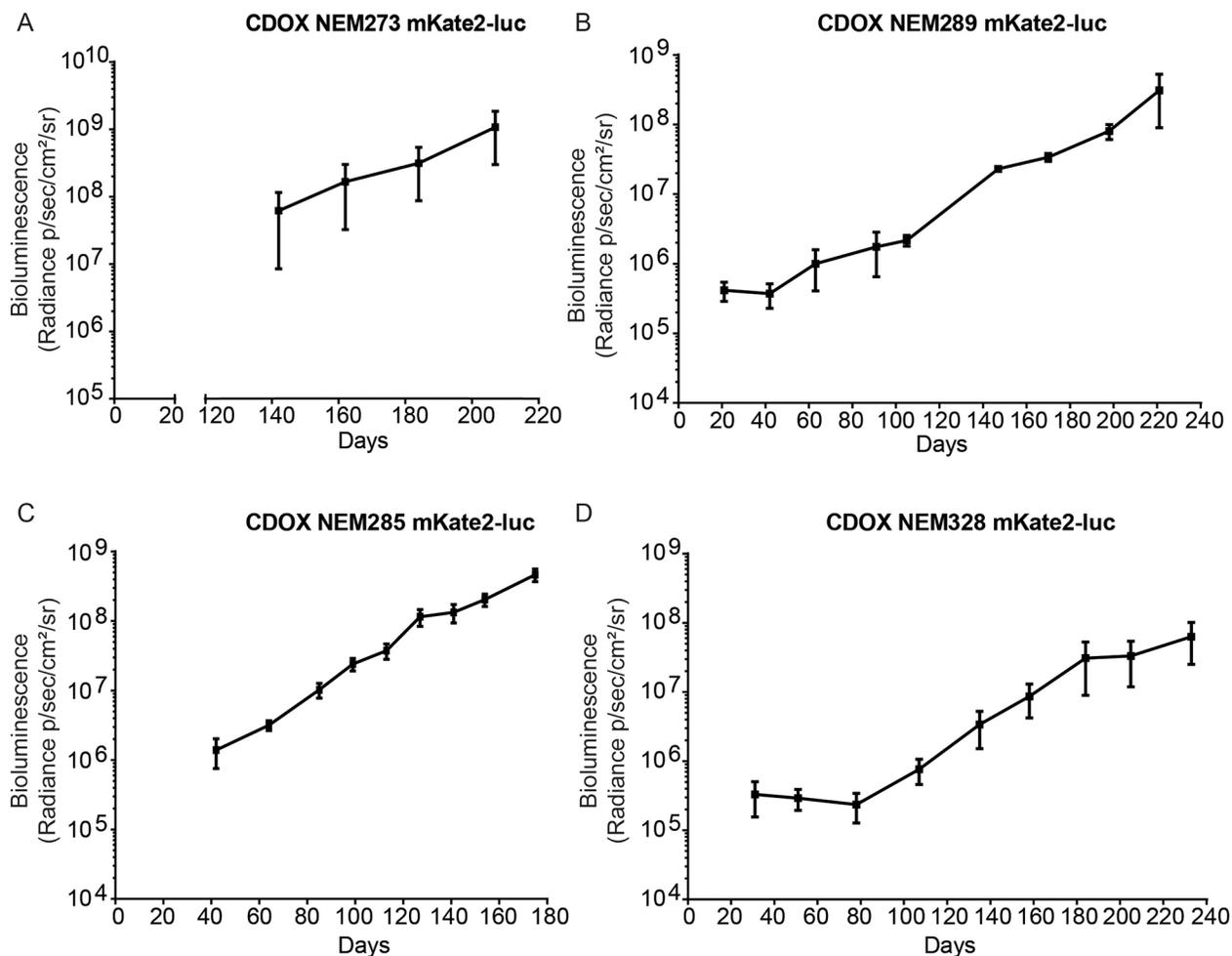
Supplementary Figure 7: Extensive infiltration in the sub-ventricular zone and cerebral peduncles in CDOX NEM290. A. H&E coloration of a sagittal section of CDOX NEM290. The rectangle represents the zoomed area shown in B-F delimiting the sub-ventricular region and the cerebral peduncle. Staining for B. H3K27me3 with arrowheads indicating cells with a H3K27me3 loss, C. H3K27M with arrowheads indicate mutated tumor cells, D. OLIG2, E. GFAP and F. Vimentin. (Scale bars 100 µm).



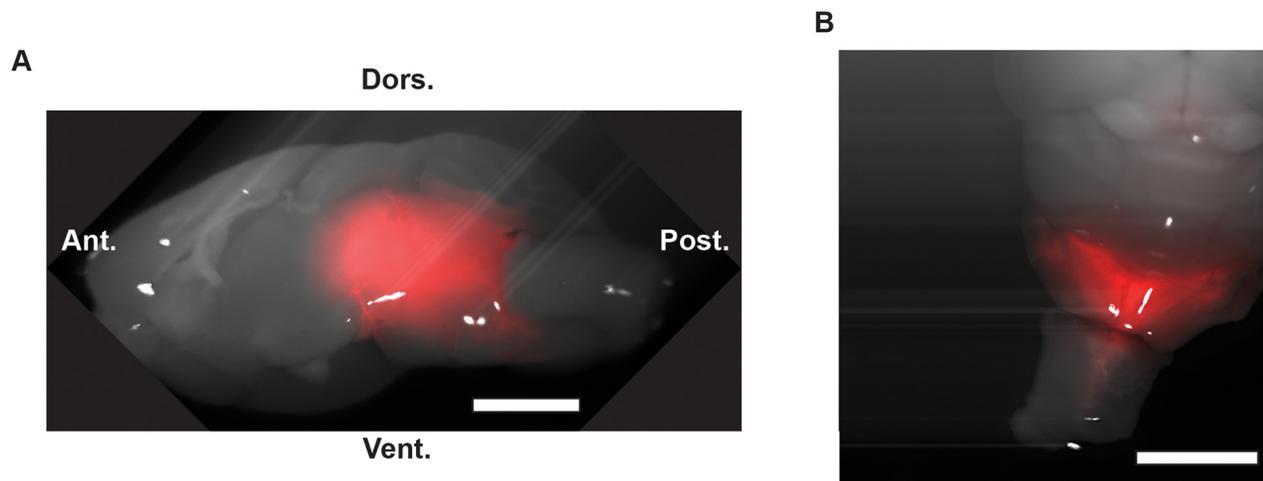
Supplementary Figure 8: Extensive infiltration in the cerebellum in PDOX and CDOX NEM290 models. A-B. H&E coloration of the cerebellar region of PDOX and CDOX NEM290 models. Scale bars indicate 1 mm. Black rectangles represent the zoomed area for the immunohistochemistry staining presented below: C-D. H3-K27M, E-F. H3K27me3, G-H. OLIG2, I-J. GFAP, K-L. Vimentin, and M-N. MIB-1 of PDOX and CDOX NEM290 models, respectively. (Scale bars 125 μ m).



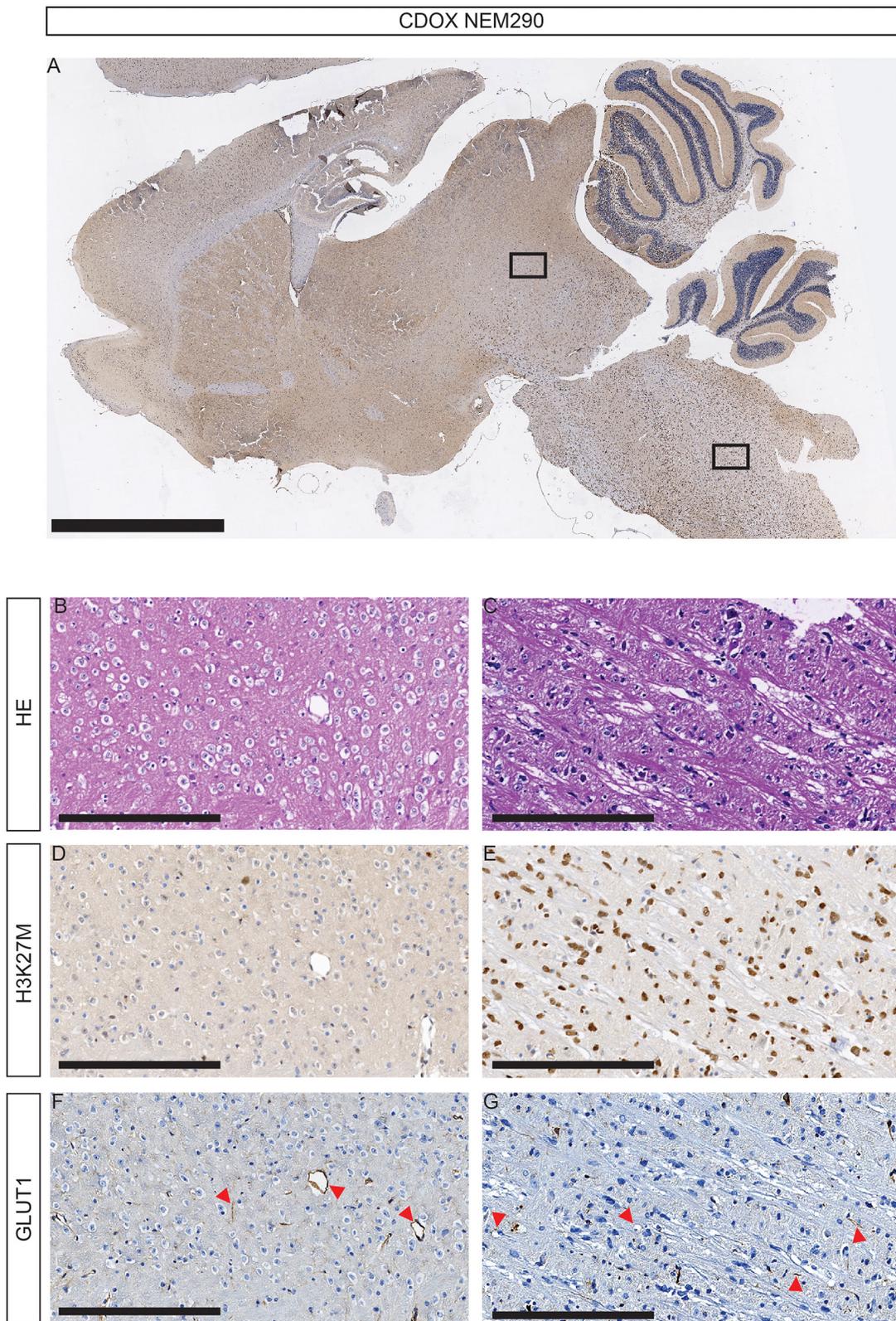
Supplementary Figure 9: Extensive infiltration in the neocortex in CDOX NEM290. A. H&E coloration of a full sagittal section of CDOX NEM290. Scale bar indicates 2.5 mm. The rectangle represents the cortical zoomed area presented in B-G panels. Staining for B. H3K27me3 – arrowheads indicate cells with a H3K27me3 loss; C. H3-K27M, arrowheads indicate tumor cells; D. OLIG2; E. GFAP; F. Vimentin; and G. MIB-1, arrowheads indicate positive tumor cells. (Scale bars: 100 μ m).



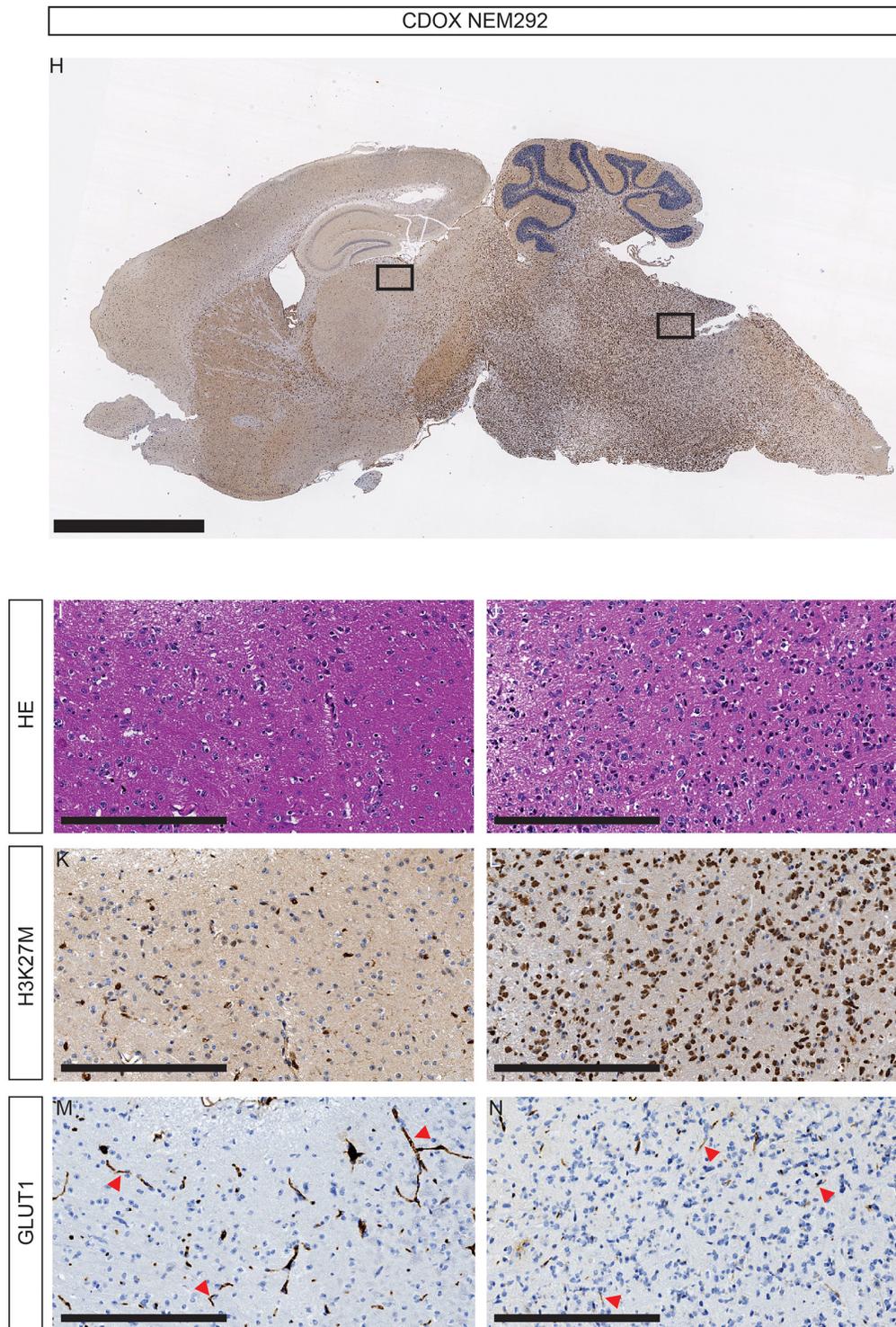
Supplementary Figure 10: Tumor growth monitoring by bioluminescence Longitudinal follow-up of tumor growth by quantification of the luciferase activity in the pontine region of 4 distinct CDOX models. As shown in Figure 5A-5B for NEM290 and NEM292, all CDOX models presented a robust exponential tumor growth. Results are represented as mean ±SEM.



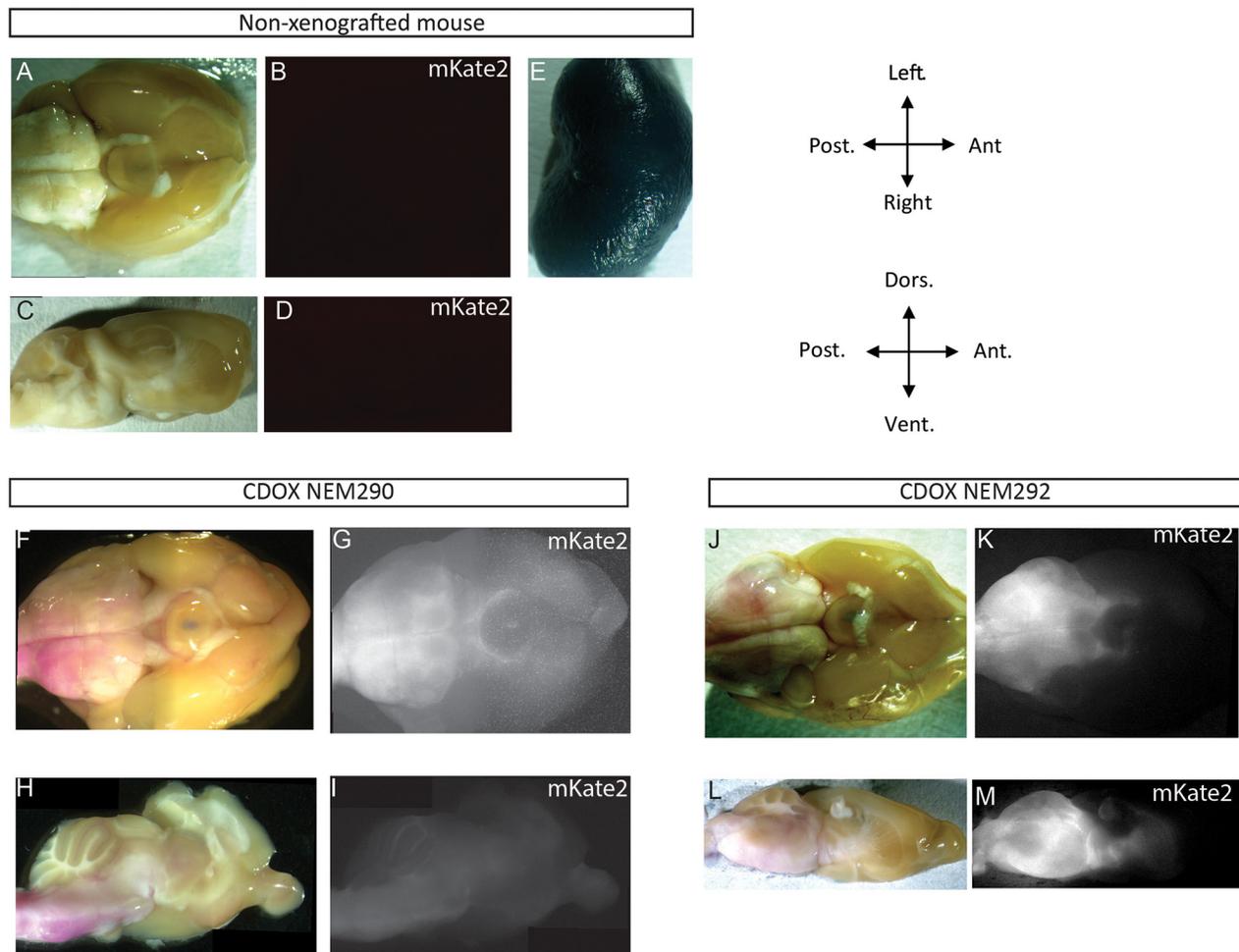
Supplementary Figure 11: Whole brain imaging by macroscopy allows the *ex-vivo* detection of tumor. A. Lateral and B. Upright view of CDOX NEM290 whole brain showing tumor location with red fluorescence. (Scale bars: 1 cm).



Supplementary Figure 12: GLUT1 expression in CDOX NEM290 and CDOX NEM292 mouse models. A. Image of a full sagittal section of CDOX NEM290 stained for H3-K27M. Rectangles represent the regions detailed in B-G. 30X magnification microphotographs of B. H&E, D. H3-K27M and F. GLUT1 staining in a brain area with few tumor cells positive for H3-K27M, and corresponding microphotograph of C. H&E, E. H3-K27M and G. GLUT1 staining in the infiltrated pons (*Continued*)



Supplementary Figure 12: (Continued) GLUT1 expression in CDOX NEM290 and CDOX NEM292 mouse models. H-N. identical staining and magnification in CDOX NEM292. There was no overt microvascular proliferation observed in tumors C, J, despite an important proportion of tumor cells presenting a brown K27M detection E, L. GLUT1 expression was strongly detected in endothelial cells from vessel and capillaries in the normal brain F, M, but vessels were sparser and showing slightly fainter staining in the bulk of the tumor. Arrowheads indicate examples of GLUT1 expressing endothelial cells. (Scale: 2.5 mm in A, H ; 250 μ m in other panels).



Supplementary Figure 13: NEM290 and NEM292 CDOX models display a functional blood-brain barrier. A, F, and J. Macroscopic reconstitution of whole brains of a non-injected control mouse and NEM290 and NEM292 CDOX models after Evans blue dye intravenous injection, and B, G, and K. corresponding mKate2 epifluorescence as recorded by fluorescence-macroscopy. E. Kidney was used as positive control of Evans blue dye extravasation as exemplified for a control non-xenografted mouse. C, H, and L. Bright field microphotograph of whole sagittal sections of the brains depicted in previous panels and D, I, and M. corresponding mKate2 red-fluorescence detection. As in control mouse, there was no detection of blue staining in bright-field images, that would underlie an extravasation of the Evans blue dye in the grafted mice despite an important infiltration of the pontine region by tumor cells (mKate2 red fluorescence). This pointed therefore to an overall functional blood-brain barrier in the DIPG xenograft.

Supplementary Table 1: Detailed engraftment rate and survival time of serially transplanted mice (PDOX).

For each PDOX model, the number of mice presenting tumors over the total number of injected mice was detailed according to passage number and also to the location of the injection (pons vs. thalamus). The average survival time of mice that developed a tumor at each passage are indicated in days. When cells were frozen prior to the transplant, the term “postfreezing” was added in the header, and survival tested vs. non-frozen samples (*P-value<0.05, T-test).

Survival data are expressed as mean \pm SD. SD was not displayed when all mice reached end-point the same day. N.D., Not determined.

Supplementary File 1**Supplementary Table 2: Short-Tandem Repeat (STR) DNA profiling of primary tumors and xenograft models.**

Patient ID	MARKER	D1S1656	D6S1043	Penta E	D2S1338	D8S1179
NEM273	Biopsy	13, 15	12, 19	11, 13	23, 25	13, 14
	CDOX	13, 15	12, 19	11, 13	23, 25	13, 14
NEM285	Biopsy	11, 15	11, 11	10, 13	18, 23	13, 14
	PDOX	11, 15	11, 11	10, 13	18, 23	13, 14
	CDOX	11, 15	11, 11	10, 13	18, 23	13, 14
NEM289	Biopsy	11, 15.3	12, 12	5, 14	23, 25	10, 11
	PDOX	11, 15.3	12, 12	5, 14	23, 25	10, 11
	CDOX	11, 15.3	12, 12	5, 14	23, 25	10, 11
NEM290	Biopsy	12, 14	13, 19	10, 11	17, 23	10, 14
	PDOX	12, 14	13, 19	10, 11	17, 23	10, 14
	CDOX	12, 14	13, 19	10, 11	17, 23	10, 14
NEM292	Biopsy	15.3, 17	10, 17	11, 12	22, 24	10, 15
	CDOX	15.3, 17	10, 14	11, 12	22, 24	10, 15
NEM325	Biopsy	15, 17.3	12, 20	10, 13	19, 24	13, 13
	PDOX	15, 17.3	12, 20	10, 13	19, 24	13, 13
NEM328	Biopsy	16, 16.3	13, 13	13, 13	17, 18	11, 11
	PDOX	16, 16.3	13, 13	13, 13	17, 18	11, 11
	CDOX	16, 16.3	13, 13	13, 13	17, 18	11, 11
NEM335	Biopsy	14, 16.3	11, 12	5, 7	18, 24	12, 13
	PDOX	14, 16.3	11, 12	5, 7	18, 24	12, 13
NEM347	Biopsy	12, 12	11, 12	12, 12	17, 23	10, 12
	PDOX	12, 12	11, 12	12, 12	17, 23	10, 12
NEM353	Biopsy	12, 15	14, 20	7, 11	17, 24	12, 14
	PDOX	12, 15	14, 20	7, 11	17, 24	12, 14

The STR profile on 5 selected loci is presented for all tested samples and confronted to patient blood DNA used as reference.

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

**Modèles *in vivo* de tumeurs gliales pédiatriques : développement
et application en préclinique.**

Ludivine LE DRET

RESUME

Les tumeurs gliales sont les tumeurs cérébrales les plus fréquemment retrouvées chez l'enfant. Les gliomes infiltrant du tronc cérébral (DIPG) sont la forme la plus agressive des gliomes pédiatriques. Les épendymomes (EPN) restent actuellement difficilement curables et à l'origine de fréquentes rechutes. Le manque de matériel biologique et l'absence de modèles *in vitro* et *in vivo* pertinents ont longtemps entravé le développement de nouvelles thérapeutiques dans ces deux cancers. Des études récentes ont montré que le DIPG est caractérisé par une mutation unique située sur la queue régulatrice de l'histone H3 dans l'un des deux gènes *HIST1H3B/C* ou *H3F3A*. En revanche, aucune cible moléculaire n'a pu être identifiée par séquençage du génome dans les EPN. Récemment, il a été montré que le profil de méthylation des EPN permet de diviser les EPN de la fosse postérieure (EPN-PF) et les EPN supratentoriels (EPN-ST) en neuf sous-groupes différents.

Dans un premier temps, nous avons développé des xénogreffes par stéréotaxie dans la souris Nude (i) de manière directe en greffant directement les cellules tumorales afin d'obtenir des modèles PDOX (Patient Derived Orthotopic Xenograft), et (ii) de manière indirecte en cultivant *in vitro* les cellules tumorales avant injection *in vivo* afin d'obtenir des modèles de CDOX (Cell Derived Orthotopic Xenograft). Ainsi, nous avons obtenu 15 PDOX et 8 CDOX bioluminescentes de DIPG différents à partir de biopsies de patient au diagnostic ; ainsi que 3 PDOX d'EPN-PF et 1 PDOX d'EPN-ST à partir de résections tumorales de patient au diagnostic ou à la rechute. Une analyse approfondie des tumeurs de DIPG obtenues montre que les xénogreffes conservent le phénotype de la tumeur du patient, en particulier les principales caractéristiques du DIPG, tout en reflétant l'hétérogénéité interindividuelle observée chez les patients. L'histologie des xénogreffes d'EPN relève leur pertinence vis-à-vis de la maladie. A partir de ces PDOX, nous avons pu générer 3 PDOX bioluminescentes sans sélection clonale *in vitro* au préalable. Puis, nous avons évalué le mébendazole dans deux modèles CDOX de DIPG. La toxicité du médicament utilisé à forte dose de manière chronique n'a pas permis de mettre en évidence un effet thérapeutique décisif. Enfin, nous avons adapté un système d'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) à l'aide d'ultrasons non focalisés couplés à des microbulles dans nos modèles *in vivo* de DIPG. Malgré l'ouverture de la BHE, il n'a pas été possible de potentialiser l'effet thérapeutique du panobinostat dans une CDOX de DIPG, le passage du médicament n'étant pas augmenté dans le tissu cérébral. Nous sommes actuellement en cours d'évaluation d'un nouveau médicament candidat, l'irinotécan.

Mots-clés : DIPG, épendymome, PDOX, CDOX, bioluminescence, mébendazole, barrière hémato-encéphalique.