


NOUVELLE

Gliomes diffus de la ligne médiane et mutation K27M de l'histone H3.3

Comment la signalisation BMP2/BMP7 façonne-t-elle l'émergence d'un état cellulaire quiescent et invasif ?

Maud Hamadou , Angèle Rolling, Marie Castets

Centre de recherche en cancérologie de Lyon, UMR Inserm 1052, CNRS 5286, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre Léon Bérard, Equipe « Mort cellulaire et cancers pédiatriques », Consortium South-ROCK, LabEx DEVweCAN, Institut Convergence Plascan, Lyon, France.
maud.hamadou@lyon.unicancer.fr
angele.rolling@lyon.unicancer.fr
marie.castets@lyon.unicancer.fr

> Les gliomes diffus de la ligne médiane constituent une entité néoplasique rare affectant presque exclusivement les enfants (environ 50 cas annuels diagnostiqués en France), et dont l'agressivité se traduit par une médiane de survie de 9 à 11 mois. Leur localisation dans le pont du tronc cérébral ou dans le thalamus, où s'entrelacent les circuits neurologiques vitaux, rend impossible toute résection chirurgicale. Les approches de chimiothérapie traditionnelles sont largement inefficaces, tandis que des molécules innovantes comme ONC201¹, en cours d'évaluation clinique, n'offrent qu'un bénéfice modeste en termes de survie. La radiothérapie, seul traitement

validé, n'apporte qu'un sursis temporaire avant la récurrence, notamment en raison du caractère invasif de ces tumeurs.

L'essor des techniques de séquençage nucléotidique de l'ADN, en permettant de décrypter les fondements moléculaires de ces gliomes, a révélé notamment la présence de la mutation K27M de l'histone H3 dans plus de 80 % des cas. Cette altération des gènes codant les histones H3.3 ou H3.1, qui substitue une méthionine à une lysine en position 27 (H3.3^{K27M} ou H3.1^{K27M}), compromet la triméthylation de ces histones sur ce résidu lysine et bouleverse profondément le paysage épigénétique cellulaire. Parmi les autres anomalies génétiques identifiées, les mutations du gène *ACVR1*, codant le récepteur ALK2 (*activin receptor-like kinase 2*), surviennent dans 20 % à 30 % des gliomes diffus de la ligne médiane. Ces mutations *ACVR1* coexistent préférentiellement avec la mutation H3.1^{K27M}, qui est retrouvée dans 69 % des gliomes portant une mutation *ACVR1*, alors qu'elle n'est présente que dans 20 à 30 % de l'ensemble des gliomes diffus de la ligne

médiane. Le récepteur transmembranaire ALK2 à activité sérine/thréonine kinase est un acteur clé de la voie de signalisation des protéines morphogénétiques osseuses (*bone morphogenetic proteins*, BMP), impliquée dans la différenciation et la prolifération cellulaires par phosphorylation des effecteurs SMAD1/5/8 et l'activation de cibles transcriptionnelles. Dans le contexte de la mutation de H3.1, la synergie entre l'histone altérée et *ACVR1* muté exerce un effet oncogénique majeur en maintenant les cellules dans un état indifférencié propice à leur prolifération [1]. Considérant l'importance de la signalisation des BMP dans l'oncogenèse, nous avons exploré son implication dans les tumeurs portant la mutation H3.3^{K27M} [2].

État d'activation de la signalisation des BMP dans les gliomes diffus de la ligne médiane indépendamment du statut mutationnel de *ACVR1*

L'analyse intégrative de données transcriptomiques issues de deux cohortes indépendantes de gliomes diffus de la

¹ Premier médicament d'une nouvelle classe d'anticancéreux (imipridones) avec deux mécanismes d'action identifiés à ce jour. ONC201 agit comme agoniste allostérique de la protéase caséinolytique P mitochondriale (ClpP) et comme antagoniste sélectif du récepteur de la dopamine de type 2 (DRD2). L'activation de ClpP entraîne la dégradation de protéines mitochondriales, dont les fragments exportés activent la réponse intégrée au stress (ATF4/CHOP), tandis que l'antagonisme DRD2 active directement cette même voie. Ces mécanismes convergent vers l'induction d'une apoptose indépendante de p53 impliquant la voie de signalisation par la protéine TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) et son récepteur DR5 (*death receptor 5*).

ligne médiane a révélé un degré d'activation de la voie de signalisation des BMP comparable entre les tumeurs avec ou sans mutation de *ACVR1*. Cette évaluation, fondée sur l'algorithme PROGENy appliqué à une signature spécifique de gènes cibles, ainsi que sur l'analyse d'expression des effecteurs canoniques de la voie des BMP, dont ID1, ID2 (*inhibitors of DNA binding and cell differentiation proteins 1 & 2*), RUNX2 (*Runt-related transcription factor 3*), GATA3 (*GATA-binding protein 3*), montre que la mutation activatrice de *ACVR1* n'est pas l'unique mécanisme d'induction de cette voie de signalisation. L'activation équivalente de la voie des BMP dans les gliomes diffus de la ligne médiane indépendamment du statut mutationnel de *ACVR1* pourrait s'expliquer par les microenvironnements développementaux distincts des cellules d'origine. Les résultats des études de lignage cellulaire suggèrent que les tumeurs H3.1^{K27M} dériveraient de cellules progénitrices oligodendrogiales ventrales exprimant *NKX6-1*, dont la spécification implique la voie de signalisation *Sonic Hedgehog*, tandis que les tumeurs H3.3^{K27M} dériveraient de cellules progénitrices dorsales exprimant *PAX3*, spécifiées par la signalisation BMP [3]. Ces microenvironnements différents, avec une signalisation *Sonic Hedgehog* active ventralement et une signalisation BMP active dorsalement, pourraient expliquer les mécanismes distincts d'activation de la voie des BMP : les tumeurs d'origine ventrale (H3.1^{K27M}) nécessiteraient des mutations *ACVR1* pour compenser leur environnement naturellement pauvre en BMP, tandis que les tumeurs d'origine dorsale (H3.3^{K27M}) exploiteraient leur contexte développemental riche en BMP. En accord avec cette hypothèse, notre analyse des données transcriptomiques des atlas développementaux des cerveaux murin et humain a révélé des pics spatio-temporels d'expression de *BMP7* dans les structures de la ligne médiane durant la période postnatale, coïncidant avec la fenêtre d'apparition clinique

des gliomes diffus de la ligne médiane (enfants âgés de 5-10 ans). Cette expression de *BMP7* par le microenvironnement pourrait provoquer une boucle d'auto-amplification [4] dans les cellules précurseurs des tumeurs H3.3^{K27M}, expliquant ainsi le maintien de fortes concentrations de BMP2 et BMP7 dans ces tumeurs, même en l'absence de mutation de *ACVR1*.

Induction d'un phénotype cellulaire quiescent et invasif par la coopération entre H3.3^{K27M} et BMP7

Pour préciser l'impact fonctionnel de la signalisation BMP dans un contexte épigénétique altéré par la présence de l'histone mutée H3.3^{K27M}, nous avons utilisé des lignées cellulaires issues d'astrocytomes de bas grade (Res259 et SF188) et génétiquement modifiées pour exprimer soit l'histone H3.3^{K27M}, soit le variant muté H3.3^{K27M}. Ces lignées ont été cultivées en présence ou non de BMP. Nous avons constaté que la présence de l'histone mutée H3.3^{K27M} réprime l'expression de *BMP7* et stimule celle de *BMP2*. Afin de reproduire les fortes concentrations de BMP7 présentes dans les gliomes de la ligne médiane, nous avons donc traité ces lignées avec la protéine BMP7 recombinante. L'analyse transcriptomique (par la technique RNA-seq) et l'application de critères statistiques classiques pour les comparaisons multiples (valeur de p ajustée $< 0,05$; $|\log_2 FC| > \log_2 1,5$)² ont permis d'identifier 900 gènes différentiellement exprimés exclusivement dans les cellules portant la mutation H3.3^{K27M} traitées par BMP7, et non dans les cellules témoins (dépourvues de cette mutation). L'analyse des voies biologiques concernées par l'expression différentielle de ces 900 gènes a révélé une répression significative des régulateurs positifs du cycle cellulaire, particulièrement des cibles du facteur de transcription E2F contrôlant la transition

² Le $\log_2 FC$ (*fold-change*) mesure l'amplitude du changement d'expression génique entre deux conditions.

de la phase G1 à la phase S. Cette reprogrammation transcriptionnelle s'est traduite par un accroissement de 17 % du nombre des cellules en phase G0 ou G1, une diminution de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome RB, et une induction de l'expression de *CDKN1A* (codant la protéine *cyclin-dependent kinase 1A*, ou p21), confirmant l'établissement d'un état cellulaire quiescent. Pour préciser le mécanisme de coopération entre BMP7 et la mutation H3.3^{K27M}, nous avons conçu un algorithme décisionnel permettant d'isoler deux catégories de gènes : ceux pour lesquels l'effet de la mutation sur leur transcription est amplifié par BMP7 (potentialisation) et ceux répondant seulement à la combinaison de BMP7 et de la mutation (synergie). Cet algorithme a permis d'identifier un enrichissement en gènes impliqués dans l'invasion cellulaire, la migration et le remodelage de la matrice extracellulaire (dont *ITGA2*, *ROBO2*, *MMP28*, *COL28A1*) préférentiellement dans les cellules d'astrocytomes génétiquement modifiées pour exprimer H3.3^{K27M} et traitées par BMP7. Les expériences d'invasion en chambre de Boyden³ ont validé fonctionnellement cette signature transcriptomique, en montrant une augmentation du potentiel invasif des cellules H3.3^{K27M} de plus de cinq fois après leur traitement par BMP7, mais de seulement deux fois pour les cellules dépourvues de la mutation K27M.

L'ensemble de ces résultats expérimentaux établit que BMP7 agit comme un amplificateur du remodelage épigénétique induit par H3.3^{K27M}, en favorisant un phénotype cellulaire paradoxal

³ Dispositif expérimental destiné à étudier la migration et l'invasion de cellules, consistant en un insert de culture cylindrique niché au sein d'un puits de plaque de culture cellulaire. L'insert contient une membrane de polycarbonate avec des pores de taille définie. Les cellules sont ensemencées dans l'insert avec du milieu de culture sans sérum, alors que le sérum ou d'autres chimio-attractants sont placés dans le puits en dessous. Les cellules capables de migrer passent à travers les pores et peuvent ensuite être quantifiées. Les cellules invasives peuvent également être analysées par ce dispositif, en plaçant des protéines de la matrice extracellulaire sur la membrane.

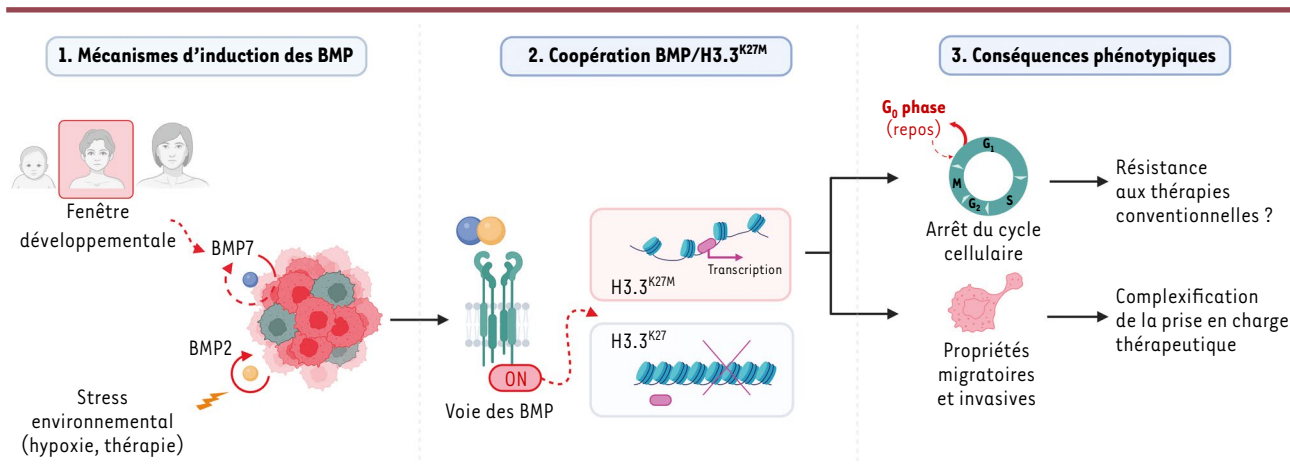


Figure 1. Coopération entre la voie des BMP et la mutation H3.3^{K27M} dans les gliomes diffus de la ligne médiane. Dans les gliomes diffus de la ligne médiane, la voie de signalisation BMP est activée par BMP7 issu du microenvironnement tumoral, créant une boucle d'auto-amplification, et par BMP2 produit lors d'un stress, selon un processus autocrine. Cette voie, combinée à la mutation H3.3^{K27M}, active la transcription génique et contribuerait à la résistance de la tumeur aux traitements, tels que ONC201 ou la radiothérapie. Figure réalisée avec BioRender Premium.

combinant quiescence et capacité d'invasion accrue. Cette dualité fonctionnelle pourrait contribuer significativement à la résistance thérapeutique caractéristique de ces tumeurs.

Caractérisation d'une sous-population de cellules tumorales BMP-dépendantes de phénotype quiescent et invasif dans les gliomes diffus de la ligne médiane

Une analyse transcriptomique, en cellule unique, de biopsies de gliomes diffus de la ligne médiane H3.3^{K27M} a mis en évidence une sous-population récurrente de cellules caractérisée par un score d'activation transcriptionnelle PROGENy TGF-β/BMP plus élevé. La signature transcriptionnelle de cette sous-population a révélé un enrichissement spécifique en gènes impliqués dans la migration cellulaire et l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire, ainsi qu'un appauvrissement concomitant en gènes liés aux processus d'expression génique (transcription et traduction), un profil compatible avec un état quiescent.

Pour valider ces constats sur le plan fonctionnel, nous avons utilisé des sphéroïdes 3D dérivés de lignées cellulaires issues de biopsies de gliomes

diffus de la ligne médiane, afin de reproduire l'hétérogénéité tumorale. L'analyse transcriptomique de ces sphéroïdes porteurs de la mutation H3.3^{K27M} a révélé une expression prépondérante de *BMP7*, tandis que *BMP2*, pourtant exprimé dans les échantillons tumoraux, ne l'était pas dans les sphéroïdes en conditions basales. Cependant, l'exposition des sphéroïdes à un stress microenvironnemental (hypoxie), ou leur traitement par un inducteur de stress oxydant (ONC201), a provoqué une augmentation de l'expression de *BMP2*. Cette réponse au stress, combinée à l'expression constitutive de *BMP7*, suggère un mécanisme adaptatif finement régulé, d'autant plus pertinent que l'hétérodimère BMP2/BMP7 possède une capacité d'activation de la voie de signalisation supérieure à celle des homodimères de BMP2 ou de BMP7 [5].

Le traitement des sphéroïdes de gliomes par la protéine recombinante BMP2 a entraîné un ralentissement de leur croissance et une diminution du marqueur de prolifération cellulaire Ki-67, confirmant l'induction d'un état cellulaire quiescent. Ces sphéroïdes ont par ailleurs fait preuve, en présence de BMP2 d'une capacité invasive accrue lors

d'expériences d'invasion en Matrigel®⁴. Au contraire, l'inhibition de la voie de signalisation des BMP par un antagoniste du récepteur ALK2 (LDN-193189) a stimulé la prolifération des cellules tout en réduisant leur potentiel invasif. La corrélation de ces phénotypes avec les données transcriptomiques spatiales a permis d'identifier des territoires tumoraux anatomiquement distincts, où la signature invasive coïncide avec une forte expression des récepteurs des BMP (BMPRIA, BMPR2, ACVR1) et une forte activation de cette voie de signalisation.

Vers des stratégies thérapeutiques ciblant la synergie de BMP et H3.3^{K27M}

La signalisation des BMP présente une remarquable dualité fonctionnelle dans les gliomes diffus de la ligne médiane, dépendant étroitement du contexte épigénétique et moléculaire. Son action « pro-différenciation » a été rapportée dans certains modèles de ces gliomes, suggérant un rôle suppresseur de tumeur [6]. À l'opposé, une production para-

⁴ Nom commercial de la matrice de membrane basale solubilisée extraite du sarcome murin EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) qui, en se solidifiant, forme une structure équivalente à une membrane basale par sa composition, sa structure et ses propriétés physiques.

crine de BMP7 par une sous-population de cellules souches de gliomes diffus de la ligne médiane, induisant un phénotype migratoire des cellules, a récemment été identifiée [7]. Les résultats de nos travaux de recherche corroborent cette fonction pro-invasive de la signalisation par BMP7, tout en soulignant sa contribution à l'arrêt du cycle cellulaire et l'importance de la coopération avec BMP2. La caractérisation de cette synergie oncogénique ouvre des perspectives thérapeutiques prometteuses. L'inhibition de la reprogrammation transcriptionnelle orchestrée par le duo formé par la signalisation BMP et l'histone H3.3^{K27M} pourrait simultanément améliorer le contrôle local de la maladie

en restreignant l'invasion tumorale et restaurer la sensibilité de la tumeur aux traitements ciblant les cellules en prolifération, notamment à la radiothérapie (Figure 1). ♦

Diffuse midline gliomas and H3.3K27M mutation: How does BMP2/7 signaling shape the emergence of a quiescent and invasive cellular state?

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Hoeman CM, Cordero FJ, Hu G, et al. ACVR1 R206H cooperates with H3.1K27M in promoting diffuse intrinsic pontine glioma pathogenesis. *Nat Commun* 2019 ; 10 : 1023.
2. Huchede P, Meyer S, Berthelot C, et al. BMP2 and BMP7 cooperate with H3.3K27M to promote quiescence and invasiveness in pediatric diffuse midline gliomas. *eLife* 2024 ; 12 : RP91313.
3. Jessa S, Mohammadnia A, Harutyunyan AS, et al. K27M in canonical and noncanonical H3 variants occurs in distinct oligodendroglial cell lineages in brain midline gliomas. *Nat Genet* 2022 ; 54 : 1865-80.
4. Kozmikova I, Candiani S, Fabian P, et al. Essential role of Bmp signaling and its positive feedback loop in the early cell fate evolution of chordates. *Dev Biol* 2013 ; 382 : 538-54.
5. Tajer B, Dutko JA, Little SC, et al. BMP heterodimers signal via distinct type I receptor class functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021 ; 118 : e2017952118.
6. Sun Y, Yan K, Wang Y, et al. Context-dependent tumor-suppressive BMP signaling in diffuse intrinsic pontine glioma regulates stemness through epigenetic regulation of CXCR5. *Nat Cancer* 2022 ; 3 : 1105-22.
7. Bruschi M, Midjek L, Ajilil Y, et al. Diffuse midline glioma invasion and metastasis rely on cell-autonomous signaling. *Neuro-Oncol* 2024 ; 26 : 553-68.

