amU
Aix Marseille Université

NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 17 décembre 2024 par

Mélanie MATTEUDI

Nouvelles options thérapeutiques pour la prise en charge des médulloblastomes : apport du repositionnement de médicaments

Discipline
Biologie Santé

Spécialité
Oncologie

École doctorale
ED 62 - SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Laboratoire/Partenaires de recherche
Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM)

Composition du jury

Dr. Sonia MARTIAL IRCAN - Nice	Rapporteuse
Dr. Vincent PICCO CSM - Monaco	Rapporteur
Pr. Emeline TABOURET AP-HM, INP - Marseille	Examinatrice
Dr. Pierre LEBLOND Centre Léon Bérard - Lyon	Examinateur
Pr. François DEVRED AMU, INP - Marseille	Président du jury
Dr. Eddy PASQUIER CRCM - Marseille	Directeur de thèse
Dr. Manon CARRE AMU. CRCM - Marseille	Co-directrice invitée

Affidavit

Je soussignée, Mélanie MATTEUDI, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Eddy PASQUIER et Manon CARRE, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 21 octobre 2024



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et participation aux conférences

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

- **Matteudi M.**, Montero M-P., Muller K., Piris P., Mouysset B., Brémond P., Roux C., Bourgarel V., Le Grand M., André N., Carré M., & Pasquier E. (**2024**) Targeting the serotonergic signaling pathway to develop novel therapeutic options for medulloblastoma. *en préparation*
- Piris P., Buric D., Yamasaki T., Huchedé P., Rossi M., **Matteudi M**., Montero M-P., Rodallec A., Appay R., Roux C., Combes S., Pasquier E., Castets M., André N., Brémond P., Carré M. (**2023**) Conditional generation of free radicals by selective activation of alkoxyamines: towards more effective and less toxic targeting of brain tumors. *Chemical Science*, 14(29):7988-7998
- Rossi M., Talbot J., Piris P., Grand M. L., Montero M-P., **Matteudi M**., Agavnian-Couquiaud E., Appay R., Keime C., Williamson D., Buric D., Bourgarel V., Padovani L., Clifford S. C., Ayrault O., Pasquier E., André N., & Carré M. (**2022**). Beta-blockers disrupt mitochondrial bioenergetics and increase radiotherapy efficacy independently of beta-adrenergic receptors in medulloblastoma. *EBioMedicine*, 82, 104149
- Spitz C., **Matteudi M**., Tintori G., Broggi J., Terme T., & Vanelle P. (**2020**). Metal-Free Addition of Benzyl Halides to Aldehydes Using Super Electron Donors: Access to 3,4-Dihydroisocoumarins and 1,2-Diarylethanols. *The Journal of organic chemistry*, *85*(23), 15736–15742.

2) Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

- **5th React4Kids Congress** "Childhood Cancers: Understand to Treat" (poster)
- 5th CRCM **PhD Day** (poster)
- Symposium **TRANSLATE-IT** (poster)
- Séminaire annuel **du Cancéropôle PACA 2023** (prix du poster)
- Journées **jeunes chercheurs** du Réseau National **React4Kids** (communication orale)
- 4th CRCM **PhD Day** (communication orale)
- Conférence grand public pour des élèves de l'enseignement secondaire dans le cadre de l'action "Apprentis Chercheurs" (communication orale)
- Séminaire à visée pédagogique "Initiation à la Recherche en Oncopharmacologie", auprès d'étudiants du cursus de Pharmacie (communication orale)
- Séminaire "Criblage et évaluation pharmacologique", dans le cadre du Master Drug Design (communication orale)

Remerciements

Aux membres du jury,

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Dr Sonia Martial et au Dr Vincent Picco pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie de l'intérêt que vous portez à ce travail et de votre engagement dans son évaluation. J'adresse également mes sincères remerciements au Pr François DEVRED, au Pr Emeline TABOURET et au Dr Pierre LEBLOND pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

A mes directeurs de thèse, le Dr Manon CARRE et le Dr Eddy PASQUIER,

Je vous remercie pour votre encadrement précieux, vos conseils avisés et votre soutien tout au long de ce travail. Votre expertise et votre disponibilité ont été essentielles à l'aboutissement de cette thèse et m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions.

Aux membres de l'équipe REMAP-4Kids,

Un très grand merci à Marie-Pierre, Patricia, Baptiste, Marion, Kevin, Julie, Christine, Véro, Anne-Sophie et Lucile. Toutes ces personnes ont contribué, par leur aide, leur disponibilité, leur expertise et leur bonne humeur, à rendre cette expérience enrichissante et motivante au quotidien.

A mes amis marseillais et niçois,

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour votre soutien constant et votre amitié inestimable tout au long de ces années d'études riches en émotions. Cette aventure, marquée par des souvenirs inoubliables à vos côtés, restera gravée dans ma mémoire. Votre présence, que ce soit de près ou de loin depuis presque dix ans, a été précieuse. Le meilleur est encore à venir, et je vous remercie pour tout.

A Philippe,

Mon pilier, merci de m'avoir soutenu et surtout supporté jusqu'au bout. Merci de croire en moi quand je n'y crois plus, de me connaitre mieux que moi-même et de toujours être présent pour moi.

A mes parents et mon frère,

Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir permis d'effectuer ces longues années d'études sereinement. Votre soutien indéfectible et votre amour inconditionnel me poussent toujours à donner le meilleur de moi-même. Cette thèse n'aurait pas été possible sans vous.

Table des matières

Affidavit **2**
Liste de publications et participation aux conférences **3**
Remerciements **4**
Table des tableaux et figures **7**
Liste des abréviations **9**
Partie 1 : Rappels bibliographiques **11**
– Chapitre 1 – Oncopédiatrie : reconnaissance récente d'un domaine à part de l'oncologie ? **12**
– Chapitre 2 – Les médulloblastomes : tumeurs intracrâniennes pédiatriques **18**

I. Epidémiologie des tumeurs intracrâniennes pédiatriques 18
II. Sous-groupes des médulloblastomes 20
A. Le sous-groupe WNT 22
B. Le sous-groupe SHH 25
C. Médulloblastomes non-WNT/non-SHH 27
III. Diagnostic 30
IV. Prise en charge thérapeutique 31
A. La chirurgie 32
B. L'irradiation intracrânienne 33
C. La chimiothérapie 34
D. Les thérapies de dernière génération 36
1. Les thérapies ciblées 36
2. Les immunothérapies 37

– Chapitre 3 – Le repositionnement de médicaments : une stratégie de choix **41**

I. Définition et grands principes 41
II. Les différentes approches de repositionnement 43
A. Quand le hasard fait bien les choses 44
B. Les approches rationnalisées 44
1. Les démarches expérimentales sur modèles biologiques in vitro et in vivo 44
a. Liaison médicament-cible 44
b. Les criblages phénotypiques 46
2. Les approches bio-informatiques in silico. 48
a. Correspondance de signatures ou "signature matching" 48
b. Étude d'association pan-génomique 49
c. Docking moléculaire 50
d. Analyses cliniques rétrospectives 51
e. L'intelligence artificielle 52
III. Avantages et défis liés au repositionnement 53
A. Principaux avantages 53
B. Quels défis à surmonter ? 54
IV. Cadre réglementaire du repositionnement de médicaments 55

A. Système dérogatoire d'accès et de prise en charge des médicaments 55
1. L'accès précoce 56
2. L'accès compassionnel 57
B. Initiatives européennes 57

V. Un exemple phare de repositionnement chez les enfants : le propranolol 58
VI. Quels médicaments repositionnables à l'avenir dans les tumeurs intracrâniennes pédiatriques ? 59
A. Parasitologie 60
B. Neurologie – psychiatrie 63
C. Cardiologie 66
D. Anti-diabétique 69
E. Anti-inflammatoires 70
F. Traitement de la dépendance alcoolique 72
G. Quelques molécules inattendues 75

Partie 2 : Travaux de thèse
Cibler la voie de signalisation sérotoninergique : vers de nouvelles options thérapeutiques pour le médulloblastome **..... 78**

I. Avant-propos 79
II. Résultats 81
III. Discussion/perspectives 102

Partie 3 : Travaux collaboratif
Associations entre médicaments repositionnés et traitements standards des médulloblastome **..... 111**

I. Avant-propos 112
II. Résultats/Discussion 112
III. Perspectives 138

Partie 4 : Autres travaux collaboratifs
Néosynthèse de candidats-médicaments efficaces dans les médulloblastomes **..... 141**

I. Avant-propos 142
II. Résultats 142
III. Perspectives 160

Conclusion 162
Bibliographie 163
Annexes 187

Table des tableaux et figures

Figure 1 : Distribution géographique des CLIP² labellisés 14
Figure 2 : Structure du système nerveux central (SNC) 19
Figure 3 : Superfamilles de tumeurs pédiatriques du SNC r 20
Figure 4 : Localisation des médulloblastomes 21
Figure 5 : Caractéristiques démographiques, cliniques et moléculaires des sous-types de MB 22
Figure 6 : Représentation schématique de la voie Wnt/β-caténine activée et inactive. 24
Figure 7 : Représentation schématique de la voie SHH active et inactive 26
Figure 8 : Comparaison des sous-types de MB non-WNT/non-SHH, ... 28
Figure 9 : Algorithme actuel de gestion des MB adaptée au risque moléculaire 35
Tableau 1 : Essais cliniques impliquant des inhibiteurs de checkpoint immunitaire dans les tumeurs cérébrales pédiatriques 38
Tableau 2 : Essais cliniques impliquant des cellules CAR T dans les tumeurs cérébrales pédiatriques 39
Tableau 3 : Essais cliniques impliquant des vaccins thérapeutiques, dans les tumeurs cérébrales pédiatriques 40
Figure 10 : Caractéristiques communes aux différentes terminologies de « repositionnement » 41
Figure 11 : Schéma des principales stratégies utilisées pour le repositionnement de médicaments 43
Figure 12 : Approche de chimio-protéomique centrée sur le composé 45
Figure 13 : Approches de profilage thermique du protéome (TPP) 46
Figure 14 : Importance du criblage à haut débit dans la stratégie de repositionnement de médicaments 47
Figure 15 : Diagramme illustrant la méthode Genome-Wide Association Study (ou GWAS) 50
Figure 16 : Illustration de l'interaction entre une molécule (ligand) et une protéine (receptor) 51
Tableau 4 : Services et bases de données consultables concernant les effets indésirables des médicaments (liste non-exhaustive) 52
Figure 17 : Avantages du repositionnement de médicament par rapport à un développement de médicament de novo 53
Figure 18 : Récapitulatif des nouveaux régimes mis en place par la réforme de l'accès dérogatoire aux médicaments du 1er juillet 2021 56
Figure 19 : Flacon et boîte d'Hémangiol, solution buvable spécifiquement développée pour les nourrissons atteints d'hémangiome sévère 59
Figure 20 : Schéma des nombreux effets anticancéreux du mébendazole sur la progression tumorale 61
Figure 21 : Voies de signalisation de l'acide valproïque dans les cellules cancéreuses 63
Figure 22 : Mécanisme d'action des statines dans le cancer 68
Figure 23 : Mécanismes d'action de la metformine 69
Figure 24 : Mécanismes d'action identifiés du célécoxib dans le cancer du sein 71
Figure 25 : Proposition des mécanismes d'action du DSF-Cu 73
Figure 26 : Mécanismes anticancéreux proposés du DSF, Cu, DSF/Cu (et CuET) dans les cellules tumorales et le microenvironnement tumoral 75

Figure 27 : Sous-types et voies de signalisation des récepteurs de la sérotonine (5-HTR)..... 80
Figure 28 : Volcano plot illustrant les partenaires protéiques de la métergoline, analysés par spectrométrie de masse après expérience de TPP..... 104
Figure 29 : Identification des partenaires protéiques potentiels de la métergoline regroupés selon leurs interactions via la base de données String..... 105
Figure 30 : Réaction de « click » entre un alcyne (R1 représentant la métergoline dans notre étude) et un azide (R2 étant le fluorophore), en présence de cuivre et d'ascorbate..... 106
Figure 31 : Mécanisme anticancéreux multi-cibles de l'itraconazole. 107
Figure 32 : Courbes de survie Kaplan-Meier..... 108
Figure 33 : Heatmaps représentant les scores de synergies (Bliss score) pour l'association métergoline-itraconazole dans des cultures 2D de cellules de glioblastomes U-87 et U251..... 109
Figure 34 : Mécanisme du pyrvinium dans la signalisation WNT contrôlée par CK1α 110
Figure 35 : Inhibition de la survie des cellules de MB par l'association métergoline-vincristine 114
Figure 36 : Heatmaps représentant les scores de synergies (Bliss score) pour l'association asénapine-vincristine et méthiothepin-vincristine, dans des cultures 2D de cellules de MB non-WNT/non-SHH (HD-MB03 et ONS-76)..... 115
Figure 37 : Association entre la métergoline et thérapies ciblées anti-EGFR..... 116
Figure 38 : Heatmaps représentant les scores de synergies (Bliss score) pour l'association de la métergoline avec des inhibiteurs de BET et avec des inhibiteurs de MEK 117
Figure 39 : Criblage de la librairie Hitch en association avec la radiothérapie..... 139
Figure 40 : Dérivés de quinoxaline comme agents anticancéreux potentiels 155
Figure 41 : Synthèse de PEP67, mise au point par l'équipe partenaire LPCR 156
Figure 42 : Sélection de PEP67 dans des modèles cellulaires 2D..... 157
Figure 43 : Validation de l'efficacité supérieure de PEP67 sur sphéroïdes tumoraux..... 158
Figure 44 : Validation de l'efficacité de PEP67 dans des modèles organotypiques de cerveau 159
Figure 45 : Mécanisme d'action de PEP67..... 160

Liste des abréviations

5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine
5-HTR : Récepteur de la sérotonine

AcSé : Accès Sécurisé aux Molécules Innovantes
AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens
ALDH : Aldéhyde déshydrogénase
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AMPK : AMP-activated protein kinase
ANSM : Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et des Produits de Santé
AP-1 : Activator protein 1
APC : Adenomatous polyposis coli
AT/RT : Tumeurs tératoïdes rhabdoïdes atypiques
ATR : Ataxia telangiectasia and Rad3-related
ATU : Autorisations temporaires d'utilisation

BET: Bromodomain and Extra-Terminal proteins
Bcl2: B-cell lymphoma 2
BHE : Barrière hémato-encéphalique

C1GALT1 : Core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase, 1
Cas9 : CRISPR associated protein 9
CBD : Cannabidiol
CDK : Cyclin-dependent kinase
CK1α : Casein kinase 1α
CLIP : Centres Labellisés INCa de Phases Précoces
ClpP: Caseinolytic protease proteolytic
CMV: Cytomégalovirus
COVID: Coronavirus Disease
COX-2 : Cyclo-oxygénase-2
CREB: cAMP response element-binding protein
CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CSI : Irradiation cranio-spinale
CT-scan: Computed-tomography ou tomodensitométrie
CTNNB1 : Catenin Beta 1

DC : Cellules dendritiques
DCA : Dichloroacétate
DDX3X: DEAD-Box helicase 3 X-linked
DIPG : Gliome infiltrant du tronc cérébral
DMG : Gliomes diffus de la ligne médiane
DRD2: Dopamine D2 receptor
DSF: Disulfirame
DVL: Disheveled

EAG2: Ether-a-go-go 2
EATRIS: European Infrastructure for Translational Medicine
EGF: Epidermal Growth factor
EGFR: Epidermal Growth factor Receptor
EMA: European Medicines Agency
EMT: Transition Epithélio-Mésenchymateuse
ERK: Extracellular signal-regulated kinases

FACT: Facilitates chromatin transcription complexe
FDA: Food & Drug Agency
Fz: Frizzled

GB: Glioblastome
GFI1: Growth factor independent 1
GFI1B: Growth factor independent 1B
GLI: GLI Family Zinc Finger
GLUT: Glucose transporter
GPCR : Récepteur couplé aux protéines G
GSK3β: Glycogène synthase kinase 3 Beta
GWAS: Genome Wide Association Study
Gy: Gray

H3K27M : Mutation de la lysine 27 en méthionine sur l'histone 3
HAS : Haute Autorité de Santé
HDAC : Histone désacétylase
HIFs: Hypoxia-inducible factor
HMG-CoA: Hydroxymethylglutaryl-CoA

IA : Intelligence artificielle

ID1 : DNA-binding protein inhibitor
INCa : Institut National du Cancer
iPSC : Cellules souches pluripotentes induites
IRM : Imagerie par résonance magnétique

KAT2A : Lysine acétyltransférase 2A
KBTBD4: Kelch repeat and BTB domain containing 4
KDM6A : Lysine déméthylase 6A
KMT2D : Lysine Methyltransferase 2D
MCI : Initiative de Caractérisation Moléculaire
MEK : Mitogen-activated protein kinase
MMP : Métalloprotéases matricielles
MTD : Dose maximale tolérée
MTG : Métergoline
mTOR : Mammalian target of rapamycin

NF-κB: Nuclear factor-kappa B

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OTX2: Orthodenticle homeobox 2

PD-1: Programmed cell death 1
PD-L1: Programmed death-ligand 1
PDX: Patient Derived Xenographt
PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinases
PIP : Plan d'Investigation Pédiatrique
PTCH : Patched
PUMA : Pediatric-Use Marketing Autorisation

React-4Kids: REsearchers in oncology ACTing for Kids
reDO: Projet Repurposing Drugs in Oncology
REMEDI4ALL: REpurposing of MEDIcines 4 ALL
ROS: Espèces réactives de l'oxygène
RT: Radiothérapie
RTU : Recommandations temporaires d'utilisation

LC3 : Protein 1A/1B-light chain 3
LCR : Liquide céphalorachidien

MAPK14: Mitogen-activated protein kinase 14
MAPPYACTS: Molecular Profiling for Pediatric and Young Adult Cancer Treatment Stratification
MB : Médulloblastome

SFCE : Société Française de lutte contre les Cancers et les Leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent
SHH: Sonic Hedgehog
SIOP : Société Internationale d'oncologie pédiatrique
SMARCA4 : SWI/SNF Related, Matrix associated, Actin dependent Regulator Of Chromatin, subfamily A, member 4
SMO: Protéine Smoothened
SNC: Système nerveux central
SNP: Single nucleotide polymorphism
STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3

TCR : Récepteur des lymphocytes T
TEP : Tomographie par émission de positons
TERT : Telomerase reverse transcriptase
THC : Δ9-tetrahydrocannabinol
TP53 : Tumor protein P53
TPP : Profilage thermique du protéome

VEGF: Vascular epidermal growth factor
VEGFR: Vascular epidermal growth factor Receptor

WNT: Wint

ZEB1: Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
ZERO : Zero Childhood Cancer
ZMYM3: Zinc Finger MYM-Type Containing 3

Partie 1 : Rappels bibliographiques

– Chapitre 1 –
Oncopédiatrie : reconnaissance récente d'un domaine à part de l'oncologie ?

Les cancers pédiatriques font partie des maladies rares, et représentent 1 à 2% de l'ensemble des cancers. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), chaque année, environ 400.000 enfants et adolescents développent un cancer et 100.000 en meurent. En France environ 2 300 enfants et adolescents sont, par an, nouvellement diagnostiqués d'un cancer. Même si le taux de survie à 5 ans dépasse désormais 80 % dans notre pays, ce chiffre est une moyenne qui cache des disparités et les cancers restent la première cause de décès par maladie chez les enfants. De plus, deux tiers de ceux qui ont survécu ont (ou auront) des séquelles de leurs traitements, voire des seconds cancers susceptibles de se manifester tout au long de leur vie. La lutte contre les cancers pédiatriques est un enjeu permanent, qui mobilise la recherche pour améliorer l'accès de cette patientèle particulière à l'innovation thérapeutique [1]. Au niveau politique, la recherche sur les cancers pédiatriques et leur prise en charge clinique a été intégrée de façon graduelle – depuis 10 à 15 ans seulement – dans les **« Plans Cancer »** successifs définis et financés par le gouvernement français.

Le Plan Cancer I (2003-2007) a été exempt de mesures spécifiquement réservées à l'oncopédiatrie, même si certaines ont indirectement bénéficié aux enfants atteints de cancer. Ce plan a principalement visé à améliorer les infrastructures de soins (en charge de la prévention, du dépistage et du traitement) et à soutenir la recherche sur le cancer en général. Une nouvelle dynamique a été impulsée avec la création de 7 entités Cancéropôles, mises en place pour structurer et dynamiser la recherche en régions autour de projets fondateurs communs. En créant l'Institut National du Cancer (INCa) en 2005, l'État s'est également doté d'une agence sanitaire et scientifique chargée de coordonner les futures actions de lutte contre le cancer [2].

Le Plan Cancer II (2009-2013) a œuvré au renforcement de la qualité et de la sécurité des soins sur l'ensemble du territoire. C'était le 1er plan à reconnaître la nécessité de traiter spécifiquement les cancers pédiatriques en raison de leur nature distincte des cancers de l'adulte. Il a ainsi soutenu la création de centres de référence pour les cancers pédiatriques, assurant une meilleure prise en charge et des traitements plus spécialisés. L'accès à la médecine personnalisée et la participation aux essais cliniques ont également progressé [3].

Il a fallu attendre le Plan Cancer III (2014-2019) pour enfin y trouver un chapitre consacré spécifiquement aux cancers de l'enfant. Il a permis la mise en place d'actions pour améliorer la qualité de vie des enfants malades, renforcer les dispositifs de dépistage et les soins de support, et développer la recherche spécifique à l'oncopédiatrie. Des efforts accrus ont été déployés pour financer des projets de recherche réservés aux cancers des jeunes patients, en reconnaissant les besoins particuliers de cette population. Ce plan a

également mis l'accent sur la formation des professionnels de santé et la diffusion d'informations adaptées aux enfants et leurs parents. Avec pour priorité majeure la réduction des inégalités et des pertes de chance face à la maladie, le Plan a aussi porté une attention particulière aux besoins des enfants, adolescents et jeunes adultes atteints de cancer, dans le but de faire progresser l'accès à l'innovation et améliorer encore la qualité des soins, ainsi que l'accompagnement des enfants et de leurs familles [4].

En ligne avec les priorités de la **Stratégie décennale de lutte contre les cancers** (2021-2030), la loi n° 2019-180 du 8 mars 2019, visant à renforcer la prise en charge des cancers pédiatriques par la recherche en France, a permis d'augmenter spécifiquement de 5 millions d'euros par an leur financement par l'INCa. Ce 4ème Plan Cancer prolonge ainsi les efforts des précédents plans en portant une attention particulière aux cancers pédiatriques, avec des objectifs à long terme visant à améliorer les taux de guérison et la qualité de vie des enfants survivants. Les axes de cette stratégie incluent ainsi l'amélioration des soins et l'innovation en recherche, mais aussi le soutien aux familles et aux enfants durant et après les traitements. Cette stratégie décennale prévoit des moyens financiers dédiés à la recherche en oncopédiatrie et des mesures pour mieux structurer la prise en charge des jeunes patients dans les établissements de santé [5].

Les mesures gouvernementales françaises ont ainsi intégré puis renforcé les initiatives spécifiques aux enfants atteints de cancer, en accroissant le soutien à la recherche en oncopédiatrie et au développement de soins spécialisés, mais également en prenant peu à peu en considération l'importance de l'accompagnement de la cellule familiale dans son entièreté.

Dans le but d'assurer la sécurité, la qualité et l'accessibilité des soins pour tous, les actions initiées par les Plans Cancer ont permis la genèse de **nouvelles entités en recherche oncopédiatrique** dont :

- 8 Centres Labellisés INCa de Phases Précoces (CLIP^2) ouverts à la recherche clinique en oncopédiatrie depuis 2024 (Fig. 1) ;

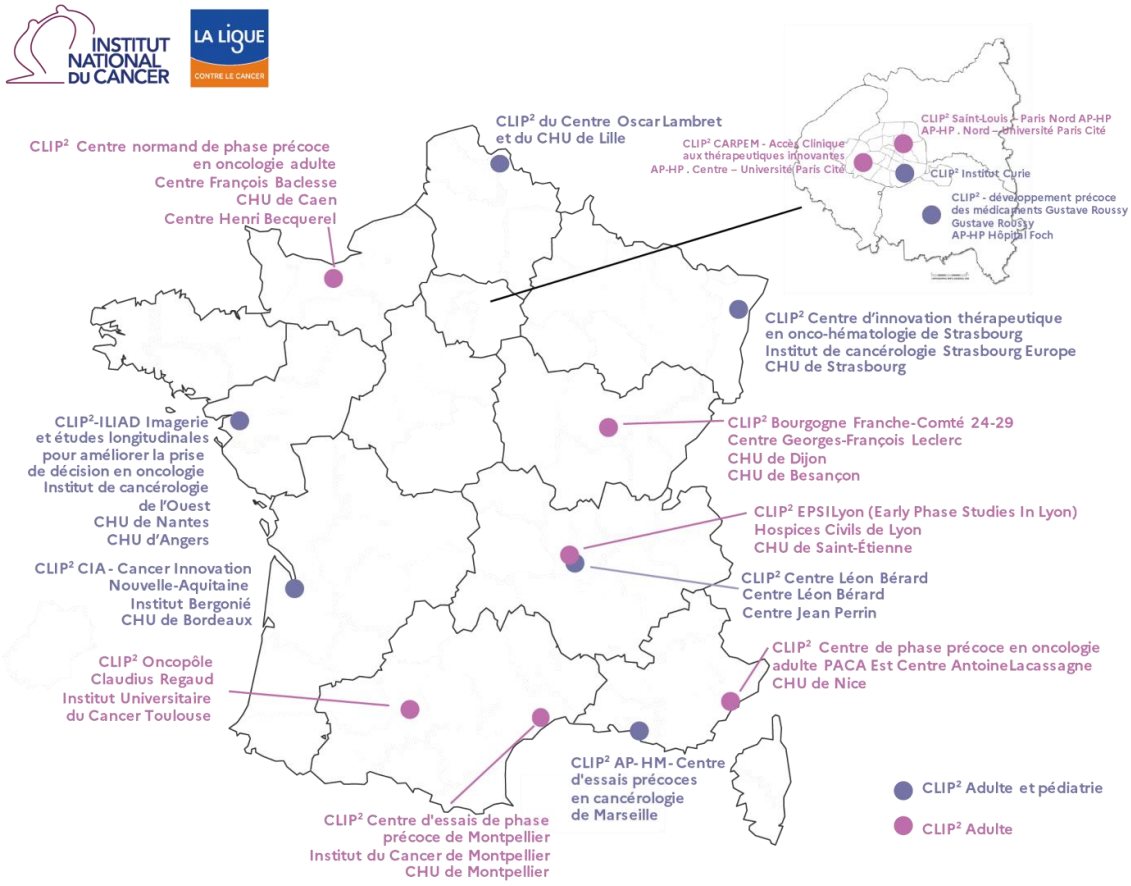


Figure 1 : Distribution géographique des CLIP² labellisés (4ème labellisation – 2024-2029)

- 2 registres pédiatriques nationaux recensant tous les cas de cancers des enfants [6] ;
- 1 intergroupe coopérateur SFCE (Société Française de lutte contre les Cancers et les Leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent), dont la labellisation par l'INCa a été renouvelée en 2022 ;
- 3 centres de recherches d'excellence dédiés à la cancérologie pédiatrique [7], dont la création a été financièrement soutenue par l'INCa en 2024 à hauteur de 15 millions d'euros suite à l'appel à candidatures PEDIACRIEX23. Les centres lauréats, labellisés pour une durée de 5 ans, sont : « EN-HOPE SMART4CBT » issu du consortium en Hémato-Oncologie Pédiatrique des hôpitaux et laboratoires de recherche de Strasbourg et Lille, « South-ROCK » alliant les services hospitaliers et équipes de recherche de Lyon et Marseille, et « Paris Kids Cancer » mené par la collaboration entre les Hôpitaux de Paris, l'Institut Curie et l'Institut Gustave Roussy. Ces structures dédiées à l'oncopédiatrie assurent un continuum entre disciplines jusqu'alors trop cloisonnées (ex : sciences biologiques, sciences des données, sciences humaines et sociales…), avec pour objectif principal de conjuguer les savoir-faire des cliniciens et des chercheurs, issus d'établissements différents, sur des sujets partagés [8].

D'autres programmes, initiés par l'INCa, contribuent également à la mise en place de **solutions thérapeutiques innovantes pour les jeunes patients atteints de cancers** [9]. C'est le cas de MAPPYACTS (pour Molecular Profiling for Pediatric and Young Adult Cancer Treatment Stratification), programme de recherche clinique qui a vu le jour en 2015 visant à étudier les caractéristiques génétiques des tumeurs pédiatriques réfractaires afin d'orienter les enfants vers des traitements innovants grâce à des essais cliniques appropriés [10]. Le programme AcSé (Accès Sécurisé aux Molécules Innovantes) est, quant à lui, un type novateur d'essai clinique lancé en 2013, avec l'accord de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) et en lien avec MAPPYACTS. Il offre aux enfants et adolescents dont les traitements ont échoué un accès sécurisé à des thérapies ciblées, même en dehors des indications initiales approuvées, en basant la stratégie thérapeutique sur le profil biologique des tumeurs et non pas uniquement sur l'organe d'origine [11]. Un essai clinique entièrement dédié aux enfants et adolescents, nommé AcSé eSMART, a été lancé en juillet 2016 dans le cadre de ce programme et a été déployé au niveau européen (incluant dix centres de soin français, dont l'hôpital de la Timone). Il vise à tester un large panel de molécules innovantes – de la catégorie des thérapies ciblées et des immunothérapies principalement, utilisées seules ou en association – au sein d'un seul et même essai clinique de phase 2 [12].

L'Initiative de Caractérisation Moléculaire (MCI) [13] est un autre exemple de programme collaboratif à l'échelle internationale qui a débuté en 2022, mettant en jeu la communauté scientifique (oncopédiatres, chercheurs, bioinformaticiens) et impliquant les jeunes patients atteints de cancer ainsi que leurs familles, afin de fournir une caractérisation moléculaire tumorale de pointe au moment du diagnostic. L'objectif premier est de sélectionner le traitement le mieux adapté à la prise en charge rapide du patient, mais ces données permettent également aux chercheurs de créer de meilleurs essais cliniques, d'améliorer leurs connaissances sur les origines et les facteurs responsables des cancers de l'enfant pour progresser plus rapidement dans le développement de traitements optimaux [13].

Zero Childhood Cancer (ZCC) [14] est un programme de médecine de précision de pointe pour les enfants et les jeunes atteints de cancer en Australie. En tenant compte des caractéristiques génétiques spécifiques de chaque tumeur, cette initiative se concentre, depuis 2015, sur l'identification de traitements personnalisés adaptés aux besoins individuels de chaque enfant atteint de cancers [15]. Une banque d'échantillons de tumeurs est collectée et des informations moléculaires et génétiques précieuses sur les cancers infantiles sont recueillies. ZCC collabore également avec des institutions internationales pour partager des données et des découvertes, renforçant ainsi l'effort mondial contre le cancer chez les enfants.

Initiative unique en Europe, **React-4Kids** (REsearchers in oncology ACTing for Kids) est le réseau national français de recherche fondamentale et translationnelle sur les cancers des enfants et des adolescents. Créé en juin 2018, ses missions sont de permettre à la recherche d'accélérer en favorisant les collaborations entre équipes, en soutenant le partage d'expertises et la mise en commun de ressources, et en répondant de manière collective à des problématiques d'envergure. Grâce à leur plateforme **Share-4Kids**, un

entrepôt national de données sur les cancers pédiatriques en libre accès labellisé par l'INCa en 2019, les chercheurs et les cliniciens peuvent accéder à la puissance des données multi-omiques pour mener à bien leurs travaux et ainsi faire avancer la recherche au profit des jeunes patients. En novembre 2023, ce projet a ainsi été récompensé par le Prix Unicancer de l'Innovation.

Enfin, **Virtual Child** est un autre projet innovant porté par un consortium international et multidisciplinaire de partenaires industriels, de chercheurs et de cliniciens qui ambitionnent de transformer la façon dont le monde comprend et traite les cancers pédiatriques. Il déploie actuellement une combinaison unique de compétences en biologie, multi-omique, informatique avancée et intelligence artificielle/apprentissage automatique afin de créer le tout premier modèle informatique, à résolution cellulaire, d'apprentissage et de données du développement normal et cancéreux du système nerveux [16]. Ce modèle d'IA dynamique, adaptatif et multi-modal, a pour objectif la découverte et la prédiction à grande échelle de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour améliorer la prise en charge des cancers pédiatriques. Pour ce faire, des « cancers numériques » sont développés et soumis à un nombre illimité d'essais cliniques *in silico* afin d'identifier, prédire et prioriser les traitements mais aussi de simuler leur utilisation avant administration aux enfants. Toutes ces informations (succès et échecs) permettront d'affiner et d'instruire continuellement l'algorithme du Virtual Child, augmentant ainsi son efficacité et son pouvoir prédictif de nouvelles cibles/traitements. Le système nerveux est le point de départ de ce projet mais d'autres systèmes organiques sont envisagés concernant les cancers pédiatriques courants tels que les os et les muscles. Des patients et des chercheurs du monde entier participeront à la conception de cet enfant virtuel en apportant des demandes spécifiques, des idées créatives et des données *via* les réseaux sociaux et le site Web (ressource : https://www.thevirtualchild.org/), le rendant également accessible à l'ensemble de la communauté mondiale.

Des efforts de plusieurs pays visent donc à l'harmonisation et à l'innovation en collectant et en partageant des données volumineuses pour éclairer le traitement des cancers pédiatriques à l'avenir [17].

Au même titre que les autres tumeurs pédiatriques, les **tumeurs intracrâniennes** bénéficient (et bénéficieront à l'avenir) de l'ensemble de ces initiatives. Néanmoins, elles présentent des défis additionnels intimement liés à leur localisation.

Pendant de nombreuses années, les cancers pédiatriques ont été analysés et traités sur la base des modèles de cancers adultes, bien que des études ultérieures aient révélé des différences importantes qui les distinguent et nécessitent des approches thérapeutiques spécifiques. Les tumeurs cérébrales pédiatriques diffèrent de leurs homologues chez l'adulte, non seulement par leur présentation clinique, mais aussi par leurs mutations génétiques spécifiques, leurs origines développementales uniques et leur microenvironnement tumoral particulier dans un cerveau en plein développement [18]. Même les tumeurs qui avaient été initialement classées dans une même catégorie se sont avérées avoir une étiologie et une pathogenèse distinctes, qui se reflètent dans leur diagnostic et leur comportement clinique. Dans la cinquième édition de la classification

des tumeurs de l'OMS, publiée en 2021, les tumeurs pédiatriques sont, pour la première fois, décrites dans un volume distinct des tumeurs adultes [19].

Si une grande partie des travaux de recherche sur les cancers cérébraux – et plus généralement en oncologie pédiatrique – se déroulent dans le milieu universitaire, la mise au point de médicaments dépend fortement des investissements financiers et techniques du secteur privé. Or, le développement d'un médicament oncologique coûte entre 765 millions et 4,6 milliards de dollars, rendant le retour sur investissement pour une indication de cancer pédiatrique extrêmement rare, à moins que l'agent thérapeutique ne puisse être utilisé plus largement chez d'autres patients ou pour d'autres maladies [20]. Malgré une forte prise de conscience de la part des instances gouvernementales quant à la gravité des tumeurs cérébrales pédiatriques, elles font l'objet de moins de financement que les autres cancers pédiatriques ou que les tumeurs cérébrales de l'adulte, limitant d'autant les ressources disponibles pour la recherche et le développement de nouveaux traitements.

Dans ce contexte, le repositionnement de médicaments offre une solution prometteuse, plus rapide et plus sécurisée, dont le but est d'accélérer la mise à disposition de thérapies efficaces pour les jeunes patients atteints de tumeurs intracrâniennes.

– Chapitre 2 –
Les médulloblastomes : tumeurs intracrâniennes pédiatriques

I. Epidémiologie des tumeurs intracrâniennes pédiatriques

Près de 2300 nouveaux cas de cancers de l'enfant (0 à 17 ans) sont diagnostiqués chaque année en France et, depuis 30 ans, ce nombre augmente de 1 à 2% par an en Europe. Les types de cancers pédiatriques les plus prévalents sont les leucémies, les lymphomes, et les tumeurs du système nerveux central (SNC, Fig. 2). Les tumeurs du SNC sont les **tumeurs solides les plus fréquentes** ; elles représentent 25% des tumeurs de l'enfant et de l'adolescent. Elles affectent près de 3 000 jeunes patients par an en Europe, dont environ 500 en France, et comme toute pathologie touchant moins d'1 personne sur 2 000, elles sont donc classées dans les maladies rares.

Même si elle peut paraitre obsolète, cette classification des tumeurs cérébrales de l'enfant perdure. Trois grands types de tumeurs regroupent à eux seuls la majorité de ces cancers :

- Les tumeurs dites embryonnaires, parmi lesquelles figurent :
  - Les médulloblastomes, tumeurs cérébrales les plus fréquentes (1 cas sur 20 000 enfants / an), localisés au niveau du cervelet, qui sont au centre de mon travail de thèse
  - Les tumeurs tératoïdes rhabdoïdes atypiques (AT/RT), tumeurs moins fréquentes (1 cas sur 1 million / an) mais extrêmement agressives et au pronostic sombre de 25 % de survie à 2 ans
- Les gliomes : situés dans les tissus de soutien (cellules gliales) de l'encéphale ou de la moelle épinière. Il en existe près d'une vingtaine différentes dont l'agressivité est variable, allant des tumeurs bénignes dites de « bas grade » (développement lent) aux tumeurs malignes dites de « haut grade » (développement rapide) ;
- Les épendymomes : tumeurs se retrouvant dans le cervelet ou dans le télencéphale (*i.e.* hémisphères cérébraux) et plus rarement au niveau de la moelle épinière [21].

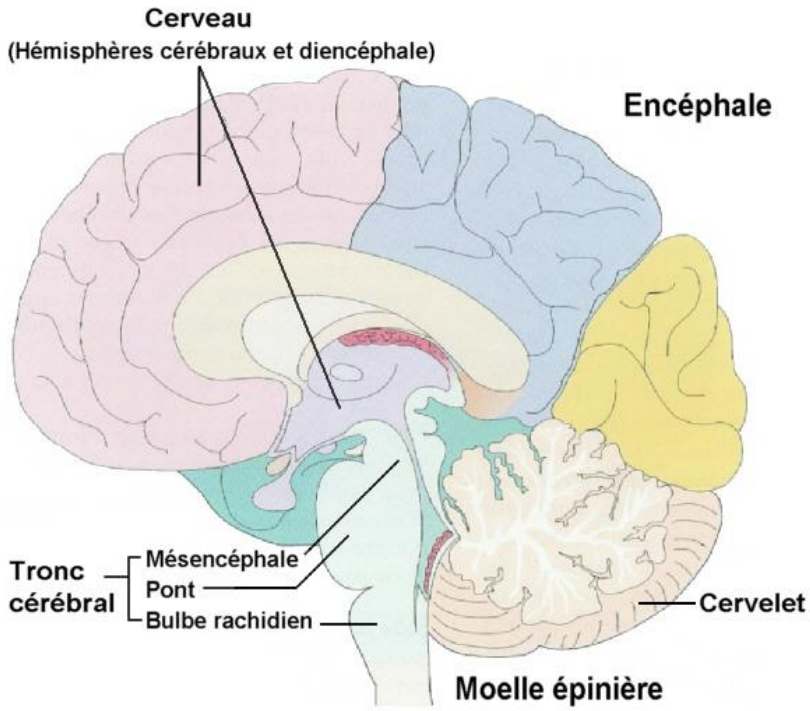


Figure 2 : Structure du système nerveux central (SNC), issue de [22]

Du fait de leur hétérogénéité clinique, anatomique, histologique et moléculaire (Fig. 3), les tumeurs cérébrales forment un ensemble de maladies au développement et pronostic très variables, allant de la guérison totale à des formes agressives actuellement incurables.

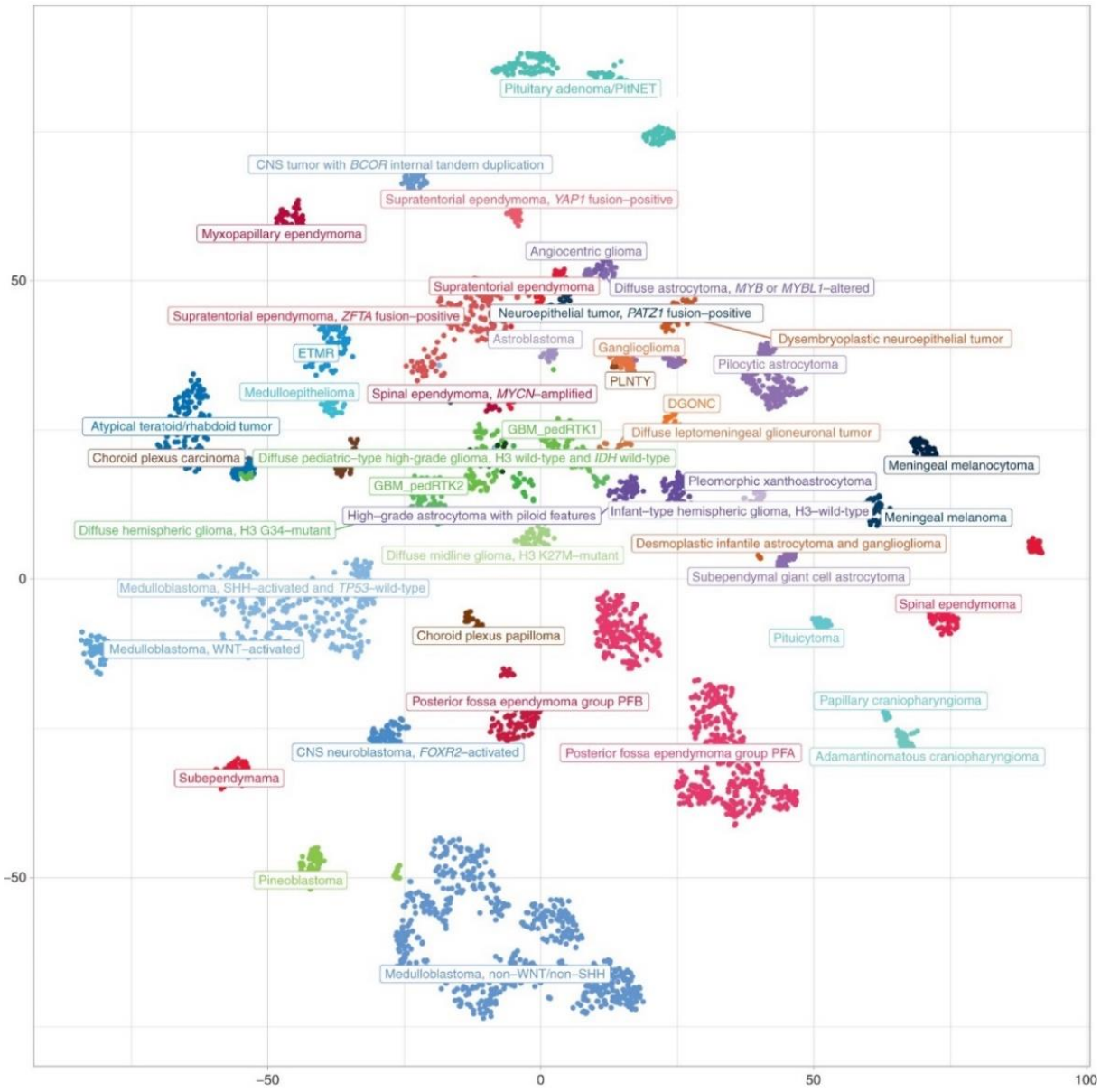


Figure 3 : Superfamilles de tumeurs pédiatriques du SNC réalisées à partir d'une projection non supervisée et non linéaire t-SNE des profils de méthylation de 4 427 tumeurs, figure issue de [19]

II. Sous-groupes des médulloblastomes

Les médulloblastomes (MB), tumeurs embryonnaires du cervelet (Fig. 4), sont les tumeurs malignes du SNC les plus courantes dans la population pédiatrique. Le cervelet est une structure située à l'arrière du cerveau, au niveau de la fosse crânienne postérieure. Ce centre nerveux est responsable de la coordination des mouvements, du maintien de l'équilibre et de la posture, ainsi que de l'apprentissage moteur.

La majorité des MB surviennent avant l'âge de 10 ans (40% avant 5 ans et 75% avant 10 ans) [23], bien qu'ils puissent se manifester au cours de la première année de vie ou chez l'adolescent et le jeune adulte pour certains individus. Ces tumeurs se caractérisent par une prolifération rapide et une tendance à se propager à d'autres régions du SNC *via*

le liquide céphalorachidien. Ainsi, au moment du diagnostic, près de la moitié des patients présentent des métastases au niveau du SNC, tout en étant peu symptomatiques.

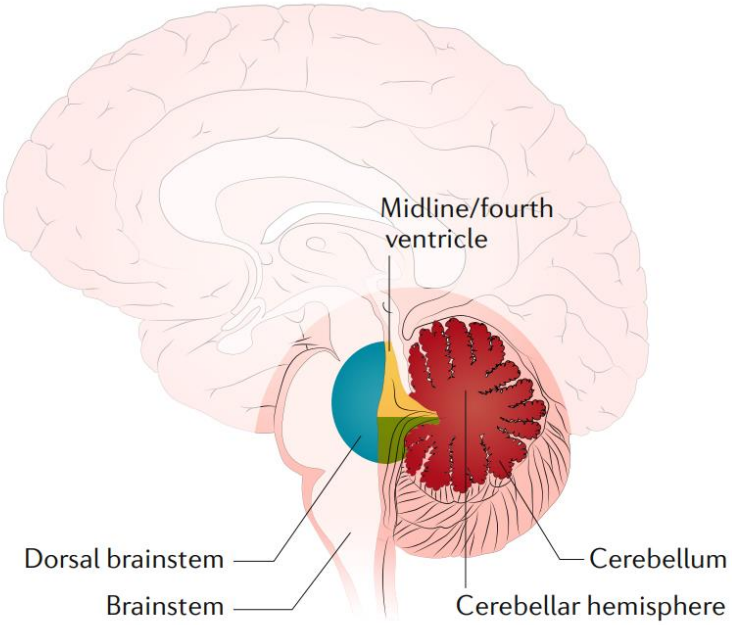


Figure 4 : Localisation des médulloblastomes (codées par couleur en fonction des localisations diagnostiques dominantes observées pour les sous-groupes : WNT (bleu) ; SHH (rouge) ; non WNT/non-SHH : groupe 3 (jaune) et groupe 4 (vert)). issue de [24]

Historiquement, la classification des MB reposait sur des critères histologiques et cliniques, tels que l'âge du patient, l'étendue de l'exérèse chirurgicale (complète ou non), la présence de métastases, et le type histologique de la tumeur. Cependant, cette approche a rapidement montré ses limites, car les MB sont des tumeurs très hétérogènes entraînant des réponses variables aux traitements et des pronostics très divers. Au cours des deux dernières décennies, des efforts à grande échelle –en génomique notamment– ont permis de démêler cette hétérogénéité inter-patient des MB [25]. En combinant ce profilage moléculaire à la caractérisation histologique des MB, l'OMS affine sa classification d'année en année donnant lieu aux sous-groupes suivants en 2022 [19] :

- Médulloblastomes moléculairement définis :
  - Médulloblastomes WNT activé
  - Médulloblastomes SHH activé et TP53-sauvage
  - Médulloblastomes SHH activé et TP53-mutant
  - Médulloblastomes non-WNT/non-SHH, par habitude encore nommés groupes 3/4
- Médulloblastomes histologiquement définis

Les pronostics varient considérablement selon le sous-groupe moléculaire (Fig. 5).

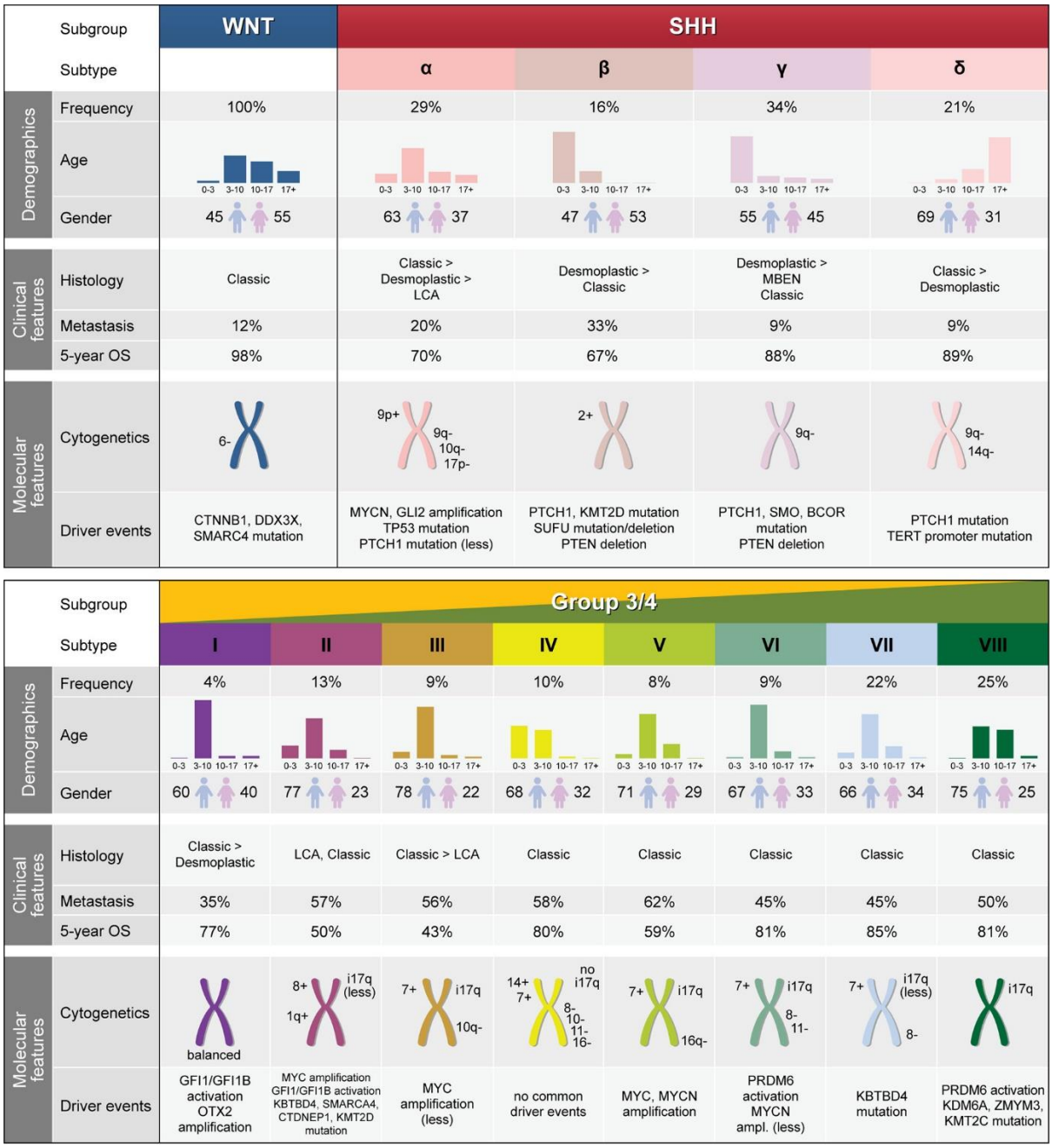


Figure 5 : Caractéristiques démographiques, cliniques et moléculaires des sous-types de MB [25]

A. Le sous-groupe WNT

Le sous-groupe WNT représente environ 10 % de tous les diagnostics de MB. Ils proviennent des neurones à fibres moussues dérivés de la lèvre rhombique inférieure extracérébelleuse [26], structure embryologique qui joue un rôle crucial dans la formation de certaines parties du SNC comme le cervelet et le tronc cérébral. Ces MB se manifestent après l'âge de 4 ans jusqu'au début de l'âge adulte (âge médian d'environ 11 ans) et présente un ratio hommes/femmes relativement équilibré. Les MB de ce groupe sont rarement métastatiques (~10%) au moment du diagnostic et sont associés au

meilleur taux de survie à 5 ans, dépassant les 95% pour les patients âgés de moins de 16 ans [24]. Ce bon pronostic pourrait s'expliquer par une réponse favorable aux traitements, facilitée par la forte vascularisation des tumeurs primaires, qui permettrait une meilleure pénétration des chimiothérapies et des thérapies ciblées jusqu'aux cellules tumorales [27].

Les MB WNT se caractérisent par une **suractivation de la voie de signalisation WNT/β-caténine** (Fig. 6) correspondant à la voie canonique de la signalisation WNT, différant de la voie non-canonique qui fonctionne indépendamment de la β-caténine.
En absence du signal WNT (voie inactive), la β-caténine cytoplasmique est continuellement dégradée par un complexe incluant plusieurs protéines importantes : Axine, APC (Adenomatous Polyposis Coli), GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3), et CK1 (Casein Kinase 1). La β-caténine est phosphorylée par CK1 et GSK3, entrainant sa polyubiquitination par le complexe E3 ubiquitine ligase et sa dégradation par le protéasome, empêchant ainsi son accumulation dans le cytoplasme et son entrée dans le noyau.
Lorsque des protéines WNT (voie active) se lient à leurs récepteurs de surface cellulaire, principalement Frizzled (Fz) et le corécepteur LRP5/6 (Low-density lipoprotein Receptor-related Protein), cela provoque le recrutement du complexe Dishevelled (DVL) à la membrane et l'inhibition du complexe de dégradation de la β-caténine, notamment via la phosphorylation de LRP6 par GSK3 et la relocalisation d'Axine vers la membrane. La β-caténine n'est plus phosphorylée par le complexe de dégradation, elle échappe à la dégradation protéasomale et s'accumule donc dans le cytoplasme.
La β-caténine cytoplasmique s'accumule alors dans le cytoplasme puis transloque dans le noyau, où elle interagit avec les facteurs de transcription TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) et recrute des coactivateurs transcriptionnels tels que CBP (CREB-binding protein) ou SMARCA4 (SWI/SNF related Matrix associated, Actin dependent Regulator of Chromatin, subfamily A, member 4) pour activer l'expression des gènes cibles de la voie WNT, comme *MYC* et *CDKN1A* (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A) impliqués dans la prolifération cellulaire, la survie et la différenciation [28].

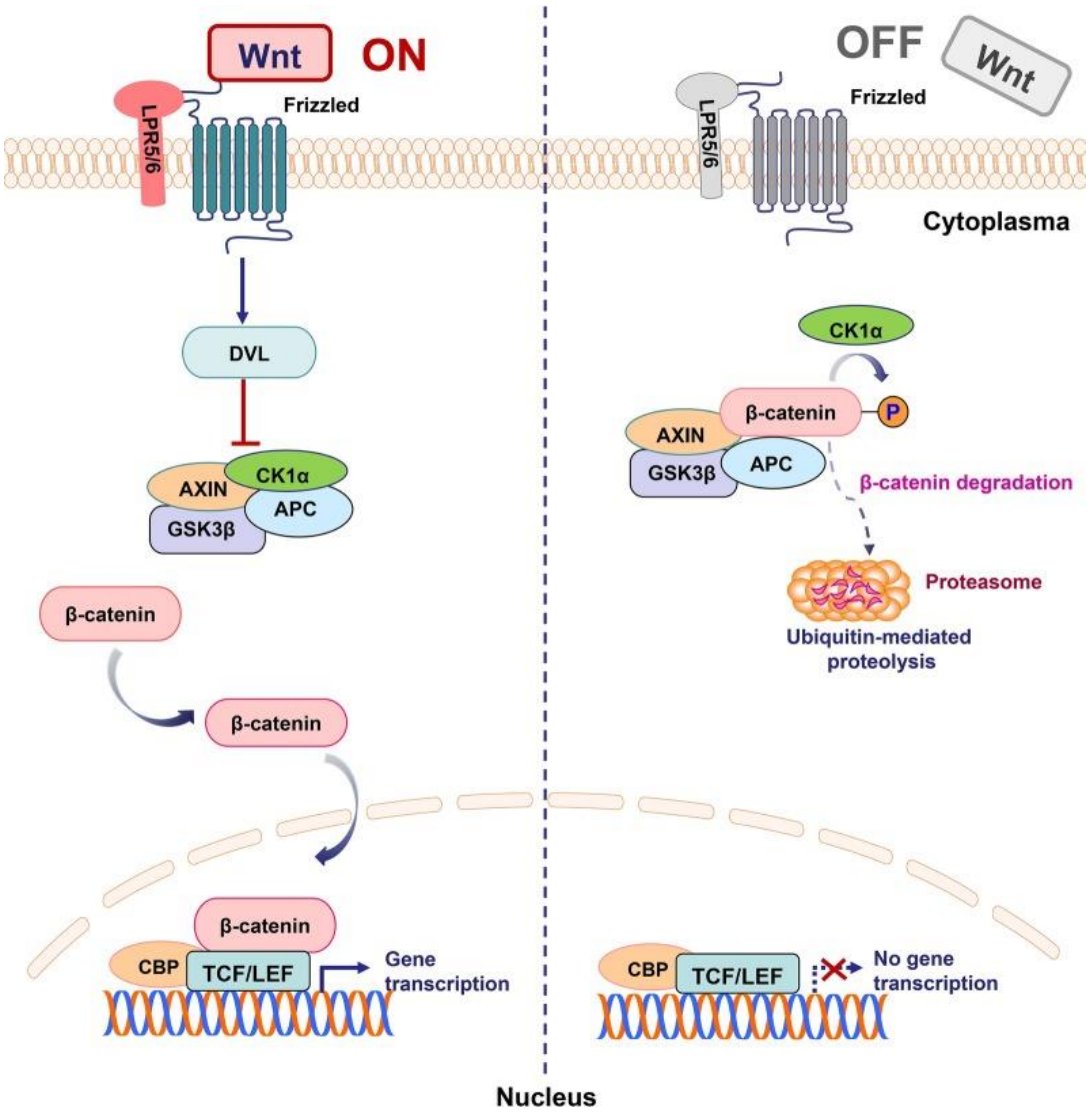


Figure 6 : Représentation schématique de la voie Wnt/β-caténine activée et inactive, issue de [28]

Les MB présentent des caractéristiques moléculaires distinctes selon les groupes auxquels ils appartiennent. La monosomie 6, altération génétique fréquente dans les MB WNT, est présente chez ≈80-85% de ces patients et est généralement associée à des mutations du gène *CTNNB1* (Catenin Beta 1) [24].

Les mutations somatiques du gène *CTNNB1* sont un autre événement génétique caractéristique définissant ce sous-groupe (≈85 % des patients) [29]. En particulier, la mutation somatique de l'exon 3 du gène *CTNNB1* empêche la dégradation normale de la β-caténine – par l'inactivation de ses sites de phosphorylation – et conduit à une activation incontrôlée de la voie WNT, favorisant ainsi la prolifération cellulaire et la tumorigenèse.

Les patients qui ne présentent pas de mutations somatiques de *CTNNB1* sont souvent porteurs de variantes constitutionnelles pathogènes du gène suppresseur de tumeur *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) [30], impliqué dans la régulation de la croissance et de la division cellulaire, ainsi que dans le contrôle de la signalisation cellulaire, notamment *via* la voie WNT.

Des mutations de *DDX3X* (DEAD-Box Helicase 3 X-Linked) sont fréquentes et affectent environ 50 % des cas dans ce sous-type de MB. Les conséquences des mutations de ce gène, codant pour une hélicase à ARN impliquée dans le processus d'initiation de la traduction, sont encore explorées à l'heure actuelle car elles pourraient favoriser la progression tumorale de plusieurs manières en lien ou non avec la signalisation WNT/β-caténine [31].
Enfin, la mutation de *SMARCA4* dans les MB WNT altère le fonctionnement du complexe SWI/SNF, perturbant la régulation de la chromatine et potentiellement contribuant à la prolifération tumorale. Bien que ces mutations ne soient pas fréquentes, elles peuvent jouer un rôle dans la progression tumorale dans certains cas.

B. Le sous-groupe SHH

Les MB Sonic Hedgehog (SHH) représentent entre 25 et 30% des MB et présentent une distribution d'âge bimodale. Il est le sous-groupe moléculaire dominant chez les nourrissons (<3 ans) et les adultes (>16 ans) – représentant environ deux tiers des cas dans ces groupes d'âge – et affiche moins de cas diagnostiqués pendant l'enfance et l'adolescence. Le ratio hommes/femmes est légèrement biaisé en faveur des hommes [27]. Les patients de ce groupe présentent une survie moyenne de 70 % à 5 ans. Ce sous-groupe peut être divisé en deux catégories selon le statut mutationnel de l'oncogène *TP53* : les médulloblastomes SHH-TP53 sauvage et muté [19]. Ce sous-classement met en évidence l'impact négatif de la mutation de *TP53* sur le pronostic, avec une survie à 5 ans de seulement 40 % pour les patients atteints de médulloblastome SHH-TP53 muté, contre 80 % pour ceux porteurs de la forme TP53 sauvage [32]. Une classification plus fine de ce sous-groupe a également été proposée comprenant quatre sous-types moléculaires de SHH-MB (Fig. 4) [33]. Les cellules à l'origine des MB du groupe SHH seraient les progéniteurs des neurones granuleux cérébelleux [34].

Les MB SHH, comme leur nom l'indique, se caractérisent par une **activation constitutive de la voie SHH** (Fig. 7). Cette voie de signalisation essentielle pour le développement embryonnaire, la régulation des cellules souches, et le maintien de l'homéostasie tissulaire. La voie SHH fonctionne grâce à l'équilibre entre l'inhibition de SMO par PTCH en absence de SHH et l'activation des facteurs GLI lorsqu'un ligand SHH est présent.
En absence du ligand SHH (voie inactive), le récepteur transmembranaire Patched (PTCH) inhibe l'activité du récepteur Smoothened (SMO), également localisé à la membrane, empêchant ainsi son accumulation dans les cils primaires et l'activation de la voie. Les facteurs de transcription de la famille GLI (GLI1, GLI2, GLI3) sont alors transformés en formes répressives par des protéases (GLI3R ou GLI2R), inhibant la transcription des gènes cibles de la voie SHH.
Lorsque le ligand SHH se lie à PTCH (voie active), il provoque une inhibition de sa fonction de répression sur SMO. L'accumulation de SMO dans les cils primaires induit ainsi une activation de la cascade de signalisation en aval, entraînant l'accumulation et l'activation

par un complexe protéique, composé de KIF7 et SUFU, des facteurs de transcription GLI sous forme active (GLI1 et GLI2 principalement) au lieu de la forme répressive (GLI3R). Les formes activées de GLI (GLI1, GLI2) se déplacent dans le noyau où elles stimulent la transcription des gènes cibles qui régulent divers processus biologiques comme le cycle cellulaire, la prolifération cellulaire, la différenciation et la survie tels que *Cycline D*, *GLI1* ou *MYCN* [35].

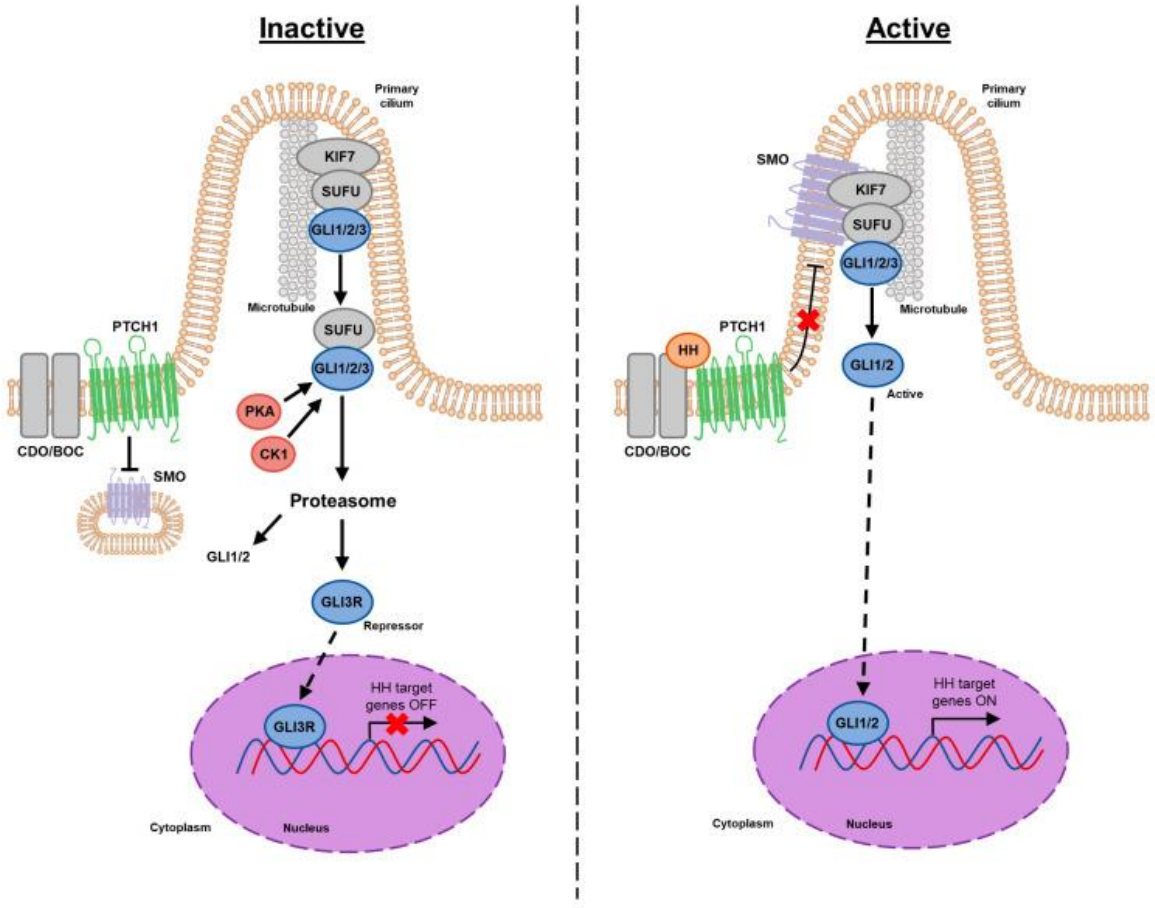


Figure 7 : Représentation schématique de la voie SHH active et inactive, issue de [35]

Dans le groupe de MB SHH, les altérations chromosomiques fréquentes comprennent la perte des chromosomes 9q, 10q, 14q et 17p, et les gains des chromosomes 2 et 9p [25]. En ce qui concerne les altérations génétiques, les plus fréquentes sont des mutations ou des délétions qui désactivent les gènes régulateurs de la voie SHH *PTCH1* (43% des patients) et *SUFU* (10%), des mutations de *SMO* (9%) activant la voie de manière anormale, et des amplifications génétiques de *GLI1* ou *GLI2* (9 %) qui augmentent la signalisation finale de la voie [24,25]. Ces événements conduisent tous à une activation anormale de la voie SHH, favorisant ainsi la prolifération des cellules cancéreuses.

En dehors de la voie SHH, les mutations du promoteur du gène *TERT* (Telomerase Reverse Transcriptase), affectant le maintien des télomères, sont plus fréquentes dans ce sous-groupe que dans tout autre sous-groupe (<5% des patients non-SHH). Cette mutation est

plus souvent observée chez les adultes atteint de MB (98% des MB SHH adultes) que chez les nourrissons (13%) et les enfants (21%) [36].
Enfin, les mutations de *KMT2D* (Lysine Methyltransferase 2D), gène impliqué dans la régulation épigénétique et dans la prévention du développement tumoral, provoquent une altération de la structure de la chromatine ce qui peut contribuer à la croissance tumorale. Ces mutations sont relativement rares et sont principalement retrouvées dans le sous-type β des MB SHH [37].

C. Médulloblastomes non-WNT/non-SHH

La définition et la sous-structure du groupe 3/4 de MB ont fait l'objet de débats depuis leur découverte initiale. Les différentes nomenclatures le définisse soit en sous-groupes distincts : le groupe 3 et le groupe 4, soit comme un seul sous-groupe « mixte » de patients, désigné MB « non-WNT/non-SHH ». Trois études récentes et indépendantes ont d'ailleurs identifié un nombre variable de sous-types mélangeant des tumeurs des groupes 3 et 4 (Fig. 8). Ici, nous choisissons donc de traiter ce groupe comme un seul groupe non-WNT/non-SHH en accord avec la dernière classification de l'OMS datant de 2021 [19] et avec les 8 sous-types identifiés (Fig. 5). La distinction entre le groupe 3 et le groupe 4 restant encore courante, elle pourra être utilisée dans ce manuscrit afin de simplifier la compréhension

Récemment, plusieurs études ont amélioré la compréhension de l'origine des MB de groupe non-WNT/non-SHH. Le Dr Northcott et ses collaborateurs ont identifié une lignée cellulaire d'origine unifiée pour ces sous-types, provenant des cellules unipolaires à brosse de la lèvre rhombique fœtale humaine [38]. Cela expliquerait les similarités moléculaires, biologiques et cliniques des MB de groupe 3/4 ainsi que leur localisation anatomique. La lèvre rhombique, une structure embryonnaire essentielle pour le développement du SNC, est responsable de la génération de plusieurs populations neuronales, notamment pour la formation du cervelet. Le Dr Taylor et son équipe ont montré que l'échec de la différenciation des progéniteurs de la lèvre rhombique favorise la survie d'une population cellulaire immature, avec un potentiel tumoral [39]. En 2024, ils démontrent que les MB de groupe 3 sont plus précisément initiés et maintenus par des cellules souches positives pour la Protogenin, issues de la lèvre rhombique, dans une niche périvasculaire spécifique [40].

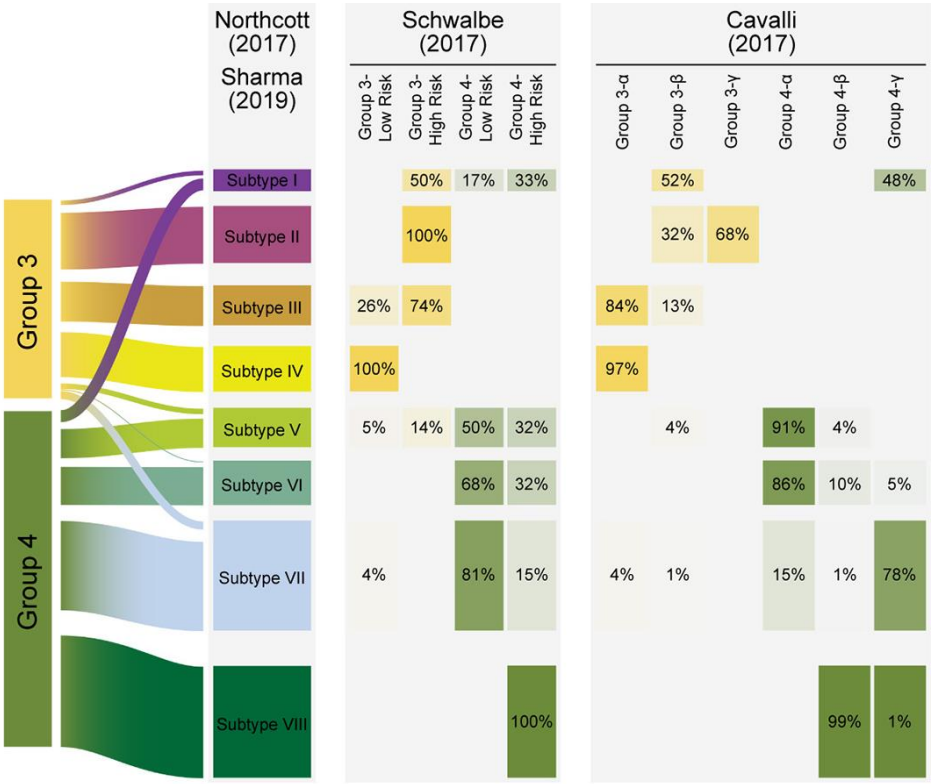


Figure 8 : Comparaison des sous-types de MB non-WNT/non-SHH, basée sur le niveau de méthylation de l'ADN décrits depuis 2017. La largeur de la ligne entre les sous-groupes de consensus et les sous-types de méthylation de l'ADN indique la fraction d'échantillons par sous-type initialement classés dans le groupe 3 ou le groupe 4. issue de [25]

Les MB anciennement groupe 3 surviennent pendant la petite enfance et l'enfance et sont rarement observés chez les patients de plus de 18 ans, tandis que ceux du groupe 4 peuvent survenir dans tous les groupes d'âge. Les ratios homme:femme sont de 2:1 ou plus pour les deux sous-groupes [25]. Contrairement aux deux groupes présentés précédemment (WNT et SHH), aucune voie de signalisation spécifique n'a été identifiée comme étant fréquemment dérégulée. Les MB non-WNT/non-SHH sont associés aux **pronostics les plus défavorables**, avec des taux de survie à 5 ans nettement inférieurs (ex : 43% pour le sous-type III ; Fig. 4), principalement en raison du caractère métastatique de ces tumeurs et de l'amplification de l'oncogène *MYC*.

Le groupe non-WNT/non-SHH présente la plus grande diversité d'anomalies génétiques. Sur le plan cytogénétique, l'isochromosome 17q est une anomalie chromosomique fréquente dans les médulloblastomes des groupes 3 et 4, présente chez plus de 50 % des patients. Il entraîne la duplication du bras 17q, pouvant favoriser la surexpression d'oncogènes comme *ErbB2* (*Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2*) [41]. En parallèle, la perte du bras 17p, contenant des gènes suppresseurs de tumeurs comme *TP53*, aggrave le pronostic [41]. Les tumeurs du groupe 3 présentent également d'autres anomalies comme le gain du chromosome 7 et la perte des chromosomes 8, 10q, et 16q. Le gain du chromosome 7 active EZH2 *(Enhancer of Zeste Homologue 2)*, un régulateur épigénétique

clé, principalement *via* sa fonction dans un complexe qui réprime la transcription des gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation, en méthylant l'histone H3 (H3K27) [42]. Dans le groupe 4, l' isochromosome 17q est retrouvé dans 80 % des cas, et la perte du chromosome 11, présente dans 27 % des tumeurs, est associée à un meilleur pronostic, avec 72 % de survie à 10 ans [43,44].

Les MB du sous-type I présentent généralement un génome équilibré, avec des amplifications de l'oncogène *OTX2* (Orthodenticle Homeobox 2) et une activation des gènes *GFI1 (Growth Factor Independent 1)* et *GFI1B (Growth Factor Independent 1B)* par insertion rétrovirale, entraînant une surexpression de ces gènes. Cela favorise la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose, contribuant à l'agressivité du cancer et à une mauvaise réponse aux traitements, ce qui en fait des cibles thérapeutiques potentielles [45].
OTX2 est un gène clé impliqué dans le développement cérébral, notamment dans la régulation de la différenciation neuronale et la formation de certaines structures du cerveau comme le cervelet [46,47]. Son amplification, dans environ 3 % des cas, perturbe la différenciation neuronale, favorisant une prolifération excessive des cellules souches du cervelet. De plus, des variantes structurelles génomiques entraînent la surexpression mutuellement exclusive de GFI1 et GFI1B dans 15 à 20 % des cas du groupe 3 [45], jouant un rôle crucial dans la tumorigénèse. Ces facteurs de transcription, combinés à la surexpression de *MYC*, augmentent l'agressivité des tumeurs en favorisant un état de cellules progénitrices non différenciées [48].

Les sous-types II, III et IV sont des MB appartenant à l'ancien groupe 3. Les sous-types II et III sont caractérisés par l'amplification de l'oncogène *MYC*, associé à un pronostic défavorable. L'amplification de *MYC* est présente chez environ 17 % des patients du groupe 3, tandis que les amplifications *MYCN* sont trouvées à une fréquence comparable chez les patients atteints de MB du groupe 3 (5 %) ou du groupe 4 (6 %) [49]. Cette altération génétique est liée à la progression tumorale, et seuls 20 % des patients avec cette mutation survivent plus de 5 ans après le diagnostic [50].
Par rapport aux autres sous-types, le sous-type IV est enrichi chez les patients plus jeunes (âge médian de 3 ans) et est associé à un résultat favorable [25].

Les sous-types V, VI, et VII comprennent principalement des MB du groupe 4, mais incluent aussi des tumeurs du groupe 3. Le sous-type V est caractérisé par l'amplification de *MYC* et *MYCN***,** avec des résultats cliniques modestes. Le sous-type VIII**,** le plus courant, est uniquement du groupe 4 [25]. Il touche surtout les enfants plus âgés (âge médian de 10 ans) et présente généralement un génome équilibré, avec la présence fréquente de l'isochromosome 17. Ce sous-type est associé à une survie favorable à 5 ans, bien que des rechutes tardives soient fréquentes [51]. PRDM6, un membre peu caractérisé de la famille des facteurs de transcription contenant le domaine PRDM (PRDI-BF1 and RIZ homology domain), est fréquemment affecté par des mutations ou des délétions qui altèrent sa

fonction répressive. Cette perte de fonction contribue dans la dérégulation épigénétique observée dans les MB de l'ancien groupe 4 [52].

Dans les MB des groupes 3 et 4, d'autres mutations récurrentes au niveau des gènes sont relativement rares :

- *SMARCA4* (cf . Section II.A.) est muté dans 9 % des cas du groupe 3 et 2 % du groupe 4.
- *KDM6A (lysine déméthylase 6A)* (7 % des MB de groupe 4), impliqué dans la régulation de la méthylation de l'histone H3 (H3K27) [53] ;
- *ZMYM3 (Zinc Finger MYM-Type Containing 3) (*6 % des MB de groupe 4) situé sur le chromosome X, faisant partie d'un complexe d'histones-désacétylases ;
- *KMT2C* (lysine methyltransferase 2C ou MLL3) (6 % des MB de groupe 4) fait partie de la famille des méthyltransférases [54];
- *KBTBD4 (Kelch repeat and BTB domain containing 4)*, sont présentes dans 6 % des cas des deux groupes, joue un rôle dans la régulation de la dégradation des protéines par le système ubiquitine-protéasome [55] ;
- *KMT2D* (ou *MLL2* ; *cf* . Section II.B.) muté dans 5 % des tumeurs.

III. Diagnostic

Les signes cliniques d'une tumeur intracrânienne pédiatrique varient en fonction de sa localisation, de sa taille et de sa vitesse de croissance. Hormis chez les très jeunes enfants dont les os du crâne ne sont pas encore soudés, de nombreux symptômes sont liés à une augmentation de la pression dans ou autour du cerveau. En effet, toute tumeur, tissu supplémentaire ou liquide additionnel peut causer une hypertension intracrânienne et entrainer céphalées, nausées et vomissements et altérations du niveau de conscience (i.e., somnolence et léthargie) [56]. D'autre troubles tels que les crises d'épilepsie ou les troubles neurologiques focaux peuvent également apparaitre, comprenant des déficits moteurs (hémiparésie, ataxie) et des troubles sensoriels ou des altérations de la vision (diplopie, perte de vision partielle ou totale, nystagmus). Enfin des symptômes d'ordre cognitifs et comportementaux sont souvent observés, tels que des difficultés de concentration, des troubles de la mémoire, une irritabilité, des changements d'humeur et une dépression [57]. Ces symptômes variés peuvent être non spécifiques et évoluer progressivement, rendant parfois le diagnostic initial difficile. Dans le cas du MB, l'hypertension intracrânienne est le signe révélateur le plus précoce et le plus fréquent, souvent accompagnée d'un trouble de l'équilibre plus ou moins prononcé. Des paralysies des nerfs crâniens peuvent apparaître en cas d'infiltration du tronc cérébral par la tumeur. L'atteinte des voies motrices survient généralement à un stade plus avancé

En plus de l'historique médical complet et d'un examen physique de l'enfant, seul un examen d'imagerie et une biopsie permettent d'établir un diagnostic précis incluant la nature de la tumeur, sa localisation et son degré d'agressivité.

L'examen d'imagerie le plus courant pour les tumeurs cérébrales est l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Elle produit des images détaillées des organes et des structures du corps, outil indispensable lorsqu'il s'agit d'examiner le cerveau. L'IRM fonctionnelle, méthode d'imagerie indirecte de l'activité cérébrale à haute résolution temporelle, permet d'obtenir des informations complémentaires sur les fonctions cérébrales du patient. D'autres examens d'imagerie peuvent être utilisés, comme la tomodensitométrie (également appelée CT-scan) et la tomographie par émission de positons (TEP) qui, en médecine nucléaire, permettent de mesurer l'activité métabolique des cellules et ainsi de révéler des zones cancéreuses qui ne sont pas visibles sur un scanner ou une IRM [58].

La biopsie est une procédure complémentaire à l'imagerie, qui consiste à prélever un échantillon biologique pour l'analyser. La biopsie chirurgicale étant une procédure invasive, elle comporte un risque de complications liées à l'intervention [59]. Dans le cas des tumeurs cérébrales pédiatriques, il peut être difficile d'obtenir une quantité suffisante de tissu tumoral pour la biopsie. Si l'opération n'est pas possible, en raison de la localisation anatomique de la tumeur, l'échantillon de tissu cérébral peut être recueilli à l'aide d'une aiguille lors d'une procédure appelée biopsie stéréotaxique à l'aiguille fine. En laboratoire, les tests effectués sur l'échantillon permettent de déterminer de nombreux paramètres tels que la malignité des cellules, la présence de mutations génétiques et les caractéristiques histologiques et immunohistochimiques, contribuant à un diagnostic précis et à la prise de décisions thérapeutiques éclairée.

Les biopsies liquides sont, quant à elles, peu invasives et peuvent fournir de nombreuses informations sur la biologie moléculaire de la tumeur, ayant ainsi le potentiel d'aider au diagnostic et au suivi de la maladie. La prise de sang, un des examens médicaux les plus incontournables, est une technique de prélèvement sanguin permettant de détecter rapidement des anomalies et de livrer différentes informations sur l'état de santé d'une personne. La ponction lombaire, quant à elle, consiste à insérer une aiguille en bas du dos, dans le canal rachidien entourant la moelle épinière, et prélever une petite quantité du liquide céphalorachidien (LCR). Dans le cas des tumeurs cérébrales pédiatriques, la propagation du cancer se fait le plus souvent vers d'autres parties du cerveau et au niveau de la moelle épinière. La ponction lombaire permet donc de déterminer, après examen au microscope, si les cellules tumorales se sont propagées dans le LCR [60]. Les différents biofluides utilisés pour les biopsies liquides tels que le LCR ou le plasma contiennent des cellules tumorales circulantes, de l'ADN et des ARN tumoraux, des micro-ARN et des biomarqueurs protéiques qui fournissent de précieuses informations sur la biologie des tumeurs pédiatriques [61].

Une fois le diagnostic posé avec précision, un plan de traitement approprié et personnalisé peut être élaboré et mis en œuvre par une équipe multidisciplinaire de spécialistes.

IV. Prise en charge thérapeutique

Le traitement standard des MB, comme une écrasante majorité des tumeurs cérébrales pédiatriques, est multimodal. Il repose sur les principales solutions thérapeutiques actuellement disponibles : chirurgie, radiothérapie (ou protonthérapie), chimiothérapie et thérapies ciblées. Cependant, l'efficacité de ces traitements est inévitablement associée à des effets secondaires significatifs à court-, moyen- et long-terme, impactant la qualité de vie des jeunes patients. Le risque de toxicité est particulièrement élevé chez les plus enfants de moins de 5 ans, dont le système nerveux est encore en développement.

A. La chirurgie

Dès le diagnostic clinique posé, l'intervention neurochirurgicale est habituellement le premier geste thérapeutique dans les MB. L'objectif principal est d'éliminer l'ensemble des cellules de la masse tumorale, mais elle peut également aider à réduire la taille de la tumeur, soulager des symptômes (ex : maux de tête et vision floue) induits par la présence de la masse ou l'excès de LCR. Cependant, l'intervention peut ne pas être effectuée, lorsque la tumeur cérébrale se trouve à un endroit trop difficile à atteindre ou à proximité de parties cruciales du cerveau (zone motrice par exemple) qui pourraient être endommagées pendant l'opération. En présence de métastases, l'ablation de la tumeur ne sera programmée qu'après la chimiothérapie. La neurochirurgie s'inscrit ainsi dans une approche multidisciplinaire pour laquelle l'ablation complète de la tumeur, en première intention, n'est plus forcément la règle. En plus du risque lié au positionnement de la masse au sein du cervelet de l'enfant, l'ablation chirurgicale d'une tumeur intracrânienne comporte dans tous les cas des risques liés à l'intervention en elle-même, tels que des infections et des saignements importants [60]. Il convient donc de trouver un équilibre entre la maximisation de la résection chirurgicale et la minimisation de la morbidité associée. Même si la chirurgie est généralement bien tolérée par les jeunes patients, environ 25 % des enfants opérés développent un syndrome de la fosse postérieure, qui peut durer de quelques semaines à plusieurs mois et se caractérise par des troubles de l'élocution, une ataxie, une hypotonie, des paralysies des nerfs crâniens et une instabilité émotionnelle [62]. Le risque d'une aggravation neurologique post-opératoire n'est donc pris que si le bénéfice reste supérieur au risque [63]. Pour la plupart des tumeurs, la réussite du geste chirurgical aura un impact majeur sur les chances de guérison et la gravité des séquelles post-thérapeutiques et il devra être confié à des équipes expérimentées dans la prise en charge neurochirurgicale des enfants. En effet, celle-ci est très différente de celle des adultes pour plusieurs raisons liées à la croissance, au développement neurologique, à la nature des pathologies, et aux besoins médicaux et psychologiques uniques des enfants.

Les progrès des outils et techniques pré- et per-opératoires ont permis d'optimiser la sécurité, le processus de prise de décision opératoire et l'intervention chirurgicale en elle-même. Les chirurgies neuro-oncologiques pédiatriques sont de plus en plus sophistiquées grâce aux techniques d'IRM avancées, à la navigation per-opératoire et aux instruments et techniques de résection tumorale plus précis [64]. Grâce à ces progrès, la mortalité per-opératoire atteint de très faibles niveaux.

B. L'irradiation intracrânienne

L'irradiation intracrânienne est nécessaire pour le traitement de la majorité des tumeurs cérébrales malignes. Les MB étant globalement radiosensibles, la radiothérapie est un traitement de référence dont l'efficacité est meilleure s'il est initié le plus rapidement possible après la chirurgie. Sa réalisation doit tenir compte de l'âge de l'enfant, du volume tumoral à traiter, de la localisation et du mode de dissémination métastatique. La radiothérapie est divisée en fractions (de 1.8 Gy généralement) le plus souvent administrées 1 fois / jour sur une période de plusieurs semaines jusqu'à atteindre la dose totale prescrite (36 Gy en général). Dans certains cas, l'irradiation cranio-spinale peut s'accompagner d'un boost au niveau de la fosse cérébelleuse postérieure (site tumoral) délivrant alors un total de 54Gy [65]. L'objectif est de protéger autant que possible les tissus sains tout en atteignant une efficace maximale sur la tumeur elle-même [63]. Dans certains cas, une irradiation de l'ensemble du système nerveux est nécessaire pour contrôler les métastases visibles ou occultes.

La radiothérapie pour les tumeurs cérébrales utilise de puissants faisceaux d'énergie pour cibler les cellules tumorales :

- Le rayonnement provenant des rayons X (ou rayonnement photonique) est le type de radiothérapie le plus courant, disponible dans la plupart des centres médicaux. Cette technique est de plus en plus sophistiquée et précise. L'intensité des photons peut être modulée par des collimateurs mobiles et des faisceaux plus fins et donc plus précis (radiothérapie dite « en condition stéréotaxique »).
- La radiothérapie protonique utilise l'énergie des protons. Il s'agit d'une forme plus récente de radiothérapie qui n'est disponible que dans un nombre limité de centres médicaux à l'heure actuelle [60]. En 2019, il n'y avait que 3 centres de protonthérapies dans toute la France (Nice, Caen et Orsay) [66]. Cette technique est de plus en plus utilisée chez les enfants car les faisceaux de protons peuvent être ciblés plus précisément sur les cellules tumorales, protégeant ainsi les tissus sains de leur cerveau encore en développement autour de la région tumorale irradié [67].

La radiothérapie n'est pas proposée dans tous les protocoles, et l'irradiation craniospinale ne l'est qu'aux enfants de plus de trois ans et à ceux qui présentent une dissémination tumorale au moment du diagnostic. En effet, il existe une réticence à irradier les très jeunes enfants en raison des implications neurocognitives et neuroendocriniennes dans cette tranche d'âge. Les effets secondaires de la radiothérapie dépendent du type et de la dose de rayonnement que reçoivent les jeunes patients. Les principales conséquences d'une irradiation sont :

- Les séquelles intellectuelles (lenteur de réflexion, troubles de la mémoire, difficultés à réaliser des tâches complexes) [68] proportionnelles à l'âge du

patient, à la quantité de tissu cérébral sain irradiée et à la dose de rayons utilisée ;

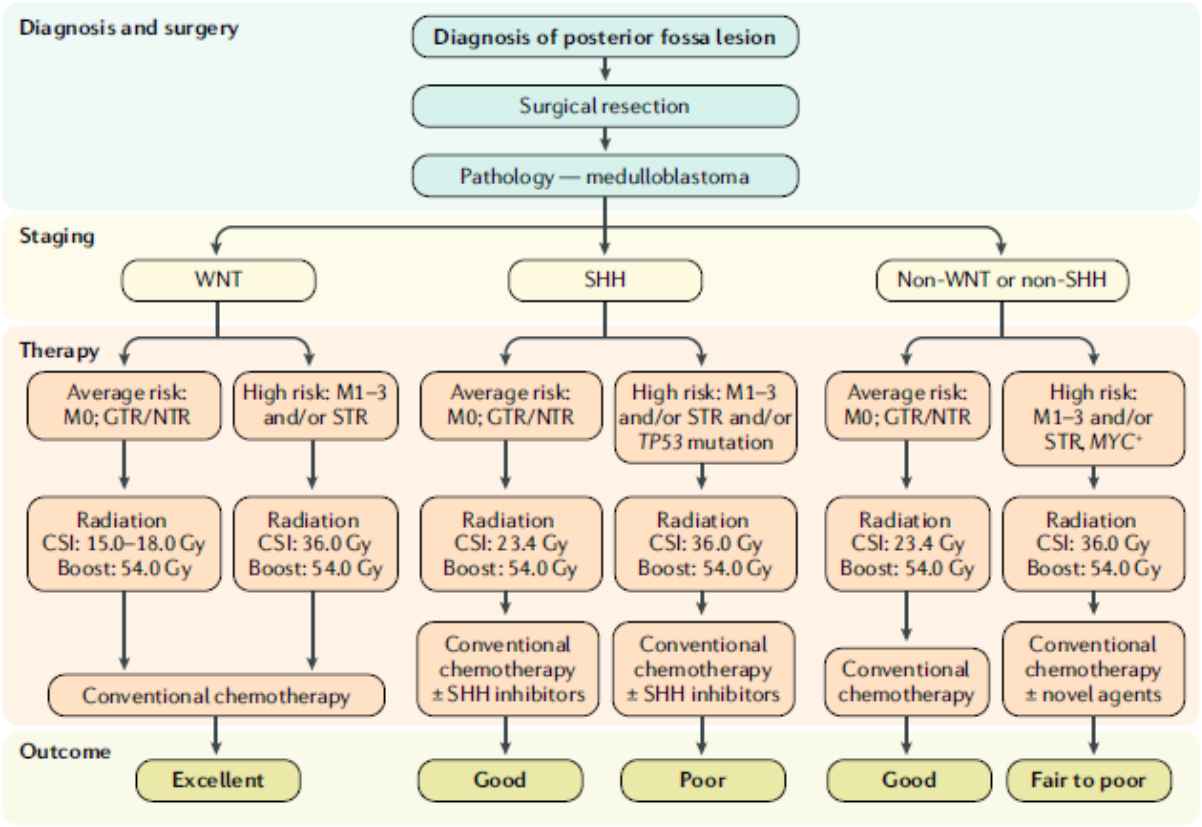
- Les séquelles endocriniennes liées à l'irradiation de l'hypophyse située à la base du crâne [69,70]. Toutes les hormones peuvent être touchées surtout à forte dose, mais principalement l'hormone de croissance, générant des troubles de développement et de la puberté ;
- Les séquelles auditives [71] en cas d'irradiation de la fosse postérieure. Une prévention des traumatismes sonores et l'éviction des traitement ototoxiques sont justifiées.

En résumé, bien que la radiothérapie soit cruciale dans le traitement des MB [72,73], elle peut entraîner des effets secondaires extrêmement handicapants à court et long terme impactant la qualité de vie et l'indépendance de ces enfants.

La radiothérapie focale semble être moins dommageable et peut également être proposée aux enfants plus jeunes (moins de 12 mois), si elle est considérée appropriée, par exemple dans les contextes palliatifs [74].

C. La chimiothérapie

Le traitement médicamenteux est un élément essentiel de la prise en charge des enfants et adolescents touchés de cancers [63]. Dans la majorité des cas de MB, il est composé d'agents de chimiothérapie utilisés depuis de nombreuses années en clinique, et dont les effets secondaires à court et long termes sont documentés [75]. La chimiothérapie est un complément précieux à la chirurgie et à la radiothérapie et contribue de manière considérable à l'augmentation de la survie [76], notamment lorsqu'elle est utilisée post-irradiation dans les MB non-métastatiques [77]. L'objectif de la chimiothérapie est similaire à celui de la radiothérapie : administrer la dose minimale nécessaire pour obtenir un contrôle maximal de la masse tumorale, tout en limitant autant que possible la toxicité envers les tissus sains. Elle peut être administrée suivant différents schémas de traitement : à doses conventionnelles, *i.e.* à fortes doses, toutes les 2 ou 3 semaines, avec un soutien en cellules souches hématopoïétiques [78], ou à doses métronomiques, qui sont plus faibles mais administrées plus fréquemment et sur des périodes prolongées, souvent comme traitement d'entretien [79,80]. La classification des différents sous-groupes (décrite plus haut section II) influence les modalités et les protocoles de traitement des MB, qui varient également en fonction de l'âge du patient et du stade de la tumeur (Fig. 9).



<u>Figure 9</u> : Algorithme actuel de gestion des MB adaptée au risque moléculaire (CSI : Irradiation Cranio-Spinale ; GTR : résection totale brute ; NTR : résection quasi totale ; STR : résection sous-totale) ; figure issue de [24]

Pour les MB, les agents de chimiothérapie les plus largement utilisés sont le cisplatine, le carboplatine, la vincristine, le cyclophosphamide et la lomustine [24]. Des combinaisons variables de ces médicaments sont administrés tous les 21 à 28 jours selon différents schémas de traitement [81]. Les doses et nombre de cycles varient également (entre 4 et 9 en général) et ces protocoles peuvent être adaptés en fonction de la réponse du patient au traitement et des effets secondaires observés. Comme la plupart des chimiothérapies, ces médicaments affectent les cellules qui se divisent rapidement, y compris celles du tractus gastro-intestinal, des follicules pileux et de la moelle osseuse, entraînant nausées, vomissements, diarrhée et/ou constipation, perte de cheveux et myélosuppression [82]. D'autres effets indésirables plus spécifiques de chaque molécule peuvent également apparaitre, tels qu'une neurotoxicité périphérique avec la vincristine [83] ou une ototoxicité et néphrotoxicité avec le cisplatine [84]. Chez les patients qui n'ont pas progressé au cours de la phase d'induction du traitement, la consolidation par chimiothérapie à haute dose (aussi connu sous le nom de « traitement myéloablatif ») et la greffe de cellules souches autologues sont effectués [81]. Dans ce cas, la greffe de cellules souches est une thérapie de secours qui consiste à remplacer les cellules de moelle osseuse qui ont été endommagées ou détruites par de fortes doses de

chimiothérapie, par des cellules souches du patient prélevées avant le début du traitement (greffe autologue).

En-dessous de 3 ans, le traitement est d'autant plus problématique que près de 40% des enfants ont une maladie disséminée au moment du diagnostic et que la radiothérapie est généralement contre-indiquée dans ce groupe d'âge [85]. Il n'y a pas de consensus sur la meilleure stratégie de prise en charge pour ces très jeunes patients. Tous les essais ont tenté d'éliminer, de réduire ou, du moins, de différer l'irradiation cranio-spinale (CSI) en raison de l'effet néfaste de ce traitement sur le cerveau en développement. La chimiothérapie systémique à haute dose (comprenant les mêmes molécules que celles utilisées chez des enfants plus âgés) et le méthotrexate intrathécal, intraventriculaire ou intravasculaire, selon les protocoles, ont été adoptés comme substitut de la CSI [24].

D. Les thérapies de dernière génération

Si les agents de chimiothérapie conventionnels sont efficaces chez de nombreux patients, certaines situations nécessitent des médicaments innovants qui agissent sur des mécanismes cellulaires spécifiques des cellules tumorales.

1. Les thérapies ciblées

Au cours des deux dernières décennies, un nouvel espoir s'est manifesté dans le domaine de la médecine personnalisée en oncologie, fondé sur la caractérisation moléculaire des tumeurs des patients par séquençage, ce qui permet une sélection rationnelle des thérapies ciblées.

Le développement de thérapies ciblant les MB du groupe WNT est délicat, du fait de l'implication de la voie WNT-β-caténine dans un large éventail de processus biologiques clés (ex : différenciation des cellules souches, apoptose, prolifération cellulaire…) [86].

Les thérapies ciblées inhibitrices de la voie SHH montrent un potentiel prometteur pour traiter les MB du sous-groupe éponyme. Le Sonidegib et le Vismodegib sont des inhibiteurs qui ciblent spécifiquement la protéine Smoothened (Smo), composant clé de la voie de signalisation SHH [87]. Ils ont été approuvés pour le traitement du carcinome basocellulaire et sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques pour les MB [87]. Leur efficacité pouvant être réduite par le développement de résistances et d'effets indésirables, des associations avec d'autres traitements sont régulièrement explorées pour surmonter ces limites [87].

Enfin, la mise au point d'inhibiteurs spécifiques pour les MB non-WNT/non-SHH, qui reste urgente au regard de leur pronostic défavorable, se voit considérablement entravée par l'absence de voie de signalisation clairement activée dans ce sous-groupe hétérogène. Les principales pistes en cours de développement et d'évaluation cliniques consistent à cibler le facteur de transcription MYC de façon indirecte, *via* une modulation de ses mécanismes de régulation ou des voies associées (ex : inhibiteurs de bromodomaines, de CDK, de HDAC ou de la voie PI3K/AKT/mTOR) [88].

Le développement de nouveaux médicaments nécessite donc souvent des approches personnalisées, adaptées aux caractéristiques spécifiques de chaque tumeur MB, ce qui reste à l'heure actuelle un processus très coûteux et chronophage. De plus, l'absence de biomarqueurs communs ralentit également les essais cliniques, puisqu'il est plus difficile de recruter un nombre suffisant de patients présentant des tumeurs (rares puisque pédiatriques) porteuses des mêmes caractéristiques [89]. Grâce à des analyses multiomiques sans précédent, menées sur des cohortes successives de jeunes patients, les MB représentent désormais l'une des entités cancéreuses les plus largement caractérisées [25]. Si cette approche moléculaire a déjà permis de transposer des connaissances fondamentales en applications sur le terrain clinique, la prise en charge thérapeutique des MB à l'ère moléculaire ne fait que commencer.

2. Les immunothérapies

Les immunothérapies (*i.e.* inhibiteurs de checkpoint immunitaire, thérapie cellulaire et thérapie vaccinale [90]) font aujourd'hui partie intégrante des stratégies thérapeutiques en cancérologie, ayant révolutionné la prise en charge des cancers du poumon, mélanomes et myélomes notamment. Ces traitements stimulent ou modifient le système immunitaire pour l'aider à reconnaître et à combattre les cellules cancéreuses plus efficacement. Contrairement aux traitements traditionnels, comme la chimiothérapie ou la radiothérapie, qui ciblent directement les cellules tumorales, les immunothérapies visent à renforcer la réponse immunitaire anti-tumorale. Forte de ces succès chez l'adulte, l'immunothérapie s'inscrit donc dans les innovations thérapeutiques porteuses d'espoir pour une prise en charge améliorée des cancers pédiatriques. La compréhension du microenvironnement immunitaire tumoral, en termes de composition et de fonction, reste cependant encore trop limitée dans les tumeurs cérébrales pédiatriques pour envisager actuellement sa modulation pharmacologique [91]. Cette caractérisation précise est d'autant plus nécessaire que certaines tumeurs du SNC ne semblent pas susciter de réponse robuste du système immunitaire et sont considérées comme immunologiquement « froides » [92]. Le nombre relativement faible de cellules T infiltrantes limiterait ainsi la réponse des MB à l'immunothérapie par rapport à d'autres tumeurs solides [93].

Les **inhibiteurs de checkpoint immunitaire** ciblant la signalisation PD-1/PD-L1 sont les immunothérapies les plus étudiées dans les MB. Malgré un environnement pauvre en cellules immunitaires, sans infiltrat cellulaire exprimant PD-1 au niveau du site tumoral et une expression faible de PD-L1 dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules non tumorales [94], plusieurs essais cliniques sont en cours pour tester ces composés (Tableau 1). Une étude, visant à évaluer l'innocuité et l'efficacité du nivolumab en monothérapie et en association avec l'ipilimumab (anti-CTLA4), n'a malheureusement pas démontré de bénéfice clinique chez des jeunes patients atteints de tumeurs malignes

primaires de haut grade du SNC par rapport aux données historiques avec des profils de sécurité globaux gérables [95].

Numéro NCT	Phase	Population/ Pathologies ciblées	Traitement
NCT02359565	1	Gliome pontin intrinsèque diffus (DIPG) récurrent, progressif ou réfractaire, Gliomes de haut grade ne touchant pas le tronc cérébral, Ependymome, Médulloblastome, Tumeurs cérébrales hypermutées	Pembrolizumab (anti-PD-1)
NCT03173950	2	Cancers rares récurrents du SNC	Nivolumab (anti-PD-1)
NCT06466798	1	Médulloblastomes et Ependymomes récurrents, Autres tumeurs malignes du SNC	Nivolumab + Methotrexate ou 5-Azacytidine

Tableau 1 : Essais cliniques impliquant des inhibiteurs de checkpoint immunitaire dans les tumeurs cérébrales pédiatriques (Source : https://clinicaltrials.gov/)

Depuis 2017, les **cellules CAR-T** font partie des immunothérapies innovantes. Elles correspondent à des lymphocytes T du système immunitaire modifiées génétiquement pour cibler spécifiquement les cellules cancéreuses. Elles sont prélevées chez le patient, modifiées pour exprimer un récepteur chimérique (chimeric antigen receptor ou CAR) qui reconnaît un antigène sur les cellules tumorales, puis réinjectées pour les détruire.
Actuellement, plusieurs essais cliniques sont en cours ou recrutent afin d'évaluer l'utilisation des cellules CAR-T pour traiter les tumeurs du SNC chez les enfants et les jeunes adultes (Tableau 2). Les cellules T autologues (CD4+ et CD8+) sont administrées par un cathéter directement dans la cavité de résection de la tumeur ou dans le système ventriculaire. Ces essais visent donc à explorer des traitements locorégionaux innovants pour des tumeurs cérébrales difficiles à traiter, en ciblant spécifiquement des antigènes présents sur les cellules tumorales du SNC, dont font partie les MB.
Dans le même but de fournir une immunité anti-cancéreuse durable, d'autres études combinant des lymphocytes autologues développés *ex vivo* chargés d'ARN tumoral total (TTRNA-xALT) dérivé des propres cellules tumorales du patient à un vaccin à base de cellules dendritiques chargées en ARN tumoral total également (TTRNA-DCs) chez des patients de moins de 30 ans, lors d'une 1ère récidive de MB ou PNET (NCT01326104). Une nouvelle étude pilote (NCT06514898) cherche même à évaluer la faisabilité et la sécurité de cette thérapie cellulaire adoptive associée au blocage du PD-1 par le pembrolizumab, chez des enfants et des jeunes adultes porteurs de MB non-WNT/non-SHH. Enfin, une étude de phase I nommée IMPACT (NCT06193759) menée au Children's National Hospital à Washington, cherche à évaluer la faisabilité, la sécurité et l'efficacité de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'antigènes multitumoraux (TSA-T). Ces lymphocytes seront personnalisés pour cibler des antigènes tumoraux identifiés par

protéogénomique chez des enfants de moins de 5 ans atteints de tumeurs cérébrales embryonnaires.

Numéro NCT	Phase	Population/ Pathologies ciblées	Traitement
NCT03500991	1	Tumeurs récurrentes ou réfractaires du SNC	Cellules CAR T HER2-Spécifique
NCT03638167	1	Tumeurs récurrentes ou réfractaires du SNC	Cellules CAR T EGFR806-Spécifique
NCT05835687	1	Tumeurs primaires du SNC	Cellules CAR T B7-H3-Spécifique
NCT04185038	1	DIPG/gliome diffus de la ligne médiane, Tumeurs récurrentes ou réfractaires du SNC	Cellules CAR T B7-H3-Spécifique
NCT05298995	1	Tumeurs récurrentes ou réfractaires du SNC	Cellules CAR T Anti-GD2

Tableau 2 : Essais cliniques impliquant des cellules CAR T dans les tumeurs cérébrales pédiatriques (Source : https://clinicaltrials.gov/)

Autre catégorie d'immunothérapie, la **virothérapie** et les **vaccins thérapeutiques** visent à stimuler le système immunitaire contre des antigènes spécifiques de la tumeur. Les principaux types de vaccins en essai incluent les vaccins à base de cellules dendritiques (DC), de peptides, d'ARNm, et de virus oncolytiques. Ces approches, encore en phase de recherche, visent à améliorer les options de traitement pour les patients atteints de MB réfractaires ou récurrents en général.
Une étude de phase I (NCT03615404) visait ainsi à évaluer la faisabilité et la sécurité de l'administration de cellules dendritiques stimulées par l'ARN du cytomégalovirus (CMV-DC) chez des enfants et de jeunes adultes (≤35 ans) atteints de tumeurs cérébrales. Les résultats préliminaires ont montré que ce traitement présentait des profils de sécurité acceptables, bien que les données complètes sur son efficacité ne soient pas encore disponibles. Deux essais ayant pour objectif d'explorer l'utilisation du vaccin peptidique spécifique au cytomégalovirus (PEP-CMV) chez des patients pédiatriques atteints de tumeurs cérébrales pédiatriques sont encore en cours.
En ce qui concerne les virus oncolytiques, une étude de phase I (NCT03911388) évalue le G207, un virus herpès simplex 1 (HSV) oncolytique conçu pour se répliquer sélectivement dans les cellules cancéreuses tout en épargnant les cellules normales. Cette étude vise à recueillir des données sur l'innocuité, l'efficacité et la réponse immunitaire induite par le traitement, qui est administré seul ou en association avec une faible dose de rayonnement. Les participants sont des enfants et des jeunes adultes souffrant de tumeurs cérébelleuses récurrentes ou évolutives (Tableau 3). Lors d'un essai de phase Ib, Thompson et al. ont,

quant à eux, démontré que l'administration par convection de Lerapolturev, un poliovirus oncolytique recombinant/rhinovirus, atteignait des critères cliniques prédéfinis pour le traitement du gliome pédiatrique récurrent de haut grade, justifiant la poursuite des essais cliniques [96].

NCT	Phase	Population/ Pathologies ciblées	Traitement
NCT03299309	1	Médulloblastome et Gliome malin récurrents	PEP-CMV (Vaccin peptidique)
NCT05096481	2	Gliome de haut grade nouvellement diagnostiqué, DIPG, Médulloblastome récurrent	PEP-CMV (Vaccin peptidique)
NCT03615404	1	Gliome de grade IV, Gliome malin récurrent, Médulloblastome récurrent	CMV-DC (Cellules dendritiques)
NCT03911388	1	Tumeurs du cervelet récurrentes ou réfractaires	HSV-G207 (Virus oncolytique)

Tableau 3 : Essais cliniques impliquant des vaccins thérapeutiques, dans les tumeurs cérébrales pédiatriques (Source : https://clinicaltrials.gov/)

– Chapitre 3 –
Le repositionnement de médicaments : une stratégie de choix

I. Définition et grands principes

En 2004, le repositionnement de médicaments a été décrit, par Ashburn et Thor, comme le processus de **recherche de nouvelles utilisations pour les médicaments existants** en dehors du champ d'application de leur indication médicale initiale [97]. Si la langue française se limite au terme de « repositionnement » de médicaments, les anglophones nous offrent les variantes telles que « redirecting », « repurposing », « reprofiling », clarifiant les objectifs de cette approche. Les recherches de Langedjik *et al*. sur ces différentes terminologies et les définitions associées ont permis de définir 4 caractéristiques communes: le concept, l'action, le produit et l'utilisation (Fig. 10) [98].

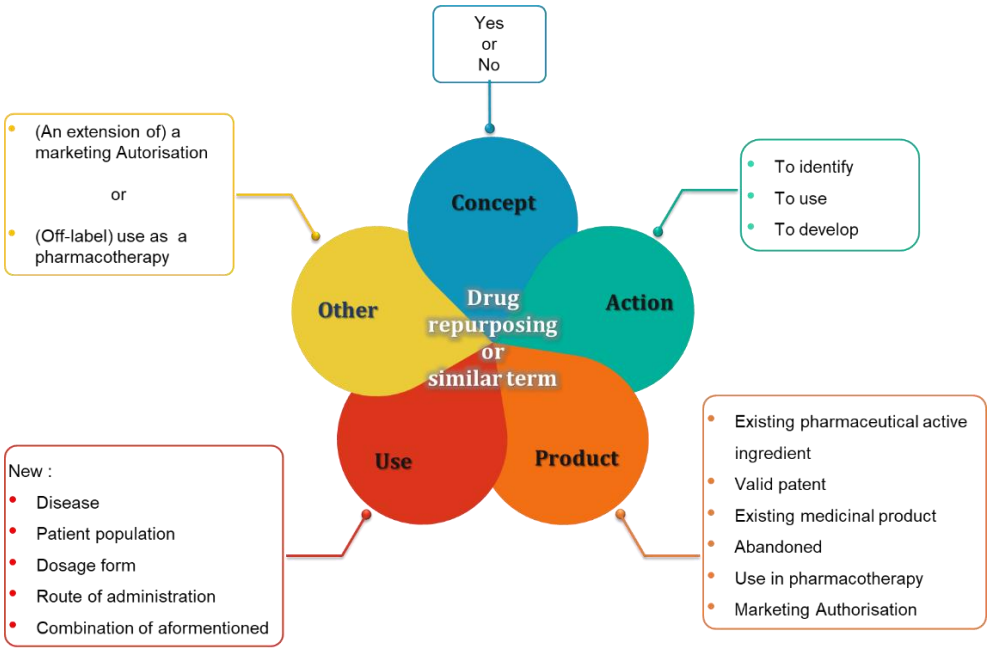


Figure 10 : Caractéristiques communes aux différentes terminologies de « repositionnement »

Le repositionnement de médicaments est particulièrement utile lorsque le développement traditionnel de médicaments *de novo* n'est pas rentable financièrement ou qu'une option thérapeutique se révèle nécessaire de toute urgence. L'exemple récent, maintenant connu de tous, est la recherche de traitements contre la COVID-19 [99]. Mais

les projets de réutilisation de médicaments sont tout aussi actifs pour les maladies rares, l'oncologie, les maladies infectieuses ou auto-immunes.
L'objectif principal du repositionnement de médicaments est d'identifier rapidement des composés présentant un profil d'innocuité établi et une activité thérapeutique qui pourraient s'avérer bénéfiques pour d'autres indications. Les médicaments qui peuvent être repositionnés comprennent : les médicaments génériques (hors brevet) déjà disponibles sur le marché, les médicaments sous brevet (y compris ceux qui font encore l'objet d'essais cliniques) et les médicaments qui ne sont plus prescrits pour leur indication initiale ou dont le développement clinique dans sa pathologie d'origine a été interrompu par manque d'efficacité.

La recherche conventionnelle vise généralement à concevoir des molécules hautement spécifiques qui présentent peu ou pas d'interactions hors cible, afin de minimiser les effets indésirables de la molécule. Cette approche a été couronnée de succès, en particulier pour de très nombreuses maladies dont les mécanismes de genèse et de progression sont bien établis. La stratégie de repositionnement s'oppose à ce paradigme « un médicament - une cible unique », puisqu'elle se base sur le concept de **polypharmacologie**, *i.e.* « un médicament - des cibles multiples ». La polypharmacologie fait ainsi référence à la capacité d'une molécule à inhiber/activer des cibles secondaires, qui produisent un effet différent de celui de la cible thérapeutique primaire pour laquelle la molécule a initialement été développée [100]. Elle prend tout son sens pour les pathologies multifactorielles, telles que les cancers qui font l'objet de ma thèse, pour lesquelles un médicament polypharmacologique peut gagner en efficacité grâce au fait qu'il module simultanément plusieurs voies impliquées dans la progression de la maladie [101].

Au cours des dernières décennies, le coût toujours croissant, les faibles taux d'approbation des institutions telles que la FDA et l'EMA ainsi que le délai prolongé de mise sur le marché des nouveaux médicaments ont augmenté l'intérêt pour les stratégies de repositionnement. Les organisations philanthropiques, les gouvernements/États et les organisations à but non lucratif jouent actuellement un rôle important dans le repositionnement de médicaments en phase précoce [102]. Des projets de grande envergure soutenant cette stratégie ont ainsi vu le jour, avec pour exemples caractéristiques (liste non-exhaustive) :

- « National Center for Advancing Translational Sciences » (ressource : https://ncats.nih.gov/about/ncats-overview), qui vise à développer la recherche translationnelle en incluant le repositionnement de médicaments, sous l'égide de l'agence gouvernementale américaine NIH (National Institutes of Health) et l'agence européenne EATRIS (European Infrastructure for Translational Medicine) avec sa plateforme REMEDI4ALL (REpurposing of MEDIcines 4 ALL, ressource : https://remedi4all.org/)
- « Broad Institutes Drug Repurposing Hub », référentiel en libre accès de plus de 6 000 composés, dont beaucoup ont été approuvés par la FDA, créé par une

collaboration entre de très nombreux chercheurs qui ont construit et validé cette banque de données, mise à jour très régulièrement (ressource : https://repo-hub.broadinstitute.org/repurposing)

- Le projet international « Repurposing Drugs in Oncology » (ReDO), développé par des scientifiques et des cliniciens ayant notamment permis la création d'une base de données en libre accès incluant les données de plus de 350 médicaments repositionnés pouvant avoir une activité anticancéreuse d'après des niveaux de preuve vérifiés (https://www.anticancerfund.org/database-repurposing-drugs-oncology)
- « Cures Within Reach » (site www.cureswithinreach.org) est une organisation indépendante dédiée au repositionnement de médicaments approuvés et disponibles.

Ces collaborations multipartenaires offrent la possibilité de rendre concrètes la recherche préclinique sur le repositionnement de médicaments et ses applications cliniques.

II. Les différentes approches de repositionnement

Différentes stratégies sont utilisées pour identifier de nouvelles indications à un médicament, leur découverte pouvant être fortuite ou fondée sur des hypothèses vérifiées par des approches expérimentales (*in vitro* / *in vivo*) et bioinformatiques (*in silico*) (Fig. 11). Ces méthodes exploitent des cibles, des médicaments, des biomarqueurs de maladies ou encore des voies de signalisation connues afin de découvrir de nouveaux agents thérapeutiques et établir une meilleure compréhension des mécanismes signalétiques impliqués dans la pathogenèse [103].

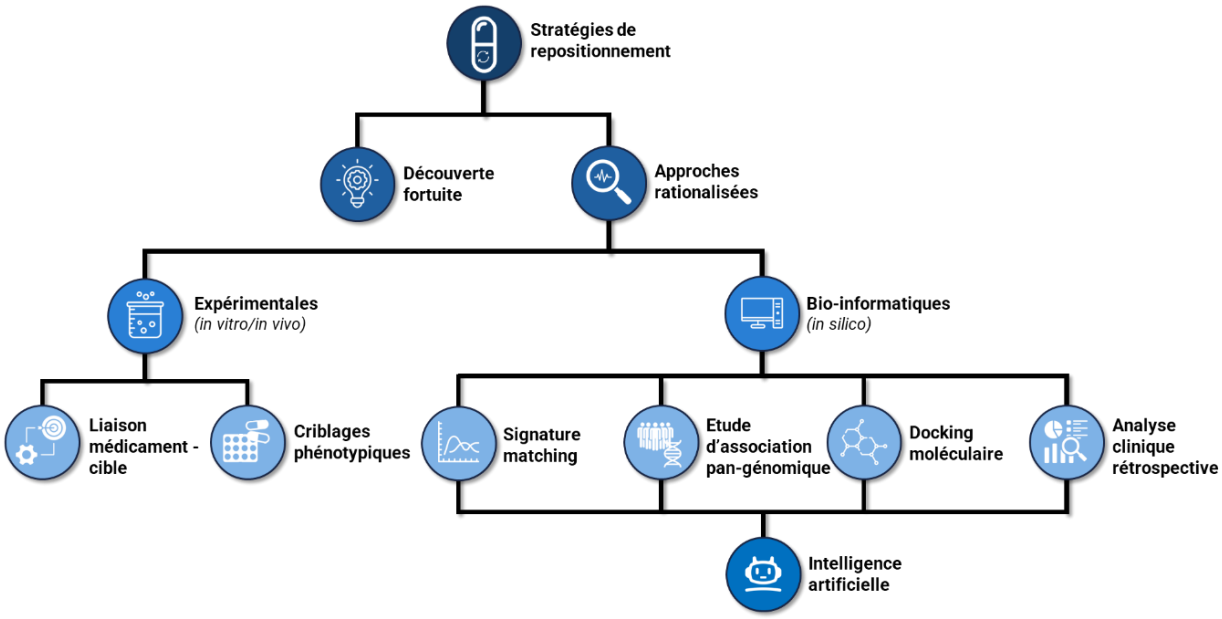


Figure 11 : Schéma des principales stratégies utilisées pour le repositionnement de médicaments

A. Quand le hasard fait bien les choses

L'anglicisme « sérendipité » renvoie au concept de « heureux hasard ». En science, on parle plutôt d'une aptitude à faire une découverte totalement inattendue et à en saisir l'utilité scientifique et pratique. Alors qu'habituellement, la science apparait comme suivant des processus logiques bien définis, certaines innovations médicales importantes ont ainsi été faites de manière fortuite.

Si on explore le processus de découverte des médicaments, le hasard a joué un rôle majeur dans l'utilisation actuelle de nombreuses molécules. Le sildénafil (Viagra), développé initialement comme médicament anti-angineux par Pfizer dans les années 1980, représente l'un des exemples les plus connus de découverte fortuite. Dans le domaine de l'oncologie, plusieurs médicaments anticancéreux ont également été mis en lumière par hasard, comme le trioxyde d'arsenic – poison utilisé dans la Grèce antique pour traiter la toux, la lèpre ou encore la syphilis – et les statines – initialement hypolipidémiantes – [104]. Toutefois, il convient de préciser qu'aucun médicament n'a jamais été totalement mis au point par pure chance. La base scientifique des découvertes fortuites vient souvent du fait que des maladies très différentes partagent des voies moléculaires et des cibles communes au niveau cellulaire.

B. Les approches rationnalisées

1. Les démarches expérimentales sur modèles biologiques *in vitro* et *in vivo*

a. Liaison médicament-cible

Les approches expérimentales permettant d'identifier des liaisons/interactions des ligands avec leurs cibles apparaissent sous le nom de « binding assays ».
Les techniques telles que la protéomique et la spectrométrie de masse concourent à l'identification des partenaires protéiques d'un nombre croissant de médicaments. Dans le cas du repositionnement, ces approches permettent non seulement l'analyse des cibles primaires (dites canoniques) mais également l'identification de cibles non-canoniques, possiblement responsables des nouveaux effets thérapeutiques observés. Des avancées technologiques significatives (méthodes d'ionisation et résolution des appareils améliorées) ont permis l'émergence de la chimio-protéomique en tant que stratégie pour déchiffrer le réseau d'interactions et de modifications que les protéines peuvent subir lors d'un contact avec des petites molécules.

La première de ces méthodes est appelée « **chimio-protéomique centrée sur les composés** » (Fig. 12) [105]. Dans ce cas, une molécule fonctionnalisée est synthétisée à partir d'un composé parental d'intérêt. Cela consiste à incorporer des groupes chimiques à réactivité hautement sélective ou des modifications protéiques sans perturber leur

fonction biologique, permettant ainsi un marquage sélectif [106]. Les cellules ou les lysats cellulaires sont traités avec le composé fonctionnalisé et les interacteurs protéiques sont isolées grâce à un linker spécifique permettant l'immobilisation du composé par liaison avec des billes ou par une matrice d'affinité. Les interacteurs protéiques sont alors identifiés et quantifiés par spectrométrie de masse [105]. En outre, cette méthode permet de marquer, mesurer et identifier sélectivement les protéines, leurs interactions et leurs modifications dans leur environnement naturel sous l'effet d'un traitement médicamenteux. Sa limite principale réside dans le fait que la fonctionnalisation de certains composés peut conduire à une modification de leurs capacités à interagir avec leur(s) cible(s), rendant inexploitable cette méthode.

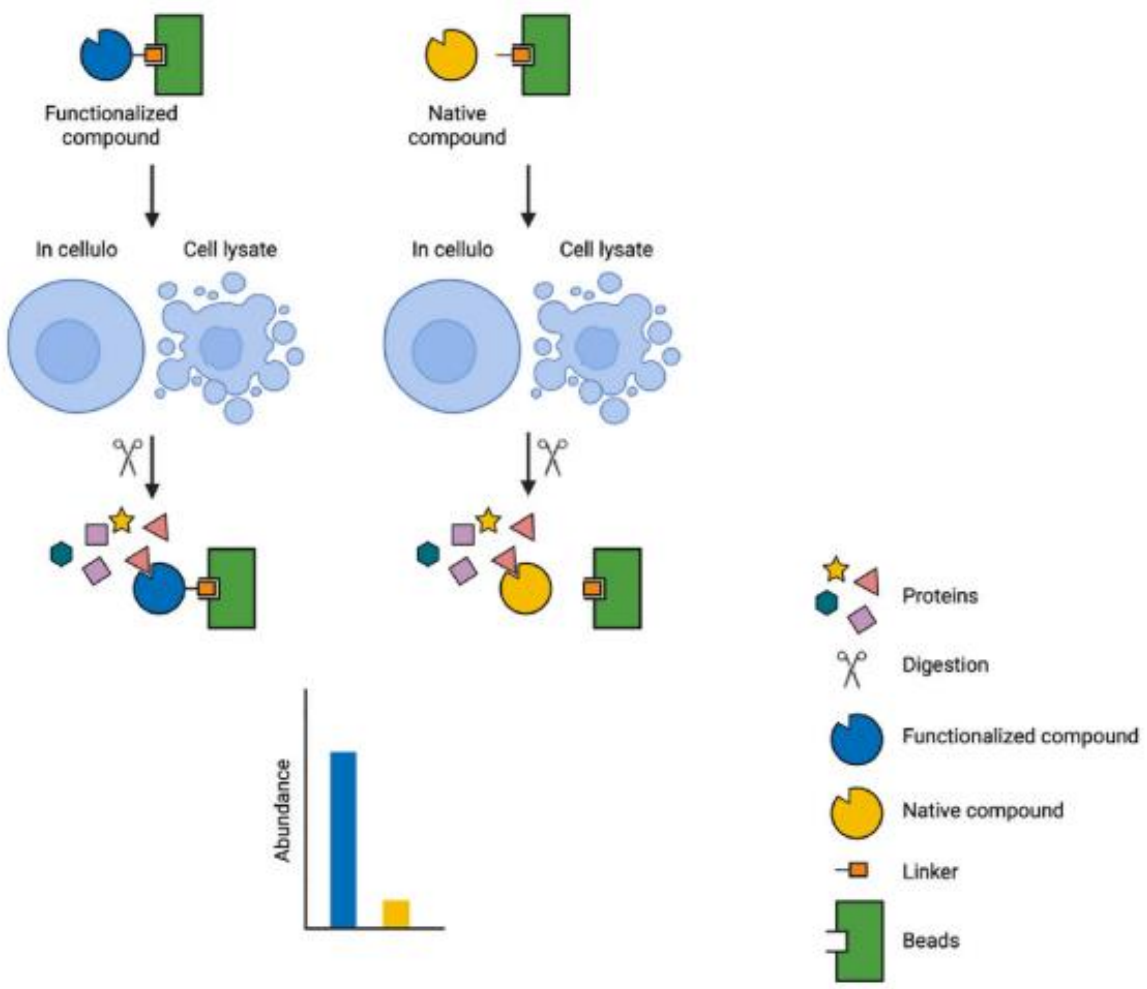


Figure 12 : Approche de chimio-protéomique centrée sur le composé, figure générée par Baptiste Mouysset [105]

Les approches de **profilage thermique du protéome** (TPP) permettent également de dévoiler l'interactome des médicaments. Les cellules ou les lysats cellulaires sont traités avec le composé d'intérêt (Fig. 13), puis sont chauffés afin de déterminer la température

de dénaturation spécifique de chaque protéine. Lorsqu'un médicament interagit avec ses partenaires protéiques, il modifie leur thermostabilité, altérant ainsi leur conformation. Les protéines dénaturées deviennent alors insolubles, permettant de les séparer des protéines natives (respectivement dans le culot et la fraction soluble), par ultracentrifugation. Les protéines de la fraction soluble sont ensuite identifiées et quantifiées par spectrométrie de masse [105]. Cette méthode innovante, basée sur l'analyse de propriétés biophysiques bien connues, permet une évaluation robuste et à haut débit des interactions protéine-ligand dans un contexte cellulaire. Elle offre ainsi des informations précieuses sur la liaison des médicaments et sur la perturbation potentielle des voies biologiques associées.

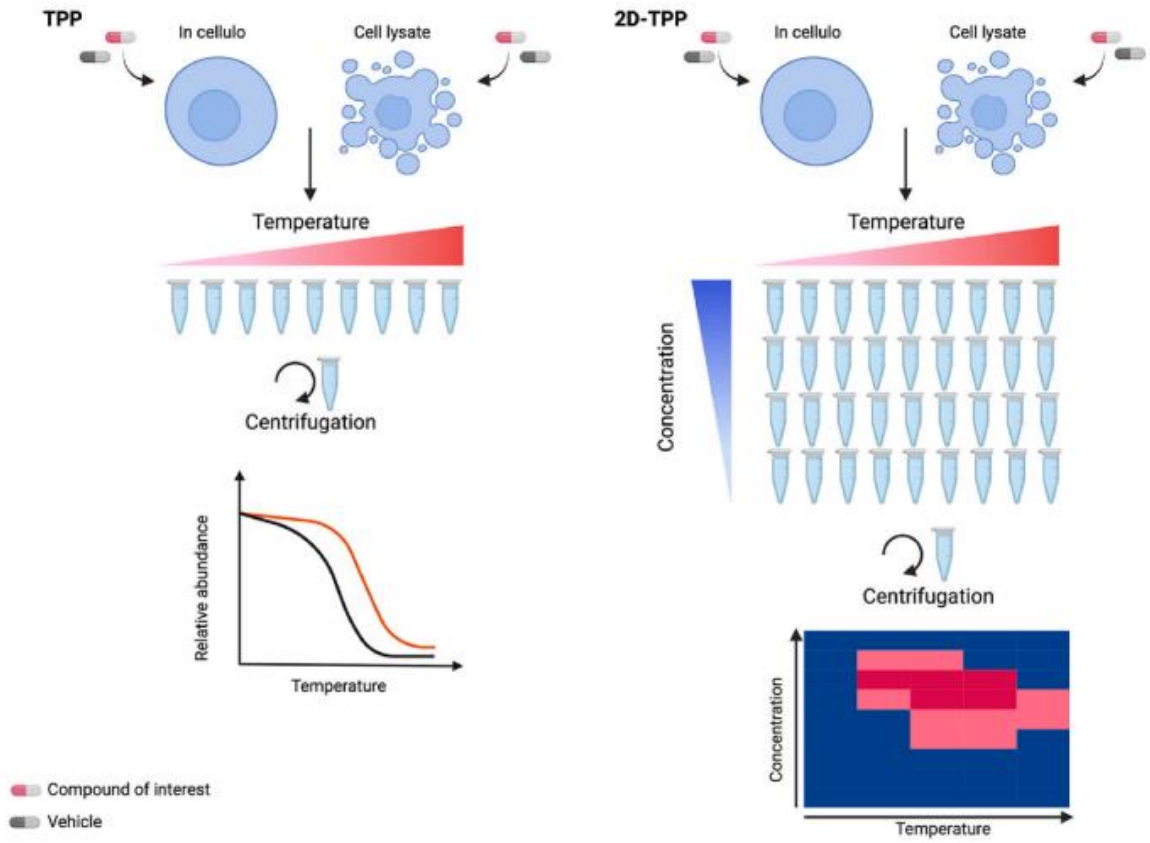


Figure 13 : Approches de profilage thermique du protéome (TPP). Les cellules ou les lysats cellulaires sont traités avec le véhicule ou le composé d'intérêt à une dose unique pour le TPP (schéma de gauche) ou à plusieurs concentrations pour le 2D-TPP (schéma de droite). Figure générée par Baptiste Mouysset [105].

b. Les criblages phénotypiques

Les criblages phénotypiques, principalement utilisés en biologie et en pharmacologie, consistent à évaluer les effets d'un large éventail de composés sur des systèmes biologiques afin d'identifier des protéines, des gènes ou d'autres facteurs qui

caractérisent un phénotype particulier. Les modèles utilisés sont variés : cellules, sphéroïdes, organoïdes ou organismes entiers comme le poisson zèbre ou la drosophile [107,108].

Dans le contexte du repositionnement de médicaments, les criblages phénotypiques offrent l'opportunité d'identifier des traitements potentiels pour des maladies dont la complexité rend difficile la caractérisation des cibles thérapeutiques primaires. Cette approche peut aboutir à la découverte de nouvelles interactions entre des médicaments connus et des cibles auparavant inexplorées [109]. De vastes librairies composées de médicaments approuvés ou en cours d'investigation sont criblées et révèlent de nouvelles options thérapeutiques à exploiter.

Cette stratégie a été révolutionné au fil des deux dernières décennies par le développement des plateformes de criblage robotisées et des systèmes de détection performants, permettant d'améliorer la sensibilité et la rapidité du criblage de grandes chimiothèques (criblages à haut et très haut débit). Les technologies actuelles sont également compatibles avec des systèmes biologiques de plus en plus pertinents vis-à-vis de la pathologie considérée, ouvrant la voie à des thérapies plus efficaces et personnalisées. Ainsi, les criblages à haut débit s'adaptent par exemple aux cellules souches pluripotentes (iPSC), cellules somatiques reprogrammées capables de reproduire divers phénotypes pathologiques observés en clinique ou le profil génétique unique d'un patient spécifiquement [110]. Les organoïdes représentent également un nouveau modèle permettant d'évaluer la sensibilité des cancers aux médicaments [111]. Ces petites structures biologiques, mimant les caractéristiques des structures morphologiques, des fonctions et des profils génétiques des organes d'origine, peuvent être générées à partir d'iPSC [112] ou dérivées de patients [113] et peuvent être utilisées sur les plateformes de criblage à haut débit [114].

Les méthodes utilisées pour identifier les médicaments repositionnés d'intérêt se diversifient aussi, intégrant par exemple la génomique fonctionnelle (interférence ARN ou CRISPR/Cas9). Combinée à un criblage de médicaments à grande échelle, cette technique permet de révéler la sensibilité et/ou la résistance des cellules aux traitements provoquée par la modification d'un gène ou de son expression [115].

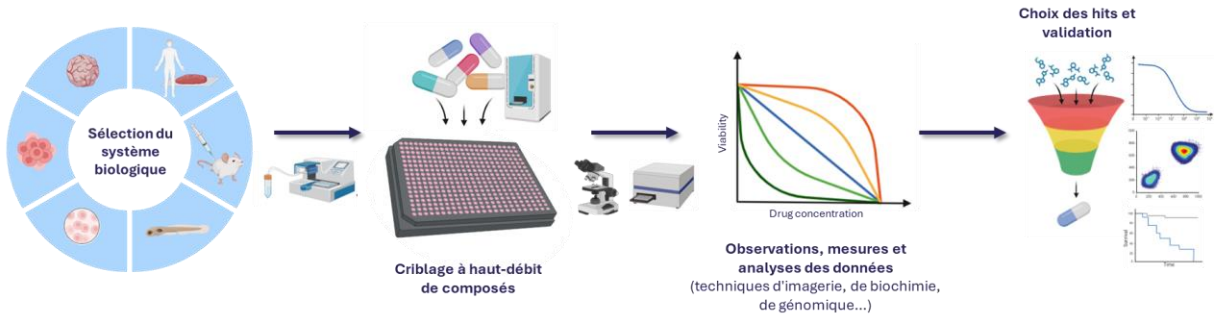


Figure 14 : Importance du criblage à haut débit dans la stratégie de repositionnement de médicaments

Le criblage phénotypique est donc une approche puissante permettant d'explorer les effets de nombreuses substances sur des systèmes biologiques complexes, ouvrant la voie à la découverte de nouvelles molécules et de nouvelles options thérapeutiques pour des médicaments déjà connus.

2. Les approches bio-informatiques *in silico*.

Des avancées dans les méthodes *in silico* se sont révélées utiles dans l'exploration de la polypharmacologie de médicaments connus et dans la découverte de nouvelles molécules. Les approches bio-informatiques jouent un rôle clé en intégrant des données provenant de diverses sources telles que l'expression génique, la structure chimique, les données protéomiques ou les dossiers de santé électroniques. À l'ère de l'intelligence artificielle et des big data, l'utilisation de méthodes analytiques avancées *in silico* permet de maximiser l'utilisation des ressources disponibles et de réduire le temps et les coûts associés à l'identification de nouveaux traitements potentiels [116].

a. Correspondance de signatures ou "signature matching"

Cette méthode repose sur l'analyse et la comparaison des « signatures pathologiques », correspondant au profil caractéristique d'une maladie, avec les « signatures thérapeutiques » obtenues après traitement avec des médicaments. Ces signatures peuvent être dérivées de différents types de données comme **les données -omiques** ou les **structures chimiques**.

Tout d'abord, la comparaison des signatures permet de prédire quels médicaments sont les plus susceptibles d'être efficaces contre une pathologie donnée en inversant la dérégulation et en contre-carrant, au moins en partie, le profil -omique pathologique. Différentes données sont alors utilisées [117], issues de l'analyse d'un échantillon biologique à un instant t en :

- Transcriptomique, *i.e.* panel des ARNm présents
- Protéomique, *i.e.* ensemble des protéines exprimées et leurs éventuelles modifications post-traductionnelles
- Métabolomique, *i.e.* réseau de métabolites dérivés des processus métaboliques biologiques.

La méthode de comparaison de signatures permet d'exploiter les données -omiques existantes et les connaissances préalables sur les médicaments afin de repérer des médicaments existants qui pourraient être efficaces dans de nouvelles pathologies, accélérant ainsi le processus de découverte.

Les correspondances de signatures peuvent aussi se baser sur la similarité des composés en termes de structure chimique, souvent associée à des propriétés biologiques

identiques ou proches. Les possibilités de repositionnement d'un médicament sont, dans ce cas, examinées en fonction de caractéristiques chimiques communes avec d'autres composés. Des méthodes bioinformatiques et des algorithmes de comparaison de structure, se basant sur les empreintes chimiques 2D ou 3D et les mesures de distance entre autres, sont utilisées pour évaluer cette similarité [118]. Bien que les structures similaires ne se comportent pas toujours de la même manière dans les systèmes biologiques, cette approche permet de comparer les molécules afin d'identifier celles qui pourraient avoir des activités comparables. La limite principale à cette approche *in silico* est liée au fait que les médicaments subissent des transformations métaboliques complexes, ainsi que des modulations pharmacocinétiques au cours de leur métabolisation et de leur distribution physiologique, pouvant décorréler leurs propriétés chimiques des effets biologiques [119].

b. Étude d'association pan-génomique

Les études d'association à l'échelle du génome (Genome-Wide Association Study ou GWAS) consistent à tester des variantes génétiques dans le génome de nombreux individus afin de caractériser des associations génotype-phénotype spécifiques [120]. L'objectif est d'identifier des loci génétiques ou des régions spécifiques du génome qui peuvent influencer la susceptibilité individuelle au cancer, la progression de la maladie ou la réponse aux traitements. Les études GWAS comportent plusieurs étapes :

- La sélection d'un grand nombre d'individus atteints de la maladie ou du trait d'intérêt et d'un groupe de comparaison approprié (cohorte contrôle)
- L'isolation de l'ADN, le génotypage de chaque individu est réalisé pour de nombreuses variations génétiques (généralement des SNP, single nucleotide polymorphisms) sur l'ensemble du génome
- L'analyse statistique de comparaison des fréquences des SNP entre les groupes de cas et de contrôles
- La validation en réalisant un/des réplicat(s) des associations identifiées dans un échantillon de population indépendant ou en examinant les implications fonctionnelles expérimentalement [121]

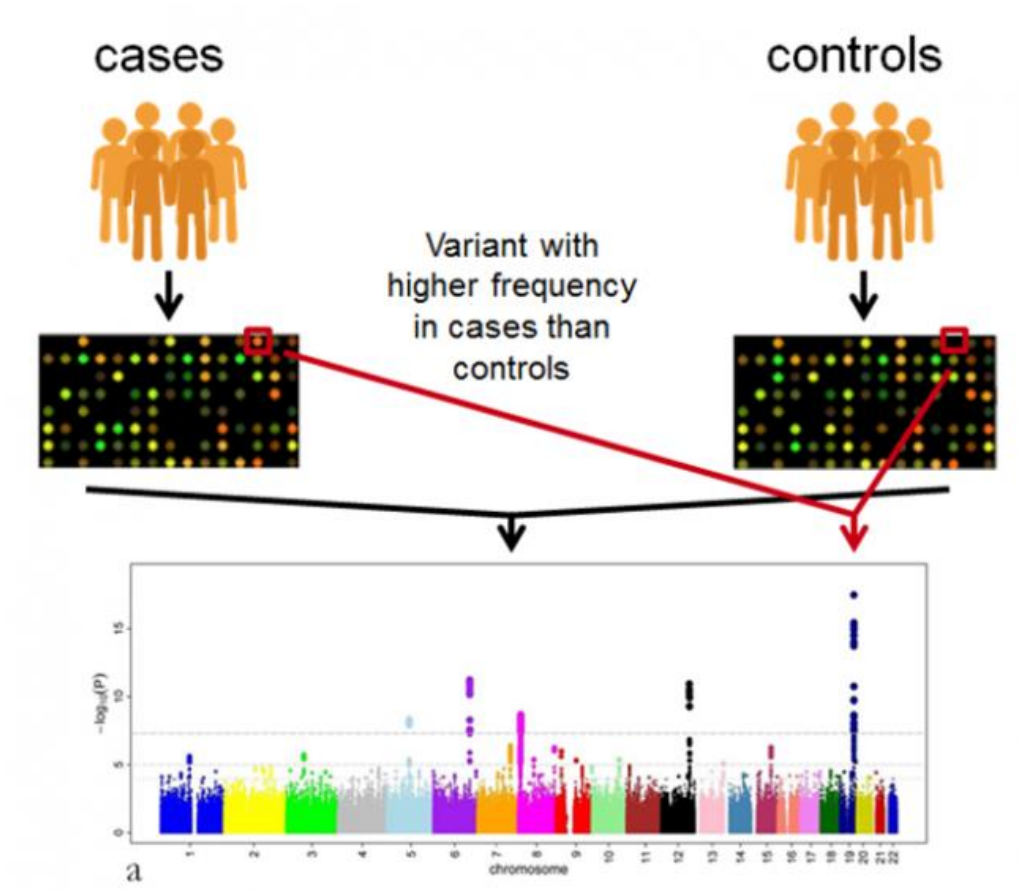


Figure 15 : Diagramme illustrant la méthode Genome-Wide Association Study (ou GWAS) permettant l'identification de variants, issu de [122]

Même si elles restent limitées, en raison de la rareté des cas et de la complexité des sous-types moléculaires de MB, une étude GWAS menée sur 244 cas de MB et 247 témoins en Suède et au Danemark a identifié des variantes génétiques germinales associées au risque de cette tumeur pédiatrique [123]. Une vaste analyse génomique, –réalisée sur 491 échantillons séquencés et 1 256 cas étudiés sur le plan épigénétique –, a également permis de cartographier l'hétérogénéité moléculaire du MB et de mettre en évidence des altérations de gènes moteurs spécifiques à certains sous-groupes [49]. Les données générés par de telles études pourraient ainsi révéler des cibles jusque-là inexplorées et déboucher sur des opportunités thérapeutiques pour le repositionnement de médicaments existants [124,125].

c. *Docking moléculaire*

Les simulations par docking moléculaire (traduit par l'expression « amarrage moléculaire » en français, peu usitée) permettent l'identification de candidats-médicaments au repositionnement [102]. Cette technique virtuelle donne lieu à des criblages rapides et à haut débit, à condition d'avoir défini au préalable les cibles

moléculaires de la pathologie concernée afin d'identifier les médicaments qui peuvent s'y lier. Le docking moléculaire est en effet utilisé pour modéliser l'interaction entre une molécule (ligand) et une cible biologique (protéine), prédisant ainsi la stabilité et l'affinité des complexes médicament-cible, mais également le possible effet thérapeutique qui en découle [126]. En pratique, la structure de la cible doit être obtenue par des méthodes expérimentales (ex : cristallographie aux rayons X) ou modélisée *in silico*, et la géométrie 3D du ligand doit être configurée. Les algorithmes de docking génèrent alors de nombreuses orientations possibles (dites « poses ») du ligand dans le site de liaison de la cible, en estimant leur affinité théorique de liaison (« scoring ») et la nature des interactions (liaisons hydrogène, interactions hydrophobes, forces électrostatiques…). Il existe de nombreux programmes puissants tels que AutoDock Vina – logiciel performant utilisable en libre accès – et Glide – utilisé pour sa précision et ses capacités robustes dans un cadre commercial –, qui peuvent gérer des librairies moléculaires de grande taille, rendant la découverte de traitements plus rapide et moins chère [127]. La précision des prédictions ne cesse de s'améliorer grâce aux nouvelles avancées dans les algorithmes, concourant par exemple à des fonctions de scoring affinées ou à la génération de poses accélérée. De plus, le docking moléculaire se voit maintenant couplé à d'autres méthodes virtuelles innovantes, comme la simulation de dynamiques moléculaires qui permet de mieux comprendre la flexibilité de l'interaction médicament-cible [128] et aide donc au repositionnement de médicaments.

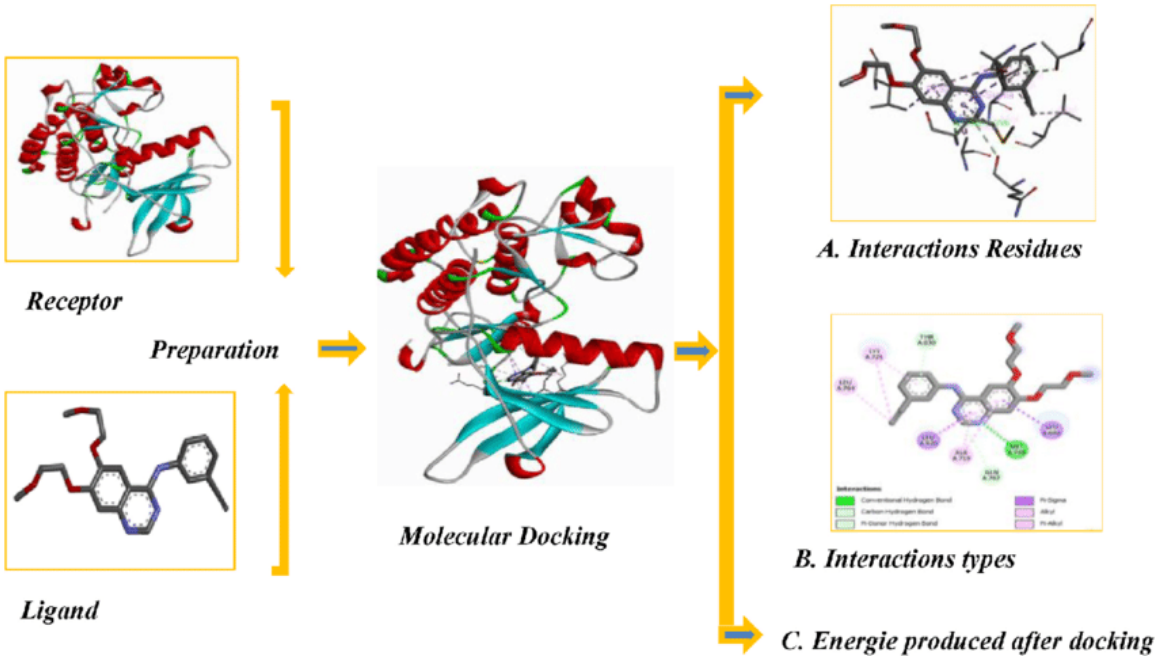


Figure 16 : Illustration de l'interaction entre une molécule (ligand) et une protéine (receptor) [129]

d. Analyses cliniques rétrospectives

Les données cliniques rétrospectives peuvent être obtenues à partir de différentes sources comme les dossiers médicaux électroniques, les données de surveillance post-commercialisation et d'essais cliniques. Plusieurs bases de données (exemples dans le Tableau 4) proposent des informations sur les patients, les maladies et les médicaments qui peuvent servir de sources importantes pour le repositionnement.

Nom	Abréviation	Description
Base National de Pharmacovigilance	BNPV	Base de données française de rapports sur les effets indésirables des médicaments enregistrés par les centres régionaux de pharmacovigilance, en lien avec l'ANSM
Medicines & Healthcare products Regulatory Agency	MHRA	Système de « yellow card » permettant de signaler les effets secondaires suspectés des médicaments et dispositifs médicaux au Royaume-Uni
UK Clinical Practice Research Datalink	CPRD	Service de recherche en situation réelle prenant en charge les études rétrospectives et prospectives de santé publique et cliniques au Royaume-Uni
FDA Adverse Event Reporting System	FAERS	Base de données américaine de rapports sur les effets indésirables et les erreurs médicamenteuse, soumis à la FDA
European Union Drug Regulating Authorities Pharmacovigilance	Eudravigilance	Base de données européenne de rapports sur les effets indésirables suspectés des médicaments, gérée par l'EMA
VigiBase		Base de données mondiale de l'OMS sur les effets indésirables des médicaments et des vaccins

Tableau 4 : Services et bases de données consultables concernant les effets indésirables des médicaments (liste non-exhaustive)

Plus particulièrement, les dossiers médicaux électroniques contiennent une énorme quantité d'informations disponibles telles que les données relatives à la prescription de médicaments et les descriptions cliniques des symptômes et des signes du patient [130]. Plusieurs hypothèses décrivent, d'une part, le fait que deux médicaments provoquant les mêmes effets indésirables pourraient agir sur une cible commune ou sur la même voie. D'autre part, si le phénotype d'effet indésirable d'un médicament particulier ressemble à celui d'une maladie cela pourrait également suggérer une physiologie et des voies communes au médicament et à la maladie. Le profil d'effets indésirables d'un médicament étant relativement unique, il pourrait donc être utilisé comme une approximation de son phénotype et permettre la découverte de nouvelles options thérapeutiques [119]. Cette approche est d'autant plus intéressante qu'après des années d'utilisation clinique et de surveillance post-commercialisation, le profil d'effets secondaires des médicaments repositionnables est souvent bien défini. Toutefois, des obstacles éthiques et juridiques sont encore à franchir pour pouvoir accéder à ces données patients et pouvoir les utiliser [130].

e. L'intelligence artificielle

La démocratisation de l'intelligence artificielle (IA) ces dernières années permet non seulement d'accélérer le processus de découverte de nouveaux usages pour les médicaments existants mais aussi d'améliorer la précision et l'efficacité des approches traditionnelles de repositionnement décrites plus haut. L'IA est un vaste terme qui englobe l'apprentissage automatique (Machine Learning) et l'apprentissage profond (Deep Learning) [131]. Elle peut être définie comme la capacité d'algorithmes à apprendre et à reconnaître des modèles et des relations à partir d'un nombre suffisant d'exemples représentatifs et à utiliser efficacement ces informations pour prendre des décisions sur des données invisibles. Compte tenu de la disponibilité de vastes ensembles de données, il est important que des méthodes soient mises en place pour permettre aux chercheurs d'utiliser ces données de manière adéquate. Plus précisément, l'utilisation d'une conception expérimentale appropriée et l'addition de différents ensembles de données biologiques, chimiques et cliniques permettraient d'identifier des relations ou des cibles nouvelles et inexplorées des médicaments [109], incluant ceux issus de l'approche de repositionnement.

III. Avantages et défis liés au repositionnement

A. Principaux avantages

Les taux d'échec élevés, les coûts exorbitants et la lenteur du processus de découverte et développement de nouveaux médicaments ont suscité un intérêt croissant pour le repositionnement. Ces vingt dernières années, le nombre de publications concernant le « drug repurposing » a ainsi été multiplié par 200 (base de données PubMed).

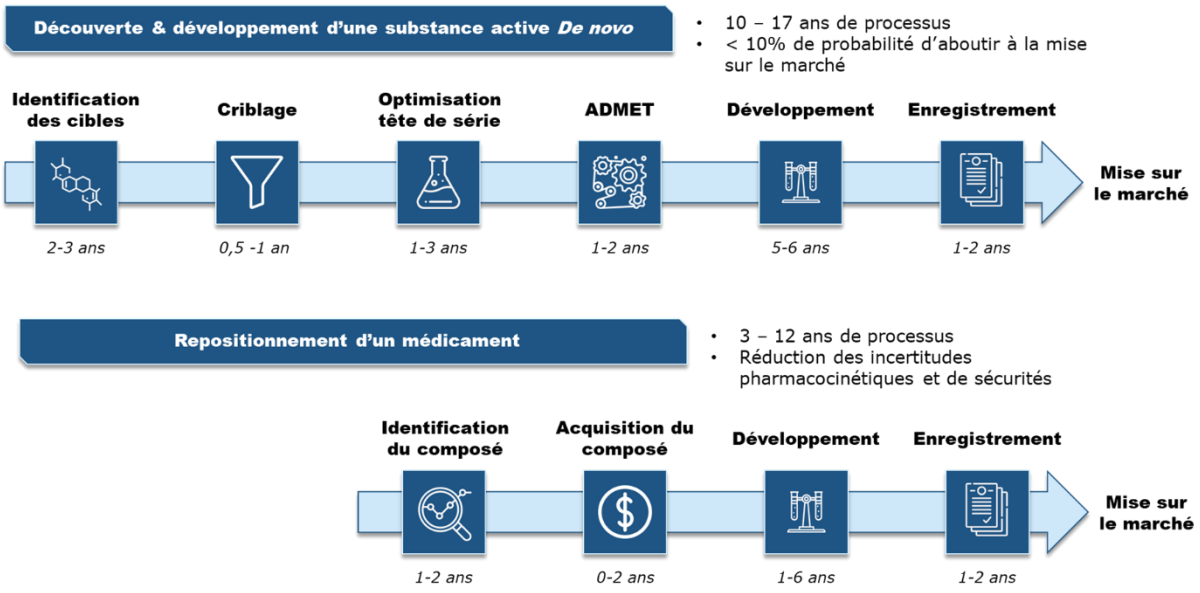


Figure 17 : Avantages du repositionnement de médicament par rapport à un développement de médicament de novo

Le temps nécessaire entre la découverte et la mise sur le marché est significativement réduit, passant de 10-17 ans pour un nouveau traitement à 3-12 ans pour un médicament déjà commercialisé dans une autre indication (Fig. 17). Au-delà de l'intérêt clinique de pouvoir proposer aux patients de nouvelles options thérapeutiques dans des délais certaines fois très courts, ce gain de temps résulte en un gain financier. Les longues étapes de recherche onéreuse, habituellement nécessaires pour l'identification d'une cible d'intérêt et la découverte d'une nouvelle molécule active associée, peuvent en effet être évitées. De plus, les données de dosage, de pharmacocinétique et de toxicologie du composé étant déjà disponible, les dépenses engagées dans les essais précliniques et cliniques précoces (de phase I) sont réduites et le passage aux phases II ou III peut se faire plus rapidement [132]. En conséquence, alors que le développement d'un médicament *de novo* coûte près de 2 à 3 milliards d'euros, la réutilisation d'un médicament engage en moyenne 6 à 10 fois moins de dépenses financières, soit environ 300 millions d'euros en moyenne [130]. Le célèbre adage de Benjamin Franklin, « Le temps, c'est de l'argent », reprend tout son sens dans le cas du repositionnement de médicaments !

Un des avantages cruciaux du repositionnement est la réduction des risques encourus pour le patient. Ayant déjà été administrés chez l'humain, le profil de sécurité des médicaments repositionnés est connu, offrant un bon aperçu de leurs possibles effets secondaires à contrôler. Avec ces données cliniques existantes, les médicaments repositionnés sont également moins susceptibles d'échouer lors des étapes de développement clinique que tout nouveau médicament. L'augmentation du taux de succès des essais cliniques mène à une augmentation des obtentions d'autorisation de mise sur le marché, qui passe d'environ 10 % pour les nouveaux médicaments à près de 30 % pour les médicaments repositionnés dans de nouvelles indications, peu importe l'ère thérapeutique impliquée [97,133].

Ainsi, la stratégie de repositionnement offre des avantages considérables en termes de sécurité améliorée, de réduction des délais et des couts associés, tout en apportant de nouvelles solutions thérapeutiques efficaces aux patients.

B. Quels défis à surmonter ?

Bien que la stratégie de repositionnement ait offert de belles opportunités, un nombre restreint de médicaments repositionnés ont réussi leur transition vers une application clinique à ce jour. Dans la pratique, certains défis restent à surmonter avant de pouvoir pleinement utiliser un médicament repositionnable.

Un défi majeur du repositionnement de médicaments réside dans la question de la propriété intellectuelle. En effet, même lorsqu'un médicament a démontré des résultats prometteurs, son entrée sur le marché dans sa nouvelle indication peut être entravée en raison de conflits associés au brevet existant. Il est également possible d'obtenir une protection de propriété intellectuelle pour une nouvelle utilisation d'un médicament déjà approuvé, à condition que celle-ci soit nouvelle et inventive. Cependant, nombre de ces utilisations potentielles sont déjà connues dans la littérature scientifique, limitant la possibilité d'obtenir une protection par brevet dans ce contexte. Dans le cas d'un

médicament qui n'est plus breveté, les perspectives de retour sur investissement sont limitées [134].
Les essais cliniques de phase avancées étant très coûteux, le processus d'approbation réglementaire et une éventuelle reformulation requise nécessitent globalement le même investissement que celui engagé pour un nouveau médicament. Les industries sont donc en général moins enclines à financer un repositionnement de médicaments pas assez rentable [135].
Enfin, comme tout autre médicament, la principale limite pharmacologique est liée à des nouvelles interactions médicamenteuses et à l'introduction d'effets secondaires imprévus. Il existe donc encore des obstacles non négligeables au repositionnement des médicaments, mais ils ne sont pas insurmontables [136]. Certaines solutions existent déjà, à l'échelle réglementaire notamment, comme décrit dans la section suivante.

IV. Cadre réglementaire du repositionnement de médicaments

Dans le cas où un médicament repositionné souhaite obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour une nouvelle indication, ainsi qu'un remboursement, les étapes principales de cette procédure sont identiques à celles d'un nouveau médicament. En France, il existe un cadre bien défini qui précise ces étapes indispensables et les différents organismes qui en sont en charge [137,138]. Dans le cas où un médicament nécessite une procédure d'approbation accélérée, il existe des solutions alternatives plus rapides pour en permettre la mise à disposition comme décrit dans la section suivante.

A. Système dérogatoire d'accès et de prise en charge des médicaments

En France, jusqu'en 2021, le système dérogatoire d'accès et de prise en charge des médicaments par l'assurance maladie faisait l'objet d'autorisations temporaires d'utilisation (ATU) ou de recommandations temporaires d'utilisation (RTU). La loi de financement de la sécurité sociale a posé les bases d'une refonte totale de ce système avec la mise en place de deux nouveaux dispositifs : l'accès compassionnel et l'accès précoce (Fig. 18). Cette réforme permet de simplifier et d'harmoniser les procédures, de garantir un accès et une prise en charge immédiats des patients tout en assurant la soutenabilité financière du dispositif [139].

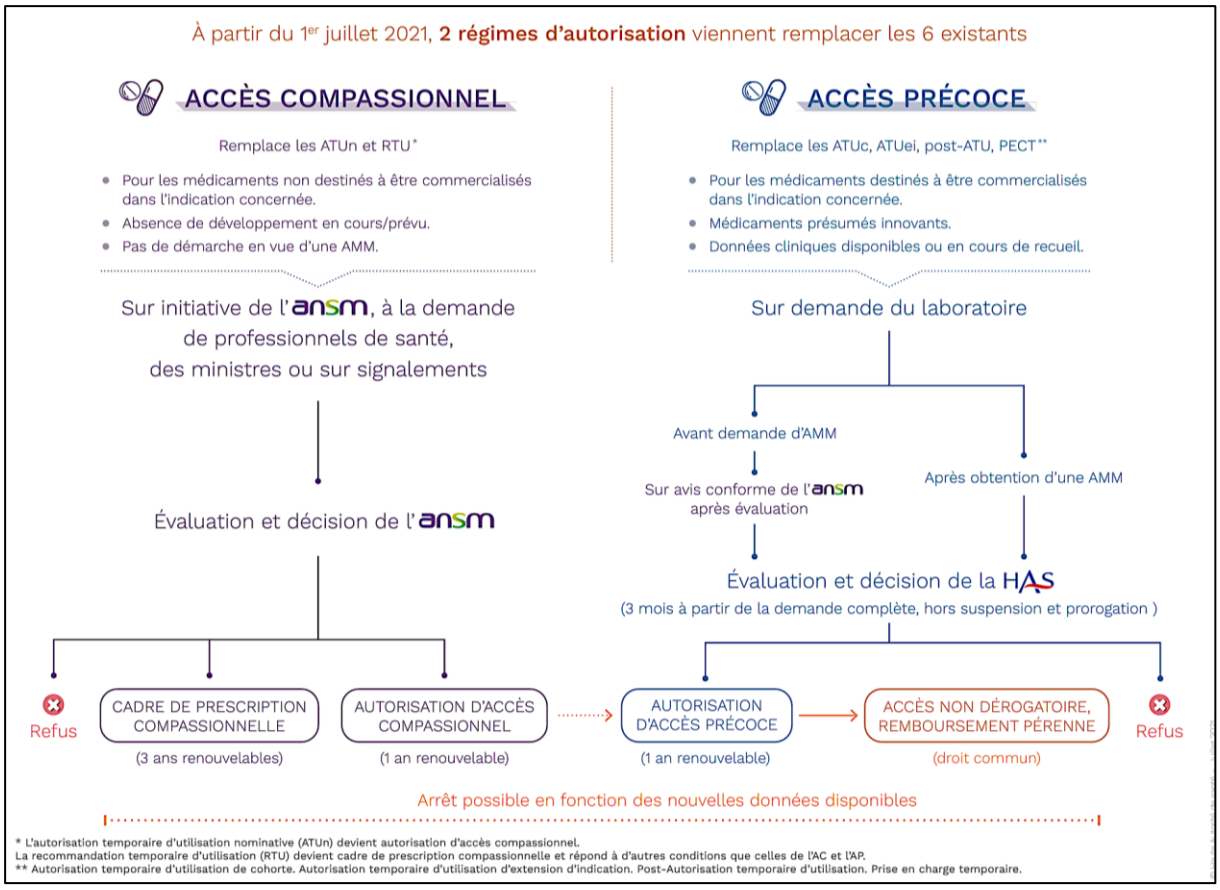


Figure 18 : Récapitulatif des nouveaux régimes mis en place par la réforme de l'accès dérogatoire aux médicaments du 1er juillet 2021 [140]

1. L'accès précoce

L'accès précoce est une procédure dérogatoire exceptionnelle qui permet la mise à disposition et la prise en charge précoces d'une ou plusieurs indication(s) de certains médicaments. Cinq conditions, définies par l'article L.5121-12 du code de la santé publique, doivent être réunies :

- l'efficacité et la sécurité du médicament sont fortement présumées au vu des résultats d'essais thérapeutiques, pour les médicaments ne disposant pas d'une AMM dans l'indication considérée
- le médicament est indiqué dans une maladie grave, rare ou invalidante
- il n'existe pas de traitement approprié disponible
- la mise en œuvre du traitement ne peut pas être différée
- le médicament est présumé innovant, notamment au regard d'un éventuel comparateur cliniquement pertinent.

L'accès précoce s'applique aux médicaments ayant une AMM dans l'indication considérée mais qui n'ont pas encore été admis au remboursement par l'Assurance Maladie et aux médicaments n'ayant pas d'AMM dans l'indication considérée et pour lesquels l'entreprise s'engage à déposer une demande. Dans ce cas, l'ANSM doit rendre un avis

conforme sur l'efficacité et la sécurité au vu des résultats d'essais thérapeutiques avant que la HAS ne se prononce [141]. L'autorisation d'accès précoce peut donc se faire dans le cadre d'une pré-AMM et post-AMM. Dans tous les cas, la HAS est responsable de l'évaluation et de la décision des demandes d'accès précoce.

2. L'accès compassionnel

L'accès compassionnel comprend l'autorisation d'accès compassionnel et le cadre de prescription compassionnelle (Fig. 16). Ce dispositif cible les médicaments n'ayant pas vocation à être commercialisés par les laboratoires dans l'indication. Une surveillance étroite est mise en place afin de minimiser les risques potentiels pour les patients.

L'autorisation d'accès compassionnel est spécifiquement destinée à des médicaments :

- ayant des indications thérapeutiques qui ne font pas l'objet de recherches impliquant la personne humaine à des fins commerciales
- ciblant une pathologie ne disposant d'aucun traitement approprié
- dont l'efficacité et la sécurité sont présumées au regard des données cliniques disponibles.

Il s'agit d'un accès nominatif, à la demande d'un prescripteur (auprès de l'ANSM), pour une durée maximale d'1 an renouvelable. Quelle que soit l'indication thérapeutique envisagée, le médicament concerné par l'accès compassionnel ne dispose pas encore d'une AMM [139].

Le cadre de prescription compassionnelle est établi en vue de sécuriser une pratique de prescription hors-AMM d'un médicament, qui n'est pas destiné à obtenir cette AMM mais qui répond de façon satisfaisante à un besoin thérapeutique non couvert. Il est établi par l'ANSM à son initiative ou à la demande des ministres ou sur signalement pour une durée de 3 ans renouvelable [139]. Contrairement aux médicaments concernés par l'accès compassionnel, ceux pris en compte dans le cadre de prescription compassionnelle disposent déjà d'une AMM dans d'autres indications.

B. Initiatives européennes

Des initiatives ont été mises en place, au niveau européen, pour garantir un accès sûr aux anciens et aux nouveaux médicaments en pédiatrie.
Dans ce cadre, le **Règlement pédiatrique** (CE - N°1901/2006) est entré en vigueur dans l'Union Européenne le 26 janvier 2007 [142]. Il a pour but d'améliorer la santé des enfants en Europe en facilitant le développement et la disponibilité de médicaments pour les enfants âgés de 0 à 17 ans. Le règlement vise à garantir que les médicaments destinés aux enfants soient de haute qualité, issus de recherches éthiques et autorisés de manière appropriée. La disponibilité des informations sur l'utilisation des médicaments destinés

aux enfants est également une de ses principales préoccupations. L'environnement réglementaire des médicaments pédiatriques en Europe a été radicalement modifié [143].

Le Règlement pédiatrique a notamment donné naissance au **Comité pédiatrique**, dont le rôle principal est de déterminer les études que les entreprises doivent réaliser sur les enfants dans le cadre des **Plans d'Investigation Pédiatrique** (PIP). Ces plans de développement requis pour les médicaments pédiatriques – nouveaux médicaments ou nouvelles indications – visent à garantir que les données nécessaires sont obtenues pour appuyer la demande d'AMM d'un médicament destiné aux enfants [144].

L'AMM en vue d'un usage pédiatrique – **nommée PUMA pour « Paediatric-Use Marketing Autorisation » –** couvre les indications et les formulations appropriées pour les médicaments développés en vue d'une utilisation dans la population pédiatrique exclusivement. Elle concerne les médicaments qui sont déjà autorisés chez l'adulte ou qui ne sont plus couverts par un brevet ou un certificat complémentaire de protection. La PUMA incite ses demandeurs (les entreprises pharmaceutiques notamment) à développer des médicaments destinés aux enfants, en offrant de nombreux avantages [145] tels que :

- un accès automatique à la procédure centralisée, même si la demande n'entre pas dans le champ d'application obligatoire de cette procédure.
- 8 ans + 2 ans de protection des données et du marché pour la nouvelle indication
- une autorisation sous le même nom et la même marque que le médicament autorisé contenant la même substance active, si le titulaire de l'AMM est le même.
- une exemption partielle de la redevance au titre de la procédure centralisée pour l'AMM et les activités postérieures à l'autorisation pendant 1 an

Malheureusement, malgré ces incitations, ce dispositif reste encore peu utilisé par les entreprises en raison de facteurs économiques (marché plus restreint, complexité et coût élevé des études pédiatriques) et logistiques (méconnaissance du dispositif et délais réglementaires associés au PIP).

Ainsi, le processus d'approbation d'une nouvelle indication peut être long et complexe, nécessitant des preuves solides d'efficacité et de sécurité du médicament ainsi qu'une justification économique de son prix et de son niveau de remboursement. Le médicament repositionné est ensuite soumis à une surveillance continue pour détecter tout effet indésirable potentiel non identifié lors des essais cliniques. Les décisions de remboursement et de prix étant basées sur des évaluations transparentes, la HAS peut réévaluer le médicament en cas de nouvelles données ou de changements dans les conditions de traitement.

V. Un exemple phare de repositionnement chez les enfants : le propranolol

À ce jour, l'utilisation du propranolol pour le traitement des hémangiomes sévères de la petite enfance représente l'un des exemples les plus réussis de repositionnement de médicaments. Le propranolol – premier de sa classe thérapeutique approuvé par la FDA

en 1967 – fait partie de la famille des antagonistes β-adrénergiques, ou β-bloquants, largement connus pour leurs propriétés régulatrices des dysfonctionnements cardiovasculaires [146]. En 2008, Léauté-Labrèze *et al*. ont découvert de manière totalement fortuite l'efficacité du propranolol dans l'hémangiome infantile puis l'ont ensuite démontré chez 11 patients [147]. Le propranolol permet d'atteindre une efficacité supérieure, stable au cours du temps, et avec moins d'effets secondaires que la norme de soins antérieure basée sur l'utilisation de corticoïdes [148]. En 2014, le propranolol reçoit l'approbation de l'EMA dans cette nouvelle indication, sur la base d'une étude de phase III soutenue par Pierre Fabre Dermatologie entre février 2010 et novembre 2011, dont les résultats ont été publiés en février 2015 [149]. Cet exemple illustre bien le temps gagné lors d'un repositionnement de médicaments car le délai entre le début de l'essai clinique et l'approbation n'a été que de 4 à 6 ans si on base sur l'observation de départ.
Les études de surveillance post-commercialisation confirment l'efficacité et la bonne tolérance du propranolol sous sa forme buvable (Hemangiol ; Fig 18) spécifiquement développée pour les enfants atteints d'hémangiome infantile.



Figure 19 : Flacon et boîte d'Hémangiol, solution buvable spécifiquement développée pour les nourrissons atteints d'hémangiome sévère

Depuis lors, des études précliniques et cliniques, ont montré que les β-bloquants peuvent également augmenter l'efficacité du traitement dans les cancers réfractaires aux médicaments [150–152], y compris dans le neuroblastome, tumeur pédiatrique du système nerveux périphérique [153]. Les β-bloquants peuvent bloquer différents processus biologiques sous-jacents à la progression tumorale – prolifération et migration cellulaires, angiogenèse tumorale et métastases – et en font un bel espoir de repositionnement de médicaments en oncologie.

La collaboration entre les différents acteurs impliqués tels que les cliniciens, les chercheurs et les industriels, a donc permis d'introduire un traitement plus efficace qui améliore grandement la qualité de vie des jeunes patients atteints d'hémangiome infantile.

VI. Quels médicaments repositionnables à l'avenir dans les tumeurs intracrâniennes pédiatriques ?

Cette partie met en lumière la richesse de la pharmacopée existante, avec des composés qui pourraient être redéployés pour de nouvelles applications thérapeutiques, optimisant ainsi le potentiel des traitements déjà éprouvés. Plusieurs classes thérapeutiques sont source de candidats prometteurs dans le traitement des tumeurs cérébrales pédiatriques, dont les propriétés pharmacocinétiques et la toxicité sont déjà disponibles.

A. Parasitologie

Les médicaments antiparasitaires représentent une classe largement décrite pour leur action anti-cancéreuse [154,155].

L'exemple phare reste les anti-helminthiques benzimidazolés qui agissent sur le cytosquelette des helminthes en inhibant la polymérisation des microtubules, bloquant l'absorption du glucose par les parasites et provoquant ainsi leur mort. La transposition de cette action anti-microtubule du mebendazole, de l'albendazole et du flubendazole dans plusieurs types de cancers, tels que les cancer du sein ou de l'appareil digestif, en font logiquement de sérieux candidats au repositionnement [156]. Le flubendazole est efficace dans le glioblastome (GB), tumeur cérébrale de l'adulte [157] et dans le neuroblastome, tumeur pédiatrique du système nerveux périphérique [158].

Le mébendazole anti-helminthique à large spectre, a été appliqué pour la première fois à des sujets humains dès le début des années 70. Son mécanisme d'action sur les parasites consiste en une dépolymérisation des microtubules des cellules intestinales des nématodes qui affecte l'absorption des nutriments. En 1976, les possibles propriétés antimitotiques de trois anti-helmintiques, dont le mébendazole, étaient déjà abordées *in vitro* et *in vivo* sur des modèles de cancer épidermoïde et de leucémies [159]. D'autres études ont suivi et souligné le fort potentiel anti-cancéreux du mébendazole dans un large panel de cancers (Fig. 20), incluant les cancers du poumon [160], de la prostate [161], du colon [162], des glandes surrénales [163] ou encore plusieurs types de leucémies [164,165]. Dans les cancers du sein, ce médicament présente des propriétés anti-métastatiques, corrélées à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle des HIFs [166].

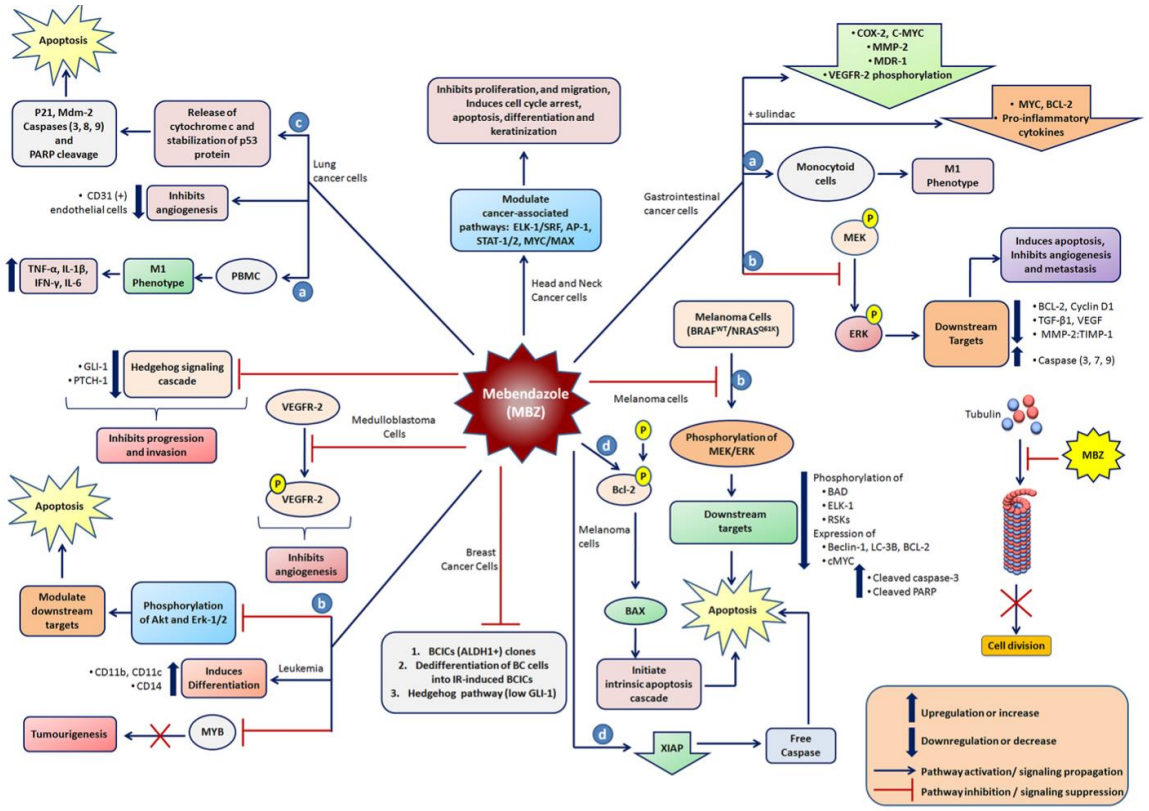


Figure 20 : Schéma des nombreux effets anticancéreux du mébendazole sur la progression tumorale, issu de [156]

En 2011, l'efficacité des anti-helminthiques dans les tumeurs intracrâniennes a été découverte par hasard, par l'équipe de G.J. Riggins, constatant l'échec de xénogreffes de GB dans des souris ayant reçu de l'albendazole pour lutter contre une série d'oxyurose [167]. Des investigations supplémentaires ont alors mis en évidence les effets de l'albendazole et surtout du mébendazole en termes d'inhibition de la formation des microtubules dans les cellules de GB *in vitro* et de gain de survie *in vivo* chez des souris porteuses de GB [167]. La capacité du mébendazole à s'accumuler en intracrânien lui confèrerait même un avantage d'efficacité par rapport à la vincristine, agent de chimiothérapie bien connu dont le mécanisme d'action repose également sur la dépolymérisation des microtubules [168]. Le mébendazole serait également en mesure de potentialiser certains traitements de référence des tumeurs du SNC, tel que décrit pour le témozolomide – seul médicament indiqué dans le traitement du GB actuellement – [169–171] ou la radiothérapie [170,172].

Plus récemment, notre équipe a identifié MAPK14 comme cible du mébendazole dans les GB en combinant l'utilisation d'un algorithme de prédiction de cible *in silico* et des expériences de liaison médicament-cible. Des études de perte d'activité de MAPK14 *in vitro*, ainsi que des validations de l'efficacité MAPK14-dépendante du mébendazole sur cellules et sphéroïdes tumoraux ont confirmé son potentiel dans le traitement GB [173].

MAPK14 étant significativement plus exprimé dans la plupart des cancers [174], cet acteur impliqué dans la progression tumorale pourrait représenter une cible de choix au repositionnement du mébendazole et expliquer l'éventail des cancers touchés par ce traitement.

L'activité du mébendazole observée dans les tumeurs intracrâniennes de l'adulte pourraient être transposable chez l'enfant, comme montré dans des modèles murins de MB qui présentent une croissance tumorale considérablement ralentie et une survie globale prolongée sous l'effet du traitement. Ces bénéfices ont été associés à une réduction sélective de la densité microvasculaire dans les tumeurs et à une préservation du tissu vasculaire cérébral non-cancéreux [175,176]. Des travaux s'accordent pour attribuer ces effets anti-angiogéniques à une diminution du taux de VEGF produit [162] et à une baisse de l'activité d'autophosphorylation du VEGFR2 [175,176]. Le mébendazole s'avère particulièrement intéressant dans les MB du groupe SHH, grâce à ses capacités d'inhibition de la signalisation HH, conséquence de la désorganisation des microtubules dans ces cellules [177]. Il améliore ainsi l'efficacité du vismodegib, thérapie anticancéreuse concourant au blocage de cette voie par interaction avec la protéine Smo [177]. Deux essais cliniques de phase I/II sont en cours (NCT02644291 et NCT01837862) afin de déterminer l'innocuité et l'efficacité du mébendazole, seul ou en association avec des médicaments de chimiothérapie standard, pour le traitement des tumeurs cérébrales pédiatriques (MB, gliomes de haut-grade, astrocytomes…). Ces études marquent l'intérêt toujours croissant pour ce médicament en tant que nouvelle option thérapeutique chez les jeunes patients atteints de tumeurs du SNC. En France, il fait actuellement l'objet d'une demande d'autorisation d'accès compassionnel pour des patients âgés de plus de 2 ans présentant un DIPG, après échec d'au moins un traitement conventionnel ou en rechute/progression lorsqu'un nouveau protocole n'est pas envisageable [178].

La classe pharmacologique des anti-parasitaires compte également le nifurtimox, utilisé dans le traitement de la maladie de Chagas grâce à son action pro-oxydative conduisant à l'accumulation de superoxydes, peroxyde d'hydrogène et radicaux hydroperoxydes toxiques pour le trypanosome. Son efficacité pré-clinique dans des cellules de MB et de NB a été démontré en combinaison avec la Buthionine Sulfoximine [179]. Le nifurtimox a également montré l'intérêt de son repositionnement dans un essai clinique de phase II, évaluant son association avec le topotécan et le cyclophosphamide chez des enfants atteints de NB et de MB en rechute ou réfractaires. Les résultats indiquent en effet une bonne tolérance du traitement, une stabilisation de la maladie et des réponses prolongées chez ces jeunes patients lourdement prétraités et présentant une maladie à rechutes multiples [180].

La classe des antipaludéens comporte également des médicaments repositionnables, comme le révèlent les résultats d'un criblage à haut-débit dans le gliome infiltrant du tronc cérébral (DIPG). Trois antipaludéens sont en effet capables de réduire la viabilité des cellules de DIPG [181], offrant un espoir de nouvelle option thérapeutique pour ces tumeurs pédiatriques très agressives et au pronostic particulièrement sombre. La

quinacrine s'est avérée être la plus efficace, et a conduit à la modélisation d'un composé anticancéreux ciblant le complexe FACT, impliqué dans le remodelage de la chromatine au cours de la transcription, de la réplication et de la réparation de l'ADN [181]. D'autres médicaments antiparasitaires, tels que l'atovaquone ou l'ivermectine, ont montré de potentiels résultats pour le traitement des tumeurs du CNS de l'adulte [182] mais leur efficacité n'a pas encore été testée dans les tumeurs cérébrales pédiatriques.

B. Neurologie – psychiatrie

Étant donné leur ciblage du CNS, les médicaments utilisés en neurologie et en psychiatrie offrent un large panel de candidats au repositionnement dans les tumeurs cérébrales.

Les médicaments antiépileptiques font actuellement l'objet d'études pour démontrer et expliquer leurs propriétés anticancéreuses [183]. L'acide valproïque en est l'exemple phare. Bien que controversé pour ses effets tératogènes, il a en effet montré une efficacité anticancéreuse dans plusieurs modèles *in vivo* de xénogreffes orthotopiques de MB [184]. Le mécanisme d'action sous-jacent serait indépendant des effets réducteurs de l'hyperexcitabilité neuronale, puisqu'il reposerait sur une puissante activité inhibitrice de l'histone désacétylase. L'hyperacétylation des histones résultante entrainerait alors une suppression de la croissance tumorale et de la différenciation, une induction de l'apoptose et une activité antiangiogénique, concourant à une prolongation significative de la durée de vie des souris (7-70 jours selon le modèle) [184] (Fig. 21).

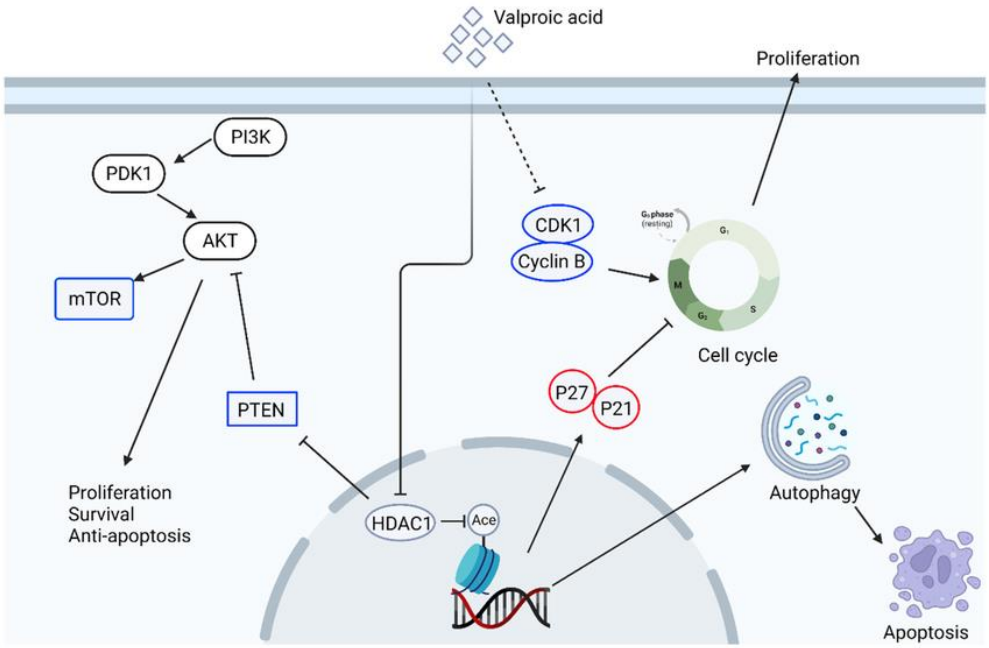


Figure 21 : Voies de signalisation de l'acide valproïque dans les cellules cancéreuses [185]

L'efficacité de ce médicament repositionné a également été démontrée chez un enfant atteint de MB en association avec des agents de chimiothérapie conventionnelle. Cette stratégie de traitement combinatoire plus douce et meilleure en termes de toxicité, de facilité d'administration et de tolérance du patient pourrait être explorée dans cette population de patients dont l'état physique général ne permet pas l'administration d'une chimiothérapie agressive ou une ablation chirurgicale d'emblée [186]. Steven Gill et son équipe soutiennent l'utilisation du valproate de sodium comme traitement adjuvant dans les tumeurs pédiatriques intracrâniennes, montrant sa capacité à renforcer les effets pro-apoptotiques du carboplatine sur cellules de DIPG mutées au niveau de l'histone H3 [187]. Récemment, l'association carboplatine-valproate, délivrée directement dans le pont, a été testé sur une petite cohorte de 13 enfants/jeunes adultes atteints de DIPG traités avec compassion après une radiothérapie. Les résultats de cette étude préliminaire indiquent une bonne tolérance ainsi qu'une amélioration de la survie sans progression et de la survie globale des patients [188]. Le fait que le valproate soit considéré comme un sérieux candidat au repositionnement dans les tumeurs pédiatriques intracrâniennes est finalement marqué par son inclusion dans un programme clinique international en cours pour le diagnostic et le traitement des enfants atteints d'épendymome dont un des sous-groupes a pour objectif de déterminer la tolérabilité du valproate associé à la chimiothérapie standard chez les enfants non éligibles à la radiothérapie [189].

Par ailleurs, les preuves de plus en plus nombreuses d'un lien entre perturbation de la voie dopaminergique et processus oncogénique ont conduit les chercheurs à s'intéresser au repositionnement des antipsychotiques neuroleptiques, antagonistes des récepteurs dopaminergiques au niveau du SNC [190].

Il a ainsi été prouvé que le pimozide, qui diminue la neurotransmission de la dopamine, possède également des propriétés anti-cancéreuses, *via* un mécanisme qui reste à définir [191]. Il pourrait induire la mort des cellules de GB par activation massive de l'autophagie et altération des fonctions lysosomales [192,193]. La capacité du pimozide à inhiber STAT3, facteur de transcription régulant de nombreux gènes liés à l'autophagie, a également été démontrée *in vitro* dans le MB et *in vivo* dans les GB [194]. La synergie observée en associant le pimozide au témozolomide – traitement de référence dans les GB – *in vitro* et *in vivo* [195] renforce l'intérêt de ce médicament repositionné, qui pourrait trouver sa place dans la prise en charge des tumeurs cérébrales.

Neuroleptique de la famille des phénothiazines, la chlorpromazine est un autre exemple de médicament présentant des effets sur cellules de cancers intracrâniens. Elle réduit notamment la prolifération des cellules de GB par inhibition de la cytochrome c oxydase de la chaine respiratoire mitochondriale [196]. Diverses cibles ont été proposées pour expliquer l'effet anticancéreux de la chlorpromazine dans les cellules de GB, telles que des facteurs impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique, avec pour conséquence la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), conduisant à une mort cellulaire médiée par l'autophagie cytotoxique et à des aberrations nucléaires résultant en une catastrophe mitotique [197]. Des changements dans le métabolisme énergétique du GB seraient attribuables à la capacité de la chlorpromazine à inhiber l'enzyme

glycolytique pyruvate kinase M2 [198]. Même si les données dans les tumeurs cérébrales pédiatriques sont encore rares, une première étude, basée sur un criblage *in silico,* a montré une activité de certains médicaments antipsychotiques, incluant la chlorpromazine, dans les cellules de MB [199]. Une toxicité réduite de la chlorpromazine a également été observée pour les cellules non-cancéreuses RPE-1, suggérant une sélectivité pour les cellules cancéreuses particulièrement prometteuse [197]. D'un point de vue clinique, un essai multicentrique de phase II a permis de montrer que l'association de la chlorpromazine au témozolomide chez des patients atteints de GB nouvellement diagnostiqués est bien tolérée mais ne permet pas une amélioration cliniquement pertinente avec une survie globale médiane des patients de 15 mois [200]. La chlorpromazine fait actuellement l'objet d'un autre essai clinique de phase I (NCT05190315) afin de déterminer sa sécurité, sa toxicité et son efficacité lorsqu'elle est administrée tout au long du protocole de traitement standard du GB (associée au témozolomide et à la radiothérapie).

La classe des phénothiazines est riche d'autres candidats au repositionnement dans les tumeurs cérébrales. La prochlorpérazine diminue ainsi la capacité migratoire et invasive des cellules de GB, en modulant les niveaux d'expression de protéines jouant un rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) telles que l'α-tubuline, les intégrines et la E-cadhérine [201]. Cet antipsychotique de première génération a également été révélé à l'issue d'une étude bioinformatique, analysant des données de profil d'expression génétique de patients atteints de MB et de sujets sains afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés ainsi que des médicaments potentiels pour le traitement des MB [202].

De même, l'évaluation de 79 médicaments, dont 14 anti-psychotiques, sur plusieurs modèles cellulaires de GB a permis de mettre en lumière les capacités cytotoxiques de la thioridazine. La thioridazine induit l'autophagie dans les cellules et les sphéroïdes de GB comme le montre l'augmentation du niveau d'expression de LC3-II, marqueur de l'autophagie. Ces bénéfices ont été confirmés *in vivo* dans des modèles murins porteurs de greffes de GB avec une diminution de la progression tumorale [203]. Dans les MB, l'équipe de L. Yeh-Jan a identifié la thioridazine comme un nouveau bloqueur des canaux EAG2 (Ether-a-go-go 2) potassiques voltage-dépendants. Des preuves impliquent le canal EAG2 dans la régulation de la croissance tumorale primaire des MB et les métastases. En le bloquant, la thioridazine a donc démontré une possible efficacité dans la réduction de la croissance des MB et des métastases dans des modèles de xénogreffes [204]. Dans un rapport de cas, cet antipsychotique a également été utilisé, en association à une chimiothérapie palliative métronomique, chez un patient de 22 ans présentant un MB SHH métastatique et une expression robuste d'EAG2 au niveau de sa lésion iliaque. Ce traitement a été associé à une régression mais a dû être interrompu suite à des effets indésirables [204]. Cet antipsychotique propose donc une option de traitement intéressante mais nécessite une amélioration de son profil de toxicité. En effet, sa cardiotoxicité importante a entrainé son retrait du marché en 2005.

Le repositionnement des antipsychotiques a révélé de nouvelles vulnérabilités des cellules cancéreuses soulignant le potentiel à la fois de cibler et de réutiliser les

médicaments antagonistes dopaminergiques. L'implication des récepteurs de la dopamine dans leur activité anti-cancéreuse reste néanmoins à déterminer. La mise en jeu d'autres voies canoniques (sérotoninergique, adrénergique, histaminique et cholinergique…) et non-canoniques pourrait impacter leur efficacité. Enfin, les médicaments antipsychotiques ont des effets secondaires potentiels considérables qui impactent leur tolérance et ils doivent donc être utilisés avec précaution.

Très récemment, l'équipe de Berend Snijder a appliqué une méthode de pharmacoscopie au GB afin de réaliser des criblages à haut-débit directement sur échantillons de patients. En se concentrant sur des agents neuroactifs traversant la BHE, ils ont identifié la vortioxétine, un antidépresseur qui active une cascade de signalisation neuronale, entraînant une augmentation du calcium intracellulaire, une activation des voies essentielles pour la suppression tumorale (AP-1 et BTG2) et ainsi une inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses [205]. Cette méthode innovante pourrait s'appliquer aux tumeurs intracrâniennes pédiatriques.

C. Cardiologie

Comme décrit plus haut, le propranolol, initialement conçu pour traiter l'hypertension et les troubles cardiaques chez l'adulte, représente l'exemple phare de repositionnement de médicaments dans l'hémangiome. Son activité anti-prolifération a été démontré dans les GB [206,207] et il fait même l'objet d'un essai clinique portant sur des gliomes canins [208]. Le repositionnement du propranolol dans le traitement des tumeurs cérébrales pédiatriques est également en cours d'exploration, comme en témoigne l'essai de phase I/II nommé PROVIN (NCT02897986), lancé à l'AP-HM sous la direction du Pr Nicolas André, oncopédiatre et co-directeur de notre équipe. Cet essai évalue l'utilisation du propranolol en association avec un agent de chimiothérapie conventionnelle, la vinorelbine, pour traiter les tumeurs solides réfractaires chez les enfants, incluant les MB et les épendymomes. Dans la troisième partie de mon travail de thèse, nous aborderons leur mécanisme d'action et leurs bénéfices en association avec un autre traitement standard des MB : la radiothérapie.

Les glycosides cardiaques présentent eux aussi un intérêt pour le repositionnement de médicaments dans les tumeurs cérébrales pédiatriques. Utilisée dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et de certains troubles du rythme, la digoxine, chef de file de cette classe thérapeutique, est connue pour inhiber l'expression des facteurs HIFs (hypoxia-inducible factor). Or, une fois activés par des conditions hypoxiques, ces derniers jouent un rôle important dans le développement des cancers en participant à des processus multiples tels que l'angiogenèse, la prolifération, le métabolisme ou encore la migration des cellules tumorales. Joseph *et al.* ont ainsi mis en évidence que l'exposition de cellules de GB à la digoxine prévenait l'EMT, contrant alors la migration médiée par l'activation de HIF1α et la cascade invasion-métastase qui en découle [209]. Une étude réalisée sur près de 300 prélèvements chirurgicaux a montré que les tumeurs cérébrales les plus invasives, chez l'adulte comme chez l'enfant, présentaient des taux supérieurs de ZEB1 (Zinc finger

E-box binding homeobox 1) [210], facteur de transcription au cœur du réseau signalétique contrôlant l'EMT. En inhibant HIF1α, la digoxine s'est montrée capable de réduire l'induction de ZEB1 dans des neurosphères hypoxiques de GB [210]. Si ces données confirment l'intérêt de ce médicament repositionné pour contrôler le processus invasif des cellules cancéreuses, elles mettent aussi en lumière la nécessité d'évaluer ses propriétés anti-migratoires dans des modèles pédiatriques. Les glycosides cardiaques et la digoxine en particulier ont été identifiés, lors d'un criblage d'une banque de plus de 1300 candidats médicaments, comme pouvant inhiber la croissance des MB non-WNT/non-SHH [211]. Cette efficacité serait due à une inhibition des voies de signalisation dépendantes des kinases AKT et ERK, induisant un dysfonctionnement mitochondrial et la mort cellulaire des MB. Le traitement de souris porteuses de PDX (xénogreffes dérivées de patients ou patient-derived xenografts) orthotopiques de MB par la digoxine permet une survie comparable à celle observée avec un schéma de radiothérapie à 20 Gy, mais la survie des animaux est prolongée lorsque ces traitements sont combinés [211].

La proscillaridine A, autre glycoside cardiaque, a monté une activité anti-cancéreuse spécifique envers les cellules tumorales et les cellules souches de GB, sans affecter les cellules saines (astrocytes et oligodendrocytes). Même à faible concentration, ce médicament – en modifiant l'accumulation de la protéine EB1 – freine la migration cellulaire et perturbe la dynamique des microtubules. La proscillaridine A a également révélé son potentiel anti-tumoral en inhibant la croissance de greffes orthotopiques de GB *in vivo*, augmentant ainsi la survie des souris [212,213]. Ces résultats soulignent à la fois le potentiel de l'activité anticancéreuse des glycosides cardiaques mais également la nécessité d'études plus approfondies de ces potentiels candidat au repositionnement.

En tant qu'inhibiteurs compétitifs de la HMG-CoA réductase – enzyme impliquée dans la synthèse du cholestérol –, les statines réduisent non seulement les taux sanguins de cholestérol améliorant ainsi le risque cardiovasculaire, mais présentent également des effets pléiotropes indépendants de leurs effets hypolipémiants. Parmi eux, les propriétés anticancéreuses des statines (Fig. 22) ont attiré beaucoup d'attention et ont indiqué leur potentiel en tant que médicaments repositionnés pour le traitement de différents cancers [214] dont le GB [215].

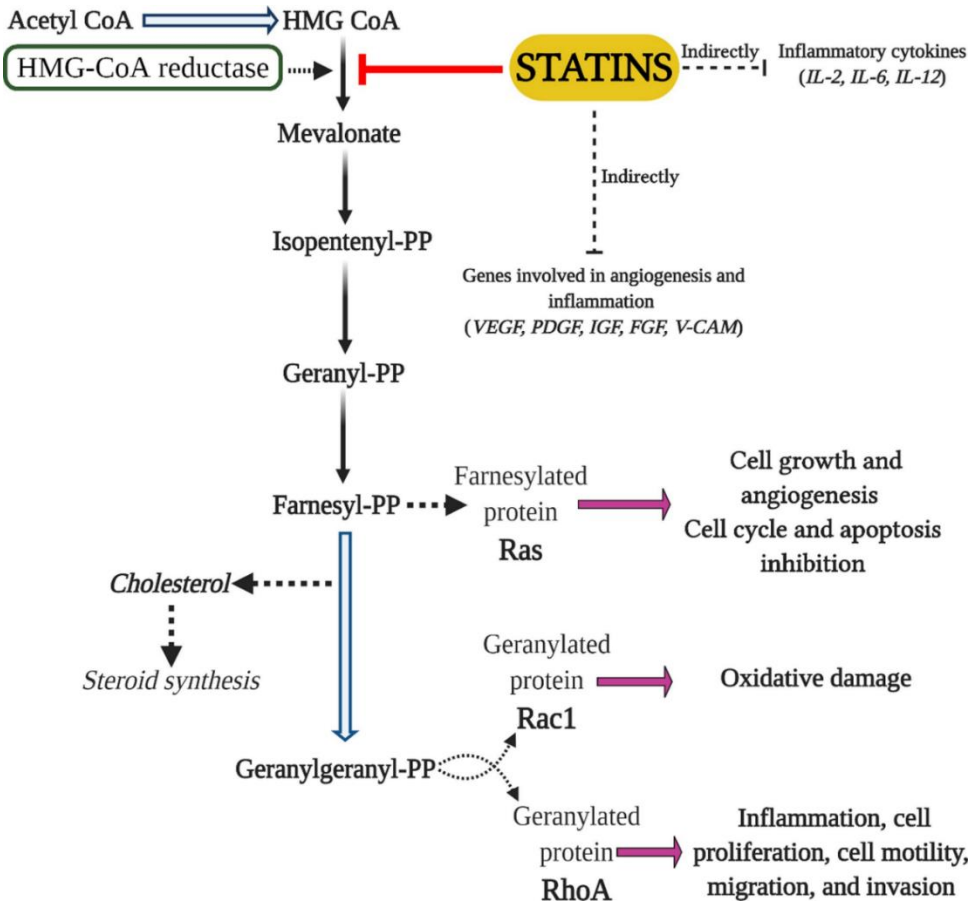


Figure 22 : Mécanisme d'action des statines dans le cancer, figure issue de [215]

Le cholestérol, partie intégrante des membranes cellulaires, participe également à la transduction du signal de la voie HH dans les cellules tumorales. En bloquant l'activité de cette voie, les statines inhibent la croissance tumorale et agissent en synergie avec le vismodegib dans des modèles murins de MB [216]. Enfin, deux essais cliniques de phase I ont cherché à déterminer si elles pouvaient améliorer des thérapies standards utilisées chez les patients atteints de gliome. Un essai a déterminé la dose maximale tolérée (MTD) de la simvastatine en association avec le topotécan et le cyclophosphamide dans les tumeurs solides ou du SNC réfractaires et/ou récidivantes de l'enfant (NCT02390843). Cette combinaison semblait bien tolérée, avec une toxicité hématologique et les effets secondaires attendus associés à la simvastatine ainsi qu'une MTD de 100 mg/m^2/dose [217]. Dans un autre essai (NCT02115074), l'association de la fluvastatine et du célécoxib a été étudiée chez des enfants atteints de gliomes de haut grade et de bas grade réfractaires ou en rechute. Les résultats de cette étude ont montré que l'association avait un bon profil de sécurité et une activité préliminaire intéressante chez les enfants atteints de gliome de bas grade [218]. Étant donné leur activité anti-cancéreuse et leur faible toxicité, ces médicaments déjà approuvés pourraient optimiser le traitement des enfants atteints de tumeurs cérébrales, sous réserve de validations supplémentaires.

D. Anti-diabétique

La metformine, biguanide prescrit pour le traitement du diabète de type 2, est connu pour ses effets anti-hyperglycémiants. Ces derniers reposent sur un ciblage du métabolisme énergétique, marqué par une inhibition du complexe I de la chaine respiratoire mitochondriale, une augmentation de l'activité des transporteurs membranaires du glucose et une stimulation de la synthèse intracellulaire du glycogène (Fig. 23).

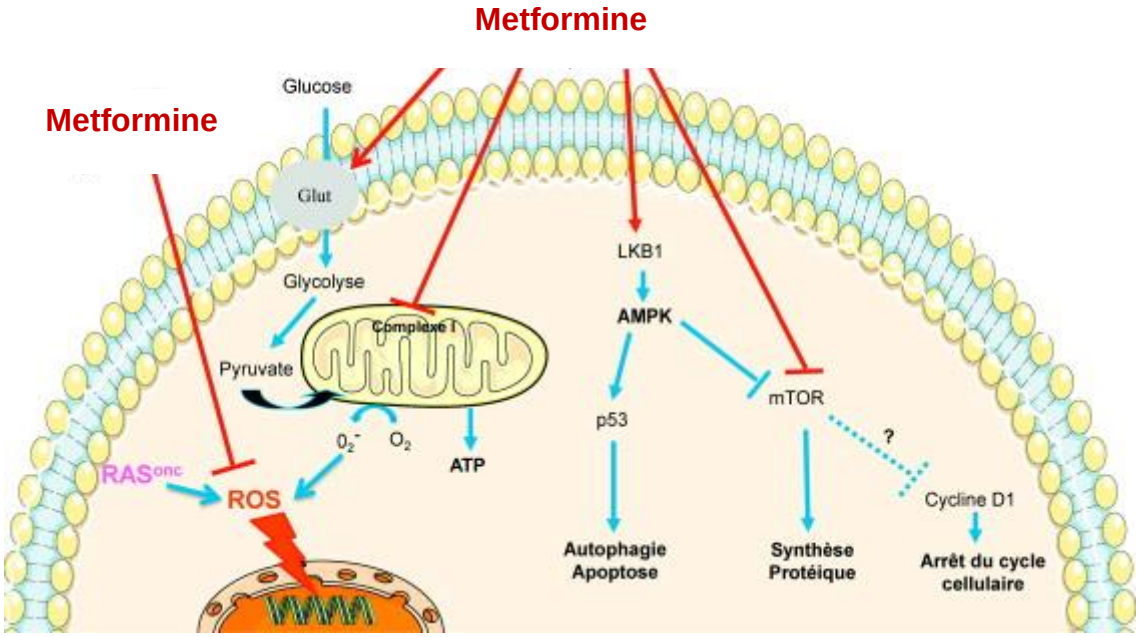


Figure 23 : Mécanismes d'action de la metformine, issue de [219]

Des études épidémiologiques rétrospectives, sur des patients diabétiques, montrent que la metformine exerce également des propriétés antitumorales [220,221], confirmées ensuite par de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. L'équipe de H. Sheng a ainsi mis en évidence le fait que la metformine inhibe la prolifération par blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1 et induit l'apoptose de cellules de MB du sous-groupe SHH [222]. La metformine inhibe aussi la croissance des MB SHH et la formation des métastases *in vivo* [222], résultats en accord avec ceux démontrés 2 ans auparavant par Di Magno *et al.* Avec la phenformine – analogue de la metformine possédant les mêmes propriétés inhibitrices du complexe I mitochondrial – [223]. Ces effets pourraient s'expliquer par l'activation de la protéine kinase AMPK, conséquence directe du stress énergétique déclenché par l'inhibition de la chaine respiratoire mitochondriale. Une efficacité de la metformine, en termes d'inhibition de croissance, a également été démontrée *in vitro* dans des cellules d'épendymomes pédiatriques et *in vivo* sur des xénogreffes dérivées de patients [224]. Ces tumeurs de mauvais pronostic présentent des dérèglements épigénétiques du fait de la perte de la méthylation de l'histone H3K27 et des dérèglements d'ordre métaboliques

marqués par une augmentation à la fois de la glycolyse et du métabolisme du cycle de l'acide tricarboxylique. La metformine est en mesure de contrecarrer ces dysfonctionnements, et ainsi freiner le progression tumorale des épendymomes [224].

L'utilisation des antidiabétiques est également profitable en association avec d'autres traitements. Noch *et al*. Montrent par exemple que la metformine améliore l'efficacité des thérapies ciblant la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3Ki) dans un modèle murin de GB orthotopique. L'induction secondaire d'une hyperglycémie par les PI3Ki résulte en une surproduction d'insuline qui conduit à la réactivation de la voie de signalisation PI3K, rétrocontrôle que la metformine permet d'éviter afin de prolonger l'efficacité du traitement anticancéreux. Le repositionnement de cet antidiabétique est soutenu par le fait qu'un régime anti-hyperglycémique améliore les bénéfices des PI3Ki chez des patients atteints de GB récurrents [225]. Dans une étude menée par M. Dun et ses collaborateurs, des souris porteuses de DIPG et traitées par le PI3Ki paxalisib voient leur survie améliorée grâce à l'ajout de metformine, via la restauration de l'homéostasie du glucose [226]. La metformine se révèle également bénéfique associée à la simvastatine, à la fois dans des cellules de GB *in vitro* en termes de réduction de la prolifération, d'inhibition de la migration ou d'induction de l'apoptose, et *in vivo* associant une survie globale améliorée et une réduction de la progression tumorale [227]. D. Ziegler et son équipe rapporte également que la combinaison de la metformine et du dichloroacétate (DCA), composé inhibiteur de la pyruvate déshydrogénase kinase, présente une efficacité antitumorale améliorée dans des modèles de DIPG résultant d'une catastrophe énergétique [228]. Les bénéfices de la metformine (combinée aux PI3Ki ou au DCA) s'amplifient même lors d'une utilisation associée aux protocoles de radiothérapie standard [226,228]. En plus de son intérêt thérapeutique à proprement parler, la metformine s'est montrée capable d'améliorer les déficiences cognitives induites par les radiations intracrâniennes dans des modèles de cancers pédiatriques chez le rongeur [229]. Un essai clinique pilote (NCT02040376) confirme qu'elle promeut la récupération cognitive et neuronale chez des survivants de tumeurs cérébrales pédiatriques présentant une radiolésion [230], renforçant la contribution que pourrait apporter ce médicament repositionné à la prise en charge des tumeurs cérébrales pédiatriques.

E. Anti-inflammatoires

Le célécoxib appartient à la famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et plus précisément à celle des inhibiteurs sélectifs de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2). Or, la surexpression de COX-2 est un phénomène fréquent dans différentes tumeurs, incluant les gliomes [231]. Il est donc peu surprenant que les inhibiteurs de COX-2 soient considérés comme repositionnables en thérapeutique anticancéreuse, même si les mécanismes d'action sous-jacents restent flous (Fig. 24).

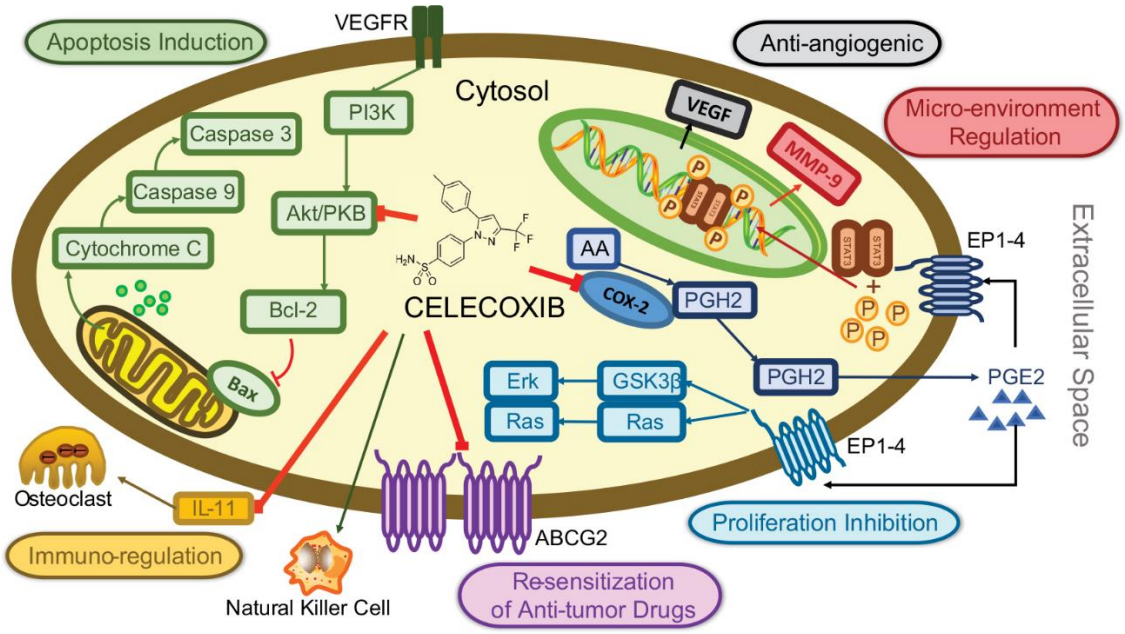


Figure 24 : Mécanismes d'action identifiés du célécoxib dans le cancer du sein, figure issue de [232]

Kang *et al*. Révèlent que le célécoxib inhibe la viabilité des cellules de GB en induisant des dommages à l'ADN, conduisant à un arrêt du cycle cellulaire en G1 et à une mort par autophagie. Cette étude met également en évidence l'importance de p53 fonctionnel dans la sensibilité au célécoxib, pour une réponse anti-GB améliorée [233]. Majchrzak-Celińska *et al*. Proposent, quant à eux, que les COX inhibiteurs affectent la progression du cycle cellulaire, induisent l'apoptose et inhibent la voie Wnt/ β-caténine qui contribue à la progression tumorale lorsqu'elle est activée de façon constitutive dans des cellules primaires de GB dérivées de patients [234].

Associé au témozolomide ou à la radiothérapie, le célécoxib démontre ses capacités à potentialiser ces traitements de référence des GB [234,235]. Le COX inhibiteur présente aussi un effet radiosensibilisant sur des cellules souches cancéreuses de MB, *in vitro* et *in vivo*, en renforçant l'apoptose induite par les rayonnements ionisants [236]. Le célécoxib est connu pour sa capacité à ajouter des effets anti-angiogéniques potentiels et induire une sensibilisation tumorale à la chimiothérapie [237] et il présente également des propriétés immunomodulatrices [238].

Enfin, l'intérêt pour le repositionnement du célécoxib est marqué par la mise en place de plusieurs essais cliniques. L'équipe de N. André rapportent ainsi le cas d'un garçon de 8 ans atteint d'une tumeur tératoïde rhabdoïde atypique et qui, après échec du traitement standard, a vu ses signes cliniques et ses symptômes stabilisés par une polychimiothérapie incluant le célécoxib en continu (sous forme orale) [239]. Cette même équipe a mené un essai multicentrique de phase II dans des gliomes de bas grade en rechute, visant à évaluer un traitement associant le célécoxib, à la vinblastine et au cyclophosphamide en alternance avec le méthotrexate. Le schéma thérapeutique à quatre médicaments décrit ici a été plutôt bien toléré et a montré une activité antitumorale, même chez les patients ayant déjà reçu un traitement à la vinblastine, justifiant des

explorations supplémentaires [240]. Une autre étude de phase II multicentrique, menée chez des enfants ayant un MB récurrent/progressif, a inclus du célécoxib en association avec du thalidomide, du fénofibrate, différents agents de chimiothérapie (métronomique) et une thérapie ciblée antiangiogénique (bevacizumab). Ce traitement combinatoire a montré une activité prometteuse chez ces jeunes patients fortement pré-traités présentant un MB en rechute– avec une survie globale médiane de 25,5 mois – et a été bien toléré. En plus de son caractère ambulatoire permis grâce à des formes majoritairement orales, cette stratégie thérapeutique mérite donc une attention particulière [241].

La dexaméthasone est un corticoïde de synthèse, dont l'indication première est liée à ses actions anti-inflammatoire et anti-allergique. Les études de Heine *et al.* Indiquent que la dexaméthasone inhibe aussi la croissance tumorale des MB du groupe SHH, améliorant ainsi la survie des souris porteuses de ces tumeurs pédiatriques [242]. Ces effets seraient le résultats d'une réduction du niveau d'expression de l'oncogène *N-myc*, impliqué dans la tumorigenèse des MB [242]. Dans des modèles murins de DIPG mutant H3.3K27M, la dexaméthasone s'est montrée capable de potentialiser l'efficacité du dasatinib – inhibiteur de la kinase BCR-ABL – associé au tariquidar – inhibiteur des pompes d'efflux P-gp –, entraînant une apoptose cellulaire tumorale accentuée et une survie améliorée des animaux [243]. Cependant, une étude rétrospective menée chez 172 patients atteints de gliomes de bas grade pédiatriques n'a révélé aucune amélioration significative des taux de croissance tumorale, survie sans progression, ou survie après résection dans la cohorte ayant reçu la dexaméthasone en périopératoire [244]. La dexaméthasone est utilisée depuis de nombreuses années pour traiter les effets secondaires liés à l'irradiation intra-crânial ainsi que l'œdème cérébral et l'inflammation provoqués par le GB chez l'adulte et le DIPG chez l'enfant, mais son efficacité est remise en question. Les stéroïdes associés à divers effets secondaires indésirables comme une immunosuppression sévère et des changements métaboliques (hyperglycémie) peuvent nuire à la survie des patients [245]. Très récemment, Watson *et al*. Ont montré que l'association de la dexaméthasone à un inhibiteur de la voie TGF-β permettait d'empêcher la formation de tissus cicatriciels qui protègent les cellules tumorales résiduelles de GB après traitement, réduisant ainsi le risque de rechute [246]. Même si des doutes subsistent quant au véritable impact clinique du repositionnement de la dexaméthasone, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour valider pleinement ses avantages et ses effets secondaires dans une population pédiatrique.

F. Traitement de la dépendance alcoolique

Le disulfirame est un médicament initialement utilisé pour le sevrage alcoolique, du fait de ses fonctions inhibitrices de l'alcool déshydrogénase, provoquant des sensations désagréables telles que rougeurs faciales, nausées, vomissements, céphalées, palpitations, essoufflements et vertiges, dissuadant ainsi la consommation d'alcool. En 1977, le Dr Lewison enregistrait déjà l'activité antinéoplasique du disulfirame. Une patiente de 35

ans, atteinte d'un cancer du sein présentant des métastases systémiques, avait en effet reçu du disulfirame pour son syndrome d'alcoolisme sévère et était restée cliniquement indemne pendant 10 ans sans recevoir aucune forme de traitement anticancéreux supplémentaire [247]. En 2009, le disulfirame est identifié par un criblage à haut débit comme agent antinéoplasique inhibant la prolifération de cellules de cancer de la prostate sans affecter les cellules épithéliales prostatiques non malignes (RWPE-1 et EP156T) ; activité sélective ensuite confirmée *in vivo* [248].

L'activité anticancéreuse du disulfirame est significativement renforcée par une supplémentation en Cu2+, conduisant à de nombreuses investigations sur cette forme combinatoire (DSF/Cu). Allensworth *et al.* Démontrent ainsi que le complexe formé par le disulfirame et le cuivre agit comme un pro-oxydant et induit une mort apoptotique des cellules de cancer du sein inflammatoire médiée par un stress oxydatif *in vitro* et *in vivo*. Le DSF/Cu agirait sur plusieurs cibles afin d'induire l'apoptose, comme illustré dans la Fig. 25 [249].

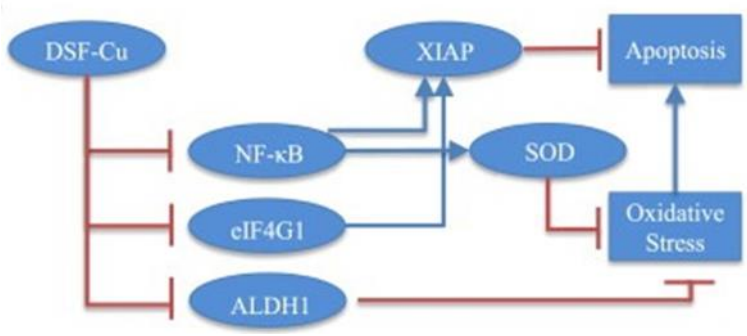


Figure 25 : Proposition des mécanismes d'action du DSF-Cu, issue de [249]

Dans le cancer du sein toujours, Zhang *et al.* Ont montré que l'association DSF/Cu induisait la mort cellulaire et sa combinaison à un inhibiteur pan-PI3K entraînait une inhibition significative de la croissance cellulaire par rapport aux médicaments seuls *in vitro* et *in vivo* [250].

Un criblage à haut débit a également révélé l'efficacité du disulfirame contre un large panel de cellules initiatrices de tumeurs cérébrales dérivées de patients – GB essentiellement –, y compris celles présentant une résistance aux thérapies anticancéreuses conventionnelles. En agissant comme un puissant inhibiteur du protéasome, le DSF/Cu altère le fonctionnement des voies de réparation de l'ADN [251]. Le médicament repositionné présente également une activité anti-angiogénique, comme montré dans des cellules de GB dont la sécrétion de VEGF est fortement diminuée puis validé sur des xénogreffes sous-cutanées et intracérébrales de GB dont la densité des microvaisseaux est significativement réduite [252]. En 2017, les travaux de Skrott *et al*. Proposent que la cible moléculaire commune aux différents effets suppresseurs de tumeurs du DSF soit NPL4 – adaptateur de la ségrégase p97 – dont l'inhibition provoque une accumulation de protéines poly-ubiquitylées, induit un stress du réticulum

endoplasmique et déclenche l'apoptose, conduisant à la mort des cellules cancéreuses [253]. Dans les tumeurs pédiatriques que sont les MB, le DSF/Cu prolonge également la survie des modèles murins en induisant la mort cellulaire par augmentation de l'expression nucléaire de NPL4 et accumulation de protéines poly-ubiquitylées [254]. Malgré la découverte de cette cible, les investigations se poursuivent et ne s'accordent pas toujours sur le mécanisme d'action moléculaire du disulfirame dans les différents modèles tumoraux.

Le disulfirame régule également le microenvironnement immunitaire tumoral. En effet, Terashima *et al.* Ont démontré que ce médicament agit comme un puissant inhibiteur de FROUNT, un régulateur de signal de chimiokines. En l'inhibant, le disulfirame réduit l'activité de promotion tumorale des macrophages associés aux tumeurs et la progression tumorale [255].

Le disulfirame exerce également ses effets antitumoraux *in vitro* et *in vivo* en activant la signalisation du récepteur des lymphocytes T (TCR) et en favorisant l'immunité antitumorale en activant les cellules T CD8 +, dans le mélanome et le cancer du côlon [256]. Dans les gliomes pédiatriques, le disulfirame induirait la mort des cellules cancéreuses et des cellules souches tumorales dérivées des patients par dégradation de l'oncoprotéine MLL, perturbant ainsi sa fonction de méthylation de l'histone H3K4 et permettant de réduire l'expression de gènes oncogéniques, expliquant ses propriétés anticancéreuses [257]. Dans le neuroblastome, la lysine acétyltransférase 2A (KAT2A) serait une cible privilégiée du disulfirame qui, en réduisant de manière significative le niveau d'expression de cette protéine ayant pour rôle l'acétylation des histones, induit l'arrêt du cycle cellulaire *in vitro* et retarde considérablement la progression du neuroblastome *in vivo* [258]. L'utilisation du disulfirame pourrait être également bénéfique dans les AT/RT pédiatriques, dont l'expression élevée en aldéhyde déshydrogénase (ALDH) semble favoriser la réponse au médicament repositionné en termes d'induction de l'apoptose et d'arrêt du cycle cellulaire *in vitro*, conduisant à une réduction du volume tumoral et à une amélioration de la survie chez des souris AT/RT traitées au disulfirame [259].

Les multiples voies induites par le DSF (Fig. 26) lui permettent de s'associer efficacement avec plusieurs traitements de référence, potentialisant ainsi la radiothérapie [260], les chimiothérapies [251,259,261] et les thérapies ciblées [250,256]. Les effets radiosensibilisants et chimiosensibilisants du DSF lui permettrait de s'inscrire dans les protocoles de traitement actuels des tumeurs cérébrales pédiatriques et constituerait une stratégie thérapeutique viable pour les jeunes patients en réduisant potentiellement les doses de rayonnement et de chimiothérapie.

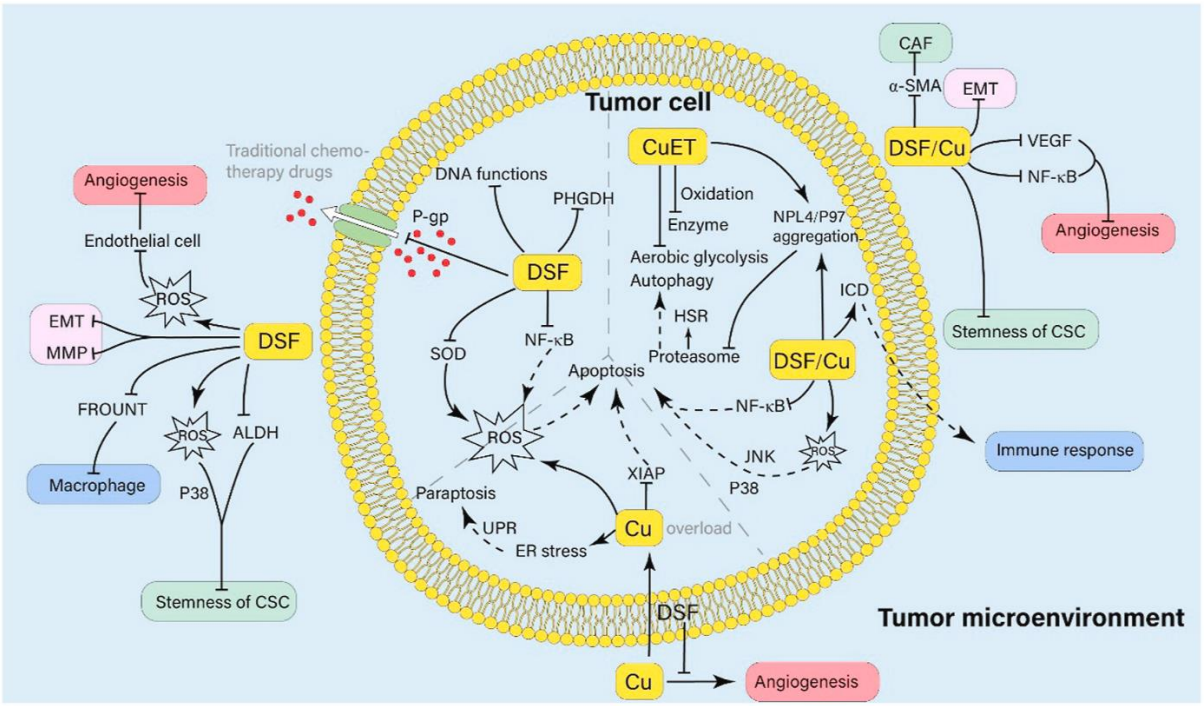


Figure 26 : Mécanismes anticancéreux proposés du DSF, Cu, DSF/Cu (et CuET) dans les cellules tumorales et le microenvironnement tumoral, figure issue de [262]

Cependant, d'un point de vue clinique, un essai randomisé a révélé que l'ajout du DSF/Cu à une combinaison d'agents de chimiothérapie conventionnelle n'apportait pas de bénéfice chez les patients atteints de GB récurrent [263].

Bien que des résultats anticancéreux encourageants soient obtenus en laboratoire, les résultats cliniques du disulfirame oral sont donc décevants. Les mécanismes métaboliques – dans le foie notamment – pourrait expliquer en partie pourquoi le traitement du cancer par administration orale de DSF n'obtient pas de résultats prometteurs et reproductibles en clinique. Des progrès dans les stratégies d'administration et les schémas thérapeutiques sont donc encore à faire pour permettre d'envisager une thérapie anticancéreuse à base de disulfurame et cuivre [262].

G. Quelques molécules inattendues

Les substances naturelles végétales ont fourni un bon nombre de molécules et sont utilisées depuis des centaines d'années. Néanmoins, ces substances naturelles sont à utiliser avec autant de précautions qu'une spécialité déjà approuvée. En effet, elles peuvent interagir avec d'autres médicaments dans l'organisme et ainsi exposer à des risques.

Divers polyphénols naturels – certains flavonoïdes par exemple – sont considérés comme des molécules à potentiel notamment pour le traitement du GB en modulant les voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse, l'apoptose, la chimiorésistance et

l'invasion cellulaire [264]. Parmi ces composés, la curcumine est un principe actif naturellement présent dans le curcuma, plante utilisée depuis des millénaires à des fins culinaires et aux vertus anti-inflammatoires et antioxydantes [265]. Dans les cellules tumorales de MB, la curcumine induit une réduction de l'activité des HDAC, conduisant à une augmentation de l'acétylation de la tubuline, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et enfin l'apoptose [266]. Ces bénéfices sont confirmés *in vivo*, puisque l'administration de curcumine réduit la croissance tumorale des MB et augmente de manière significative la survie des souris [266]. Ainsi, son activité anti-cancéreuse, ses effets secondaires qui semblent limités, et sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique font de la curcumine une molécule naturelle avec un potentiel de repositionnement dans les tumeurs intracrâniennes à approfondir.

Les cannabinoïdes font, quant à eux, partie des nombreux composés actifs présents dans la plante de cannabis (ou chanvre). Le cannabidiol (CBD) et le Δ9-tetrahydrocannabinol (THC) en sont les plus largement étudiés. Les cannabinoïdes sont connus pour induire l'arrêt du cycle cellulaire, en partie par la production d'espèces réactives de l'oxygène, l'autophagie et l'apoptose. Le CBD favorise également la liaison à l'ADN et empêche simultanément une modification post-traductionnelle de la sous-unité NF-κB RELA, qui entraîne la mort des cellules de GB. Les études *in vitro* et *in vivo* ont également démontré l'interdépendance entre les ROS et la mort tumorale déclenchée par le CBD et ont confirmé le pouvoir prédictif des ROS pour le traitement par le CBD en neuro-oncologie préclinique [267]. Enfin, après avoir apporté les preuves pré-cliniques de l'inhibition de l'angiogenèse tumorale – par une diminution de la production de VEGF et de l'activation de VEGFR-2 – et de l'induction de l'apoptose dans les GB [268,269], une étude clinique visant à évaluer l'action antitumorale des cannabinoïdes a été menée par l'équipe de M. Guzman. Lors de cet essai pilote de phase I, neuf patients en phase terminale présentant des GB récurrents, en croissance active ayant déjà échoué au traitement standard (chirurgie et radiothérapie), ont reçu une administration intratumorale de THC. Bien que l'utilisation des cannabinoïdes en médecine puisse être limitée par leurs effets psychotropes bien connus, l'administration intracrânienne de THC s'est avérée sûre et sans effets psychoactifs manifestes. Le THC a également inhibé la prolifération des cellules tumorales *in vitro* et a diminué l'immunocoloration Ki67 des cellules tumorales lorsqu'il a été administré à deux patients [270]. De plus, Messinger *et al.* Ont montré que l'inhibition d'ID1 (DNA-binding protein inhibitor) par le CBD diminuait l'invasion et la migration des cellules de gliomes diffus de la ligne médiane (DMG), tumeurs cérébrales pédiatriques incurables provenant des cellules gliales du SNC. *In vivo*, le knockdown d'*ID1* dans les cellules DMG réduit la croissance tumorale et améliore la survie des souris [271]. A l'inverse, aucune augmentation de la survie n'a été observée après administration orale ou intrapéritonéale de THC et de CBD, en monothérapies ou en association avec l'agent de chimiothérapie cyclophosphamide, dans des modèles murins de MB et d'épendymomes de haut grade [272]. Si leur activité anticancéreuse a été démontrée dans des modèles de cancers chez l'adulte, peu d'études cliniques évaluent leur intérêt dans les cancers pédiatriques [273]. Malgré le fait que les cannabinoïdes soient généralement bien tolérés,

des défis importants subsistent avant de pouvoir être utilisés chez des enfants dont le cerveau est en développement. Des problèmes d'administration, d'effets potentiels hors cible ou de variabilité inter-patients doivent être résolus pour traduire de façon pertinente les résultats précliniques et cliniques et réaliser pleinement le potentiel de ces molécules candidates au repositionnement.

Objectifs de la thèse

Ce travail explore de nouvelles options thérapeutiques pour la prise en charge des MB. Dans la première partie expérimentale, nous rapportons notre étude sur des modèles cellulaires variés (cultures 2D, sphéroïdes 3D et modèles organotypiques) qui vise à définir si les médicaments antagonisant les récepteurs sérotoninergiques, tels que la métergoline, peuvent présenter des propriétés anti-cancéreuses en monothérapie ou en association avec d'autres médicaments repositionnés. Une deuxième partie expérimentale analyse plus en détails l'activité chimio-sensibilisatrice de la métergoline avec des agents de chimiothérapie conventionnelle comme la vincristine et avec des thérapies ciblées telles que l'anti-EGFR Osimertinib. Avec l'exemple des β-bloquants, cette partie s'attache également à évaluer la compatibilité entre médicaments repositionnés et protocoles de radiothérapie dans les MB. Enfin, la dernière partie de ce manuscrit souligne l'importance de poursuivre également des recherches classiques de recherche et développement de nouvelles molécules pour diversifier les options thérapeutiques. Ces travaux ont en commun leur objectif à terme : accélérer l'innovation thérapeutique et augmenter les chances de trouver des solutions efficaces et peu toxiques, qui contribueraient à améliorer la qualité de vie des jeunes patients atteints de MB.

Partie 2 : Travaux de thèse

Cibler la voie de signalisation sérotoninergique :
vers de nouvelles options thérapeutiques
pour le médulloblastome

I. Avant-propos

Comme décrit dans la partie introductive (*cf* Partie 1), les **médulloblastomes** représentent les tumeurs cérébrales malignes les plus fréquentes chez l'enfant. Bien que les progrès réalisés dans le domaine de la neuro-oncologie aient permis d'améliorer les taux de survie des jeunes patients, ces avancées n'effacent pas les conséquences sur le long terme. Les traitements multimodaux actuels sont en effet encore trop souvent associés à des effets secondaires graves et durables qui affectent profondément la qualité de vie des survivants. Une des limites au développement de nouveaux médicaments, et notamment de thérapies ciblées, réside dans le fait qu'il existe peu de biomarqueurs communs aux différentes types de tumeurs cérébrales pédiatriques [274]. Rien qu'au sein de la famille des MB, chaque sous-type de tumeur présente un ensemble unique de mutations et d'altérations moléculaires [275], compliquant la tâche des chercheurs pour identifier des cibles thérapeutiques pouvaient être exploitées dans plusieurs sous-groupes de patients. Cette hétérogénéité, tant sur le plan moléculaire que clinique, ajoute donc une complexité supplémentaire à la prise en charge de cette pathologie. De plus, la localisation anatomique des MB représente également un des principaux obstacles au développement d'options thérapeutiques efficaces. La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une structure vasculaire multicellulaire qui sépare le SNC de la circulation sanguine périphérique. Sa perméabilité extrêmement faible a pour fonction de protéger le cerveau des agents pathogènes circulant dans le corps et de maintenir l'homéostasie cérébrale en régulant l'afflux et l'efflux à l'interface sang-cerveau. Bien que ce mécanisme de protection soit essentiel au bon fonctionnement du cerveau humain, cette barrière peut également conduire à une situation où les cellules tumorales se voient – au moins en partie – protégées du ciblage thérapeutique [90]. Parvenir à une diffusion suffisante à travers la BHE est donc une préoccupation majeure lors du développement de traitements destinés aux MB, et de façon plus générale aux tumeurs intracrâniennes [276].

Face à ces défis, le **repositionnement de médicaments** apparaît comme une opportunité pour offrir rapidement des solutions thérapeutiques novatrices. Reposant sur des médicaments dont le profil de toxicité et la pharmacocinétique – incluant le passage de la BHE – sont connus, cette approche pourrait rapidement offrir de nouvelles pistes pour optimiser la prise en charge des MB et améliorer la qualité de vie des patients. Des travaux récents sur des cancers du sein triple-négatif et gastriques ont proposé que l'expression de différents sous-types de récepteurs sérotoninergiques (5-HTR) puisse constituer un biomarqueur pronostique [277,278]. Par ailleurs, l'activation de la **voie de la sérotonine** (5-hydroxytryptamine ou 5-HT) soutiendrait la progression tumorale, comme décrit dans les cancers de la prostate, colorectal, du sein ou du poumon à petites cellules (revue détaillée dans [279]). Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier la possibilité de réduire la progression des MB à l'aide d'inhibiteurs des 5-HTR. La sérotonine est un neurotransmetteur clé qui régule de nombreuses fonctions physiologiques, dont l'humeur, le comportement, le sommeil, et la cognition [280]. Ces dernières reposent sur sa liaison à un panel de 7 familles de récepteurs (notées 5-HTR_1 à 5-HTR_7) comprenant une quinzaine de sous-types différents [281]. La plupart de ces

récepteurs sont couplés aux protéines G (GPCRs) qui, selon leurs cofacteurs privilégiés, déclenchent de multiples cascades signalétiques intracellulaires. Dans les cellules cancéreuses, l'activation des récepteurs 5-HTR$_1$ et 5-HTR$_2$ activeraient ainsi la voie PI3K/Akt/mTOR, favorisant la survie cellulaire, ainsi que la voie ERK/MAPK, stimulant la prolifération tumorale (Fig. 27). Les récepteurs 5-HTR$_4$, 5-HTR$_6$, et 5-HTR$_7$ stimuleraient quant à eux la croissance et la survie cellulaire tumorales en déclenchant la voie PKA/AMPc [282].

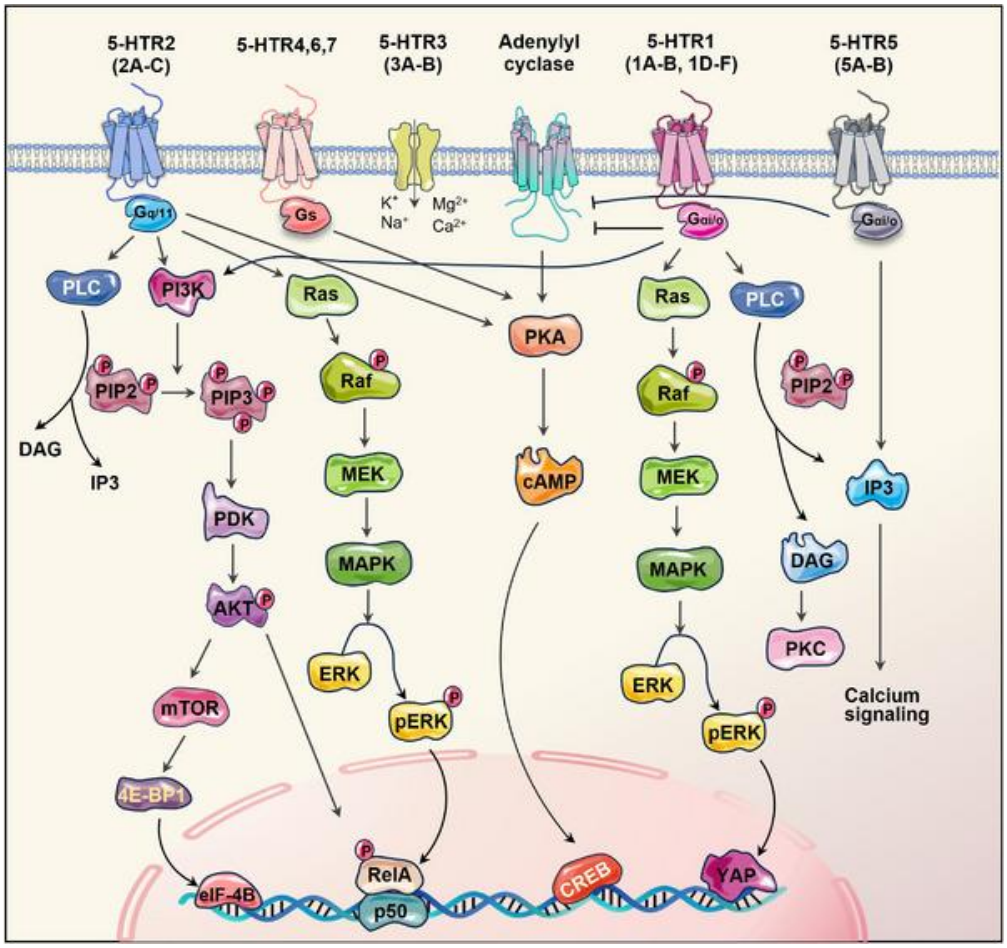


Figure 27 : Sous-types et voies de signalisation des récepteurs de la sérotonine (5-HTR) [282]

Ainsi, les récepteurs et les acteurs du réseau sérotoninergique pourraient constituer des cibles de choix dans une démarche de développement de nouvelles options thérapeutiques, mais aussi se révéler à l'avenir être des biomarqueurs de réponse au traitement dans les MB.

II. Résultats

Title

Targeting the serotonergic signaling pathway to develop novel therapeutic options for medulloblastoma

Authors

Mélanie Matteudi[1], Marie-Pierre Montero[1], Kevin Muller[1,4], Patricia Piris[1], Baptiste Mouysset[1], Paul Brémond[1,5], Christine Roux[1], Véronique Bourgarel[1,3], Marion Le Grand[1], Nicolas André[1,2], Manon Carré[1] and Eddy Pasquier[1,2].

[1]Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Aix-Marseille Université, CNRS, Inserm, Institut Paoli Calmettes, Marseille, France

[2]Service d'Hématologie & Oncologie Pédiatrique, Timone Hospital, AP-HM, Marseille, France

[3]Direction de la recherche, AP-HM, Marseille, France

[4]Plateforme Hits, CRCM, Marseille, France

[5]Plateforme DOSynth CRCM, Marseille, France

Corresponding authors at : Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin 13005 Marseille, France.

Email adresses : manon.carre@univ-amu.fr (M. Carré), eddy.pasquier@inserm.fr (E. Pasquier)

Abstract

Medulloblastomas (MB) are embryonal tumors of the cerebellum and the most common childhood brain cancers. Despite major advances in their therapeutic management - combining surgery, radiotherapy and chemotherapy -, 30% of MB patients remain without effective long-term treatment. In addition, because young patients are exposed to highly toxic treatments very early in their development, survivors often have long-lasting side effects that are a major concern. To broaden the range of clinically effective and better-tolerated therapeutic options, our strategy is to apply drug repurposing, which consists in using already approved drugs in new indications. In this study, we explored whether pharmacologically targeting serotonin receptors (5-HTR) could represent a novel therapeutic strategy for MB. Indeed, there is increasing evidence that 5-HTR overexpression correlates with tumor progression in various cancers, which led us to screen a library of 5-HTR antagonists in human non-WNT/non-SHH MB cells. We identified metergoline, a drug initially used for the treatment of hyperprolactinemia-related disorders, as a potent compound that reduces MB survival and migration in both 2D cultures and 3D spheroids. A drug combination screen was then performed using a custom-made library of 110 approved drugs. It revealed a highly synergistic combination between metergoline and the antifungal agent itraconazole. We confirmed the benefits of this co-treatment in *ex vivo* organotypic cerebellar models. Lastly, using metergoline derivatives modified by click chemistry, we showed that the benzyl-carbamate radical is essential for its activity in MB cells. Collectively, these findings suggest that targeting the serotonergic pathway represents a promising therapeutic strategy for childhood MB.

Introduction

Medulloblastomas (MBs) are embryonal tumors of the cerebellum that represent the most common type of malignant brain tumor in childhood, accounting for around 25% of pediatric central nervous system (CNS) cancers. These tumors arise from immature neural cells in the cerebellum, a region of the brain responsible for motor coordination. Classically, MBs have been subdivided into four main subgroups based on distinct transcriptomic and epigenetic profiles: the WNT, SHH, group 3 and group 4 subgroups. The WNT and SHH groups are better characterized, being defined by activation of the WNT and SHH signaling pathways, respectively, and presenting a more favorable prognosis compared to the other subtypes [1]. However, the so-called non-WNT/non-SHH groups, which include groups 3 and 4, account for almost 60% of cases and are characterized by increased molecular and genetic heterogeneity, often correlated with an unfavorable prognosis. In particular, group 3 MB is associated with a high risk of early CNS metastases and a poor response to conventional therapies, leading to higher mortality in these patients [2]. Current therapeutic strategies for MB include a multimodal approach combining surgery, radiotherapy and chemotherapy, enabling long-term overall survival of 60-75%, depending on the molecular subtype and disease extension [1]. However, this improved survival is associated with severe side effects, such as neurocognitive, endocrine and sensory deficits, which have a lasting impact on the quality of life of cured patients [3]. These sequelae, mainly linked to radiotherapy and high-dose chemotherapy, underline the need to develop more targeted, less toxic therapies for children with MB.

To address this medical challenge, we turned to drug repurposing, which involves exploring in new pathologies the efficacy of drugs already approved for other indications. This approach has several advantages: the toxicity and pharmacokinetic profiles of repurposed drugs are already well established, thus reducing the risks associated with clinical development, while accelerating entry into Phase II clinical trials [4]. In this context, we have chosen to focus on targeting serotonin (5-HT), a neurotransmitter widely implicated in the regulation of mood and behavior, which can also act on other systems, notably the immune system and cancer cells, via its receptors (5-HTR) distributed throughout the entire organism. Indeed, 5-HTRs are expressed in many cell types, including cancer cells. Recent studies have shown that overexpression of certain 5-HTR subtypes is correlated with the development and aggressiveness of several cancers, such as glioblastoma, melanoma, and malignant tumors of the breast, lung and pancreas [5]. By blocking 5-HTR activation, serotonergic antagonists inhibit various downstream signaling pathways that are kinase cascades involved in the activation of transcription factors such as NF-κB and CREB, thus leading to the induction of genes implicated in cell proliferation, migration and survival – three processes that are critical to tumor progression [6]. Here, we showed that targeting serotonergic receptors is a promising avenue for improving MB therapy. We provide evidence that repositionable 5-HTR antagonists, and especially metergoline, significantly reduce MB survival and migration in 2D cultures, 3D spheroids and organotypic models. We then used a click cytometry approach with metergoline structural derivatives, which indicates that the benzyl-carbamate radical of metergoline is essential for its activity in MB cells, and strongly suggests that metergoline binding to 5-HTRs is a key step in its anticancer efficacy. We finally carried out a combinatorial drug screening, which revealed that itraconazole further increased MB cell sensitivity to metergoline, opening potential therapeutic avenues for MB patients.

Material and methods

Cell culture

The human MB cell line D341 Med (RRID: CVCL_0018) was obtained from the ATCC biobank. HDMB-03 cells (RRID: CVCL_S506) were kindly provided by Sonia Martial and Gilles Pagès from the Institute for Research on Cancer and Aging (Nice, France), the human ONS-76 (RRID: CVCL_1624) by Janet Lindsey and Steven Clifford from the Wolfson Childhood Cancer Research Center (New Castle, UK) and the human D425 Med (RRID: CVCL_1275) and D458 Med (RRID : CVCL_1161) cell lines by Célio Pouponnot from the Curie Institute (Paris, France). HD-MB03, D341 Med, D425 Med, D458 Med and ONS-76 cells are representatives of non-WNT/non-SHH MB. All the cells were maintained at 37°C and 5% CO_2. HDMB-03 cells were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco, ref. 21875034) supplemented with 10% FCS, 1% Non-Essential Amino Acids (Gibco, ref. 11140035) and 1% PS. ONS-76 cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and 1% PS. D341 Med cells were maintained in MEMα medium supplemented with 20% FCS and 1% PS. D425 Med and D458 Med cells were maintained in MEMα medium supplemented with 10% FCS and 1% PS. A mtDsRed plasmid has been transfected in each cell line using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, ref. 11668019) following the manufacturer's protocol. Stable transfectants were obtained after geneticin selection (0.8 mg/mL, Gibco, ref. 10131035) and two cycles of fluorescence-activated cell sorting (FACS). All the cells were tested for the absence of mycoplasma contamination (MycoAlert^{TM}, ref. #LT07-418, Lonza) at least once a month.

Drugs and reagents

The drugs were resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO). Stock solutions were stored at -20°C for Metergoline (50 mM, Sigma-Aldrich, ref. #M3668) and Cabergoline (50 mM, Selleckchem, ref. #S5842). The solutions are diluted in culture medium ex-temporaneously for the experiments. All drugs used in our custom-made libraries and for validation were suspended in DMSO at 10 mM and stock solutions were stored at −80 °C (Table S1 and S2 for details). Catalog No.,

Screening of a serotonin antagonist library

Briefly, 3,000 living cells from the HD-MB03, ONS-76, D-341 Med, D-425 Med and D-458 Med cell lines were seeded per well with the Certus Flex® (GyGer) in 384-well plates (Corning, #3830). Cells were incubated in the presence of a custom-made drug library containing 16 serotonin antagonists. Drugs were distributed with the Echo 550 liquid dispenser® (Labcyte) at 6 different concentrations covering 3 logs (*i.e.*, 100 nM - 100 μM) in constant DMSO. Cell viability was evaluated using CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay (Promega, #G9243) after 72 h drug incubation in a humidified environment at 37 °C and 5% CO2. Luminescence was measured using a PHERAstar® plate reader (BMG). Data were normalized to negative control wells (DMSO only). IC_{50}, defined as half maximal inhibitory concentration values, and AUC (Area Under the dose response Curve — %.mol. L^{-1}) were obtained using ic50, drc, ggplot2 and PharmacoGx script packages from R studio.

Cell growth and survival assays

Cell viability assays were performed as previously described [7]. Briefly, the human MB cells were seeded in flat bottom 96-well microplates (2,000 cells/well for ONS-76; 9,000 cells/well for HD-MB03 and D283 Med; 12,000 cells/well for D341 Med; 15,000 cells/well for D425 Med and D458 Med) for 24 h. Cells were then exposed to increasing concentrations of drugs for 72 h. To measure the synergy of drug combinations, cells were treated with a 6 × 5 combination matrix containing two compounds at different concentration ratios

for 72 h. Metabolic activity was detected by addition of Alamar Blue and spectrofluorimetric analysis using a PHERAstar® FS multi-Plate Reader (BMG LABTECH; λ_{ex} 540 nm / λ_{em} 590 nm). IC_{50} values were determined as previously described [8]. Cell viability was determined and expressed as a percentage of untreated control cells. To assess the synergy score of the tested combinatorial treatments, Bliss heatmaps were generated using the SynergyFinder web application (https://synergyfinder.fimm.fi) [9].

Spheroid growth assay

DsRed-expressing MB cells were plated in round bottom 96-well microplates (1200 cells per well for HD-MB03 and 2000 cells per well for ONS-76) in a culture medium containing 20% methyl cellulose (Sigma-Aldrich, ref. M7027) for 72 h. Spheroids were then exposed to metergoline. Spheroid growth over time was quantified by acquisition of DsRed fluorescence signal for 14 consecutive days using the PHERAstar® FS multi-plate reader (λex 580 nm/λem 620 nm – "well scanning" mode 10 × 10). Images were captured with the 4X objective of the JuLI™Stage live imaging system (NanoEntek).

Cerebellar organotypic models

As previously described [10,11], to establish organotypic cultures of cerebellar tissues, mouse cerebellums were surgically harvested and sectioned into 250 µm thick slices using a vibrating blade microtome (RRID:SCR_016495). A spheroid formed from DsRed-expressing MB cells was then grafted onto each cerebellum slice. These organotypic co-culture models were then placed on inserts with 0.4 µm pore size membranes (Falcon®, ref. 353090) and maintained in medium containing 48% MEMα, 25% horse serum (Gibco, ref. 16050122), 25% Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS; Gibco, ref. 14065056), 10 mM HEPES buffer (Gibco, ref. 15630106), 28 mM Glucose (Gibco, ref. 15023021), 1% L-Glutamine (Gibco, ref. 25030081) and 1% PS. After exposure to Metergoline and/or Itraconazole every 4 days, tumor growth and invasion within the cerebellum slices were analyzed over time, using the JuLI™ Stage imaging system and the PHERAstar® FS multi-plate reader (λ_{ex} 580 nm / λ_{em} 620 nm - fluorescence signal acquisition with a 15x15 matrix scanning mode).

High-throughput drug combination screening

Briefly, 3,000 living cells from the HD-MB03, ONS-76 and D-341 Med cell lines were seeded per well with the Certus Flex® (GyGer) in 384-well plates (Corning, #3830). Cells were incubated in the presence of a custom-made drug library containing 110 drugs (Table S1 for details) alone or in association with Metergoline at 5 and 10 µM. Drugs were distributed with the Echo 550 liquid dispenser® (Labcyte) at 6 different concentrations covering 3 logs (*i.e.*, 1 nM–1 µM, 10 nM–10 µM or 100 nM–100 µM) in constant DMSO. Cell viability was measured using CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay (Promega, #G9243) after 72 h of drug incubation in a humidified environment at 37 °C and 5% CO2. Luminescence was measured using a PHERAstar® plate reader (BMG). Data were normalized to negative control wells (DMSO only). IC_{50} and AUC values were obtained using ic50, drc, ggplot2 and PharmacoGx script packages from R studio. The difference in AUC method was used to identify potent combinations. Z score evaluation revealed a variability below 0.03 in AUC. Differences in AUC of more than 0.1 (*i.e.*, > 3 x SD) were therefore considered statistically significant.

Synthesis of the clickable compounds

Metergoline (200 mg, 0.50 mmol) and Pd/C (10%, ca. 10 mg) were mixed with methanol (5 mL) under a hydrogen atmosphere. After magnetic stirring at room temperature for 30 min, the reaction medium was then filtered over Celite, the residue rinsed with methanol and the filtrate

concentrated under reduced pressure on a rotary evaporator to give a colorless oil. The obtained oil (135 mg, 0.5 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in anhydrous dichloromethane (5 mL) under an argon atmosphere. The resulting solution was cooled using an ice bath, then triethylamine (139 µL, 1.0 mmol, 2.0 equiv.) and propargyl chloroformate (73 µL, 0.75 mmol, 1.5 equiv.) were successively added and magnetically stirred for 1h while maintained in the ice bath. The reaction mixture was then hydrolyzed with a saturated solution of sodium hydrogen carbonate. After settling, the organic phases were collected, washed with water and a saturated solution of sodium chloride, then dried with anhydrous sodium sulphate. After filtration and concentration under reduced pressure in a rotary evaporator, the residue was purified by flash chromatography on silica gel using a gradient of methanol in dichloromethane. This yielded Metergoline-click 1 (144 mg). Metergoline (50 mg, 0.125 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (2.5 mL) under an argon atmosphere. The resulting solution was cooled using an ice bath, then NaH (9.92 mg, 0.25 mmol, 2.0 equiv.) and propargyl bromide (16 µL, 0.15 mmol, 1.2 equiv.) were successively added and magnetically stirred for 24h while maintained in the ice bath. The reaction mixture was then treated as before. After filtration and concentration under reduced pressure in a rotary evaporator, the residue was purified by flash chromatography on silica gel using a gradient of methanol in dichloromethane. This yielded Metergoline-click 2 (23 mg). The purity of the synthesized clickable derivatives was verified by Nuclear Magnetic Resonance (NMR; ^{13}C and ^{1}H) and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) ; the molar mass was determined by mass spectrometry (ESI+, capillary at 3 kV, cone at 70 V).

Study of metergoline incorporation by click-cytometry

Briefly, HD-MB03 cells were seeded in flat bottom 6-well microplates (1.10^6/well) for 24h. Cells were then exposed to Metergoline, Metergoline-click 1 and Metergoline-click 2 for 2, 4, 6, 16 or 24h. The incorporation of the molecules in dissociated cells was analyzed using the Click-iT Plus EdU Alexa Flour 647 Flow Cytometry Assay Kit (Invitrogen™, ref. C10634), according to the manufacturer's instructions. This method, based on “click” chemistry, involves a covalent reaction between an alkyne and an azide, catalyzed by copper. In this approach, the alkyne is integrated into the derivatives molecules, while the azide is coupled to an Alexa Fluor® dye. Conventional flow cytometry techniques were then employed to quantify the number of cells in which metergoline was bound at different time points. The fluorescence was analyzed by flow cytometry on the Cytoflex S (Beckman Coulter) and data were analyzed using the Kaluza software (Beckman Coulter).

Statistical analyses

All experiments were performed in independent biological replicates and statistical significance was determined by student’s t test using the GraphPad Prism 10.0.1 software (RRID:SCR_002798). A significant difference between two conditions is defined as: * $p < 0{\cdot}05$, ** $p < 0{\cdot}01$, *** $p < 0{\cdot}001$.

Results

Screening of a serotonin antagonist library identifies metergoline as a drug candidate in MB.

To identify potentially effective serotonergic antagonists for the treatment of MB, we developed a custom-made library containing 16 compounds specific to one or more 5-HTR subtypes (**Fig 1A**). We then screened this library in a panel of 5 MB cell lines characteristic of the non-WNT/non-SHH MB group: HD-MB03, ONS-76, D341 Med, D458 Med and D425 Med (**Fig. 1B**). Cell sensitivity to the different

compounds was determined by calculating the area under the curve (AUC). This drug screen revealed that non-specific inhibitors were overall more effective than inhibitors targeting a specific receptor subtype, as evidenced by the fact that 4 of the top 5 molecules were non-selective 5-HTR antagonists. The most effective compounds were metergoline and methiothepin, which showed antiproliferative activity in all the tested cell lines (**Fig. 1C**). Methiothepin was used for antipsychotic purposes, but its clinical use remained marginal due to its side-effect profile and the availability of more specific treatments. As for metergoline, due to its role in serotonin modulation, it is used in pathologies such as endocrine disorders (hyperprolactinemia). We have elected to pursue our investigations with this second molecule, which has a more favorable safety profile. We assessed the ability of metergoline to reduce cell survival in the same panel of human MB cell lines previously used. Cells were exposed to a range of increasing concentrations of metergoline and showed a concentration-dependent reduction in the number of living cells under the influence of metergoline (**Fig. 1D**). The 5 tested cell lines had very similar sensitivity to metergoline, as shown by IC_{50} values ranging from 13.0±0.2 to 21.3±0.5 µM (Table 1). At a concentration of 25 µM, cell survival in these 5 models characteristic of the lower-prognosis non-WNT/non-SHH tumor groups was completely suppressed. As an ergoline analogue, metergoline is classified in the same family as other ergot derivatives, such as cabergoline, which is more frequently used for similar indications. In view of a possible future clinical application, we tested cabergoline and its IC_{50} was one log higher than that of metergoline in HD-MB03 and ONS-76 cells (Fig. 1E). We therefore elected to continue our study with metergoline, which showed greater efficacy in MB models.

Metergoline inhibits the proliferation and survival of MB tumor spheroids.

Multicellular spheroids are 3D structures more closely mimicking the architecture and cell-cell interactions within a tumor mass and that are therefore more relevant than cell monolayers to study tumor growth and drug response. To confirm the efficacy of Metergoline on these models, we developed MB spheroids. These 3D tumor micromasses were formed from HD-MB03 cells previously transfected with a plasmid encoding DsRed and selected for their ability to stably express this fluorochrome (see Materials and Methods). Spheroids were treated on D0 with a single dose of 5, 10 or 20 µM Metergoline. Over the following 14 days, the impact of treatment on tumor growth was assessed by fluorescence microscopy and quantification of the DsRed fluorescence signal emitted by living cells. Spheroids treated with 5 µM Metergoline showed slower growth beyond day 8 post-treatment, resulting in > 70% decrease in growth at D14 compared with control ($p<0.001$; **Fig. 2A&B**). Stable inhibition of spheroid growth was observed from day 2 of treatment with 10µM Metergoline, resulting in a reduction in the number of HD-MB03 cells of almost 90% at D14 compared with control ($p<0.001$; **Fig. 2A&B**). Finally, 20µM Metergoline significantly abolished spheroid growth from the start of treatment. We obtained similar results in the ONS-76 pro-migratory model, where Metergoline induced a significant inhibition of cell survival, measured by the Alamar Blue assay after 14 days of treatment, with an effect observable as low as 5 µM ($p<0.01$; **Fig. 2C&D**).

Structural modification of the benzylcarbamate moiety results in loss of metergoline interaction with MB cells and a significant decrease in its efficacy.

Crystallographic studies, as well as *in vitro* and *in vivo* experiments, have revealed that the ergoline core-bound radical of 5-HTR ligands (*i.e.*, the diethylamide moiety of Lysergic acid diethylamide and the benzylcarbamate moiety of metergoline) is essential to their efficacy by interacting

with an extended receptor binding site [12,13]. To analyze the interaction of metergoline with the 5-HTR in MB cells, we synthesized two derivatives, according to the protocol illustrated in Fig. 5A. We chose to carry out the structural modifications by grafting an alkyne group, making it possible to monitor the cellular accumulation of compounds by click cytometry. When the benzyl-carbamate moiety of metergoline was replaced by an alkyl-carbamate (**Fig. 3A**), the compound "metergoline-click 1" exhibited a significant loss of activity on MB cells – compared to parental metergoline –, with IC_{50} values reaching 88.3 ± 4.8 µM and 83.9 ± 2.5 µM in HD-MB03 and ONS-76 cells, respectively **(Fig. 3B&C**). Quantification of this metergoline-click 1 derivative over time showed that it was not able to accumulate in HD-MB03 cells (**Fig. 3D**). In contrast, the "metergoline-click 2" derivative, whose benzyl-carbamate moiety remained intact (**Fig. 3A**), interacted with MB cells as early as 2h incubation (**Fig. 3D**), which resulted in a cytotoxic efficacy similar to the parental metergoline (**Fig. 3B&C**). Consistently with its well-known mechanism of action in the central nervous system, our results indicate that the benzyl-carbamate radical is essential for metergoline activity in MB cells, and strongly suggest that metergoline binding to 5-HTRs is a key step in this anticancer efficacy.

Combination drug screening identifies itraconazole as a highly potent synergizer of metergoline efficacy in MB

To exploit the full potential of metergoline, we performed a drug combination screen. We chose to use a dose of 10µM - corresponding to an ~ IC20 - to identify potent combinations. The custom-made library contains 110 compounds, including epidrugs, targeted agents, chemotherapies and repurposable drugs (**Table S1** & **Fig. S1A**). These agents were chosen because they were either approved by the US Federal Drug Administration (FDA) or well-advanced in clinical development and considered potentially useful in the treatment of brain tumors, based on previous clinical and/or preclinical evidence. To select promising drug combinations, we used the difference in AUC between the combinatorial treatment and the monotherapy condition. In the ONS-76 cell line, combinations with AUC differences of more than 0.1 were considered potentially synergistic. Of the 110 combinations tested with metergoline, 8 appeared to display a potential synergism (**Fig. 4A**). This screening was carried out in two additional MB cell lines: HD-MB03 and D341 Med (**Fig. S3B**). We cross-referenced the results of the drug combination screens performed in these 3 lines, always with an AUC difference cut-off of 0.1. Potential synergistic combinations with itraconazole, pyrvinium and berzosertib were common to the 3 MB models (**Fig. 4B**). These results translated into a decrease in the IC50 of the drugs when co-administered with metergoline in ONS-76 (**Fig. 4C**) and HD-MB03 cell lines (**Fig S1C**). Since itraconazole - a drug commonly used as an antifungal agent - was the top hit identified in all 3 drug combination screens (**Fig. S1B**), we continued our investigations into its association with metergoline. A 6 × 5 matrix containing the two compounds at different concentration ratios was created, enabling us to cover a wide range of drug combinations. To assess the synergy of treatments with the two compounds, the Bliss score was calculated using the SynergyFinder web application (https://synergyfinder.fimm.fi). As expected from the results of our combination screen, we found a highly synergistic interaction between itraconazole and metergoline in the 5 tested cell lines, as shown by high Bliss scores of 42.4 ± 4.6 for HD-MB03 and 60.0 ± 1.9 for ONS-76 (**Fig. 4D**). The potentiating effect of itraconazole was also observed with two other serotonergic antagonists, methiothepin and asenapine, with similar Bliss scores in the

HD-MB03 and ONS-76 lines (**Fig. S1D&E**), supporting the benefits of combining itraconazole with a serotonergic antagonist.

To confirm that we were selecting the best therapeutic combination with metergoline, we also evaluated its association with pyrvinium, another repurposable drug usually employed as an antiparasitic, discovered as a common hit in our screening (**Fig 4C**). As expected, this combination demonstrated synergy, but with a lower Bliss score than the combination with itraconazole on HD-MB03 and ONS-76 cells (**Fig. 4E**). We therefore decided to pursue our investigations with the metergoline-itraconazole combination.

Metergoline-induced inhibition of proliferation and survival is potentiated by itraconazole in cerebellar organotypic models.

To assess the potential of the combination of metergoline and itraconazole under more clinically relevant conditions, we developed an organotypic cerebellar model in which MB spheroids stably expressing DsRed were grafted into healthy mouse cerebellum slices (**Fig. 5A&B**). These innovative co-cultures were exposed to metergoline and/or itraconazole twice weekly, and tumor progression was analyzed over time. We chose to study this association on ONS-76 tumor mass models for its migratory potential and highest Bliss score. As expected, in the "control" condition, we observed a progression of tumor mass manifested by invasion of cerebellar tissue (**Fig. 5B**). From day 18, the number of ONS-76 cells expressing DsRed increased progressively over time, reaching a 20-fold increase at the end of the experiment (**Fig. 5C**). Itraconazole at 2.5 µM did not inhibit tumor expansion (**Fig. 5B&C**), while metergoline alone at 15 µM reduced tumor proliferation only at extended times (days 24 and 28; **Fig. 5C**). Despite the limited efficacy of monotherapy treatments, the combination of the two molecules completely abolished tumor growth over the entire duration of the experiment (Fig. **5B&C**). Thus, the synergy between metergoline and itraconazole, previously characterized, is illustrated here by the superior efficacy of the combined treatment compared with monotherapies (**Fig. 5C**).

Discussion

In recent years, major advances have been made in the management of children with MB. However, long-term sequelae due to early exposure to toxic treatments remain a major concern [14,15]. Drug repurposing appears as a major tool for rapidly developing effective, well-tolerated therapeutic approaches in oncology [16,17]. For instance, cardiovascular regulators [10] and anti-helminthic drugs [18] have demonstrated their capacity to inhibit MB cell progression, both *in vitro* and *in vivo*, resulting in several ongoing clinical trials.

Besides their well-known role in pathologies such as psychiatric and neurological disorders, serotonin and its receptors 5-HTR have been related to carcinogenesis by promoting proliferation and migration of various cancer cells, such as prostate, colorectal, breast or small cell lung cancers (extensively reviewed in [19]). To date, very few studies have analyzed the potential link between modulation of the serotonergic signaling pathway and control of pediatric cancers. Research originally designed to propose neuroprotective solutions showed that 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride, a 5-HTR_{2A} agonist, attenuated serum deprivation-mediated neuroblastoma cell death, supporting a link between the serotonergic pathway and pediatric tumor cell survival [20]. Selective serotonin reuptake inhibitors (*i.e.* paroxetine or fluoxetine), used as antidepressants, have been shown to display pro-apoptotic properties in human neuroblastoma and rhabdomyosarcoma cell lines, while being less active in primary mouse brain cells and

neuronal cultures *in vitro* [21,22]. In MB, the serotonin reuptake inhibitor sertraline has been shown to reduce the growth of DAOY spheroids [23]. In this context, we investigated whether targeting the serotonin receptors could be a strategy of choice for reducing MB expansion. The present study revealed that inhibiting the serotonergic pathway in a panel of non-WNT/non-SHH MB cell models leads to a significant reduction in both cancer cell survival and invasion. Using a library of serotonergic inhibitors, we showed that 4 of the 5 most active compounds – including metergoline – were pan-inhibitors. They share the common feature of antagonizing the 5-$HTR_{1A/B/D}$, 5-$HTR_{2A/B/C}$ and 5-HTR_7 receptor subtypes. Our results are consistent with the fact that 5-HTR_1, 5-HTR_2 and 5-HTR_7 have been specifically associated with tumor growth *in vitro* and malignant transformation *in vivo* in prostate, lung, breast and gastric cancer models [24–29]. Cabergoline, another ergot alkaloid also used in the treatment of hyperprolactinemia-related disorders, is 10 times less active in MB cells than metergoline. This lack of efficacy in cancer cells may be linked to the poor affinity of cabergoline for 5-HTR – compared to metergoline – [30], its inhibitory properties of prolactin secretion being rather related to its dopamine agonist functions. Characterizing the role of each 5HT receptor subtypes in cancer cells will, in the future, help to identify biomarkers of response to 5-HTR antagonists and may reveal new therapeutic vulnerabilities to define the most appropriate drugs to use in MB.

The selection of metergoline in the present study is based both on its ability to be repurposed as an already-approved drug, its limited side effects (compared with those induced by methiothepin, for example), and its efficacy in non-WNT/non-SHH MB models. Like all drugs initially designed to target the central nervous system, metergoline has the advantage of penetrating the blood brain barrier, which can be a major hurdle in drug therapy of intracranial tumors. In addition to the direct effect on MB cells themselves, the benefits of metergoline could also lie in its anti-angiogenic properties, as demonstrated in colon, ovarian and breast cancer models [31–33]. Finally, the interest in this repurposed drug is also strengthened by the fact that it can enhance the antitumor immune response, by inducing T-cell stimulation, dendritic cell maturation, B-cell development, and the cytotoxicity of natural killers for example [34,35].

As the vast majority of cancer treatments involve the combination of several drugs to provide optimal activity, we investigated which other drugs could be used in association with metergoline. Our results propose a new therapeutic combination of metergoline with itraconazole, highly synergistic in MB cell cultures and MB spheroid micromasses. Furthermore, in response to the ever-increasing need for alternative methods to animal experimentation, we have used an innovative organotypic cerebellum model, which we have previously proven valuable for studying MB progression over time and monitoring response to therapeutic strategies [10,36,11]. We have shown that the combination of metergoline and itraconazole gives promising results in this *ex vivo* model, leading to significant inhibition of tumor progression (*i.e.*, growth and invasion). Itraconazole is originally a well-known antifungal agent, but it has also been found to inhibit key signaling pathways involved in cancer cell proliferation and survival. It can inhibit the Hedgehog signaling pathway, as shown in colorectal [37] and breast cancer [38], which is of particular interest as it is over-activated in SHH MB. In addition, itraconazole displays anticancer properties through the inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway, as shown in melanoma [39], endometrial [40] and liver cancer cells [41]. Since 5-$HTR_{1A/B/C/D/F}$ and 5-$HTR_{2A/B/C}$ activation results in the induction of the PI3K/AKT/mTOR

pathway, metergoline is likely to synergize with itraconazole through a simultaneous inhibition of this signaling pathway. This therapeutic option is highly promising given that the expression of genes involved in the PI3K/AKT pathways in non-WNT/non-SHH MB is associated with poor survival [42].

Despite its efficacy *in vitro* and *ex vivo*, this therapeutic combination may present challenges for clinical application. Since itraconazole is a potent inhibitor of CYP3A4 – key enzyme in the metabolism of many drugs –, it could lead to significant pharmacokinetic interactions and less degradation of metergoline, increasing the risk of side effects and toxicity. Consequently, simultaneous use of these two drugs might increase the risk of ergotism, a syndrome linked to the severe vasoconstriction caused by ergot derivatives, with possible serious clinical complications. Thus, to definitively confirm the advantages of this combinatorial approach, future *in vivo* experiments will be required to pay particular attention to cardiovascular toxicity.

The present study also highlights that metergoline can be potentiated by the antihelminthic drug pryvinium. Its ability to be repurposed in cancer therapy, by targeting casein kinase 1a, has previously been shown in WNT and SHH MB subgroups [43,44]. Our work thus suggests that pyrvinium could also offer benefits in non-WNT/non-SHH MB, although the mechanism of action underlying this efficacy remains to be elucidated. Lastly, metergoline synergizes with Berzosertib, a targeted therapy currently under clinical evaluation in lung, breast, ovarian, prostate, gastrointestinal, bladder, or head and neck cancers, but not so far in childhood and adolescent cancers. Its targeting of the kinase ATR, a central regulator of the DNA damage response, is particularly interesting since this molecular actor plays an essential role in MB oncogenesis [45].

In conclusion, our results extend the therapeutic scope of metergoline beyond its current indications, as a new option for treating poor-prognosis MB, particularly in combination with itraconazole. Given the limited number of druggable targets identified in non-WNT/non-SHH MB and the treatment restrictions imposed by patient age, our work proposes an alternative approach aimed at accelerating the transfer of effective strategies to the clinic to improve the outcome of young patients.

Declaration of interests

The authors have declared no conflict of interest.

Reference list

1. Northcott PA, Robinson GW, Kratz CP, Mabbott DJ, Pomeroy SL, Clifford SC, et al. Medulloblastoma. Nat Rev Dis Primer. 2019 Feb 14;5(1):1–20.

2. Hovestadt V, Ayrault O, Swartling FJ, Robinson GW, Pfister SM, Northcott PA. Medulloblastomics revisited: biological and clinical insights from thousands of patients. Nat Rev Cancer. 2020 Jan;20(1):42–56.

3. Tonning Olsson I, Lundgren J, Hjorth L, Munck Af Rosenschöld P, Hammar Å, Perrin S. Neurocognitive development after pediatric brain tumor - a longitudinal, retrospective cohort study. Child Neuropsychol. 2024 Jan 2;30(1):22–44.

4. Hua Y, Dai X, Xu Y, Xing G, Liu H, Lu T, et al. Drug repositioning: Progress and challenges in drug discovery for various diseases. Eur J Med Chem. 2022 Feb 28;234:114239.

5. Sarrouilhe D. Serotonin and human cancer: A critical view. 2019;5.

6. Chen L, Huang S, Wu X, He W, Song M. Serotonin signalling in cancer: Emerging mechanisms and therapeutic opportunities. Clin Transl Med. 2024 Jun 28;14(7):e1750.

7. Pasquier E, Street J, Pouchy C, Carre M, Gifford AJ, Murray J, et al. β-blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic mechanisms in neuroblastoma. Br J Cancer. 2013 Jun 25;108(12):2485–94.

8. Ariey-Bonnet J, Carrasco K, Le Grand M, Hoffer L, Betzi S, Feracci M, et al. In silico molecular target prediction unveils mebendazole as a potent MAPK14 inhibitor. Mol Oncol. 2020 Dec;14(12):3083–99.

9. Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T. SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples. Nucleic Acids Res. 2022 May 17;50(W1):W739.
10. Rossi M, Talbot J, Piris P, Grand ML, Montero MP, Matteudi M, et al. Beta-blockers disrupt mitochondrial bioenergetics and increase radiotherapy efficacy independently of beta-adrenergic receptors in medulloblastoma. eBioMedicine. 2022 Jul 8;82:104149.
11. Piris P, Buric D, Yamasaki T, Huchedé P, Rossi M, Matteudi M, et al. Conditional generation of free radicals by selective activation of alkoxyamines: towards more effective and less toxic targeting of brain tumors. Chem Sci. 2023 Jun 29;14(29):7988.
12. Wacker D, Wang S, McCorvy JD, Betz RM, Venkatakrishnan AJ, Levit A, et al. Crystal Structure of an LSD-Bound Human Serotonin Receptor. Cell. 2017 Jan;168(3):377-389.e12.
13. Sanchez-Reyes OB, Zilberg G, McCorvy JD, Wacker D. Molecular insights into GPCR mechanisms for drugs of abuse. J Biol Chem. 2023 Aug 18;299(9):105176.
14. Chevignard M, Câmara-Costa H, Doz F, Dellatolas G. Core deficits and quality of survival after childhood medulloblastoma: a review. Neuro-Oncol Pract. 2016 Aug 26;4(2):82.
15. Aktekin EH, Kütük MÖ, Sangün Ö, Yazıcı N, Çaylaklı F, Erol İ, et al. Late effects of medulloblastoma treatment: multidisciplinary approach of survivors. Childs Nerv Syst. 2024 Feb 1;40(2):417–25.
16. Xia Y, Sun M, Huang H, Jin WL. Drug repurposing for cancer therapy. Signal Transduct Target Ther. 2024 Apr 19;9:92.
17. Weth FR, Hoggarth GB, Weth AF, Paterson E, White MPJ, Tan ST, et al. Unlocking hidden potential: advancements, approaches, and obstacles in repurposing drugs for cancer therapy. Br J Cancer. 2024 Mar;130(5):703–15.
18. Bai RY, Staedtke V, Rudin CM, Bunz F, Riggins GJ. Effective treatment of diverse medulloblastoma models with mebendazole and its impact on tumor angiogenesis. Neuro-Oncol. 2015 Apr;17(4):545–54.
19. Balakrishna P, George S, Hatoum H, Mukherjee S. Serotonin Pathway in Cancer. Int J Mol Sci. 2021 Jan;22(3):1268.
20. Marinova Z, Walitza S, Grünblatt E. 5-HT2A serotonin receptor agonist DOI alleviates cytotoxicity in neuroblastoma cells: Role of the ERK pathway. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2013 Jul 1;44:64–72.
21. Levkovitz Y, Gil-Ad I, Zeldich E, Dayag M, Weizman A. Differential induction of apoptosis by antidepressants in glioma and neuroblastoma cell lines. J Mol Neurosci. 2005 Sep 1;27(1):29–42.
22. Stepulak A, Rzeski W, Sifringer M, Brocke K, Gratopp A, Kupisz K, et al. Fluoxetine inhibits the extracellular signal regulated kinase pathway and suppresses growth of cancer cells. Cancer Biol Ther. 2008 Oct 1;7(10):1685–93.
23. Kurita J ichi, Hirao Y, Nakano H, Fukunishi Y, Nishimura Y. Sertraline, chlorprothixene, and chlorpromazine characteristically interact with the REST-binding site of the corepressor mSin3, showing medulloblastoma cell growth inhibitory activities. Sci Rep. 2018 Sep 13;8:13763.
24. Julius D, Livelli TJ, Jessell TM, Axel R. Ectopic Expression of the Serotonin 1c Receptor and the Triggering of Malignant Transformation. Science. 1989 Jun 2;244(4908):1057–62.
25. Cattaneo MG, Fesce R, Vicentini LM. Mitogenic effect of serotonin in human small cell lung carcinoma cells via both 5-HT1A and 5-HT1D receptors. Eur J Pharmacol. 1995 Oct 15;291(2):209–11.
26. Launay JM, Birraux G, Bondoux D, Callebert J, Choi DS, Loric S, et al. Ras Involvement in Signal Transduction by the Serotonin 5-HT2B Receptor (∗). J Biol Chem. 1996 Feb 9;271(6):3141–7.
27. Expression of serotonin receptors and role of serotonin in human prostate cancer tissue and cell lines - Dizeyi - 2004 - The Prostate - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2024 Oct 18]. Available from: https://onlinelibrary-wiley-com.lama.univ-amu.fr/doi/10.1002/pros.10374
28. Cınar V, Hamurcu Z, Guler A, Nurdinov N, Ozpolat B. Serotonin 5-HT7 receptor is a biomarker poor prognostic factor and induces proliferation of triple-negative breast cancer cells through FOXM1. Breast Cancer. 2022 Nov 1;29(6):1106–20.
29. Tu RH, Wu SZ, Huang ZN, Zhong Q, Ye YH, Zheng CH, et al. Neurotransmitter Receptor HTR2B Regulates Lipid Metabolism to Inhibit Ferroptosis in Gastric Cancer. Cancer Res. 2023 Dec 1;83(23):3868–85.
30. Mantegani S, Brambilla E, Varasi M. Ergoline derivatives: receptor affinity and selectivity. Il Farm. 1999 May 30;54(5):288–96.

31. Nocito A, Dahm F, Jochum W, Jang JH, Georgiev P, Bader M, et al. Serotonin Regulates Macrophage - Mediated Angiogenesis in a Mouse Model of Colon Cancer Allografts. Cancer Res. 2008 Jul 1;68(13):5152–8.
32. Banskota S, Gautam J, Regmi SC, Gurung P, Park MH, Kim SJ, et al. BJ-1108, a 6-Amino-2,4,5-Trimethylpyridin-3-ol Analog, Inhibits Serotonin-Induced Angiogenesis and Tumor Growth through PI3K/NOX Pathway. PLOS ONE. 2016 Jan 29;11(1):e0148133.
33. Lee JY, Yang C, Lim W, Song G. Methiothepin Suppresses Human Ovarian Cancer Cell Growth by Repressing Mitochondrion-Mediated Metabolism and Inhibiting Angiogenesis In Vivo. Pharmaceutics. 2020 Jul;12(7):686.
34. Herr N, Bode C, Duerschmied D. The Effects of Serotonin in Immune Cells. Front Cardiovasc Med. 2017 Jul 20;4:48.
35. Karmakar S, Lal G. Role of serotonin receptor signaling in cancer cells and anti-tumor immunity. Theranostics. 2021;11(11):5296–312.
36. Penco-Campillo M, Molina C, Piris P, Soufi N, Carré M, Pagnuzzi-Boncompagni M, et al. Targeting of the ELR+CXCL/CXCR1/2 Pathway Is a Relevant Strategy for the Treatment of Paediatric Medulloblastomas. Cells. 2022 Dec 5;11(23):3933.
37. Deng H, Huang L, Liao Z, Liu M, Li Q, Xu R. Itraconazole inhibits the Hedgehog signaling pathway thereby inducing autophagy-mediated apoptosis of colon cancer cells. Cell Death Dis. 2020 Jul 17;11(7):539.
38. Wang X, Wei S, Zhao Y, Shi C, Liu P, Zhang C, et al. Anti-proliferation of breast cancer cells with itraconazole: Hedgehog pathway inhibition induces apoptosis and autophagic cell death. Cancer Lett. 2017 Jan 28;385:128–36.
39. Liang G, Liu M, Wang Q, Shen Y, Mei H, Li D, et al. Itraconazole exerts its anti-melanoma effect by suppressing Hedgehog, Wnt, and PI3K/mTOR signaling pathways. Oncotarget. 2017 Feb 14;8(17):28510–25.
40. Tsubamoto H, Inoue K, Sakata K, Ueda T, Takeyama R, Shibahara H, et al. Itraconazole Inhibits AKT/mTOR Signaling and Proliferation in Endometrial Cancer Cells. Anticancer Res. 2017 Feb;37(2):515–9.
41. Wang W, Dong X, Liu Y, Ni B, Sai N, You L, et al. Itraconazole exerts anti-liver cancer potential through the Wnt, PI3K/AKT/mTOR, and ROS pathways. Biomed Pharmacother. 2020 Nov 1;131:110661.
42. Park AK, Lee JY, Cheong H, Ramaswamy V, Park SH, Kool M, et al. Subgroup-specific prognostic signaling and metabolic pathways in pediatric medulloblastoma. BMC Cancer. 2019 Jun 11;19:571.
43. Fan J, Reid RR, He TC. Pyrvinium doubles against WNT-driven cancer. J Biol Chem [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2023 May 10];298(10). Available from: https://www.jbc.org/article/S0021-9258(22)00922-X/abstract
44. Li B, Fei DL, Flaveny CA, Dahmane N, Baubet V, Wang Z, et al. Pyrvinium attenuates Hedgehog signaling downstream of Smoothened. Cancer Res. 2014 Sep 1;74(17):4811–21.
45. Lang PY, Nanjangud GJ, Sokolsky-Papkov M, Shaw C, Hwang D, Parker JS, et al. ATR maintains chromosomal integrity during postnatal cerebellar neurogenesis and is required for medulloblastoma formation. Dev Camb Engl. 2016 Nov 1;143(21):4038.

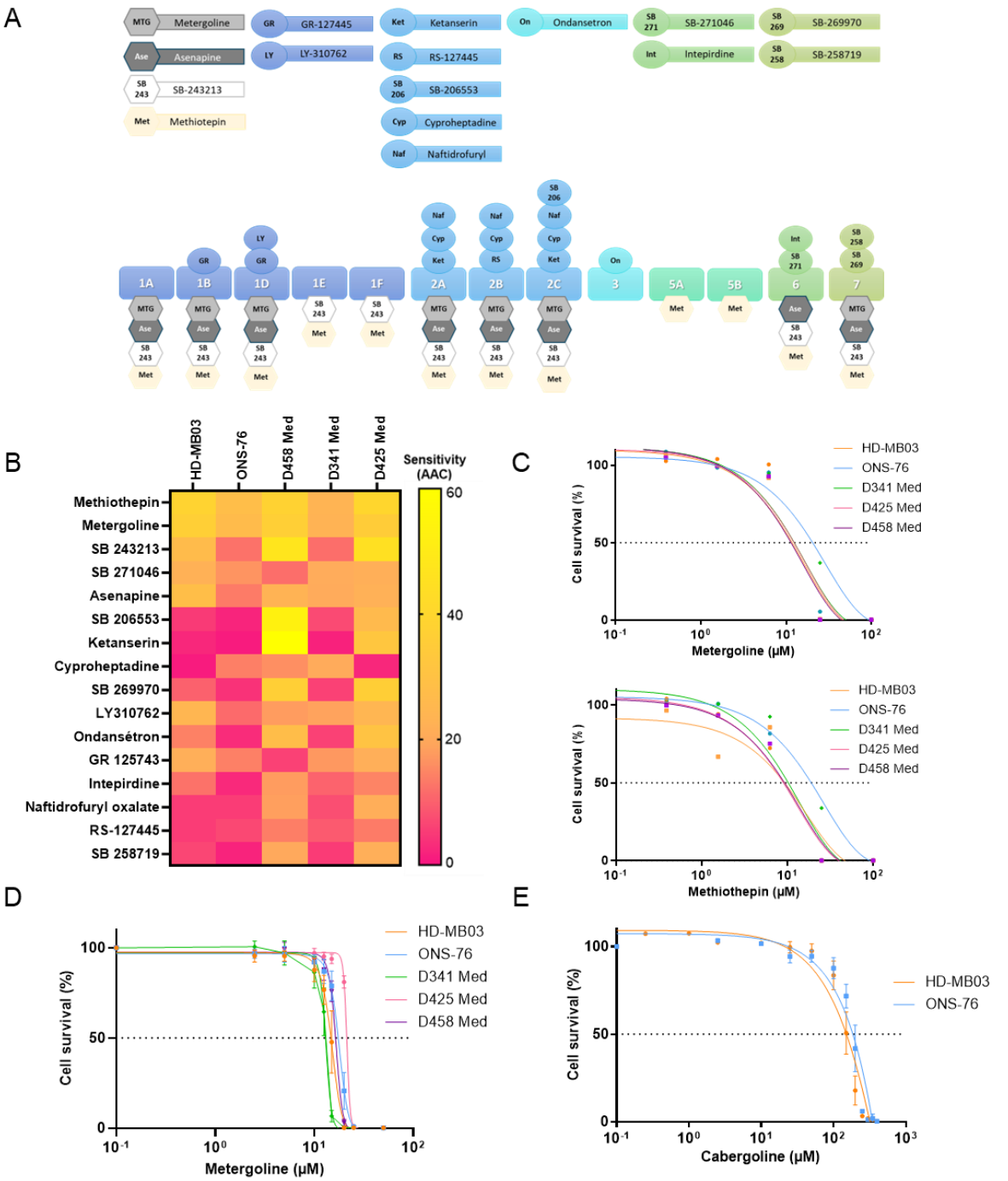


Figure 1 : **Screening of serotonin antagonist library identifies metergoline as a drug candidate in MB,**
(A) Schematic representation of the serotonergic antagonist library used for the first screening and the 5-HT receptor subtypes they target. Each antagonist is illustrated with its specificity for serotonin receptors (5-HT1, 5-HT2, 5-HT3, etc.), highlighting the diversity of targets within the serotonin system. **(B)** Heat map representing the sensitivity (AAC) of serontin antagonists, extracted from the screen performed in five human MB cell lines with sixteen compounds tested at six different concentrations covering 3 logs (*i.e.* 100 nM–100 µM, n=1 per condition). After 72 h incubation, cell viability was assessed using CellTiter-Glo® assay **(C)** Screening-derived dose-effect curves of the two top hits, metergoline and methiotepin. **(D)** Cell survival analysis in five human MB cell lines by Alamar Blue assay after 72 h of treatment with increase concentrations of metergoline and **(E)** in two human MB cell lines for cabergoline. Values are the average of four independent experiments ± standard deviation (SD), with a biological triplicate in each experiment.

MB non-WNT/non-SHH cell lines	IC_{50} (µM)
HD-MB03	14.9 ± 0.2
ONS-76	17.7 ± 0.3
D341 Med	13.0 ± 0.2
D425 Med	21.3 ± 0.5
D458 Med	16.5 ± 0.2

Table 1 : IC_{50} values of metergoline after 72 h of treatment of non-Wnt human MB cells (HD-MB03, ONS-76, D341 Med, D425 Med and D458 Med), determined by GraphPad Prism software. Values are the average of at least three independent experiments ± SD.

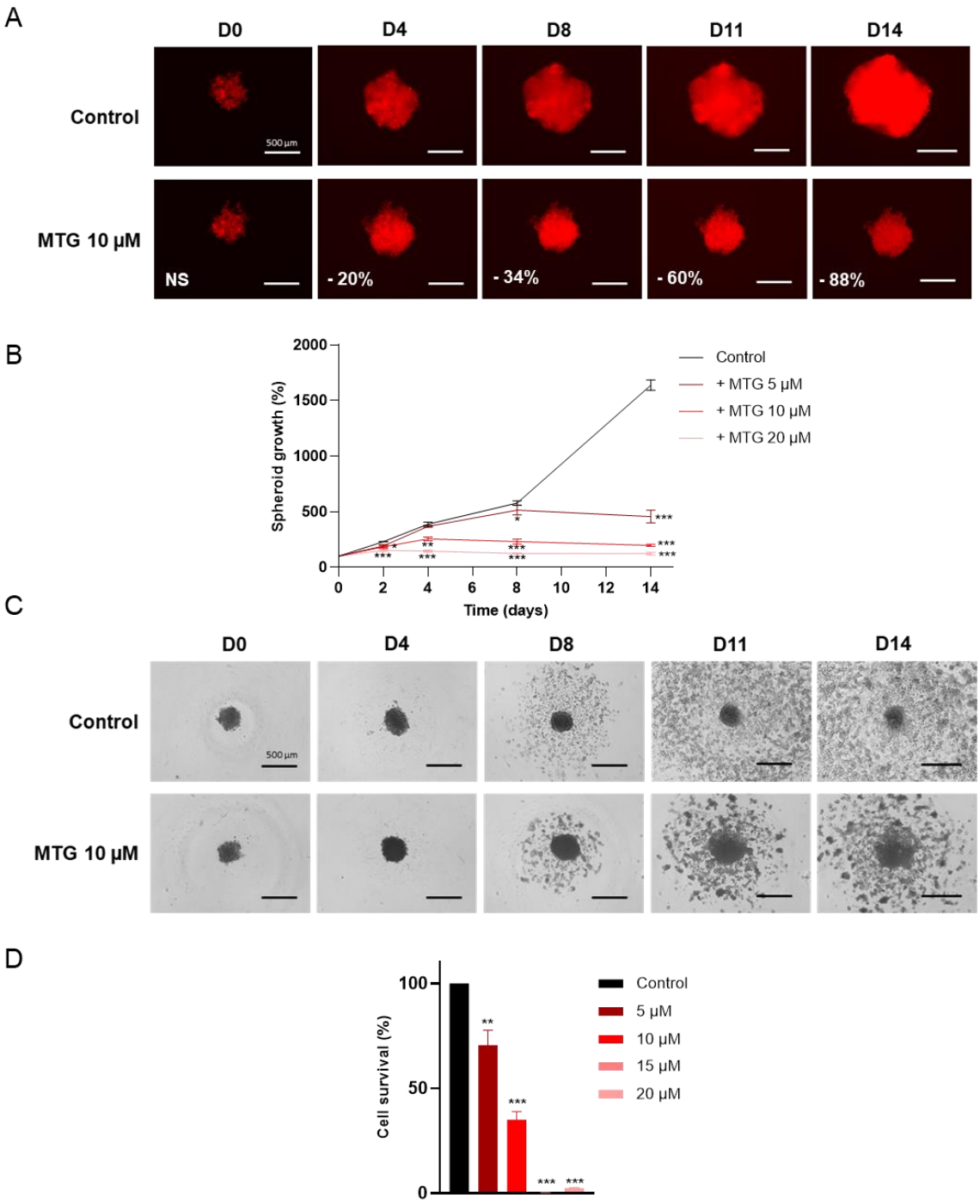


Figure 2 : **Metergoline inhibits the proliferation and survival of MB tumor spheroids.** The 3D tumour micromasses were exposed to one dose of metergoline (MTG) at day 0. Representative images of **(A)** DsRed-expressing HD-MB03 spheroids and **(C)** ONS-76 spheroid, acquired over time with the JuLi™ Stage system. Treatment efficacy was expressed as a percentage of spheroid growth inhibition *vs* control spheroids, determined by quantifying the DsRed signal with the PHERAstar microplate reader. Scale bars: 500 µm. **(B)** HD-MB03 spheroid growth measured by acquisition of the DsRed signal over 14 days after one treatment with 5,10 and 20µM of metergoline (MTG) at day 0, Values are the average of n =3 samples per condition, from at 3 independent experiments ± SD. **(D)** Spheroid viability assessment by using Alamar blue assay in ONS-76 cells after fourteen days of treatment with 5, 10, 15 and 20µM of metergoline. Values are the average of n =3 samples per condition, from three independent experiments ± SD. *$p < 0{\cdot}05$, **$p < 0{\cdot}01$, ***$p < 0{\cdot}001$

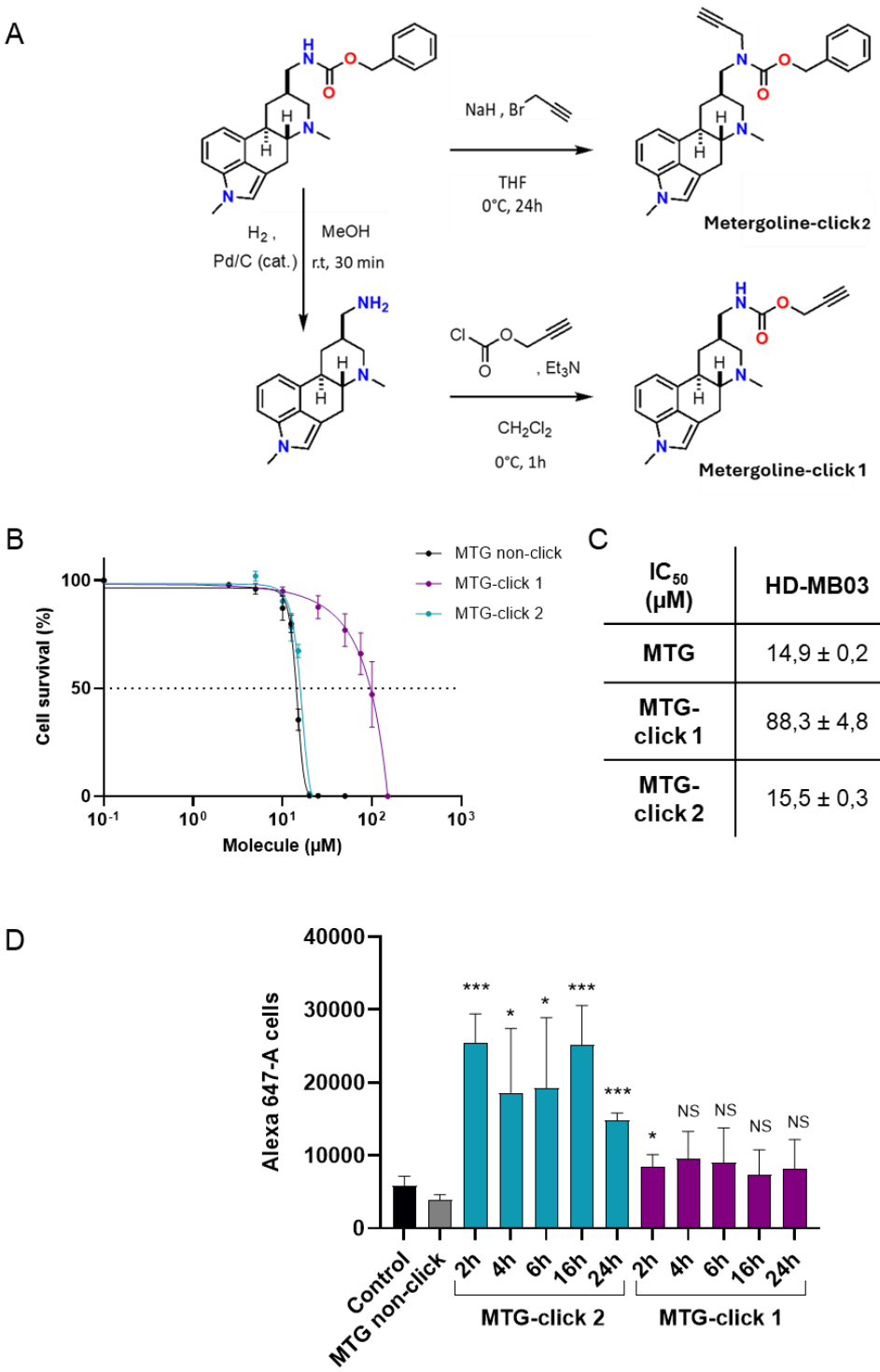


Figure 3 : **Study of metergoline incorporation by click-cytometry**. **(A)** Synthesis of clickable derivatives ; **(B)** Cell survival analysis in HD-MB03 cells by Alamar Blue assay after 72 h of treatment with increase concentrations of metergoline (MTG), metergoline-click 1 (MTG-click 1) and metergoline-click 2 (MTG-click 2) and **(C)** IC_{50} values, determined by GraphPad Prism software. Values are the average of at least three independent experiments ± SD with a biological triplicate in each experiment. (D) HD-MB03 cells wells treated with IC_{80} of MTG, MTG-click 1 and MITG-click 2 for 2, 4, 6, 16 and 24hr. Each bar represents relative number of cells labeled with Alexa Fluor® 647 picolyl azide analyzed on the Cytoflex S, All values are the average of at least three independent experiments ± SD, $*p < 0{\cdot}05$, $**p < 0{\cdot}01$, $***p < 0{\cdot}001$

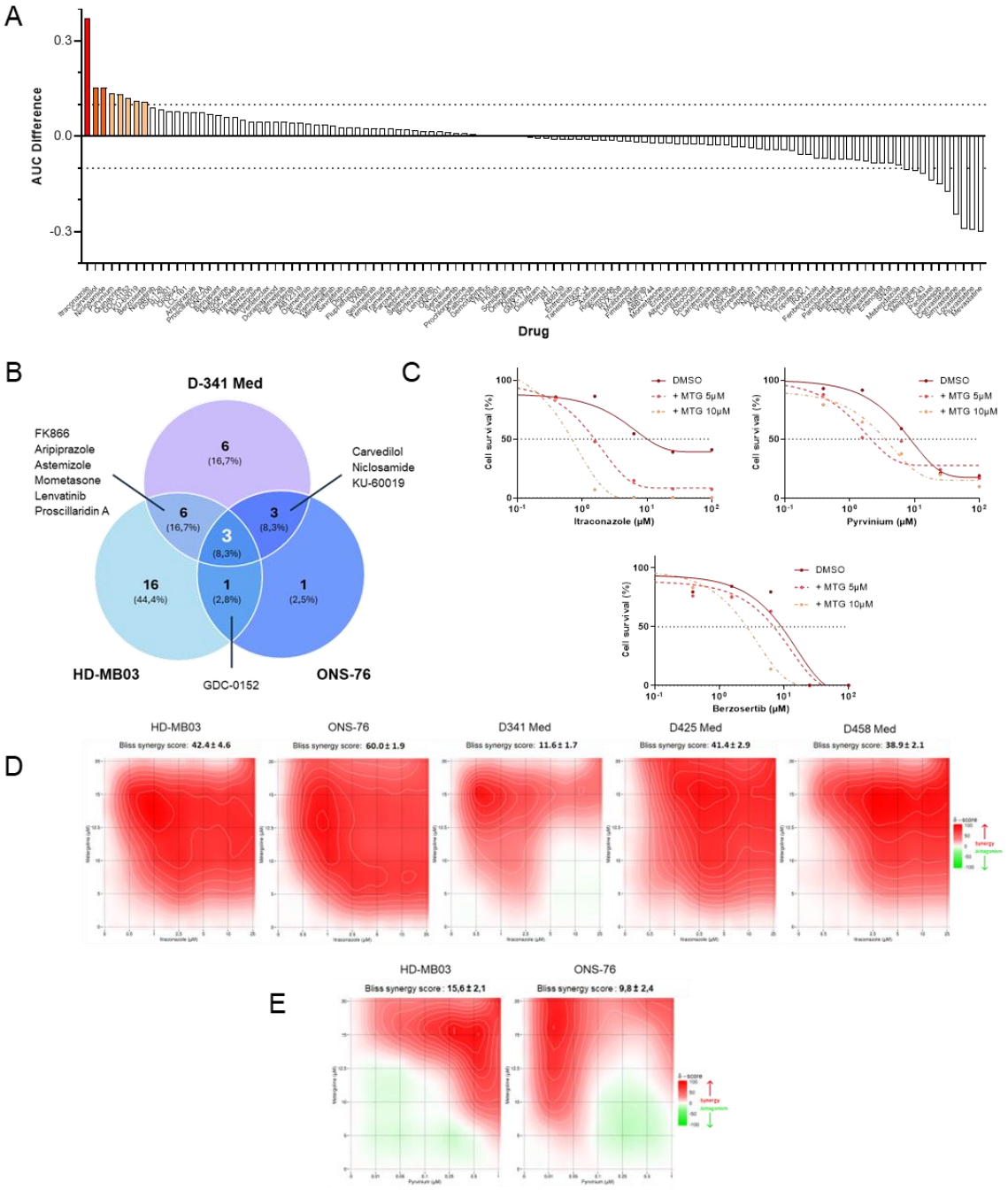


Figure 4 : **Drug combination screening identifies promising combination with metergoline. (A)** Waterfall plot illustrating the effects of screening the HITCH library in combination with metergoline (10 µM) on ONS-76 cells, based on the difference in area under the curve (AUC) between monotherapy treatments and combinations. Each bar corresponds to a compound, ranked according to the magnitude of the AUC difference. **(B)** Venn diagram illustrating the results of screens performed in combination with metergoline in ONS-76, HD-MB03 and D341 Med cell lines, with AUC difference cut-off set at 0.1. Overlapping areas indicate compounds with a consistent effect across multiple lines, suggesting potential combinatorial treatment with metergoline for MB treatment. **(C)** Screening-derived dose-effect curves in ONS-76 cells of the three common hits (itraconazole, pyrvinium and berzosertib) alone and in combination with metergoline (MTG) at 5 and 10 µm. A 6 × 5 matrix was used to test drug combinations in human non-WNT/non-SHH MB cell lines. Heat maps representing the Bliss score for two tested combinations: metergoline-itraconazole **(D)** and metergoline-pyrvinium **(E)** All values are the average of at least three independent experiments ± SD, with a technical duplicate in each experiment.

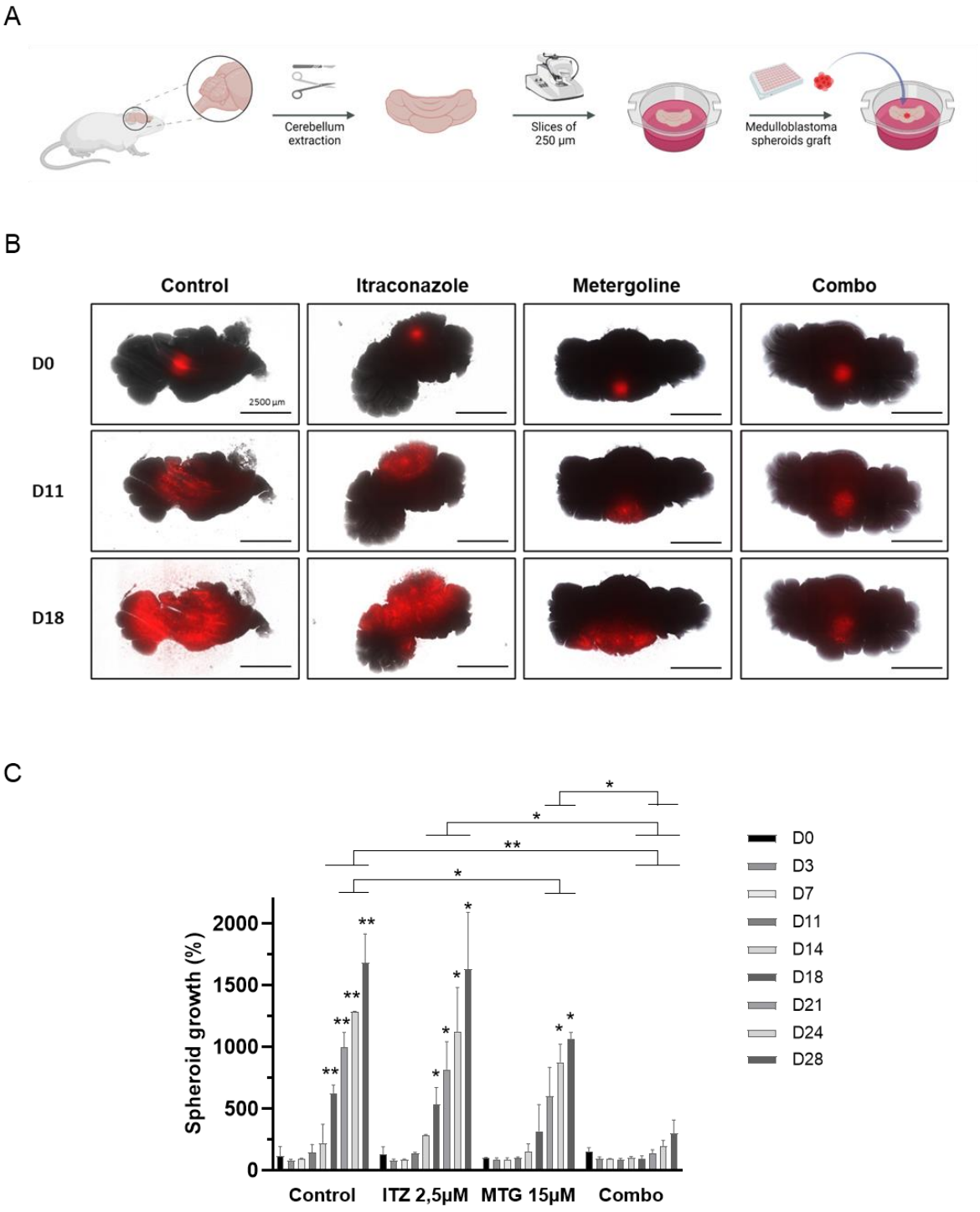
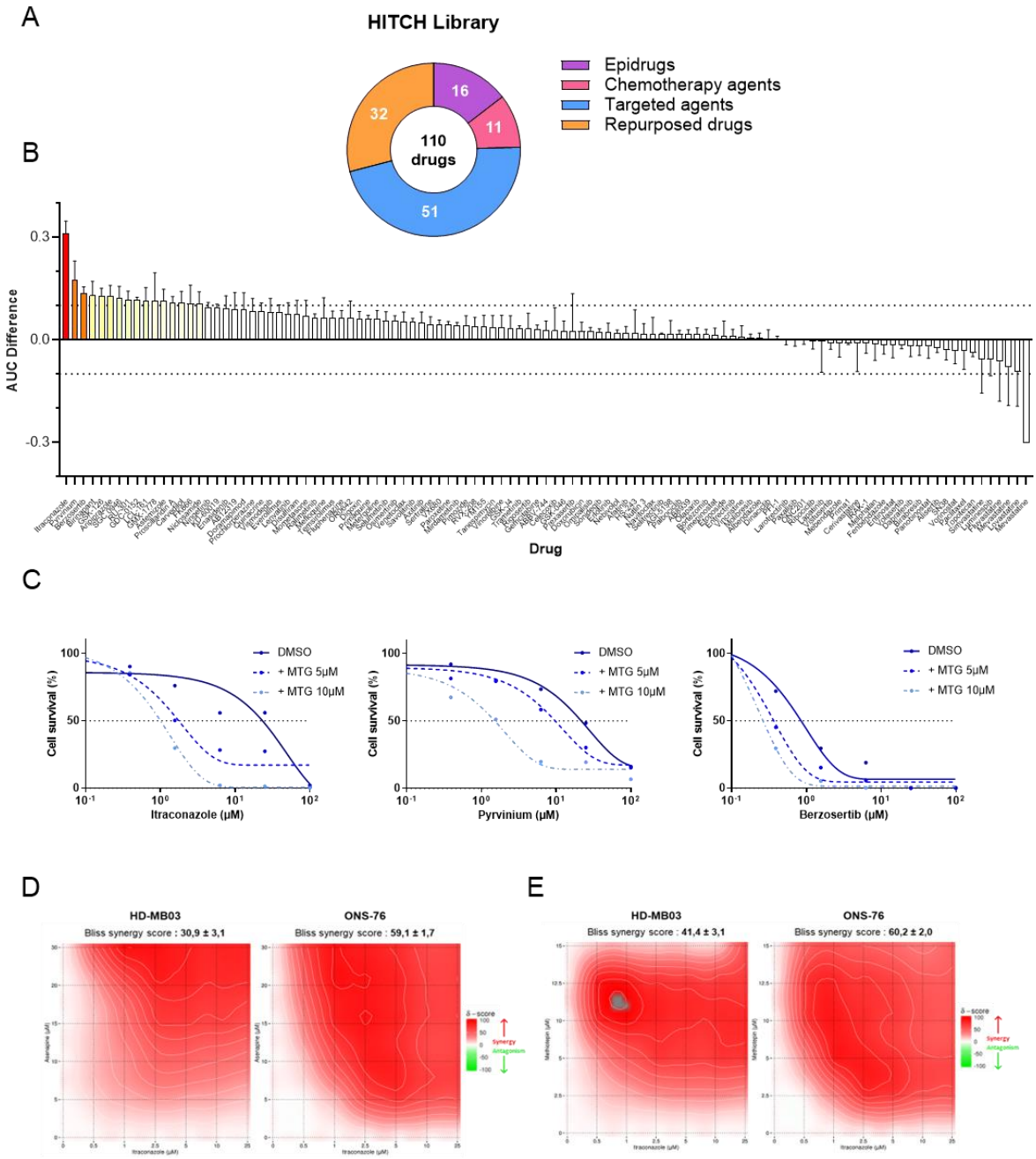


Figure 5 : **Metergoline-induced inhibition of proliferation and survival is potentiated by itraconazole in cerebellar organotypic models.** For twenty-eight consecutive days, the organotypic cerebellar co-cultures were exposed twice a week to 15µM of metergoline (MTG) alone or combined to 2,5µM of itraconazole (ITZ), **(B)** Representative pictures, acquired with the JuLi™ Stage live imaging system, of DsRed-expressing ONS-76 tumour micromasses grafted in slices of healthy cerebellum according the **(A)** experimental setup . Scale bars: 2500µm. **(C)** HD-MB03 tumour growth was measured over 28 days by acquisition of the DsRed signal with the PHERAstar microplate reader (well-scanning mode). Values are the average of n = 2 samples per condition, from one independent experiments ± standard error of the mean (SEM). $*p < 0{\cdot}05$, $**p < 0{\cdot}01$, $***p < 0{\cdot}001$



Supplementary Figure 1 : **Drug combination screening identifies promising combination with metergoline. (A)** 110 compounds in HITCH llibrary are represented in donut diagram and classified by pharmacological classes. **(B)** Waterfall plot illustrating the effects of screening the HITCH library in combination with metergoline (10 µM) on ONS-76, HD-MB03 and D341 Med cells, based on the difference in AUC ± SD between monotherapy treatments and combinations. Each bar corresponds to a compound, ranked according to the magnitude of the mean of the AUC difference in the three cell lines. **(C)** Screening-derived dose-effect curves in HD-MB03 cells of the three common hits (itraconazole, pyrvinium and berzosertib) alone and in combination with metergoline (MTG) at 5 and 10 µm. A 6 × 5 matrix was used to test drug combinations in two human MB cell lines (HD-MB03 and ONS-76). Heat maps representing the Bliss score for two tested combinations : asenapine-itraconazole **(D)** and methiothepin-itraconazole **(E)** All values are the average of at least three independent experiments ± SD, with a technical duplicate in each experiment.

Drug ID	Drug target
Methiothepin	5-HTR1A, 1B, 1D, 2A, 2B, 2C, 5A, 5B, 6, 7
SB 243213	5-HTR1A, 1B, 1D, 1E, 1F, 2A, 2B, 2C, 6, 7
Asenapine	5-HTR1A, 1B, 2A, 2B, 2C, 6, 7
Metergoline	5-HTR1A, 1B, 2A, 2B, 2C, 7
GR-125743	5-HTR1B/1D
LY310762	5-HTR1D
Cyproheptadine	5-HTR2
Naftidrofuryl oxalate	5-HTR2
Ketanserin	5-HTR2A
RS-127445	5-HTR2B
SB-206553	5-HTR2C, 5-HTR2B
Ondansétron	5-HTR3
Intepirdine (SB-742457)	5-HTR6
SB-271046	5-HTR6
SB-269970	5-HTR7
SB-258719	5-HTR7

Supplementary Table 1 : Library of serotonergic antagonists and the subtypes they target, used in the first screening.

Drug ID	Drug family	Drug ID	Drug family
Birabresib	BET inhibitor	Prima1	DNA repair inhibitor
Molibresib	BET inhibitor	Berzosertib	DNA repair inhibitor
PFI-1	BET inhibitor	Nutlin 3	DNA repair inhibitor
ABBV-744	BET inhibitor	Prexasertib	DNA repair inhibitor
GSK-046	BET inhibitor	KU-60019	DNA repair inhibitor
RVX-208	BET inhibitor	Osimertinib	EGFR inhibitor
Entinostat	HDAC inhibitor	Afatinib	EGFR inhibitor
Vorinostat	HDAC inhibitor	Erlotinib	EGFR inhibitor
Panobinostat	HDAC inhibitor	Paxalisib	MAPK / AKT / PI3K inhibitor
Fimepinostat	HDAC inhibitor	Ralimetinib	MAPK / AKT / PI3K inhibitor
SGC 0946	Other Epidrug	Doramapimod	MAPK / AKT / PI3K inhibitor
GSK-J4	Other Epidrug	Selumetinib	MEK inhibitor
GSK-126	Other Epidrug	Trametinib	MEK inhibitor
Pyrvinium	Anti-helminthic	Mirdametinib	MEK inhibitor
Primaquine	Anti-helminthic	Temsirolimus	mTOR inhibitor
Quinacrine	Anti-helminthic	Omipalisib	mTOR inhibitor
Mefloquine	Anti-helminthic	Vistusertib	mTOR inhibitor
Niclosamide	Anti-helminthic	Everolimus	mTOR inhibitor
Mebendazole	Anti-helminthic	GMX-1778	NAMPT inhibitor
Fenbendazole	Anti-helminthic	FK866	NAMPT inhibitor
Albendazole	Anti-helminthic	Ningetinib	Receptor inhibitor
Mometasone	Anti-inflammatory drug	AMG337	Receptor inhibitor
Celecoxib	Anti-inflammatory drug	Savolitinib	Receptor inhibitor
Prochlorperazine	Anti-psychotic	Lapatinib	Receptor inhibitor
Aripiprazole	Anti-psychotic	RU-301	Receptor inhibitor
Fluphenazine	Anti-psychotic	Lenvatinib	Receptor inhibitor
Pimozide	Anti-psychotic	Rigosertib	Receptor inhibitor
Proscillaridin A	Cardiovascular drug	Axitinib	Receptor inhibitor
Carvedilol	Cardiovascular drug	Larotrectinib	TRK inhibitor
Nebivolol	Cardiovascular drug	Selitrectinib	TRK inhibitor
Digoxin	Cardiovascular drug	Entrectinib	TRK inhibitor
Mevastatin	Statin	Tanespimycin	HSP90 inhibitor
Fluvastatin	Statin	Luminespib	HSP90 inhibitor
Simvastatin	Statin	IRAK-1	Other targeted agent
Cerivastatin	Statin	HS-243	Other targeted agent
Lovastatin	Statin	Sonidegib	Other targeted agent
Disulfiram	Other repurposed drug	Enasidenib	Other targeted agent
Buparlisib	Other repurposed drug	Vismodegib	Other targeted agent
Astemizole	Other repurposed drug	ONC201	Other targeted agent
Sertraline	Other repurposed drug	Dabrafenib	Other targeted agent
Paroxetine	Other repurposed drug	AGI-5198	Other targeted agent
Itraconazole	Other repurposed drug	OR0642	Other targeted agent
Metergoline	Other repurposed drug	YM155	Other targeted agent
Navitoclax	Apoptosis targeting	Bortezomib	Other targeted agent
Birinapant	Apoptosis targeting	AB12319	Chemotherapy
LCL-161	Apoptosis targeting	AB8939	Chemotherapy
Olaparib	Apoptosis targeting	Doxorubicin	Chemotherapy
GDC-0152	Apoptosis targeting	Etoposide	Chemotherapy
Venetoclax	Apoptosis targeting	Gemcitabine	Chemotherapy
Dinaciclib	Aurora / PLK / CDK inhibitor	Melphalan	Chemotherapy
Volasertib	Aurora / PLK / CDK inhibitor	Paclitaxel	Chemotherapy
Ribociclib	Aurora / PLK / CDK inhibitor	SN38	Chemotherapy
VX680	Aurora / PLK / CDK inhibitor	Topotecan	Chemotherapy
Palbociclib	Aurora / PLK / CDK inhibitor	Vincristine	Chemotherapy
Alisertib	Aurora / PLK / CDK inhibitor	Vinorelbine	Chemotherapy

Supplementary Table 2 : List of compounds and their drug family from the HITCH library classified into four categories, including epidrugs, repurposable drugs, targeted therapies and chemotherapeutic agents, enabling an assessment of their synergistic potential with metergoline.

III. Discussion/perspectives

- **Inhiber les récepteurs sérotoninergiques dans les MB : une bonne idée ?**

Notre étude met en lumière l'intérêt des pan-inhibiteurs sérotoninergiques dans le traitement des MB. En particulier, la métergoline a démontré des capacités supérieures à réduire la survie et l'invasion des cellules cancéreuses dans un éventail de modèles de MB non WNT/non SHH, allant des cultures 2D aux sphéroïdes 3D et aux co-cultures organotypiques *ex vivo*. La capacité de la métergoline à franchir la BHE renforce son potentiel thérapeutique dans les tumeurs intracrâniennes que sont les MB.

La métergoline comme les autres inhibiteurs qui se sont révélés efficaces dans les cellules de MB (*i.e.* methiothépine et asénapine) se distinguent par leur capacité à antagoniser les récepteurs de sous-types 5-HTR$_{1A/B/D}$, 5-HTR$_{2A/B/C}$ et 5-HTR$_7$. Nos résultats s'accordent avec des études antérieures qui associent spécifiquement les sous-types de récepteurs 5-HTR$_1$, 5-HTR$_2$ et 5-HTR$_7$ à la croissance tumorale *in vitro* et à la transformation maligne *in vivo* dans divers modèles de cancers, comme ceux de la prostate, du poumon, du sein et de l'estomac [283–286,277,278]. Notre observation selon laquelle la modification du résidu benzyl-carbamate de la métergoline entraîne une perte d'activité cytotoxique soutient également cette hypothèse du ciblage des 5-HTR par la métergoline dans les cellules de MB.

La suite de ce travail s'attachera à identifier (ou confirmer) le panel de sous-types de récepteurs mis en jeu dans la réponse des cellules de MB à la métergoline, afin de mieux comprendre le mécanisme d'action sous-jacent à l'efficacité anticancéreuse des médicaments anti-sérotoninergiques repositionnables. Pour ce faire, nous avons débuté une analyse par puces RT-PCR de l'ensemble des gènes impliqués dans la voie de la sérotonine, en vue de : *(i)* définir quels récepteurs et acteurs moléculaires de la voie sont exprimés dans les cellules de MB, et comparer ces profils d'expression à ceux observés dans des cellules non-cancéreuses ; *(ii)* caractériser les acteurs clés de la signalisation sérotoninergique dont l'expression est modulée par une exposition des cellules de MB à la métergoline.
Dans une très faible mesure par rapport à l'affinité qu'elle présente pour les 5-HTR, la métergoline est capable d'interagir avec les récepteurs dopaminergiques. Nous avons donc entamé l'étude de cette voie également, par puces RT-PCR. L'absence d'efficacité anticancéreuse de la cabergoline, composé qui présente quant à lui une forte affinité pour les récepteurs dopaminergiques et très faible pour les 5-HTR, suggère fortement une implication marginale de la voie de la dopamine dans la réponse des cellules de MB à cette famille de médicaments. Par ailleurs, aux doses préconisées pour son utilisation en tant qu'anti-prolactinémique, la métergoline ne possède pas d'action dopaminergique (réduisant ainsi l'apparition des phénomènes de vomissement). L'analyse de cette voie

permettra d'évaluer avec précision son influence éventuelle – ou confirmer son absence de participation – dans la réponse des cellules de MB à la métergoline.
Au-delà d'une meilleure compréhension de l'efficacité de la métergoline dans les cellules cancéreuses, la caractérisation des cascades signalétiques mises en jeu vise à identifier des biomarqueurs de réponse au traitement et révéler de nouvelles vulnérabilités des MB qui aideront à définir les options thérapeutiques les plus appropriés.

Quels que soient les récepteurs et co-facteurs impliqués, l'avenir de ce projet devra également passer par une étude du phénomène de mort cellulaire résultant de l'exposition à la métergoline. Au regard de nos résultats préliminaires montrant une perturbation de la dynamique du réseau mitochondrial (données non montrées), une attention particulière sera portée à l'induction du programme de mort apoptotique intrinsèque. Des études ont montré que ce processus de mort cellulaire est induit par la métergoline chez *Candida krusei* et par la methiotepin dans les cancers de la prostate et de l'ovaire [287–289]. Pour autant, d'autres morts cellulaires devront être investiguées telle que la ferroptose, dont le principe repose sur l'accumulation létale de lipides peroxydés, due aux réactions initiées par le fer libre intracellulaire. Son déclenchement dans les MB a été montré sous l'effet de différents inducteurs comme l'érastine, le RSL3 ou un donneur de fer [290]. De plus, l'implication du récepteur 5-HTR_{2B}, dans la régulation des lipides et l'inhibition de la ferroptose a récemment été mise en évidence dans le cancer gastrique [278], suggérant un rôle possible dans le mécanisme d'action de la métergoline, qui inhibe ce récepteur.
Là encore, l'objectif est double : comprendre les mécanismes moléculaires soutenant l'efficacité anticancéreuse de la métergoline, mais également révéler les vulnérabilités communes aux MB non-WNT/non-SHH qui permettront de rationaliser les futurs traitements et de contourner les éventuelles résistances.

- **Quand la polypharmacologie s'en mêle…**

L'expérience acquise par notre équipe dans le repositionnement de médicaments, notamment à travers nos travaux sur les bêta-bloquants et le mébendazole, confirme le concept de polypharmacologie selon lequel un médicament repositionné peut éventuellement exercer son activité anticancéreuse *via* des mécanismes distincts de ceux régissant son action thérapeutique dans son indication initiale. Nous avons donc mis en place des techniques permettant d'identifier les interacteurs non-conventionnels des médicaments, afin de maximiser leur potentiel clinique et leurs résultats thérapeutiques. Afin d'explorer toutes les cibles potentielles de la métergoline, nous avons choisi d'utiliser plusieurs approches complémentaires, permettant non seulement de valider les cibles canoniques, mais aussi d'identifier de nouvelles cibles non-canoniques.

Le **Profilage Thermique du Protéome** (TPP) fait justement partie des approches expérimentales, dites non supervisées, utilisables dans le cadre du repositionnement de médicaments (*cf* Partie1-Chapitre 3 et Fig. 13). Cette méthode puissante, mise au point

par Baptiste Mouysset dans notre équipe, permet d'identifier les partenaires protéiques déjà connus d'un médicament et/ou de découvrir des cibles dites non-canoniques à grande échelle. Elle repose sur le principe physique qui fait que l'interaction d'une petite molécule avec une protéine peut affecter la stabilité thermique de cette dernière. Autrement dit, lorsque le médicament se lie à sa cible protéique, il modifie la température à laquelle cette protéine perd sa conformation tridimensionnelle. L'expérience de TPP que nous avons réalisée a consisté à exposer les lysats des cellules HD-MB03 à la métergoline (20µM), puis à les soumettre à des paliers de températures croissantes (37 – 64°C). Dans ces conditions, les protéines non stabilisées par le médicament ont précipité (à leur température de dénaturation), tandis que les protéines liées au médicament sont restées intactes en solution. Les protéines solubles ont alors été analysées par spectrométrie de masse, sur la plateforme MaP du CRCM. En comparant les échantillons traités et non traités, les protéines dont la stabilité thermique a été modifiée ont été identifiées. Nous avons ainsi mis en évidence un large éventail d'interacteurs protéiques, révélant autant de cibles potentielles de la métergoline (Volcano plot - Fig. 28).

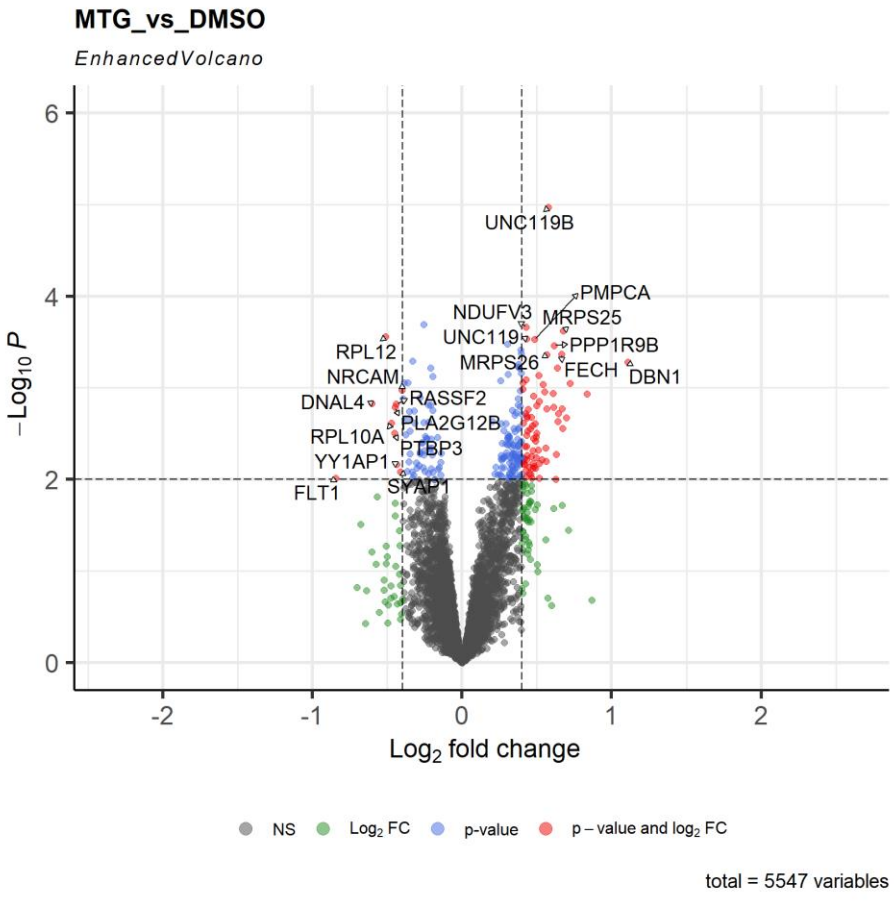


Figure 28 : Volcano plot illustrant les partenaires protéiques de la métergoline, analysés par spectrométrie de masse après expérience de TPP sur lysats cellulaires de HD-MB03

L'étude des données générées met en avant les acteurs de la traduction mitochondriale comme un ensemble de cibles impliquées dans le mécanisme d'action antitumoral de la

metergoline (Fig. 29). Leur rôle dans la réponse des cellules de MB à ce médicament devra être explorée dans le détail, d'autant plus qu'une étude a récemment mis en évidence le potentiel thérapeutique de cette voie dans les glioblastomes [291]. Dans la continuité de nos travaux, nous prévoyons donc de valider de manière orthogonale ces cibles de la métergoline identifiées par TPP, en utilisant à la fois une approche par interférence ARN et des inhibiteurs pharmacologiques comme certains antibiotiques ciblant spécifiquement la traduction mitochondriale.

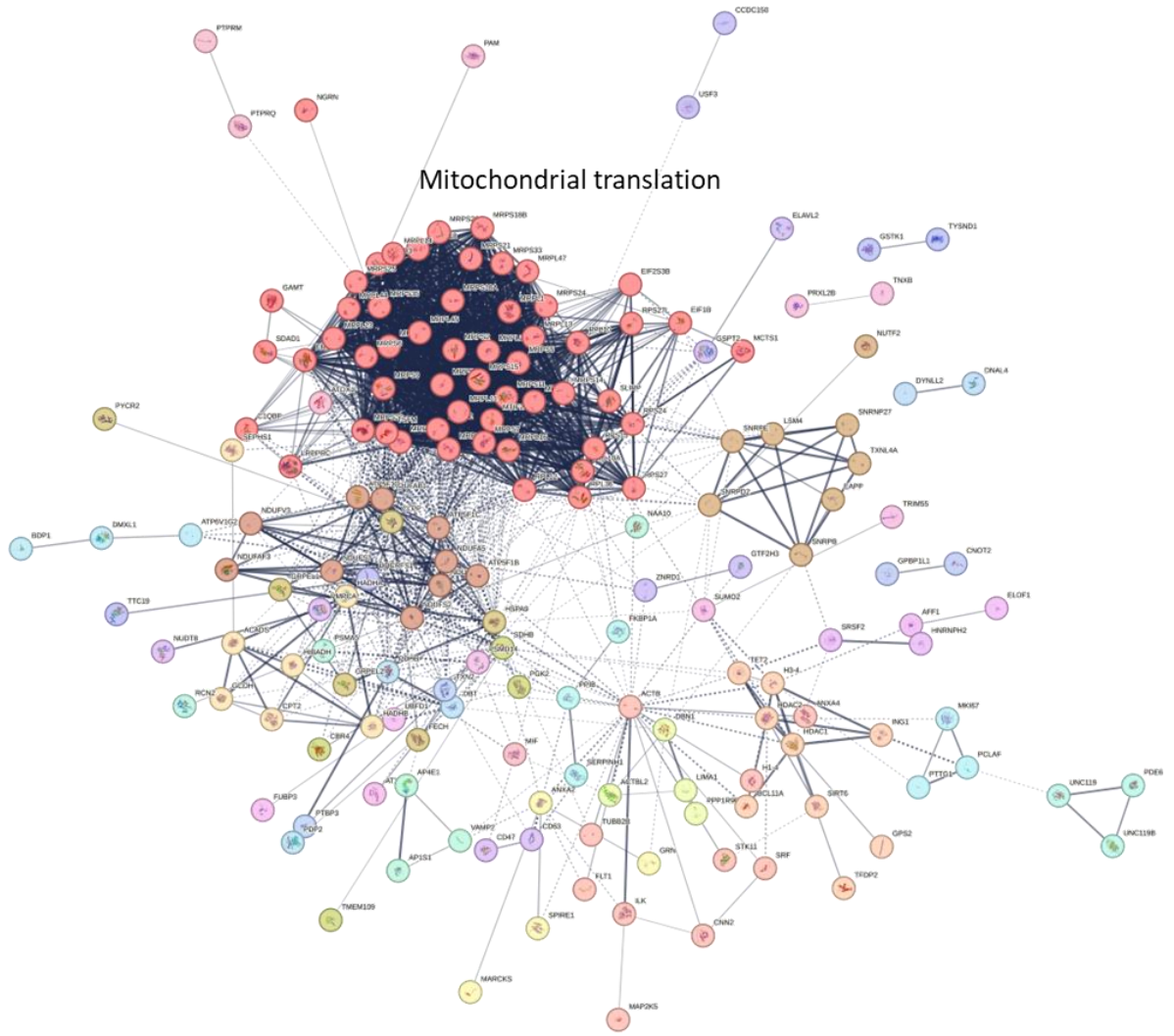


Figure 29 : Identification des partenaires protéiques potentiels de la métergoline, analysés par TPP (n=3) et regroupés selon leurs interactions via la base de données String.
L'analyse met en évidence l'implication de la voie de la traduction mitochondriale dans le mécanisme d'action de la métergoline.

De façon complémentaire, la **click-imagerie** peut être utilisée pour observer en temps réel l'action et le comportement de molécules, telles que des médicaments, à l'intérieur des cellules. Elle repose sur une réaction chimique dite de « click », qui permet de coupler

de manière covalente deux molécules sans perturber le système biologique. Cette approche, récompensée par le Prix Nobel de Chimie 2022 décerné à Carolyn Bertozzi, Barry Sharpless et Morten Meldal, s'est imposée comme une technique incontournable pour étudier les interactions biochimiques. En effet, la chimie click est rapide, hautement sélective et compatible avec des conditions physiologiques douces, minimisant ainsi les perturbations cellulaires. Dans le cadre de notre étude sur l'action de la métergoline dans les cellules de MB, nous avons généré deux dérivés fonctionnalisés avec un groupement alcyne à différents endroits de la structure moléculaire (*cf* Fig. 3A de l'article). Le dérivé dit « MTG-click 2 », dont l'activité cytotoxique est parfaitement maintenue par rapport à celle de la molécule parentale, pourra être utilisé pour mieux comprendre les mécanismes d'action de la métergoline au niveau subcellulaire. Pour ce faire, les cellules seront exposées à la MTG-click 2, puis à un fluorophore portant le partenaire complémentaire du groupement alcyne, liant ainsi ce fluorophore à la métergoline au sein même des cellules (*cf* réaction de click - Fig. 30). Les sites d'action du médicament repositionné pourront ainsi être analysées par des techniques d'imagerie avancée en temps réel.

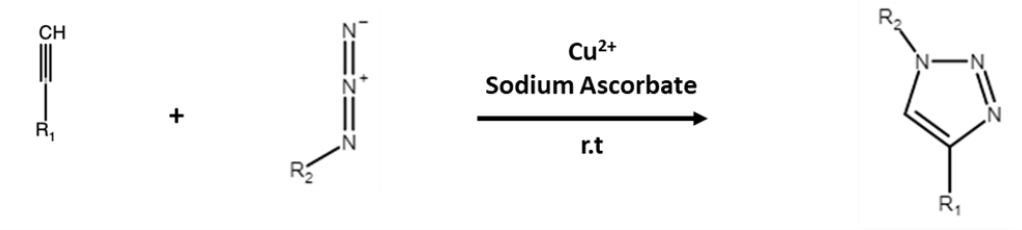


Figure 30 : Réaction de « click » entre un alcyne (R1 représentant la métergoline dans notre étude) et un azide (R2 étant le fluorophore), en présence de cuivre et d'ascorbate

En complément, des expériences de co-localisation par microscopie confocale permettront d'analyser la répartition spatiale de la métergoline et d'évaluer son effet sur la localisation de ses cibles (préalablement identifiées par TPP). Nous analyserons également l'effet du traitement sur l'activité fonctionnelle de ces cibles, en nous concentrant particulièrement sur les altérations du réseau mitochondrial.
Ainsi, les approches de TPP et de click-imagerie fourniront, de façon hautement complémentaire, de précieuses informations sur la biodistribution intracellulaire, la cinétique d'action et l'identification des cibles moléculaires de la métergoline.

- **Les associés de la métergoline**

Comme la grande majorité des traitements anticancéreux reposent sur l'association de plusieurs médicaments pour assurer une activité optimale, nous avons étudié avec quels autres médicaments la métergoline pourrait être proposée. Nous avons ainsi mis en évidence plusieurs options de traitements combinatoires, le plus efficace étant celui avec l'**itraconazole**. Ce médicament est initialement utilisé pour ses propriétés antifongiques à large spectre *via* l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol, constituant essentiel de la membrane des champignons et des levures. Cependant, il présente diverses activités

anticancéreuses, qui reposeraient sur l'induction de l'apoptose et de l'autophagie, ou l'arrêt du cycle cellulaire dans des cellules cancéreuses humaines [292]. Il a été caractérisé, *in silico*, comme un inhibiteur du signal oncogène C1GALT1 qui concoure à diminuer l'affinité de liaison EGF-EGFR et inhiber la signalisation EGFR [293]. Son activité sur la voie WNT et sur la voie HH, en tant qu'inhibiteur de Smo, a également été démontrée [294,295], le faisant entrer dans la catégorie des médicaments potentiellement repositionnables dans les cancers présentant une suractivation de ces voies, tels que les MB des sous-groupes éponymes. Il a été rapporté que l'itraconazole exerçait également ses effets antitumoraux en ciblant d'autres voies de signalisation telles que AMPK et PI3K/mTOR [294,296,297]. Cette dernière étant également inhibée par la métergoline, elle est susceptible d'expliquer la synergie par une inhibition simultanée. L'association de ces médicaments est d'autant plus prometteuse que l'expression des gènes impliqués dans les voies PI3K/AKT dans les MB non-WNT/non-SHH est associée à une faible survie [298].

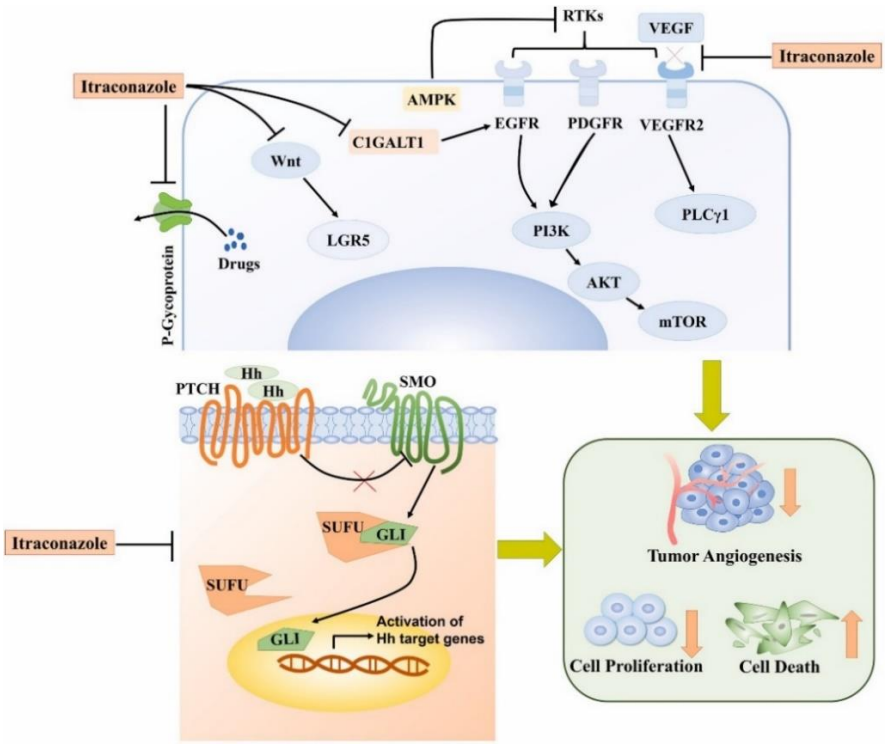


Figure 31 : Mécanisme anticancéreux multi-cibles de l'itraconazole. figure issue de [292].

Bien que l'expérimentation animale ne soit plus systématiquement requise pour les médicaments repositionnés, son utilisation reste justifiée dans notre étude en raison du risque d'ergotisme associé à la métergoline. Ayant préalablement obtenu le diplôme d'habilitation à l'expérimentation animale, j'ai pu suivre une formation en greffe orthotopique de MB, auprès de Magalie Larcher, ingénieure dans l'équipe du Dr Célio Pouponnot à l'Institut Curie. Cette collaboration m'a donné l'opportunité de réaliser une première expérience associant métergoline et itraconazole sur des souris surnuméraires. Les courbes de survie Kaplan-Meier obtenues à partir de ces données préliminaires (Fig.

32) montrent que l'unique dose choisie pour la métergoline et l'unique dose choisie pour l'itraconazole ne sont pas assez élevées pour être efficaces en tant que telles. Dans ces conditions, sans surprise, l'association de ces deux médicaments n'a eu aucun bénéfice. Nous planifions donc des investigations supplémentaires, qui nécessiteront de tester une gamme de doses afin de déterminer celles qui seront les plus adaptées à une utilisation en combinaison sur ces modèles murins. Bien que cette 1ère expérience n'ait révélé aucune perte de poids majeure ni comportement animal modifié, la toxicité de l'association devra être surveillée attentivement dans nos futures études afin d'assurer la sécurité des traitements dans des conditions optimisées.

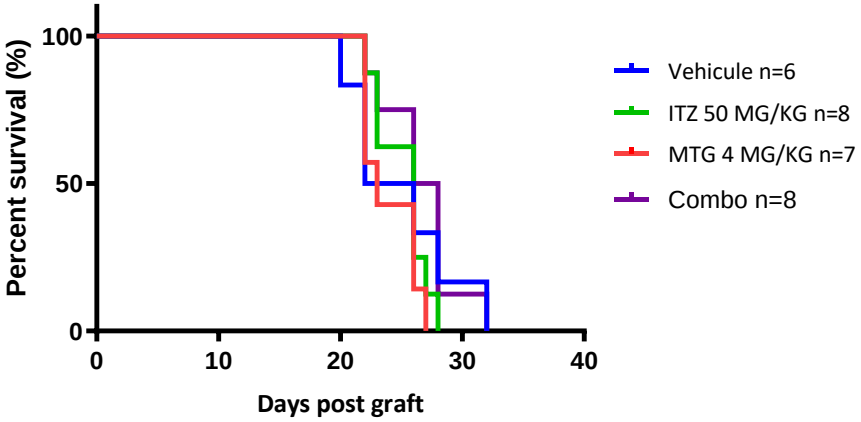


Figure 32 : Courbes de survie Kaplan-Meier de souris porteuses de MB ayant reçu par gavage oral 5 fois par semaine, à partir de 4 jours après l'injection orthotopique de cellules HD-MB03, le solvant seul (1/10 DMSO dans de l'huile de maïs ; bleu), l'itraconazole (50 mg/kg ; vert), la métergoline (4 mg/kg ; rouge) ou la combinaison des deux médicaments (violet).

Une fois validé l'intérêt de cette association thérapeutique dans les MB *in vivo*, il sera pertinent de la valoriser dans d'autres types de tumeurs intracrâniennes, touchant les populations pédiatriques comme adultes. Nos résultats obtenus dans des cellules de glioblastome adulte confirment par exemple la synergie entre métergoline et itraconazole (Fig. 33). Poursuivre ces travaux dans un panel de tumeurs élargi permettrait d'améliorer les options thérapeutiques pour un plus grand nombre de patients, tout en approfondissant notre compréhension des mécanismes impliqués.

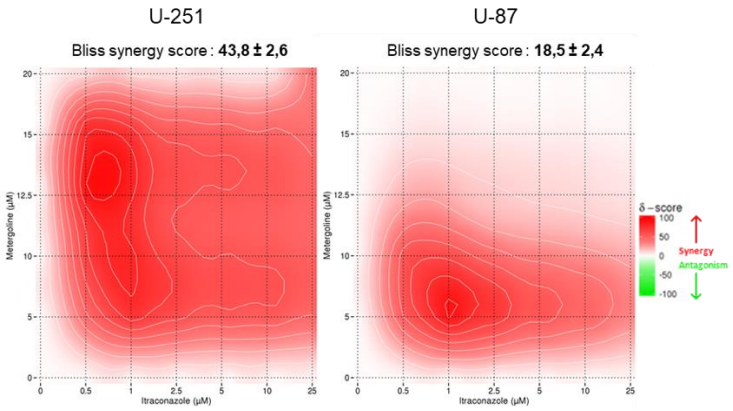


Figure 33 : Heatmaps représentant les scores de synergies (Bliss score) pour l'association métergoline-itraconazole dans des cultures 2D de cellules de glioblastomes U-87 et U251

Notre étude souligne également que la métergoline peut être potentialisée par le médicament anthelminthique **pyrvinium**. Son activité léthale contre les parasites a été attribuée à son interférence avec l'absorption du glucose [299]. Il a également été décrit pour sa capacité à inhiber la respiration mitochondriale de cellules cancéreuses, dans un environnement dépourvu de glucose [300]. Les travaux de l'équipe de Lee *et al*. ont permis d'identifier un mécanisme double par lequel le pyrvinium inhibe la voie de signalisation WNT à la fois en activant l'activité de la Casein kinase 1α (CK1α) et en atténuant sa déstabilisation médiée par Cereblon [301,302] (Fig. 34). CK1α est également un régulateur clé de la signalisation Hedgehog, voie impliquée dans la tumorigenèse des MB du sous-groupe SHH. L'action agoniste du pyrvinium sur cette kinase atténue l'activité de la voie Hedgehog par la déstabilisation de Gli en aval de Smo et la croissance tumorale *in vivo* dans des modèles murins d'allogreffes de MB [303]. Malgré sa faible biodisponibilité, nécessitant de possibles stratégies d'administration innovantes, le repositionnement du pyrvinium en tant qu'anticancéreux constitue un espoir dans le traitement des MB des sous-groupes WNT et SHH, caractérisés par une suractivation des voies de signalisation du même nom. Nos travaux, quant à eux, suggèrent que le pyrvinium pourrait également offrir des bénéfices dans les MB non WNT/non SHH, bien que le mécanisme d'action sous-jacent à cette efficacité reste à élucider.

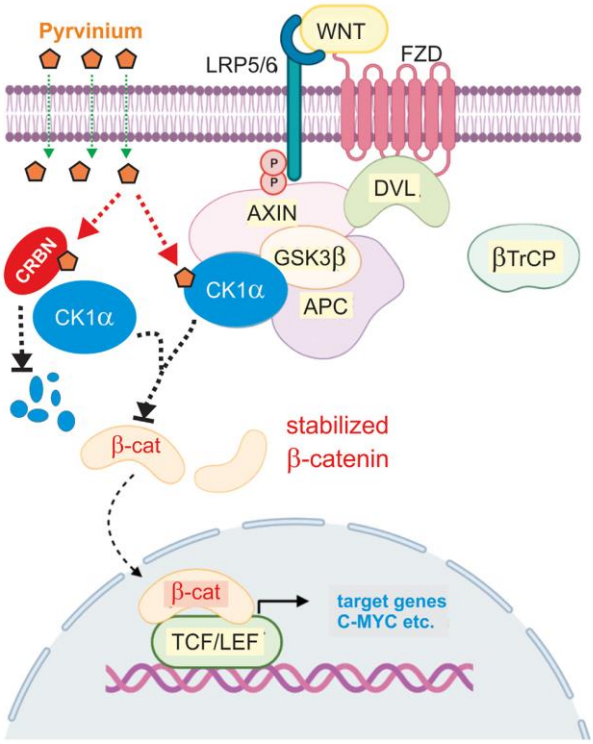


Figure 34 : Mécanisme du pyrvinium dans la signalisation WNT contrôlée par CK1α, issu de [304]

A l'avenir, la caractérisation précise des cibles engagées dans le mécanisme d'action de la métergoline pourrait conduire à envisager d'autres pistes combinatoires, dans le traitement de ces tumeurs intracraniennes. Ainsi, même si des analyses approfondies restent nécessaires avant de pouvoir envisager pleinement le repositionnement de la métergoline, nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour son utilisation, élargissant son champ d'application au traitement des MB de mauvais pronostic, en particulier lorsqu'elle est combinée avec l'itraconazole. Face à la rareté des cibles thérapeutiques disponibles pour les MB non WNT/non SHH et aux défis liés à l'âge des patients, notre étude propose une alternative innovante qui vise à améliorer la prise en charge clinique et le pronostic des jeunes patients.

<u>Partie 3</u> : Travaux collaboratifs

Associations entre médicaments repositionnés et traitements standards des médulloblastomes

I. Avant-propos

L'utilisation d'un traitement repose sur une approche stratégique de bénéfices/risques, qui vise à optimiser l'efficacité thérapeutique tout en considérant les effets secondaires potentiels et la sécurité d'emploi de chaque médicament. Les cancers, maladies complexes et hétérogènes, résultent de multiples mécanismes biologiques et impliquent divers types de cellules tumorales [305,306]. Dans ce contexte, les traitements anticancéreux sont, en général, plus efficaces en multithérapie qu'en monothérapie. Les associations de médicaments aux mécanismes d'action différents permettent en effet d'agir sur plusieurs fronts simultanément. Cela contribue notamment à minimiser le risque de résistance des cellules cancéreuses [307,308]. Dans le cas des MB aussi, l'intégration de nouveaux médicaments repositionnés dans les protocoles de soins standard pourrait permettre d'obtenir une action optimale. Une synergie conduirait à proposer des traitements plus efficaces aux jeunes patients n'en bénéficiant pas encore, et/ou à réduire les doses des traitements actuels afin d'en limiter les effets secondaires associés [309].
Les nouvelles classes de médicaments, telles que les thérapies ciblées, les immunothérapies et les thérapies géniques, ne dérogent pas à la règle, en illustrant elles aussi l'intérêt des thérapies combinatoires. Ces traitements innovants sont en effet souvent associés à des thérapies conventionnelles pour en maximiser l'efficacité et s'intégrer dans les protocoles de traitements existants. De plus, une analyse des essais cliniques annuels en oncologie (de 2007 à 2021 sur clinicaltrials.gov) a montré que, malgré une augmentation du nombre d'essais au fil du temps, la proportion de monothérapies a fortement chuté, passant de 70 à 20–30 % [310].

Dans cette 3ème partie, nous aborderons différentes stratégies thérapeutiques combinant le repositionnement de médicaments avec des traitements standards. Nous explorerons d'abord l'association de la métergoline avec la chimiothérapie conventionnelle, avant d'examiner son potentiel futur en association avec des thérapies ciblées. Enfin, nous verrons comment l'utilisation des bêta-bloquants peut contribuer à la réduction des doses de radiothérapie nécessaires.

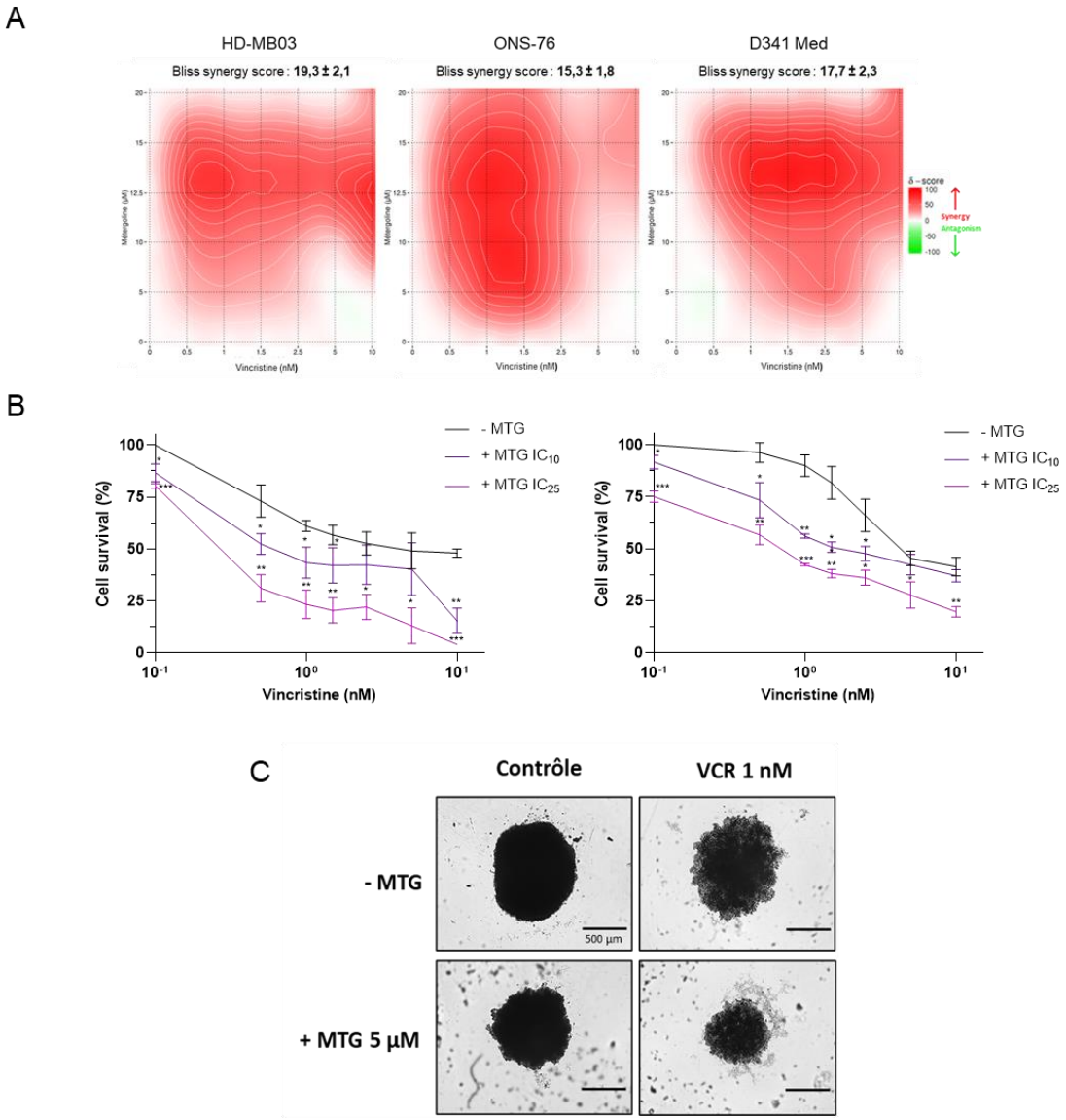
II. Résultats/Discussion

- **La métergoline peut-elle soutenir l'efficacité des protocoles de chimiothérapie conventionnelle ?**

Forts de nos résultats sur l'efficacité de la métergoline en monothérapie (*cf* Partie 2), nous avons entrepris de la tester en association avec la vincristine, agent de chimiothérapie conventionnelle utilisé dans le traitement des MB. Sur la base des protocoles mis au point pour les précédentes expériences d'associations médicamenteuses, une matrice 6 × 5 incluant la vincristine et la métergoline à différentes

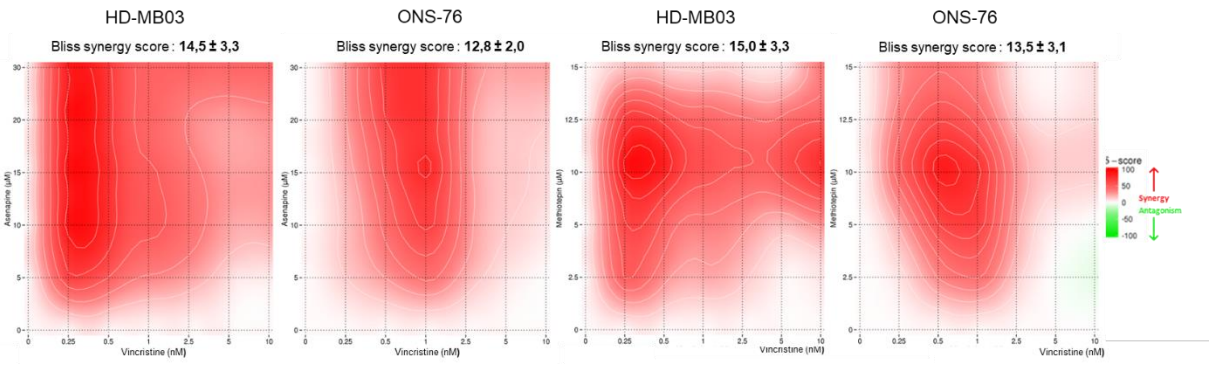
concentrations a été créée, nous permettant de couvrir un large éventail de combinaisons de médicaments (30 différentes). Pour évaluer la synergie des traitements avec ces deux composés, le score de Bliss a été calculé, à l'aide de l'application web SynergyFinder. Cet indicateur mathématique est utilisé pour évaluer si deux agents agissent de manière antagoniste, additive ou synergique. Après 72 h de traitement, nous avons trouvé un effet synergique entre la vincristine et la metergoline dans les cellules de MB non-WNT/non-SHH testées, comme le montrent les scores de Bliss allant de 15,3 ± 1,8 pour ONS-76 à 19,3 ± 2,1 pour HD-MB03 (Fig. 35A). Les courbes dose-réponse présentées en Fig. 35B illustrent également l'intérêt de cette association. De faibles concentrations de métergoline (IC_{10} et IC_{25}) suffisent en effet à améliorer de façon significative l'activité de la vincristine sur l'ensemble de la gamme ($p<0,05$ *vs* vincristine seule), et ce dans les 2 modèles cellulaires étudiés. Des résultats préliminaires indiquent que cette potentialisation n'est pas observée avec une autre classe d'agent de chimiothérapie conventionnelle, que sont les sels de platine (données non montrées).

Nous avons donc poursuivi l'exploration de l'association vincristine + métergoline sur le modèle de sphéroïdes de cellules HD-MB03. Ces derniers ont été exposés aux traitements (à J0) et les effets du co-traitement ont été déterminés par acquisition de photos au microscope optique (système JuLIStage). Nos résultats montrent que l'ajout d'une faible concentration de métergoline (5µM) à la vincristine 1 nM entraine une réduction de la croissance des micromasses tumorales et une déstructuration accrue des sphéroïdes, deux processus témoignant de l'efficacité de l'association sur ces structures 3D (Fig. 35C).



*<u>Figure 35</u> Inhibition de la survie des cellules de MB par l'association métergoline-vincristine (A) Heatmaps représentant les scores de synergies (Bliss score) pour l'association métergoline-vincristine (HD-MB03, ONS-76 et D341 Med). (B) Survie cellulaire mesurée après 72 h de traitement avec la vincristine seule et son association avec la métergoline (IC_{10} et IC_{25}) dans les cellules de MB (HD-MB03 et ONS-76), (C) Sphéroïdes HD-MB03 exposées, au jour 0, à 5µM de métergoline (MTG) et/ou 1 nM de vincristine (VCR), Photos acquises au jour 7 avec le système JuLi™ Stage. Barres d'échelle : 500 µm. * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 vs contrôle.*

L'effet potentialisateur de la vincristine par la métergoline a également été mis en évidence avec deux autres antagonistes sérotoninergiques : la méthiothépine et l'asénapine. Cette synergie est caractérisée par des scores de Bliss similaires à ceux observés avec la métergoline dans les cellules HD-MB03 et ONS-76. (Fig. 36). Ces résultats suggèrent donc fortement que les voies sérotoninergiques jouent un rôle clé dans la modulation de la réponse des cellules cancéreuses à la vincristine.



<u>Figure 36</u> : Heatmaps représentant les scores de synergies (Bliss score) pour l'association asénapine-vincristine (à gauche) et méthiothepin-vincristine (à droite), dans des cultures 2D de cellules de MB non-WNT/non-SHH (HD-MB03 et ONS-76)

Ainsi, nos résultats montrent que, en plus de réduire efficacement la survie des cellules de MB (*cf* Partie 2), les inhibiteurs des 5-HTR améliorent très significativement les effets de la vincristine dans des cellules issues des groupes de MB présentant les plus sombres pronostics. Ils ouvrent donc la voie à une nouvelle stratégie thérapeutique basée sur l'utilisation combinée de la vincristine et d'antagonistes sérotoninergiques repositionnés, pour maximiser l'efficacité thérapeutique tout en réduisant les doses nécessaires et, conséquemment, leur toxicité associée.

- **La métergoline peut-elle envisager son avenir combinatoire avec des thérapies ciblées ?**

Le criblage à haut débit que nous avons réalisé (*cf* article de la partie 2) a non seulement permis d'identifier des associations avec des médicaments repositionnables, mais aussi de découvrir quelles thérapies ciblées seraient en mesure de potentialiser l'efficacité de la métergoline. Bien que leur usage général ait pris du retard en oncologie pédiatrique par rapport à l'essor observé depuis plus de deux décennies dans les cancers de l'adulte, les thérapies ciblées gagnent en importance ces dernières années, soulignant la nécessité de les considérer dans les futures approches thérapeutiques.

Nos résultats placent le **Berzosertib** en 3ème position des agents capables de potentialiser les effets de la métergoline sur cellules de MB. Cette thérapie ciblée est actuellement en essais cliniques dans une grande variété de cancers de l'adulte, mais pas encore dans les cancers de l'enfant et de l'adolescent. Son ciblage de la kinase ATR, régulateur central de la réponse aux dommages de l'ADN, est particulièrement intéressant puisque cet acteur moléculaire joue un rôle essentiel dans l'oncogenèse du MB [311]. Par ailleurs, le rôle de cette kinase dans la réponse à la radiothérapie fait de son ciblage pharmacologique une stratégie de choix dans les tumeurs réfractaires traitées par ce biais [312,313].

Parmi les thérapies ciblées évaluées, l'**osimertinib** s'est également distingué en association avec la métergoline, éveillant notre intérêt pour les inhibiteurs de la voie de l'EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor). Ces agents, connus pour leur capacité à

inhiber la prolifération et la survie des cellules tumorales, sont couramment employés dans le traitement des cancers présentant des mutations activatrices de l'EGFR [314]. L'étape de validation de l'efficacité de la combinaison métergoline / osimertinib dans les cellules HD-MB03 révèle une forte synergie, avec un score de Bliss de 14,1 ± 3,0 (Fig. 37A). En parallèle, nous avons montré que l'association entre métergoline et afatinib, autre inhibiteur de l'EGFR, conduisait également à un effet synergique dont le score Bliss global est de 12,3 ± 4,8 dans la même lignée (Fig. 37A). Ces observations ont été confirmées dans les modèles de sphéroïdes tumoraux profilératifs (HD-MB03) et pro-migratoires (ONS-76), montrant une inhibition accrue de la croissance des micromasses tumorales (Fig. 37B), et renforçant la pertinence de cette stratégie combinatoire. En revanche, l'erlotinib, inhibiteur de la même classe thérapeutique très largement utilisé en clinique, n'a montré qu'un profil d'additivité, la synergie étant limitée à une gamme de concentrations restreinte dans nos modèles de MB (Fig. 37A). Ainsi, si des recherches additionnelles seront nécessaires pour élucider la raison d'une telle variabilité entre agents anti-EGFR, la synergie entre métergoline et osimertinib est particulièrement prometteuse au regard du fait que cet anti-EGFR a été spécialement conçu pour franchir efficacement la BHE. Il est donc souhaitable que les travaux qui seront effectués à la suite de mon étude prêtent une attention particulière à cette association, au fort potentiel de transfert vers la clinique.

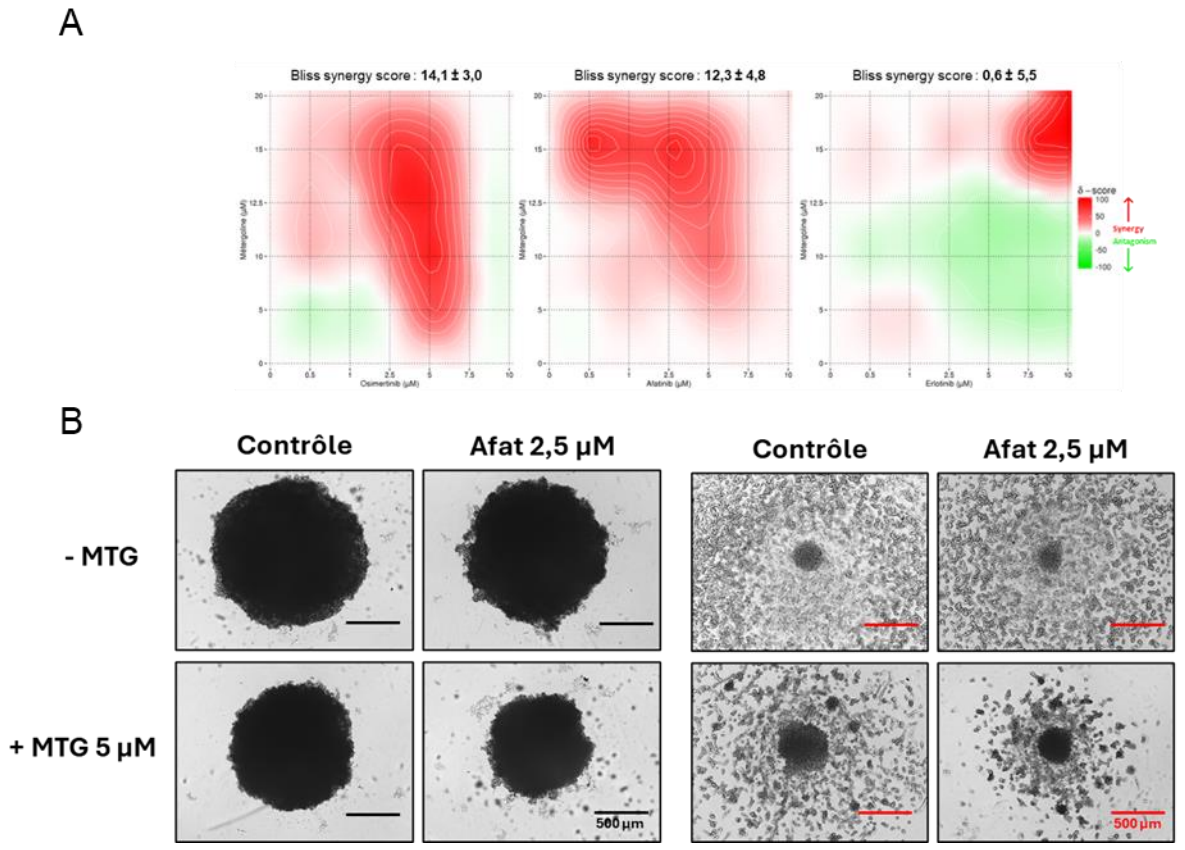
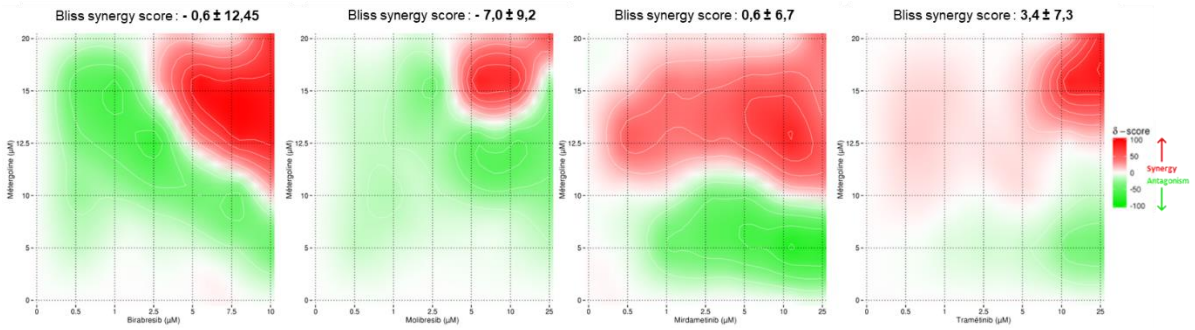


Figure 37 : Association entre métergoline et thérapies ciblées anti-EGFR (A) Heatmaps représentant les scores de synergies (Bliss score) pour l'association de la métergoline avec des thérapies ciblées anti-EGFR : osimertinib, afatinib et erlotinib (de gauche à droite), dans des

cultures 2D de HD-MB03 (B) Sphéroïdes HD-MB03 (à gauche) et ONS-76 (à gauche) exposées, au jour 0, à 5µM de métergoline (MTG) et/ou 2,5 µM d'afatinib (Afat), Photos acquises au jour 14 avec le système JuLi™ Stage. Barres d'échelle : 500 µm.

D'autres associations entre métergoline et thérapies ciblées n'ont pas eu autant de succès que celle avec les anti-EGFR. En effet, nous avons étendu notre analyse aux inhibiteurs de BET (Bromodomain and Extra-Terminal proteins), composés en cours de développement clinique pour des cancers agressifs comme le cancer du sein triple négatif, le cancer de la prostate et certains cancers hématologiques [315]. Dans les cellules HD-MB03, les associations entre métergoline et birabresib ou molibresib ont résulté en un antagonisme, marqué par avec des scores de Bliss négatifs (Fig. 38). De même, les effets de la métergoline sur les cellules de MB n'ont pas été améliorés par le mirdamétinib et le tramétinib, inhibiteurs de MEK (mitogen-activated protein kinase) particulièrement efficaces dans les cancers porteurs de mutations BRAF [316].



<u>Figure 38</u> : Heatmaps représentant les scores de synergies (Bliss score) pour l'association de la métergoline avec, de gauche à droite, des inhibiteurs de BET : birabresib et molibresib et avec des inhibiteurs de MEK : mirdametinib et trametinib, dans des cultures 2D de HD-MB03

Il est à noter que la banque de molécules et médicaments évaluée dans notre étude sur cellules de MB n'inclut pas d'inhibiteurs d'Akt. Pourtant, au vu du mécanisme d'action proposé pour les antagonistes sérotoninergiques (*cf* Partie 2), l'exploration des bénéfices potentiels de leur association avec les inhibiteurs d'Akt serait particulièrement informative. La capivasertib suscite notamment un intérêt croissant et fait actuellement l'objet d'une évaluation clinique dans le cadre de l'essai européen E-SMART.

Enfin, d'autres classes de thérapies ciblées seraient également intéressantes à étudier en association avec la métergoline. A l'avenir, il faudra intégrer dans nos études combinatoires des modèles permettant notamment d'évaluer les inhibiteurs de l'angiogenèse, processus qui joue un rôle important dans la pathogenèse et la survie des MB [317,318]. Le bévacizumab, anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), a ainsi montré une efficacité dans le traitement d'un patient atteint de MB [319]. Toutefois, l'apparition de mécanismes de résistance, basés sur l'activation de voies alternatives de néoangiogenèse [320], limite souvent cette efficacité

dans les tumeurs intracraniennes et illustre encore la nécessité de stratégies thérapeutiques combinées pour contrer ce phénomène [321] L'axitinib, inhibiteur des VEGFR, a également montré des résultats prometteurs à la fois *in vitro* et *in vivo* dans les MB [322]. Il fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase I/II pour évaluer son efficacité chez les enfants et adolescents atteints de MB ou d'épendymome réfractaires ou en rechute (MEPENDAX ; NCT06485908). Nos résultats préliminaires tendent à exclure la possibilité d'une synergie entre axitinib et métergoline, mais l'association entre antisérotoninergiques et anti-VEGFR méritent d'être plus amplement investiguée à l'avenir.

- **Quelle place pour le repositionnement dans l'univers de la radiothérapie ?**

Dans l'article qui suit, nous avons démontré l'intérêt d'associer de faibles concentrations de β-bloquants pour augmenter l'efficacité de la radiothérapie dans divers modèles de MB (y compris ceux peu sensibles aux radiations). Par ailleurs, nous proposons un nouveau mécanisme d'action pour ces médicaments repositionnés qui ne résulte pas de l'inhibition des cibles canoniques des β-bloquants, mais plutôt d'une perturbation de la bioénergétique mitochondriale, provoquant une accumulation de radicaux superoxydes qui amplifient les dommages à l'ADN induits par les radiations ionisantes.

Beta-blockers disrupt mitochondrial bioenergetics and increase radiotherapy efficacy independently of beta-adrenergic receptors in medulloblastoma

Maïlys Rossi,[a] Julie Talbot,[b] Patricia Piris,[a] Marion Le Grand,[a] Marie-Pierre Montero,[a] Mélanie Matteudi,[a] Emilie Agavnian-Couquiaud,[c] Romain Appay,[d] Céline Keime,[e] Daniel Williamson,[f] Duje Buric,[g] Véronique Bourgarel,[a] Laetitia Padovani,[h] Steven C. Clifford,[f] Olivier Ayrault,[b] Eddy Pasquier,[a,i] Nicolas André,[a,i,j]* and Manon Carré[a]*

[a]Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Aix-Marseille Université, CNRS, Inserm, Institut Paoli Calmettes, Marseille, France
[b]Institut Curie, Inserm, CNRS, Université Paris-Saclay, Orsay, France
[c]Plateforme ICEP (CRCM), Aix-Marseille Université, CNRS, Inserm, Institut Paoli Calmettes, Marseille, France
[d]Service d'anatomie pathologique et de neuropathologie, Hôpital de la Timone, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (APHM), Marseille, France
[e]Plateforme GenomEast, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), CNRS, Inserm, Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France
[f]Wolfson Childhood Cancer Research Centre, Newcastle University Centre for Cancer, Newcastle upon Tyne, United Kingdom
[g]Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Écologie marine et continentale (IMBE), Aix-Marseille Université, CNRS, IRD, Avignon Université, Marseille, France
[h]Service de Radiothérapie, Timone Hospital, Assistance Publique-Hopitaux de Marseille (AP-HM), Marseille, France
[i]Metronomics Global Health Initiative, Marseille, France
[j]Service d'Hématologie & Oncologie Pédiatrique, Timone Hospital, AP-HM, Marseille, France

Summary

Background Medulloblastoma is the most frequent brain malignancy of childhood. The current multimodal treatment comes at the expense of serious and often long-lasting side effects. Drug repurposing is a strategy to fast-track anti-cancer therapy with low toxicity. Here, we showed the ability of β-blockers to potentiate radiotherapy in medulloblastoma with bad prognosis.

Methods Medulloblastoma cell lines, patient-derived xenograft cells, 3D spheroids and an innovative cerebellar organotypic model were used to identify synergistic interactions between β-blockers and ionising radiations. Gene expression profiles of β-adrenergic receptors were analysed in medulloblastoma samples from 240 patients. Signaling pathways were explored by RT-qPCR, RNA interference, western blotting and RNA sequencing. Medulloblastoma cell bioenergetics were evaluated by measuring the oxygen consumption rate, the extracellular acidification rate and superoxide production.

Findings Low concentrations of β-blockers significantly potentiated clinically relevant radiation protocols. Although patient biopsies showed detectable expression of β-adrenergic receptors, the ability of the repurposed drugs to potentiate ionising radiations did not result from the inhibition of the canonical signaling pathway. We highlighted that the efficacy of the combinatorial treatment relied on a metabolic catastrophe that deprives medulloblastoma cells of their adaptive bioenergetics capacities. This led to an overproduction of superoxide radicals and ultimately to an increase in ionising radiations-mediated DNA damages.

Interpretation These data provide the evidence of the efficacy of β-blockers as potentiators of radiotherapy in medulloblastoma, which may help improve the treatment and quality of life of children with high-risk brain tumours.

Funding This study was funded by institutional grants and charities.

Copyright © 2022 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Keywords: Beta-blockers; Bioenergetics; Medulloblastoma; Radiotherapy; Therapeutic combinations

*Corresponding authors at: Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin 13005 Marseille, France.
E-mail addresses: nicolas.andre@ap-hm.fr (N. André), manon.carre@univ-amu.fr (M. Carré).

eBioMedicine 2022;82: 104149
Published online 8 July 2022
https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104149

Research in context

Evidence before this study

In young patients with medulloblastoma, the current multimodal treatment allows 70% of children to survive up to 5 years but is often accompanied by serious and long-lasting side effects. Drug repositioning represents an attractive strategy to fast-track the development of new low-toxicity therapeutic options. Preclinical and clinical studies have shown that β-blockers can increase the efficacy of chemotherapy in drug-refractory cancers, including paediatric tumours such as neuroblastoma. However, far less is known about the ability of β-blockers to potentiate radiotherapy, which has never been studied in paediatric cancers. Moreover, the literature is divided regarding the mechanisms responsible for the anti-tumour properties of β-blockers. Here, we propose to analyse the combination of β-blockers with radiotherapy in models of high-risk medulloblastoma.

Added value of this study

We provide the evidence that low concentrations of propranolol, carvedilol and nebivolol improve the efficacy of ionising radiation in medulloblastoma cell lines, patient-derived tumour cells and spheroid micromasses, including those poorly responsive to radiation. In response to the ever-increasing need to find alternatives to animal experimentation, we have developed an innovative organotypic cerebellum model that confirmed the benefits of the combinatorial treatment. Although we showed that patient medulloblastoma biopsies exhibit detectable expression of β-adrenergic receptors, the efficacy of β-blockers in medulloblastoma cells does not result from the inhibition of the canonical targets but is instead driven by a rapid disruption of the mitochondrial bioenergetics. This leads to a sustained accumulation of superoxide radicals that potentiate the DNA damages caused by ionising radiation.

Implications of all the available evidence

Given the few druggable molecular targets identified in high-risk medulloblastoma and the fact that young age of patients limits treatment options, our work proposes an alternative approach in which drug repurposing could be quickly translated to the clinic to improve the efficacy of radiotherapy. In addition, as the dose of ionising radiations can be significantly reduced by adding β-blockers, this may help limit treatment long-term side effects and improve the quality of life of children with medulloblastoma. Lastly, our work highlights the interest of exploiting the ability of selected repositioned drugs to inhibit mitochondrial bioenergetics to design new therapeutic combinations with radiotherapy.

Introduction

Medulloblastomas (MB) are embryonal tumours of the cerebellum and the most common malignant brain tumours of childhood. They have been classified into four main subtypes. WNT MB, has the most favorable clinical prognosis but accounts for only 10% of cases. SHH MB, and the other Non-WNT/Non-SHH subgroups (Group 3 and Group 4) are somewhat more aggressive and more frequently metastatic, with a poorer prognosis.[1–3] The current multimodal treatment combines surgery, radiotherapy and chemotherapy.[4,5] Overall, long-term survival is now achieved in 60-75% of patients but it comes at the expense of serious and often long-lasting side effects that can reduce independence and significantly alter the quality of life of survivors.[6,7] High-risk MB are treated with radiation therapy with a cumulative dose of 54 Gy for irradiation of the posterior cerebellar fossa and additional 36 Gy for craniospinal irradiation. Although these doses are not always sufficient to control tumour progression, they cannot be increased as both acute toxicities and the cognitive and endocrinological sequelae would be too important in the long-term.[7,8] Since these sequelae are even greater in young patients, radiotherapy is contraindicated in children under 3-5 years of age depending on countries.[9,10] Therefore, new treatment options for MB patients are needed to improve the response to radiotherapy, with the aim of increasing the therapeutic benefits of ionising radiation (IR) and/or reducing its doses and associated deleterious side effects while maintaining its efficacy.

Drug repurposing consists in using already-approved drugs for indications that differ from those for which the drugs were originally developed. Toxicity and pharmacokinetic profiles are well documented, so that repurposed drugs can directly enter Phase II clinical trials. By reducing the time, expenses and risks associated with the development process, drug repurposing is an attractive strategy in anticancer therapeutics.[11–13]

One of the promising pharmacological classes to be repurposed is the β-adrenergic antagonists, or β-blockers. They are widely known for their regulatory properties in cardiovascular dysfunctions.[14] To date, the use of propranolol for the treatment of severe hemangiomas of infancy represents one of the most successful examples of drug repurposing, with higher efficacy and fewer toxic side effects than the previous standard of care.[15] Since then, our preclinical and clinical studies have shown that β-blockers can increase the efficacy of chemotherapy in drug-refractory cancers,[16,17] including paediatric tumours such as neuroblastoma.[18] β-blockers can impair fundamental biologic processes underlying tumour progression, such as cell proliferation, migration, tumour angiogenesis and metastasis. β-blockers have also been shown to sustain the response of irradiated gastric adenocarcinoma, colon adenocarcinoma or non-small cell lung cancer (NSCLC) *in vivo*,[19–23] and improve survival outcomes in adult patients with intracranial meningiomas and NSCLC.[24,25] These recent examples provide a strong rationale to combine β-blockers with radiotherapy in paediatric solid tumours, where

this type of combination has never been evaluated. Here, we provide evidence that β-blockers can improve the efficacy of IR in MB cell lines and PDX-derived cells, by disrupting mitochondrial bioenergetics, independently of the β-adrenergic receptors.

Material and methods

Cell culture

The human MB cell lines DAOY (RRID: CVCL_1167), D341 Med (RRID: CVCL_0018) and D283 Med (RRID: CVCL_1155) were obtained from the ATCC biobank. HDMB-03 cells (RRID: CVCL_S506), were kindly provided by Sonia Martial and Gilles Pagès from the Institute for Research on Cancer and Aging (Nice, France). The human ONS-76 (RRID: CVCL_1624) and UW228-2 (RRID: CVCL_0572) cell lines were kindly provided by Janet Lindsey and Steven Clifford from the Wolfson Childhood Cancer Research Center (New Castle, UK). DAOY and UW228-2 cells are representatives of the WNT group; HD-MB03, D341 Med, D283 Med and ONS-76 cells are representatives of non-WNT/non-SHH MB.

All the cells were maintained at 37°C and 5% CO_2. DAOY and D283 Med cells were grown in MEMα medium (Gibco, ref. 12561056) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Gibco, ref. 26140079) and of 1% penicillin-streptomycin (PS; Gibco, ref. 15140122). HDMB-03 cells were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco, ref. 21875034) supplemented with 10% FCS, 1% Non-Essential Amino Acids (Gibco, ref. 11140035) and of 1% PS. ONS-76 cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and 1% PS. UW228-2 cells were grown in DMEM/F12 medium (Gibco, ref. 11320033) supplemented with 10% FCS and 1% PS. D341 Med cells were maintained in MEMα medium supplemented with 20% FCS and 1% PS.

A mtDsRed plasmid has been transfected in each cell line using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, ref. 11668019) following the manufacturer's protocol. Stable transfectants were obtained after geneticin selection (0·8 mg/mL, Gibco, ref. 10131035) and two cycles of fluorescence-activated cell sorting (FACS). To establish β-blocker resistant cell lines, ONS-76 cells were exposed to increasing doses of propranolol (from 10 to 200 µM), carvedilol or nebivolol (from 2·5 to 20 µM), over 3 to 4 months. The resistant cell lines were named: ONS-76 RP, ONS-76 RC and ONS-76 RN, respectively, and were maintained in the same culture conditions as the parental ONS-76 cells (*i.e.*, ONS-76 WT).

The murine SHH MB cell lines were obtained from spontaneous medulloblastoma arising from *Patched1*$^{+/-}$ *C57BL/6* mouse model (RRID: MGI:2159769), as previously described.[26]

All the cells were tested for the absence of mycoplasma contamination (MycoAlert™, ref. #LT07-418, Lonza) at least once a month.

Patient-derived xenografts culture

Patient-derived xenografts (PDXs) were generated from primary human MB samples and were maintained into the subscapular fat pad of Nude mice (RRID: MGI:5649750) as previously described.[27] G3-PDX3, G3-PDX7 and SHH-PDX12 correspond to group 3 ICN-MB-PDX-3, group 3 ICN-MB-PDX-7 and SHH ICN-MB-PDX-12, respectively. For *in vitro* cultures, tumour cells were purified from the PDX using an enzymatic dissociation followed by a Percoll density gradient separation and cultured as previously described.[26]

Drugs and reagents

The β-blockers were resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO). Stock solutions were stored at -20°C for Nebivolol (50 mM, Sigma-Aldrich, ref. #N1915) and Carvedilol (50 mM, Sigma-Aldrich, ref. #C3993) and at -80°C for Propranolol (150 mM, Selleckchem, ref. S4076). The antioxidants Mito-TEMPO (MT) and Troxerutin (TROX) were resuspended in DMSO and stock at -20°C. The solutions are diluted in culture medium extemporaneously for the experiments.

Irradiation of MB cells, spheroids and organotypic cultures

Exposure to IR of the different culture models was performed in the Radiotherapy Department of Pr. Cowen (Timone Hospital, AP-HM, France). Water-equivalent RW3 phantom with a chamber adaptation plate was used for therapy dosimetry. Cells, spheroids and organotypic cultures were exposed to doses ranging from 1·8 Gy to 10 Gy, using the Synergy MLCi Elekta® linear accelerator with a beam of 6 MV and a flow rate of 400 UM/min. The PDX cells were irradiated in the RadExp platform of the Curie Institute on the X-Rad 320 equipment (Precision X-ray irradiation).

Cell growth and survival assays

Cell viability assays were performed as previously described.[18] Briefly, the human MB cells were seeded in flat bottom 96-well microplates (2,000 cells/well for DAOY, ONS-76 and UW228-2; 9,000 cells/well for HD-MB03 and D283 Med; 12,000 cells/well for D341 Med) for 24 h. Cells were then exposed to β-blockers alone or in combination with IR for 72 h. Metabolic activity was detected by addition of Alamar Blue and spectrofluorimetric analysis using a PHERAstar® FS multi-Plate Reader (BMG LABTECH; λ_{ex} 540 nm / λ_{em} 590 nm). IC_{50} values were determined as previously described.[28]

For IncuCyte experiments (RRID:SCR_019874), SHH MB tumour cells were plated in 96-well plates (5,000 cells/well for murine SHH-MB and 7,500 cells/-well for ICN-MB-PDX-12), pre-coated with poly-D-lysine (EMD Millipore, ref. A-003-E) and Matrigel (BD

Biosciences, ref. 354234). The next day, tumour cells were treated with a range of concentrations of β-blockers or the control, as indicated in figures. Propidium iodide (PI, Sigma Aldrich; 0·3 μg/ml) was also added to the medium to evaluate cell death. Then, the plates were scanned for phase contrast and PI staining during 72-96 h, using the IncuCyte® live cell analysis system with a 4X objective. Proliferation was measured using quantitative kinetic processing metrics from time-lapse image acquisition and showed as percentage of culture confluence over time. For the PI staining, the percentage of PI positive cells was divided by the percentage of cell confluence for each well, thus indicating the level of dead cells in each well.

For the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Group 3 MB tumour cells were cultured in neurospheres in round bottom 96-well plates (5,000 cells/well). Tumour cells were then treated either 1) once with a range of concentrations of β-blockers or 2) daily with β-blockers and/or IR for five consecutive days. Then, the cell viability was evaluated 72 h later using the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay according to the manufacturer's instructions (Promega Corporation, ref. G7570).

Spheroid growth assay

DsRed-expressing MB cells were plated in round bottom 96-well microplates (1,200 cells/well for HD-MB03 – 1,500cells/well for UW228-2 and DAOY – 2,000 cells/-well for ONS-76, D283 Med and D341 Med) in a culture medium containing 10% FBS and 20% methyl cellulose (Sigma-Aldrich, ref. M7027) for 72 h. Spheroids were then daily treated with β-blockers and/or IR for five days. Spheroid growth was quantified over time by acquisition of DsRed fluorescence signal using the PHERAstar® FS multi-plate reader (λ_{ex} 580 nm/λ_{em} 620 nm – "well scanning" 10 × 10). Images were captured with the JuLI™Stage live imaging system (NanoEntek).

Cerebellar organotypic model development and analysis

To establish organotypic cultures of cerebellar tissues, mouse cerebellums were surgically harvested and sectioned into 250 µm thick slices using a vibrating blade microtome (RRID:SCR_016495). A spheroid formed from DsRed-expressing MB cells was then grafted onto each cerebellum slice. These organotypic co-culture models were then placed on inserts with 0,4 µm pore size membranes (Falcon®, ref. 353090) and maintained in medium containing 50% MEMα, 25% horse serum (Gibco, ref. 16050122), 25% Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS; Gibco, ref. 14065056), 10 mM HEPES buffer (Gibco, ref. 15630106), 28 mM Glucose (Gibco, ref. 15023021), 1% L-Glutamine (Gibco, ref. 25030081) and 1% PS. After daily exposure to IR and/or β-blockers for 5 consecutive days, tumour growth and invasion within the cerebellum slices were analysed over time, using the JuLI™ Stage imaging system and the PHERAstar® FS multi-plate reader (λ_{ex} 580 nm/λ_{em} 620 nm - fluorescence signal acquisition with a 15 × 15 matrix scanning mode).

Sample preparation and immunohistochemistry

Samples were fixed overnight at 4°C with 4% formaldehyde and prepared for paraffin inclusion using automated tissue processor ASP 300 (RRID:SCR_018916). Dehydration, clarification, and infiltration steps were performed by successive absolute ethanol, histolemon and paraffin baths. After FFPE-embedding, samples were cut at 3µm-thickness with HM340E microtome (Thermo Scientific). Hematoxylin Eosin Safran staining was performed using automated H&E staining Dako CoverStainer.

Ki-67- and γH2AX-immunohistochemistry was carried out with rabbit anti-Ki67 antibody (RRID: AB_443209) and with mouse anti-γH2AX antibody (Merck Milliopore, ref. JBW301) on a Ventana Discovery XT (RRID:SCR_018643). After deparaffinisation, antigen retrieval was performed with Citrate-based buffer pH 6·5 (RiboCC Solution, CC2, ref. 760-107). The primary antibodies were incubated for 20 min at 37°C then an OmniMap anti-Rabbit HRP Detection Kit (ref. 760-149) was used with DAB. Finally, the counterstaining was done with hematoxylin and slides were cleaned, dehydrated and coversliped with permanent mounting media. The microscopic analysis of the tissues was carried out by the pathologists of the Neuropathology Department (Timone Hospital, AP-HM, France).

Western-blot

Cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0·1% SDS) to which was extemporaneously added a cocktail of phosphatase and protease inhibitors (Sigma-Aldrich, ref. PPC1010). Protein concentration was determined using a Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, ref. #5000006EDU) according to the Bradford method. Proteins (30 µg) were separated by polyacrylamide-SDS gel (10% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, Bio-Rad, ref. 4561034) and were transferred on nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences). Primary antibodies used were directed against COX2, β-actin or γH2AX (RRID: AB_2571729, RRID: AB_2242334 and RRID: AB_2799949, respectively). Secondary antibody coupled to peroxidase (RRID: AB_2099233 for anti-rabbit, or RRID: AB_330924 for anti-mouse IgG antibody) were used for revelation, performed using the Luminata chemiluminescence detection kit (Millipore, ref. WBLUC0100). Images were acquired using the G-BOX

phosphoimager (Ozyme) and signal quantification was realised by Image J® software (RRID:SCR_003070).

Measurement of superoxide production

MB cells were seeded on 96-well microplates (2,000 cells/well for ONS-76 and 9000 cells/well for HD-MB03) for 24 h and exposed to IR and/or β-blockers for 6 h. 3D spheroids of MB cells were formed 3 days before treatment, and exposed to IR and/or propranolol for 6 h. Superoxide anion production was assessed by adding 10% V/V of WST-1 reagent (Roche, ref. 11644807001) in the wells for 30 min at 37°C. Absorbance was measured at 450 nm with a PHERAstar® FS multi-plate reader. To normalise superoxide production to the cell number in each condition, cells were fixed with 1% glutaraldehyde and stained with a solution of 1% (W/V) crystal-violet in 20% methanol (Sigma-Aldrich). The dye has finally been solubilised in DMSO to measure absorbance at 600 nm.

Colony formation assay

Ninety-six-well microplates were coated with 1% agarose for 24 h. Two hundred and fifty ONS-76 cells and 500 HD-MB03 cells per well were then plated in a 10% Matrigel®- containing medium (Corning, ref. 354234) for 24 h and exposed to β-blockers and/or IR. Photos of the colonies were captured with the JuLI™ Stage imaging system and quantified using the Image J® software, 7 and 10 days after treatment initiation for ONS-76 and HD-MB03 cells, respectively.

Analysis of energy metabolism

Energy metabolism analysis was performed using the Seahorse XFe24® extracellular flux analyser (RRID: SCR_019539). Adherent MB cells were seeded in XF24 V7-PS plates (10,000 cells/well for DAOY; 12,000 cells/well for ONS-76 and UW228-2; 30,000 cells/well for HD-MB03; Agilent, ref. 102340-100) for 24 h. Cells were then exposed to β-blockers and/or IR for 6 or 24 h. Oxygen consumption rate (OCR) was measured using XF cell Mito Stress test (Agilent, ref. 103015-100). One hour before measurement, culture medium was changed with unbuffered DMEM, 143 mM NaCl, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 10 mM glucose. OCR was measured after injection of 1 µM Oligomycin, 0·5-1 µM FCCP and 0·5 µM antimycin A/rotenone mixture. The acidification rate of the extracellular environment (ECAR) was measured using XF Glycolysis stress test (Agilent, ref. 103020-100). Cell culture medium was replaced with unbuffered DMEM, 143 mM NaCl, 2 mM glutamine and 1 mM sodium pyruvate. ECAR was measured after the addition of glycolysis modulators: 10 mM glucose, 1 µM oligomycin and 100 mM 2-deoxy-glucose.

Maximal mitochondrial respiration was measured after injection of FFCP. OCR-linked ATP production was calculated with difference between basal and maximal respiration values, while glycolytic reserve was calculated as the difference between oligomycin-enhanced and glucose-mediated ECAR values.

To normalise the data to cell number, cells were fixed with glutaraldehyde 1%, stained with violet crystal in 20% methanol (Sigma-Aldrich) and solubilised with DMSO to measure absorbance at 600 nm with PHERAstar®FS multi-plate reader. A calibration range established for each type of cell was finally used to convert the absorbance values into cell numbers.

Quantitative RT-PCR analysis

The expression of β1-, β2- and β3-adrenergic receptor genes (*ADRB1*, *ADRB2* and *ADRB3*) was examined using real-time quantitative RT-PCR. Total cellular RNA was extracted from MB cells using the RNeasy Mini Kit according to the protocol supplied by the manufacturer (Qiagen, ref. 74104). RNA concentration was measured with the NanoVue™ Plus spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences). Reverse transcription of RNAs was done using QuantiTect® Reverse Transcription kit (Qiagen, ref. 205311) and real-time PCR was ran using the QuantiTect® SYBR® Green PCR kit (Qiagen, ref. 204143) on a LightCycler®480 Instrument (RRID: SCR_020502). The primers were synthetised by Qiagen (QuantiTect® Primer Assay, ref. 249900) according to the sequences described in Cao DX *et al.*[29] Gene expression level of *ADRB1*, *ADRB2* and *ADRB3* was determined using $2^{-\Delta Ct}$ or $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, normalised to *GAPDH* as housekeeping gene.

siRNA transfection

Small interfering RNAs directed against β1- or β2-adrenergic receptors (Silencer Select siRNA, ref. #4392420 - S1118, S1119 and S1120 for *ADRB1* and S1121, S1122 and S1123 for *ADRB2*, ThermoFischer), and non-targeted SignalSilence® Control siRNA (Cell signaling, ref. #6568S) were transfected in MB cells using Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen, ref. L3000015) according to the protocol supplied by the manufacturer. Verification of the successful transfection was performed by quantitative RT-PCR, as described above.

RNA sequencing

The MB cells ONS-76 WT, ONS-76 RP, ONS-76 RC and ONS-76 RN were homogenised using a Buffer RLT (Qiagen, ref. 79216) and DNA-free cell lysates were obtained using genomic DNA purification columns (Qiagen). Extraction of total RNA was performed using the RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, ref: 74134), according to the protocol supplied by the manufacturer. RNA was

quantified using a NanoVue™ Plus spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences). RNA-Seq libraries were generated from 600 ng of total RNA using TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit and TruSeq RNA Single Indexes kits A and B (Illumina), as previously described.[30] The final cDNA libraries were checked for quality and quantified using capillary electrophoresis. Libraries were then sequenced on an Illumina HiSeq4000 sequencer (RRID:SCR_016386) as single end 1 × 50 base reads. Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14. Reads were preprocessed using Cutadapt v1.10[31] in order to remove adapter, polyA and low-quality sequences (Phred quality score below 20), reads shorter than 40 bases were discarded for further analysis. Reads mapping to rRNA were also discarded (this mapping was performed using Bowtie v2.2.8.[32] Reads were then mapped onto the hg38 assembly of human genome using STAR v2.5.3a.[33] Gene expression was quantified using htseq-count v0.6.1p1[34] and gene annotations from Ensembl release 99. Statistical analysis was performed using R 3.3.2 and DESeq2 1.16.1 Bioconductor library.[35]

Read counts for *ADRB1, ADRB2* and *ADRB3* expression in primary MB samples from patients were produced by aligning paired end RNA-seq (~90 M read/sample Illumina HiSeq2500; RRID:SCR_020123) reads to HG19 genome using STAR-align.[33] Read counts were produced using HT-SEQ-count. DESeq 2 (R/Bioconductor) was used to normalise reads to library size and variance stabilised data (VSD) was generated using the vsd function. Statistical testing for differential expression across groups was performed using an ANOVA test.

Ethics

Tumour samples from individuals with confirmed medulloblastoma diagnosis were used for RNA-seq analysis. These were provided as part of UK CCLG-approved biological study BS-2007-04 and/or with approval from Newcastle North Tyneside Research Ethics Committee (study reference 07/Q0905/71); informed, written consent was obtained from parents of all patients younger than 16 years.

All animals for PDX were housed in the animal facility of the Institut Curie, in accordance with the recommendations of the European Community (2010/63/UE) for the care and use of laboratory animals. Experimental procedures were specifically approved by the ethics committee of the Curie Institute CEEA-IC #118 (approval number: 03130.02, C91471108 and Authorisation *APAFiS# 26879-2020081315161665-v1* given by National Authority) in compliance with the international guidelines. Cerebellar explants were obtained from the animal facility of the Faculty of Pharmacy, in accordance with the recommendations of the European Community (approval number: E 13 055 20).

Statistics

All experiments were performed in independent replicates and statistical significance was determined by ANOVA or student's t test using the GraphPad Prism 6 software (RRID:SCR_002798). A significant difference between two conditions is defined as: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

Role of funders

The study sponsors did not have any role in study design, in the collection, analysis, interpretation of data, in the writing of the manuscript or in the decision to submit it for publication.

Results

β-blockers inhibit the proliferation and survival of MB cell lines and patient-derived tumour cells

To determine the anti-proliferative properties of three different β-blockers with different selectivity profiles for adrenergic receptors – *i.e.*, non-selective β-blocker propranolol, mixed α/β-blocker carvedilol and β1-selective antagonist nebivolol –, we first used a panel of six human MB cell lines characteristic of group 2 SHH (UW228-2 and DAOY) and non-WNT/non-SHH group (HD-MB03, ONS-76, D283 Med and D341 Med) tumours. All tested β-blockers inhibited the proliferation of MB cells, irrespective of their group (Figures 1a-c), with IC_{50} values ranging from 60-120 µM for propranolol, 12-15 µM for carvedilol and 13-15 µM for nebivolol (Table 1). We further showed that the activity of β-blockers results from both the inhibition of cell growth and the induction of cell death in murine SHH-MB cells (Figure S1a-f). To evaluate the three β-blockers in more clinically relevant cellular models, we cultured primary cells from group 3 and SHH patient-derived xenografts MB tumours (G3-PDX7 and SHH-PDX12, respectively). We confirmed the dose-dependent efficacy of propranolol, carvedilol and nebivolol in inhibiting cell survival of these PDX-derived cells (Figures 1d-f), as well as their ability to inhibit cell proliferation and induce cell death (Figure S1g-l).

β-blockers enhance IR-mediated inhibition of MB cell proliferation and clonogenicity

To study the combination between β-blockers and radiotherapy in MB cells, we first tested a single co-treatment of IR at 2, 5 or 10 Gy and low concentrations – IC_{20} – of propranolol, carvedilol or nebivolol. Results showed that the addition of the β-blockers led to a two-fold reduction in the dose of IR while maintaining the same activity in HD-MB03 cells (Figure 2a). For example, irradiation at 2 Gy combined with IC_{20} of propranolol is as effective in reducing cell survival as irradiation alone at 5 Gy. IR potentiation by propranolol was also found in

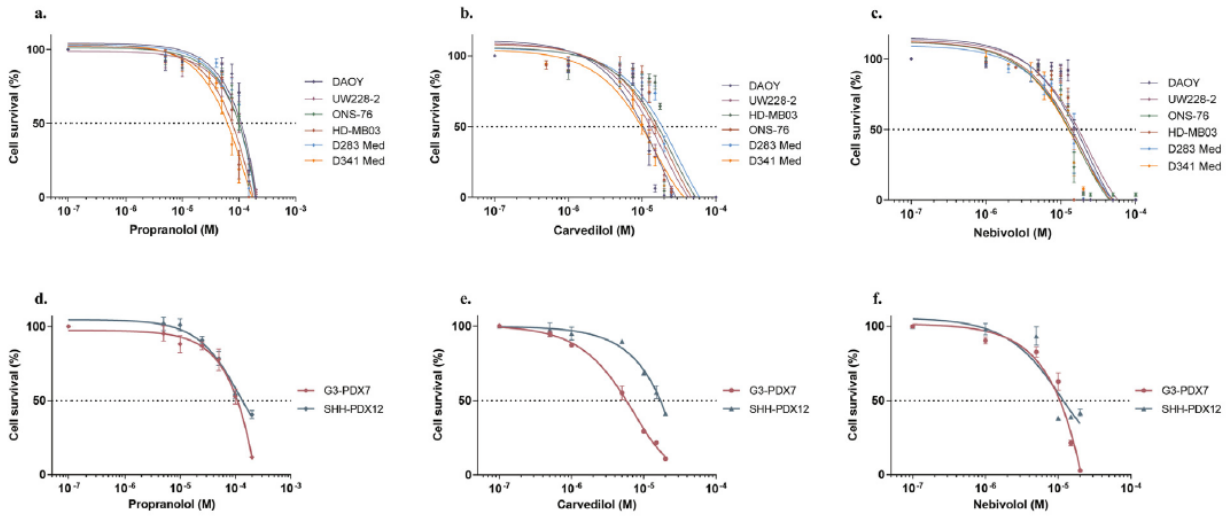


Figure 1. Inhibition of MB cell survival by β-blockers. Cell survival analysis in six human MB cell lines by Alamar Blue assay after 72 h of treatment with increase concentrations of propranolol **(a)**, carvedilol **(b)** and nebivolol **(c)**. Values are the average of ten independent experiments ± standard deviation (SD), with a biological triplicate in each experiment. Evaluation of cell survival using CellTiter-Glo® assay in neurosphere cultures of human MB cells from G3-PDX7 and IncuCyte® live cell analysis system for SHH-PDX12 cells, after 96 h of treatment with increase concentrations of propranolol **(d)**, carvedilol **(e)** and nebivolol **(f)**. Values are the average of three independent experiments ± SD, with a biological triplicate in each experiment. *$p < 0{\cdot}05$; **$p < 0{\cdot}005$; ***$p < 0{\cdot}001$.

ONS-76 cells (Figure 2b) and in the three other tested MB cell lines (Figure S2a-c). Similar effects were observed with low concentrations of carvedilol or nebivolol combined to IR in the different MB cell lines (Figures 2a-b and Figure S2a-c). To better explore the potential of these combinations in MB cell radiosensitivity, we conducted clonogenic assays. HD-MB03 and ONS-76 cells were exposed to propranolol and/or IR at 1·8 Gy, which is the daily radiation dose the most widely used in the clinic. As expected, the number of colonies was reduced by IR by 64 ± 5 % and 60 ± 5 % in HD-MB03 and ONS-76 cultures, respectively (Figures 2c-d).

	Propranolol	Carvedilol	Nebivolol
DAOY	124.9 ± 3.2	14.9 ± 0.1	15.0 ± 0.1
UW288-2	101.5 ± 3.8	14.6 ± 0.1	14.5 ± 0.1
HD-MB03	91.1 ± 3.1	12.9 ± 0.4	12.9 ± 0.4
ONS-76	111.8 ± 2.3	13.2 ± 0.2	13.2 ± 0.2
D283 Med	105.3 ± 2.7	13.9 ± 0.4	13.9 ± 0.4
D341 Med	62.0 ± 1.4	13.0 ± 0.3	13.0 ± 0.3
murine SHH-MB	31.2 ± 2.7	6.3 ± 0.4	1.7 ± 0.3
G3-PDX7	93.2 ± 6.0	5.3 ± 0.2	10.9 ± 0.4
SHH-PDX12	133.7 ± 8.2	17.2 ± 0.6	13.0 ± 1.1

***Table 1*: IC_{50} values of propranolol, carvedilol and nebivolol after 72 h of treatment of non-Wnt human MB cells (DAOY, UW228-2, HD-MB03, ONS-76, D283 Med, D341 Med), mice MB cells (murine SHH-MB) and PDX-isolated cells (G3-PDX7 and SHH-PDX12), determined by GraphPad Prism software. Values are the average of at least three independent experiments ± SD.**

Our results also demonstrated that propranolol decreased the clonogenicity of MB cells, in a dose-dependent manner and significantly enhanced the efficacy of IR (Figures 2c-d and Figure S2d). For instance, the clonogenic capacity of HD-MB03 and ONS-76 cells exposed to the combination of IR with propranolol IC_{20} was reduced by 86 ± 3 % and 82 ± 3 %, respectively (Figures 2c-d, $p < 0{\cdot}001$ *vs* control).

To confirm the interest of such a combination in 3D tumour micromasses, we developed tumour spheroid models from MB cells stably expressing DsRed. For five consecutive days, spheroids were exposed to daily low doses of β-blockers alone or in combination with IR at carvedilol and nebivolol sustainably potentiate IR in HD-MB03 spheroids, as compared with IR alone (Figures 3a-d). While IR did no longer significantly impact the spheroid growth at day 21 (2317 ± 60 % growth in irradiated *versus* 2206 ± 79 % growth in control spheroids; $p > 0{\cdot}05$), the co-treatment with propranolol, carvedilol and nebivolol decreased the spheroid growth to 724 ± 5 %, 335 ± 2 % and 292 ± 5 %, respectively ($p < 0{\cdot}001$, Figures 3a-d). Similar results were obtained in ONS-76 spheroids (Figure S3a). In addition, β-blockers were able to restore IR efficacy in UW228-2 and D283 Med spheroids that were unresponsive or minimally responsive (Figure S3b-c) and they could further increase IR efficacy against the highly radio-sensitive D341 Med spheroids (Figure S3d). Finally, to evaluate the efficacy of daily co-treatment on primary MB cells, we established 3D neurospheres from the G3-PDX7 cells. Our results confirmed that low

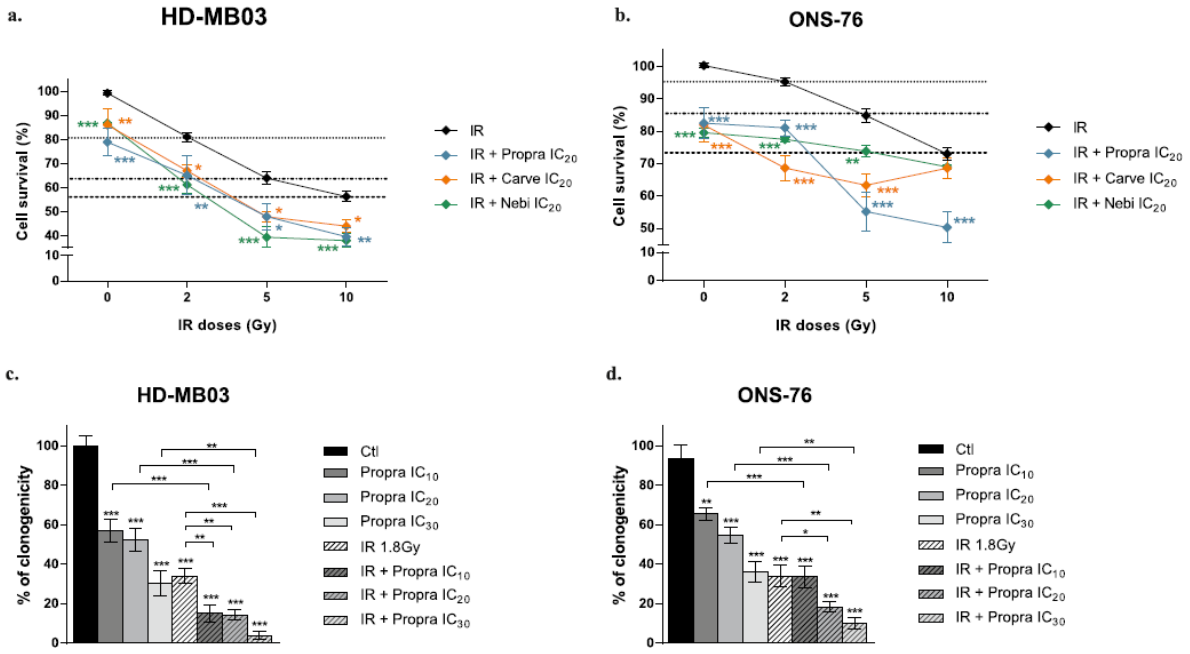


Figure 2. Increase of IR efficacy by β-blockers in MB cells. HD-MB03 **(a)** and ONS-76 **(b)** cell survival analysis by the Alamar Blue assay after 72 h of treatment with IC_{20} of propranolol (propra), carvedilol (carve) or nebivolol (nebi) alone and combined to radiotherapy (IR) 2, 5 and 10 Gy. Values are the average of three independent experiments ± standard error of mean (SEM). Quantification of HD-MB03 **(c)** and ONS-76 **(d)** cell colonies, using the ImageJ™ software, respectively after 10 or 7 days of treatment with increase concentrations of propranolol (propra) or radiotherapy (IR) 1·8 Gy alone and their combination. Values are the average of three independent experiments ± SEM. *$p < 0{\cdot}05$; **$p < 0{\cdot}005$; ***$p < 0{\cdot}001$.

concentrations of propranolol, carvedilol, or nebivolol highly potentiated the effects of IR (Figure 3e). The use of a second group 3 PDX model (G3-PDX3) further validated the relevance of combining β-blockers in co-treatment with daily radiotherapy in MB (Figure S3e). Altogether, our results demonstrated that β-blockers can improve the efficacy of IR in *in vitro* MB models.

Fractionated IR is potentiated by daily low doses of β-blockers in cerebellar organotypic models

To evaluate the potential of the β-blockers and IR combination in more clinically relevant conditions, we developed an organotypic cerebellar model in which MB spheroids stably expressing DsRed were grafted into slices of healthy mouse cerebellum. These innovative cultures were daily exposed to IR (1·8 Gy) and/or very low concentrations of propranolol (IC_{10} *i.e.*, 25 µM) for five consecutive days. After seven days, our data showed that monotherapies reduced the growth of HD-MB03 tumour masses by 23 ± 5% and 27 ± 5% in organotypic models subjected to IR and propranolol, respectively ($p < 0{\cdot}001$ and $p < 0{\cdot}05$, respectively; Figures 4a-b). The combinatorial treatment resulted in a reduction of 38 ± 6% ($p < 0{\cdot}001$ compared with control), which significantly increased the efficacy of IR ($p < 0{\cdot}001$, Figures 4a-b). The potentiating effect persisted over time, with the combination reducing tumour growth by 57 ± 6% after 14 days ($p < 0{\cdot}001$ *vs* control and $p < 0{\cdot}05$ *vs* IR; Figures 4a-b). The benefits of combining propranolol with IR were also confirmed in organotypic cerebellar models transplanted with ONS-76 tumour masses (Figure S4a-b). After 14 days, the organotypic cultures were fixed, sectioned, and subjected to HES and Ki67 staining (Figure 4c). Microscopic analysis of these labelling patterns showed that the combinatorial treatment did not induce histological lesions in the non-tumour cerebellar tissue, including in the MB periphery. Furthermore, γH2AX staining of the organotypic models showed that the co-treatment with IR and propranolol did not induce DNA damage in the non-tumour tissue either (Figure 4c, Table 2, and positive control in FigureS4c). This suggests that the combination is effective in significantly reducing MB tumour mass without inducing additional damage to the cerebellum.

β-blocker efficacy and potentiation of IR are independent of β-adrenergic receptors in MB cells

The strong synergism between IR and β-blockers in MB stresses the need for a better understanding of the underlying mechanism(s). Since β-blockers antagonise the β-adrenergic receptors (β-ARs) in the cardiovascular system, we first evaluated the expression pattern of

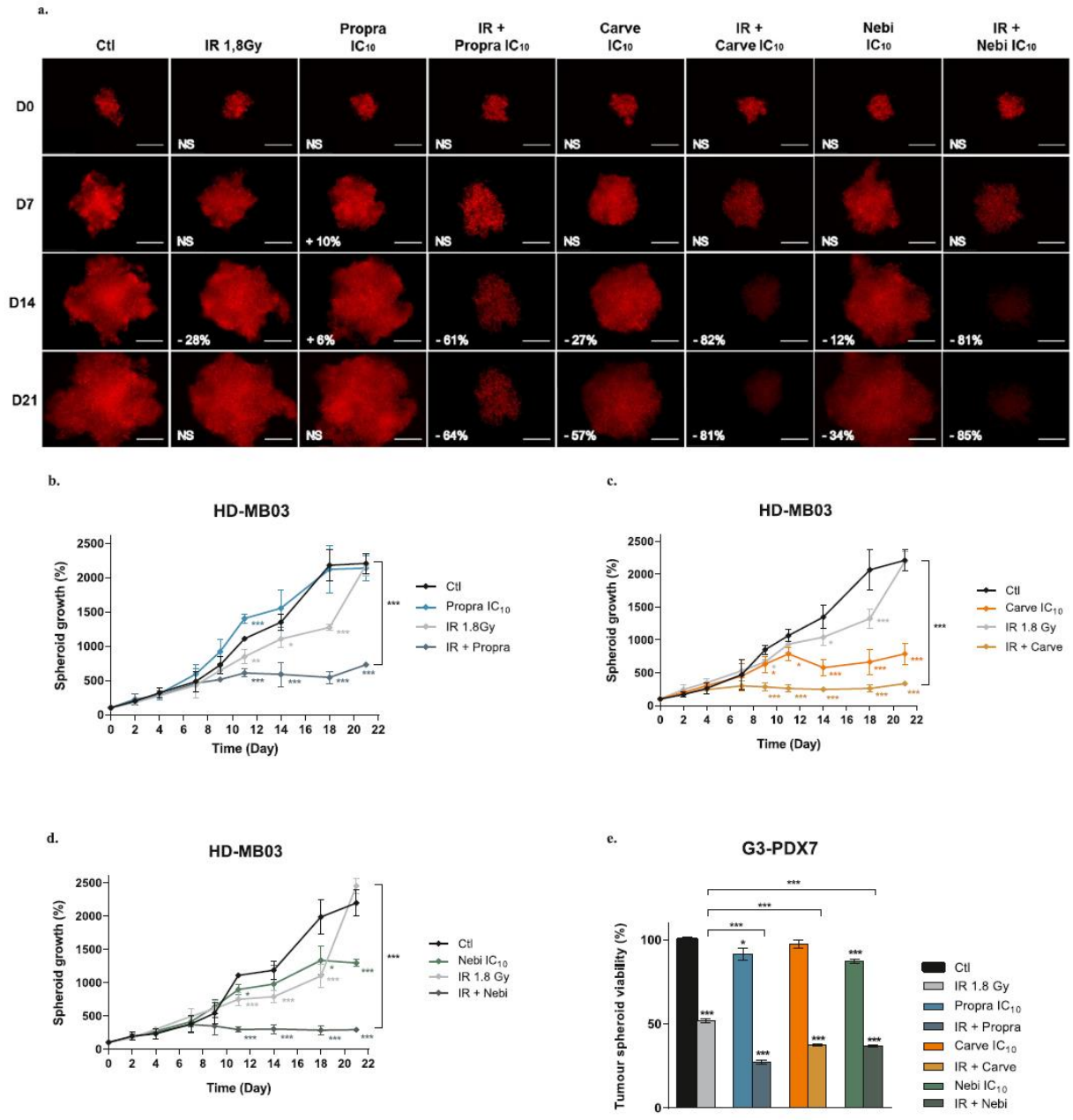


Figure 3. β-blockers enhance IR activity in 3D spheroids of MB cell lines and MB PDX cells. For five consecutive days, the 3D tumour micromasses were exposed to daily low doses (IC_{10}) of β-blockers or radiotherapy (IR) 1·8 Gy alone and their combination. **(a)** Representative images of DsRed-expressing HD-MB03 spheroids, acquired over time with the JuLi™ Stage system. Treatment efficacy was expressed as a percentage of spheroid growth inhibition *vs* control spheroids (Ctl), determined by quantifying the DsRed signal with the PHERAstar microplate reader. Scale bars: 500 µm. HD-MB03 spheroid growth measured by acquisition of the DsRed signal over 21 days after treatment with IC_{10} of propranolol (propra) **(b)**, carvedilol (carve) **(c)** and nebivolol (nebi) **(d)** alone or combined with radiotherapy (IR) 1·8 Gy. Values are the average of n = 15 samples per condition, from at least four independent experiments ± standard deviation (SD). **(e)** Spheroid viability assessment by using the CellTiter-Glo® assay in G3-PDX7 cells after 72 h of treatment with IC_{10} of propranolol (propra), carvedilol (carve) and nebivolol (nebi) alone or combined with radiotherapy (IR) 1·8 Gy. Values are the average of n = 10 samples per condition, from three independent experiments ± SD. *$p < 0{\cdot}05$; **$p < 0{\cdot}005$; ***$p < 0{\cdot}001$.

β-AR genes *ADRB1*, *ADRB2* and *ADRB3* in MB tumours from a cohort of 240 patients (Figures 5a-c). While there are significant differences in expression of β-AR isoforms across MB groups (each $p < 0{\cdot}001$), the median expression of *ADRB2* is the highest, followed by *ADRB1*, and WNT MB are the only samples that express

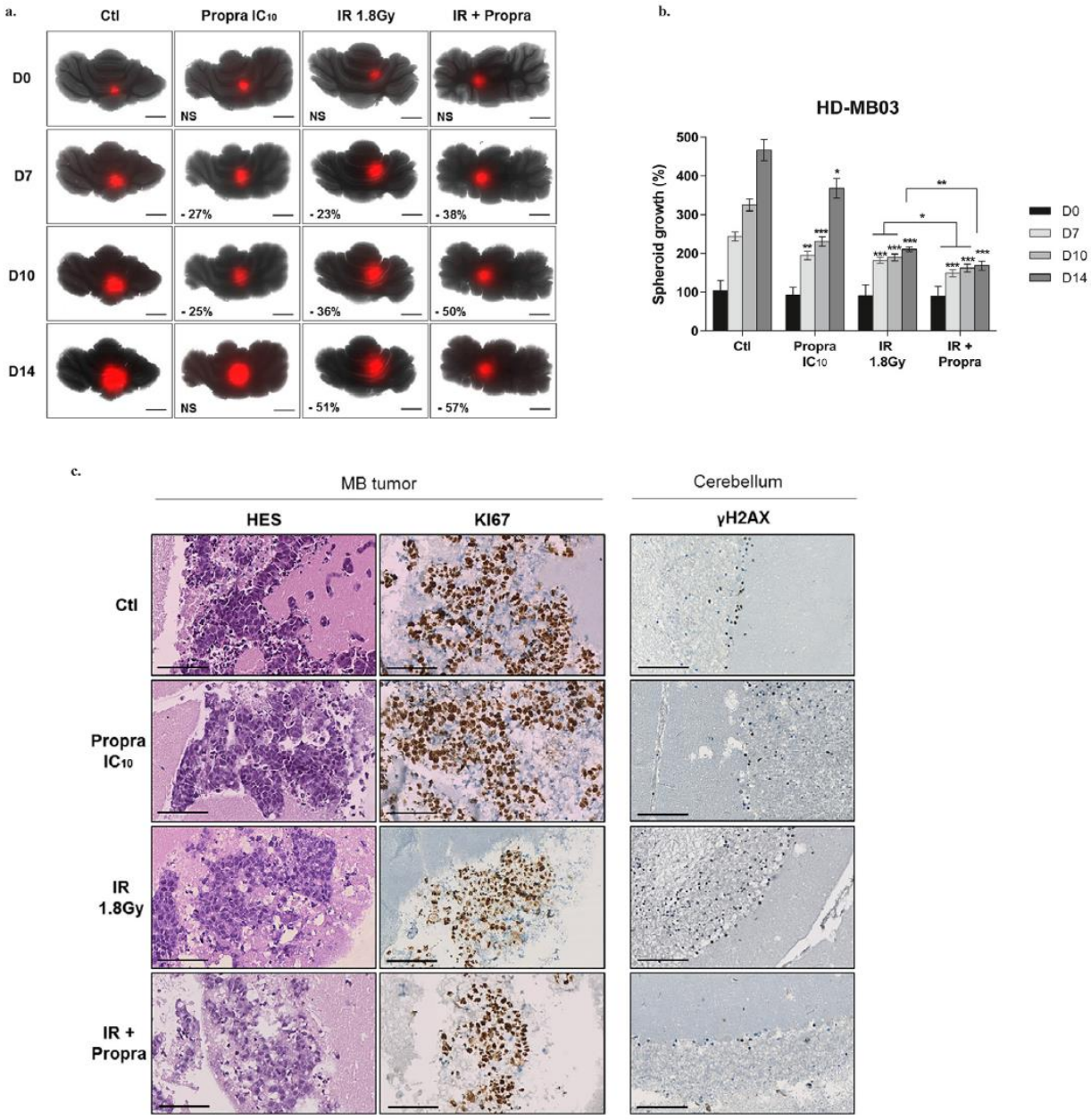


Figure 4. Benefits of daily low concentrations of β-blockers combined to IR in *ex-vivo* MB organotypic model. For five consecutive days, the organotypic cerebellar co-cultures were exposed to daily low doses (IC_{10}) of propranolol alone or combined to radiotherapy (IR) 1·8 Gy. **(a)** Representative pictures, acquired with the JuLi™ Stage live imaging system, of DsRed-expressing HD-MB03 tumour micromasses grafted in slices of healthy cerebellum. Scale bars: 1 mm. Results were expressed as percentage of growth inhibition in treated *vs* control organotypic models (Ctl). **(b)** HD-MB03 tumour growth was measured over 14 days by acquisition of the DsRed signal with the PHERAstar microplate reader (well-scanning mode). Values are the average of n = 15 samples per condition, from five independent experiments ± standard deviation (SD). **(c)** Representative pictures of HES, KI67 and γH2AX immunostaining in organotypic models, control (Ctl) and treated with IC_{10} of propranolol (propra), radiotherapy (IR) 1·8 Gy or their combination. Scale bars: 100 µm. $^{*}p < 0{\cdot}05$; $^{**}p < 0{\cdot}005$; $^{***}p < 0{\cdot}001$.

high levels of *ADRB3*. Kaplan Meier and Cox regression analyses revealed that high expression (>median) of *ADRB1* and *ADRB2* were associated with a good prognosis in a cohort of 222 patients (Figures 5d-f). We then quantified β-AR mRNA levels in the six human SHH and non-WNT/non-SHH group MB cell lines studied. Consistently with the results obtained with patient samples, *ADRB2* and *ADRB3* are the major and the minor

	%	SD	p	
Control	1.6	1.34	/	
Propra IC10	1.6	1.30	0.49	*vs* Control
IR 1,8 Gy	2.0	1.00	0.30	*vs* Control
IR + Propra	1.2	0.63	0.28	*vs* Control
			0.08	vs IR

***Table 2*: γH2AX positive cells (% +/- SD) in the cerebellum of the organotypic models. Quantification was made by microscopic analysis in the Neuropathology Department. *p* values > 0·05 indicate no significant variations.**

isoforms across the panel of cell lines, respectively (Figure 5g). Interestingly, despite being as sensitive as the other cell lines to the β1-selective antagonist nebivolol (Figure 1c), neither the DAOY nor the D341 Med cell lines express *ADRB1* (Figure 5g). This suggests that the efficacy of β-blockers in MB cells may not rely on the canonical β-adrenergic pathway. To confirm this hypothesis, we silenced *ADRB1* and *ADRB2* in HD-MB03 and ONS-76 cells using RNAi technology (Figure S5a-b), β3-AR not being a target of any of the three β-blockers tested here. Our data showed that the efficacy of propranolol, carvedilol and nebivolol alone or in combination with IR was not impacted by β-AR silencing (dotted *vs.* solid lines, Figure 5h and Figure S5c-g). Moreover, β-AR siRNA did not improve the effects of IR alone in HD-MB03 cells, regardless of the dose used (Figure 5h and Figure S5c-d). In ONS-76 cells, β-AR silencing even significantly reduced the effects of IR ($p < 0·05$; Figure S5e-g). These results indicate that β-ARs are neither involved in β-blocker-induced cytotoxicity nor in radio-sensitisation of MB cells and support the idea that β-blockers trigger an alternative signaling pathway to potentiate radiotherapy in MB cells.

Response to β-blockers is associated with inhibition of energy metabolism in MB cells

Our previous work in triple-negative breast cancer has highlighted the ability of propranolol to affect energy metabolism pathways in tumour cells.[36] To determine whether β-blockers disrupt the energy metabolism in MB cells, we characterised their bioenergetic profiles by measuring the mitochondrial respiration *via* the oxygen consumption rate (OCR) and the glycolytic activity *via* the extracellular acidification rate (ECAR). β-blocker treatment induced a significant drop in mitochondrial respiratory functions in ONS-76, HD-MB03, UW228-2 and DAOY cells, regardless of their initial bioenergetic status (Figure 6a and Figure S6a). Indeed, our data showed a decrease in both basal and maximal respiration after 24 h treatment with propranolol, carvedilol and nebivolol, for concentrations ranging from IC_{20} to IC_{80} (Figures 6b-c). As a result, ATP production was strongly reduced in all four MB cell lines exposed to the three β-blockers, even at the lowest concentrations (Figure 6d and Figure S6b, d, f). In addition, we demonstrated that incubation with propranolol, carvedilol and nebivolol led to a decrease in the glycolytic reserve in ONS-76, HD-MB03, DAOY and UW228-2 cells (Figure 6e and Figure S6c, e, g). Thus, treatment with β-blockers results in a metabolic catastrophe that deprives MB cells of their adaptive bioenergetics capacities.

To better understand the importance of bioenergetics in response to treatment, we generated β-blocker-resistant ONS-76 cells by exposing them to increasing concentrations of propranolol, carvedilol or nebivolol for 16 weeks (Figure S7a). The resulting cell lines *i.e.*, ONS-76 RP, ONS-76 RC and ONS-76 RN, were cross-resistant to all β-blockers (Figure S7b). By qRT-PCR, we showed that the expression of β-AR genes was not altered in these resistant cells (Figure S7c). RNA sequencing further indicated that cell resistance could not be explained by the downregulation of key genes of the β-AR downstream signaling and its transcriptional targets (Figure S7d). Although four of the ten isoforms of adenylate cyclase are overexpressed in ONS-76 RP cells (ADCY1, 2, 5 and 8; $p < 0·001$), this pattern of overexpression was not found in ONS-76 RC and ONS-76 RN and therefore may not be the common factor behind the cross-resistance of the cell lines to beta-blockers. Analysis of the metabolic energetic activities in the three β-blocker resistant cell lines showed that they had higher mitochondrial OCR and ATP production than the sensitive parental ONS-76 WT cells ($p < 0·001$, Figures 7a-b and Figure S7e), but no significant changes in glycolytic capacity (Figures 7c-d). However, as illustrated with ONS-76 RC cells exposed to IC_{20} of propranolol, carvedilol or nebivolol, resistant cells were able to counteract both the β-blocker-mediated suppression of ATP production by mitochondria and glycolytic reserve (Figures 7e-f).

Lastly, we measured the effects of the combination of β-blockers and IR on the bioenergetics of MB cells. This analysis was performed at short time point (6 h) and with low doses of propranolol (IC_{10} and IC_{20}) to better examine the effects of the combinatorial treatment. Propranolol alone and IR alone (1·8 Gy) did not significantly affect ATP production nor glycolytic reserve of HD-MB03 cells in these conditions (Figures 7g-h). Nevertheless, IR combined with IC_{20} propranolol inhibited the two processes by 39 ± 5 % and 63 ± 11 % respectively, as compared with IR monotherapy ($p < 0·05$, Figures 7g-h). This potentiation was also confirmed in ONS-76 cells (Figure S7f-g). Our results thus support the importance of bioenergetic disturbances in the response of MB cells to β-blockers and their combination with radiotherapy.

β-blockers enhance IR-induced oxidative stress and consequently increase DNA damage in MB cells

Reactive oxygen species (ROS) are the major effectors of IR, contributing substantially to radiation-induced DNA

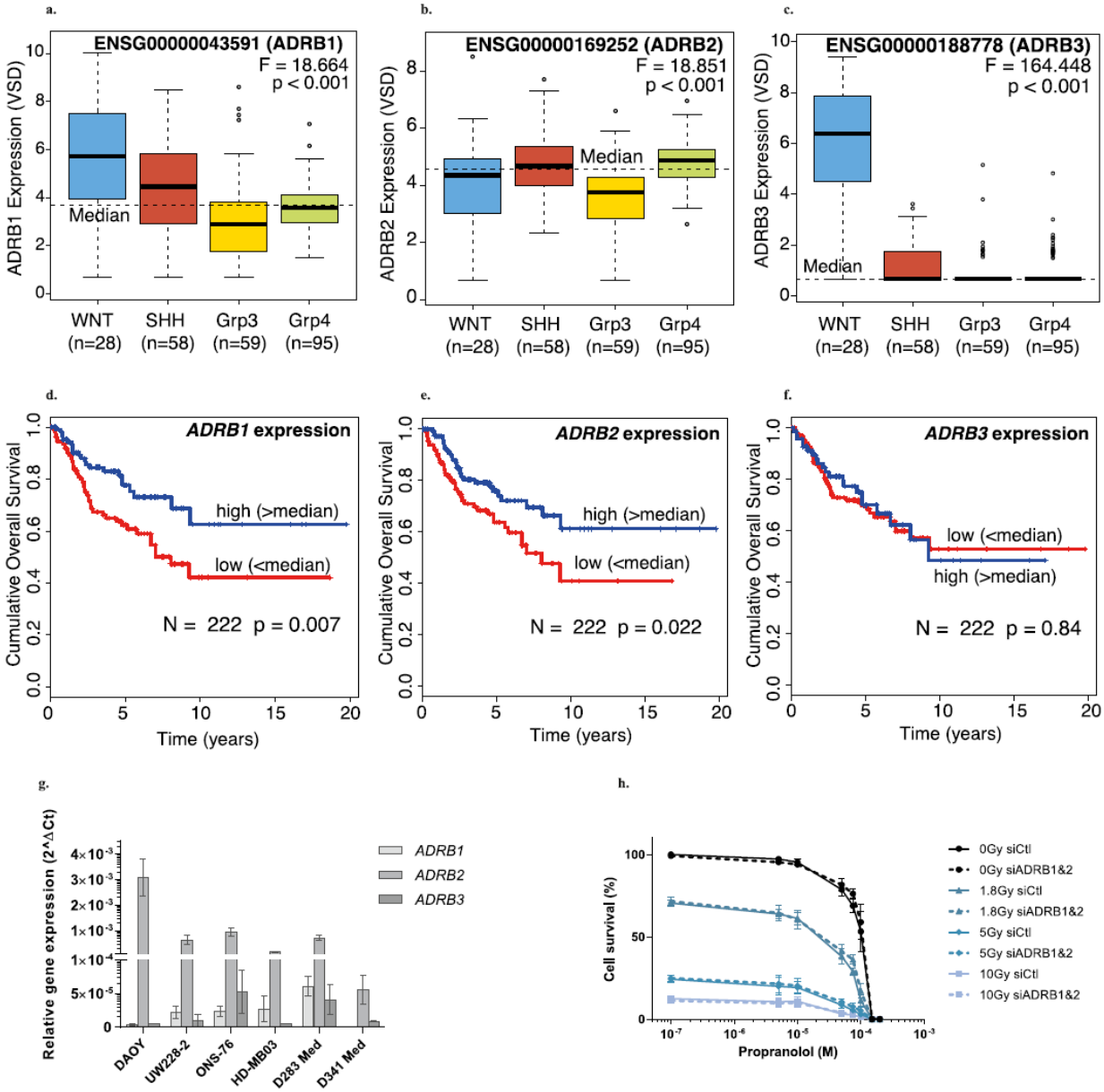


Figure 5. β-Adrenergic receptors (β-AR) are not involved in the response of MB cells to β-blockers. Boxplot showing expression of *ADRB1* **(a)**, *ADRB2* **(b)** and *ADRB3* **(c)** by subgroup in MB patient cohort (n = 240). Kaplan-Meier curves reporting patient overall survival stratifying patients by > median and < media expression for *ADRB1* **(d)**, *ADRB2* **(e)** and *ADRB3* **(f)** expression levels. **(g)** Relative gene expression of *ADRB1*, *ADRB2* and *ADRB3* quantified by qRT-PCR using *GAPDH* as housekeeping gene (n = 8 per condition, from four independent experiments). Calculation has been done by the 2^-ΔCt method. Values are the average of independent experiments ± standard error of mean (SEM). **(h)** Cell viability analysis by using the Alamar Blue assay after 72h of treatment with radiotherapy (IR) 1·8, 5 and 10 Gy and increase concentrations of propranolol in HD-MB03 cells transfected with siRNA control (Ctl) or siRNA *ADRB1&2*. Values are the average of three independent experiments ± SEM, with a biological triplicate in each experiment. *$p < 0·05$; **$p < 0·005$; ***$p < 0·001$.

damage and cancer cell death.[37] Given the effects of co-treatment on mitochondrial energy metabolism, we first determined whether the combination therapy could disrupt redox balance, by assessing the superoxide ion levels. Six hours post-irradiation, an expected increase in superoxide relative level of 34 ± 4 % was observed in IR HD-MB03 cells compared to control cells ($p < 0·001$, Figure 8a). Propranolol, at 10 µM (IC_5) and 25 µM (IC_{10}), also increased the production of ROS by 36 ± 12 % and 31 ± 9 %, respectively ($p < 0·01$, Figure 8a).

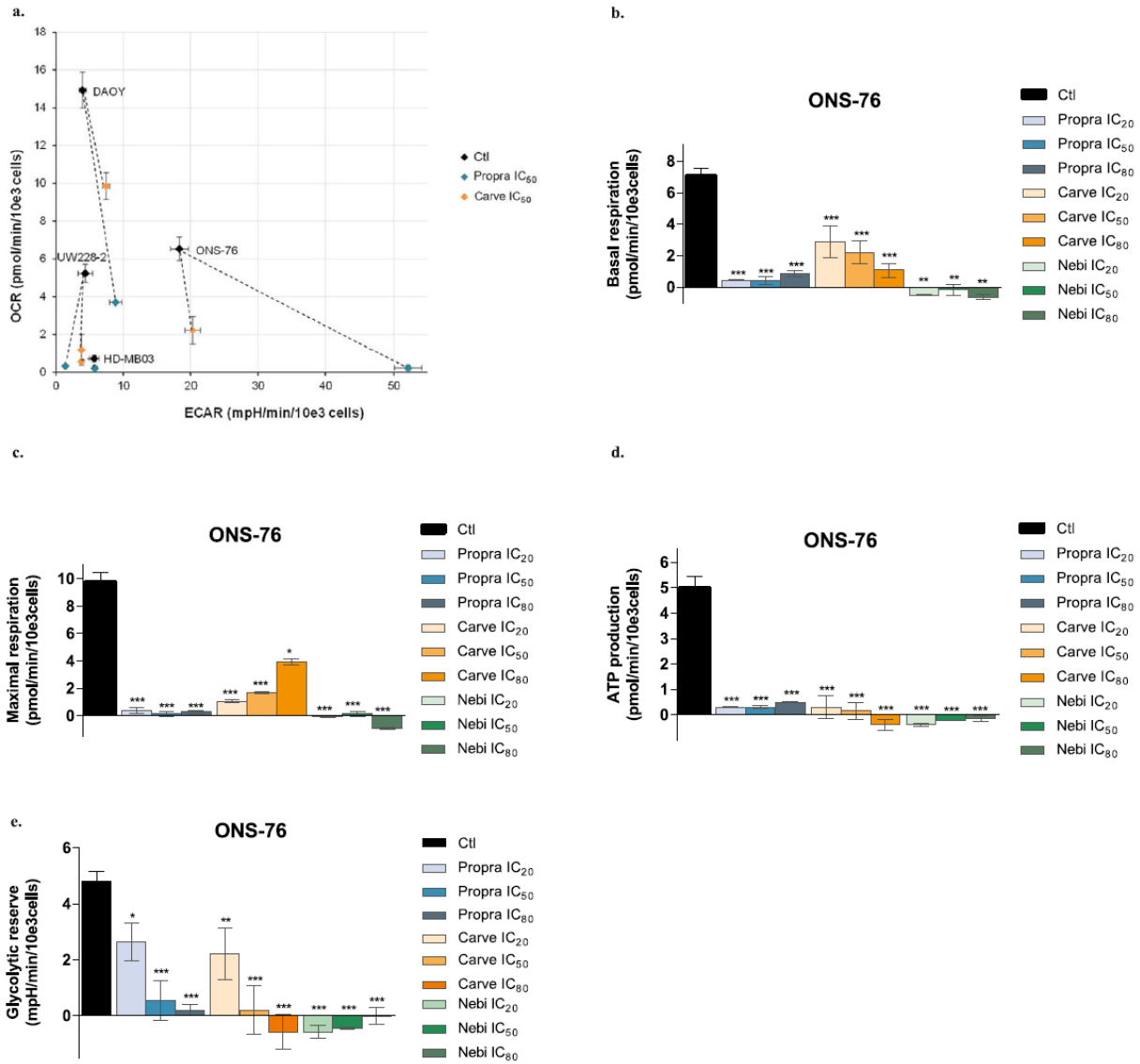


Figure 6. β-blockers inhibit MB cell energy metabolism. (a) Metabolic profile of MB cells before (Ctl) and after a 24 h treatment with IC_{50} of propranolol (propra) or carvedilol (carve). Mitochondrial respiration (OCR, oxygen consumption rate) and glycolytic activity (ECAR, extracellular acidification rate) were measured with the Seahorse XFe24® analyser. Values are the average of at least six independent experiments ± standard error of mean (SEM). Basal respiration **(b)**, maximal respiration **(c)**, ATP production **(d)** and glycolytic reserve **(e)** of ONS-76 cells exposed for 24 h to increasing concentrations of propranolol (propra), carvedilol (carve) or nebivolol (nebi). Values are the average of three independent experiments ± SEM, with a biological duplicate in each experiment. ECAR and OCR were normalised to cell number. $^{*}p < 0{\cdot}05$; $^{**}p < 0{\cdot}005$; $^{***}p < 0{\cdot}001$.

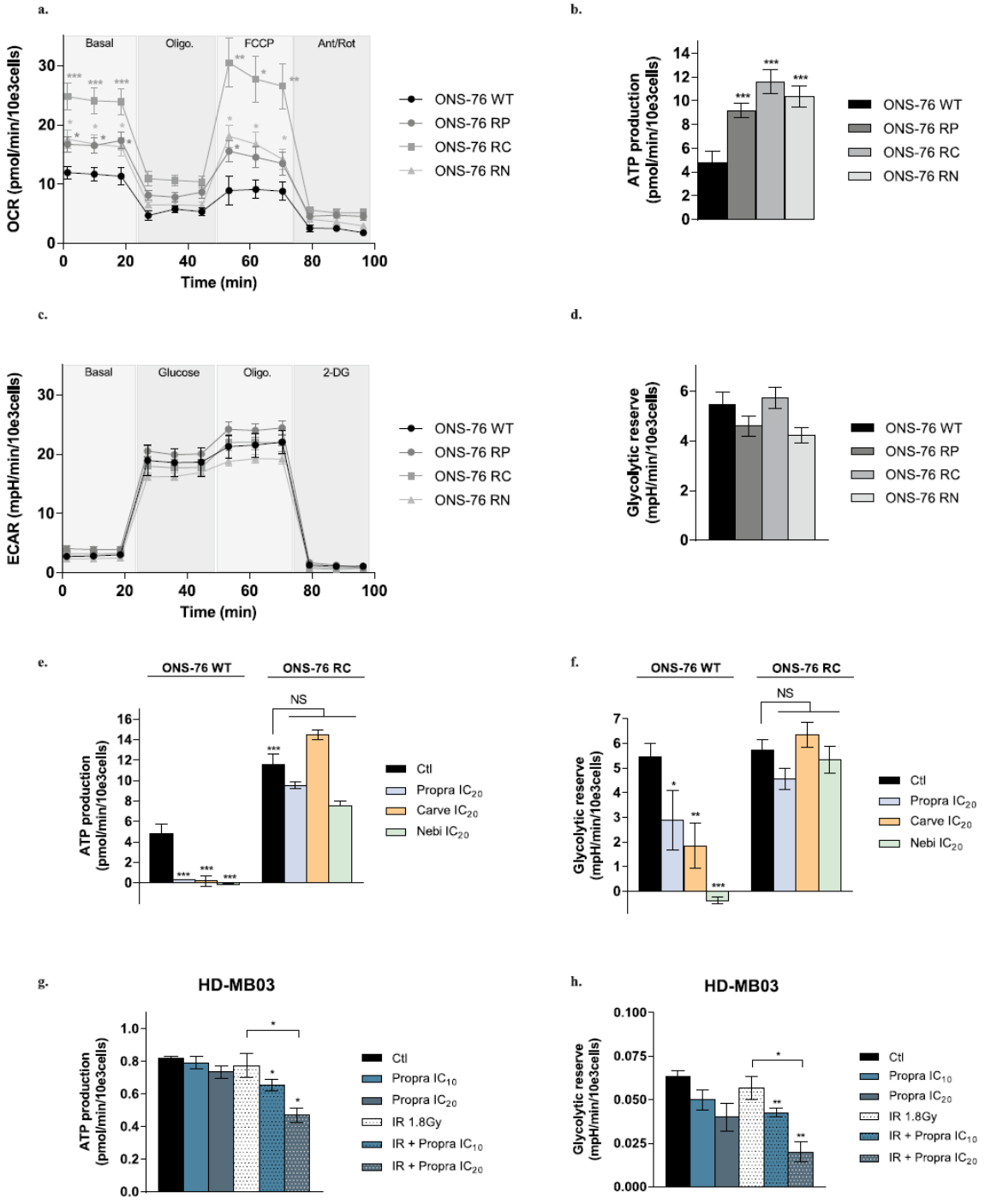


Figure 7. MB cells resistant to β-blockers are not sensitive to the treatment-mediated alteration of energy metabolism. Mitochondrial oxygen consumption rate (OCR) **(a)** and ATP production **(b)** in β-blocker sensitive cells (ONS-76 WT) and in three β-blocker resistant cells (ONS-76 RP, ONS-76 RC, ONS-76 RN), measured using the Seahorse XFe24® analyser. Glycolytic extracellular acidification rate (ECAR) **(c)** and glycolytic reserve **(d)** in β-blocker sensitive cells (ONS-76 WT) and in β-blocker resistant cells (ONS-76 RP, ONS-76 RC, ONS-76 RN), measured using the Seahorse XFe24® analyser. ATP production **(e)** and glycolytic reserve **(f)** measured with the Seahorse XFe24® analyser in sensitive and carvedilol resistant cells (ONS-76 RC) exposed to IC_{20} of propranolol (propra), carvedilol (carve) or nebivolol (nebi) for 24 h. ATP production **(g)** and glycolytic reserve **(h)** measured by using the Seahorse XFe24® analyser in HD-MB03 cells exposed for six hours to radiotherapy (IR) 1·8 Gy or IC_{10}-IC_{20} of propranolol (propra) alone and their combination. All the values are the average of four independent experiments ± standard error of mean (SEM), with a biological triplicate in each experiment. Data were normalised to cell number. *$p < 0{\cdot}05$; **$p < 0{\cdot}005$; ***$p < 0{\cdot}001$.

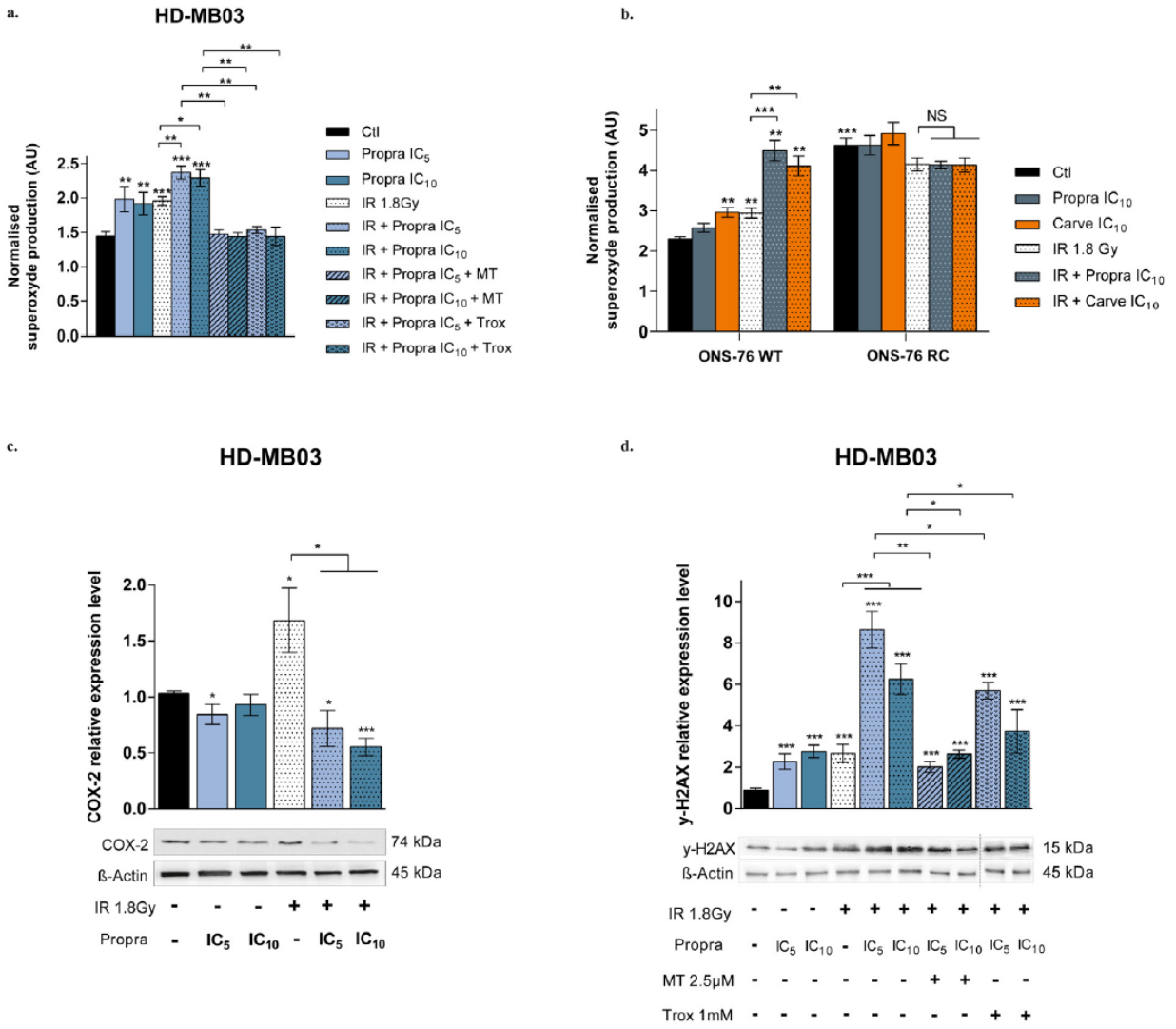


Figure 8. Low concentrations of β-blockers enhanced IR-mediated MB cell oxidative stress and DNA damage. (a) Superoxide ions production measured with WST-1 in HD-MB03 cells, six hours after treatment with radiotherapy (IR) 1·8 Gy or IC_5-IC_{10} of propranolol (propra) alone and their combination, and with anti-oxydants (mito-TEMPO (MT) 2·5 µM or Troxerutin (Trox) 1 mM). Data were normalised to cell number. Values are the average of five independent experiments ± standard error of mean (SEM), with a biological quadruplicate in each experiment. **(b)** Superoxide ions production measured with WST-1 in β-blocker sensitive (ONS-76 WT) and carvedilol resistant ONS-76 cell lines (ONS-76 RC), six hours after treatment with radiotherapy (IR) 1·8 Gy or IC_{20} of propranolol (propra) or carvedilol (carve) alone and their combination. Data were normalised to cell number. Values are the average of four independent experiments ± SEM, with a biological quadruplicate in each experiment. Protein expression level of COX-2 **(c)** and γ-H2AX **(d)** in HD-MB03 cells exposed to radiotherapy (IR) 1·8 Gy or IC_5-IC_{10} of propranolol (propra) alone and their combination, and with anti-oxydants (mito-TEMPO (MT) 2·5 µM or Troxerutin (Trox) 1 mM). Western blots were quantified using ImageJ™ software; data were normalised to β-Actin. Values are the average of at least five independent experiments ± SEM. *$p < 0{\cdot}05$; **$p < 0{\cdot}005$; ***$p < 0{\cdot}001$.

The combination of IR with these low doses of propranolol led to an additional upregulation of ROS levels, up to 64 ± 4 % and 59 ± 5 %, respectively (Figure 8a, $p < 0{\cdot}001$). These results were confirmed with carvedilol at 5 (IC_{10}) and 7·5 µM (IC_{20}) in HD-MB03 cells (Figure S8a), as well as in MD 3D spheroids (Figure S8b, c). A significant overproduction of superoxide ions of 96 ± 6 % ($p < 0{\cdot}001$) and 78 ± 7 % ($p < 0{\cdot}01$) was also found in ONS-76 cells exposed to IR and combined with IC_{10} of propranolol or IC_{10} of carvedilol (Figure 8b). However, in the β-blocker-resistant cells ONS-76 RC, both propranolol and carvedilol were unable to amplify the effects of IR on superoxide production (Figure 8b). Potentiation of IR efficacy by the

two β-blockers was also significantly reduced in these cells (Figure S8b), supporting a tight link between ROS production and response of MB cells to the combinatorial treatment.

As the overproduction of ROS may contribute to an increase in cyclooxygenase 2 (COX-2) expression, which has been associated with the acquisition of a secondary radioresistance by tumour cells,[38] we ensured that such a feedback loop was not triggered in MB cells. By analysing COX-2 relative expression level in HD-MB03 cells 24 h after treatment, we showed that it was reduced from 1·7 ± 0·3 in 1·8 Gy irradiated cells to 0·8 ± 0·1 and 0·7 ± 0·1 in cells subjected to IR combined with IC_5 and IC_{10} propranolol respectively ($p < 0·05$, Figure 8c). The inhibition of IR-mediated increase in COX-2 expression by the combinatorial treatment was confirmed in ONS cells (Figure S8c).

Lastly, we evaluated the phosphorylation level of H2AX, being an early response to DNA double-strand breaks that here may be caused following ROS exposure. In HD-MB03 cells, 4 h after treatment, IR triggered the expected accumulation of γH2AX, as did low concentrations of propranolol (Figure 8d). Our results also showed a significant increase in γH2AX relative level from 2·7 ± 0·4 in irradiated cells to 8·6 ± 0·9 and 6·3 ± 0·7 in cells exposed to the co-treatment with IC_5 and IC_{10} propranolol, respectively ($p < 0·001$, Figure 8d). By scavenging the superoxide ions (Figure 8a), Mito-TEMPO (MT) counteracted the increase in γH2AX level by the combinatorial treatments – which dropped to 2·0 ± 0·4 and 2·6 ± 0·2, respectively – ($p < 0·01$ and 0·05 *vs* co-treatments, respectively, Figure 8d). Likewise, scavenging of free radicals by Troxerutin (TROX; Figure 8a) led to a significant reduction in IR-mediated γH2AX accumulation ($p < 0·05$ *vs* co-treatments, Figure 8d). Taken together, our results suggest that β-blockers can specifically modulate mitochondrial bioenergetics and ROS production in MB cells, thus priming them for IR-induced oxidative stress and DNA damage. Our results therefore show that the efficacy of the combination of IR with β-blockers is, at least in part, based on a strong inhibition of MB cell bioenergetics, linked to the triggering of an endogenous oxidative stress.

Discussion

In recent years, many advances have been made in the management of children with MB. Nevertheless, a real concern remains the long-term sequelae due to the early exposure to toxic treatments.[7,10] Drug repurposing appears to be a major tool to rapidly find effective and well-tolerated therapeutic approaches in oncology.[11,13] It might especially be an alternative strategy to manage rare cancers such as paediatric tumours. Cardiovascular regulators, anti-helminthic drugs and non-steroidal anti-inflammatory drugs have recently shown to reduce MB tumour cell progression *in vitro* and *in vivo*.[39] Here, we evaluated in MB models propranolol, carvedilol and nebivolol, which are lipophilic β-blockers that can cross the blood-brain barrier, and enter the cerebrospinal fluid and intracranial tissue.[40]

Our results showed that the three β-blockers potentiate the efficacy of IR in a panel of MB cells, PDX cells and spheroid micromasses, including those poorly responsive to radiation. These results are consistent with the recent study from Chaudhary *et al.*, that described a propranolol-mediated sensitisation to IR in non-small cell lung cancer cells *in vitro*.[20] Enhanced effectiveness of IR at reducing the growth of gastric adenocarcinoma *in vivo* when combined with propranolol was also shown recently.[23] Retrospective clinical studies have also shown that the combination of -blockers and radiotherapy did not result in increased toxicities in patients with lung cancer[20,41,42] and brain tumors such as meningioma.[24] The interest of combining radiotherapy with β-blockers is further supported by the fact that -blockers are largely known to be good brain protectors that can be used for instance after head trauma including in children.[43,44]

In response to the ever-increasing need to find alternatives to animal experimentation, we have developed an innovative organotypic cerebellum model in which MB tumour progression has been analysed over time. These *ex vivo* tissue cultures are described as highly relevant models to study the evolution of pathologies and to test their response to different therapeutic strategies, including in MB.[45] We further showed that the dose of IR can be significantly reduced while maintaining treatment efficacy in MB cells by adding β-blockers. As the severity of cognitive damages in patients correlates with radiation doses,[10,46] this suggests that combining β-blockers with IR may help limit treatment side effects.

One of the advantages of repurposing β-blockers as anti-cancer agents is that they can be translated to the clinic without the need for extensive preclinical studies, including *in vivo* experiments. For instance, propranolol was first used in a clinical setting in combination with metronomic chemotherapy in patients before it was later confirmed to be active *in vivo* in mouse models.[17,47,48] In addition, an ongoing clinical trial (NCT04682158) exploring the combination of propranolol with chemo-radiation is based on *in vitro* experiments and retrospective clinico-epidemiological experience in patients who received β-blockers for non-cancer purposes in combination.[49] Another potential example is based on multiple myeloma for which clinical trials have been completed (NCT02420223) or recently initiated (NCT02420223) without myeloma-specific *in vivo* data but based but again on *in vitro* and clinic-epidemiological experiments.[50] The results of the present article can thus provide a strong basis for initiating an early phase clinical trial.

The literature is divided regarding the mechanisms responsible for the anti-tumour properties of β-blockers.

Inhibition of the β-adrenergic signaling pathway has been suggested to be involved in propranolol activity in pancreatic cancer cells.[51] Studies in angiosarcoma cells provide a good illustration of the conflicting hypotheses. Amaya *et al.* proposed the involvement of the β-adrenergic pathway in the mechanism of action of propranolol,[52,53] whereas a recent study by Overman *et al.* argued the opposite and showed a key role for the SOX18 protein in the response to the β-blocker.[52,53] In the paediatric tumours neuroblastoma and hemangioma, the results agree that β-ARs are not responsible for the anti-tumour efficacy of β-blockers, showing that the R-enantiomer of propranolol – which has very low affinity for β-ARs – has the same efficacy as the S-enantiomer that is highly affine for the receptors.[53–55] Although patient MB biopsies showed detectable β-AR expression, we demonstrated herein that their silencing did not alter the efficacy of propranolol, carvedilol and nebivolol in MB cells, suggesting that the efficacy of β-blockers in MB cells may not result from the inhibition of the canonical targets.

We and others have reported that propranolol-exposed cancer cells were sensitised to the metabolic stress induced by metformin, rapamycin, 2-deoxy-D-glucose or dichloroacetate.[36,56–58] Here, we showed that the activity of the β-blockers in MB cells was driven by a rapid disruption of the mitochondrial bioenergetics, which led to a sustained accumulation of ROS. This is consistent with the alteration of the mitochondrial fusion/fission balance that we previously observed in neuroblastoma cells treated with propranolol.[18] The significance of cancer cell energy metabolism in response to β-blockers is further strengthened by the fact that the lack of impact on mitochondrial and glycolytic pathways results in resistance of MB cells to these repurposed drugs.

Efficacy of radiation therapy relies on its ability to cause DNA breaks and to subsequently trigger cell death. The DNA damages mainly result from the generation of ROS, such as superoxide and hydroxyl radicals, during H_2O radiolysis.[37] In the present study, we showed that β-blockers potentiate IR-mediated DNA damages in MB cells by increasing superoxide accumulation. Our results are consistent with the fact that pharmacologic depletion of glutathione, which belongs to the cell antioxidant system, significantly results in radiosensitisation of cancer stem cells.[59] Recently, Gd-doped titania nanoparticules that target mitochondria to enhance ROS accumulation were also shown to sensitise breast cancer cells to radiotherapy-induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*.[60] Increasing ROS levels in MB tumour cells during radiotherapy may thus significantly enhance the efficiency and decrease the dosage of radiation.

COX-2 overexpression has been associated with resistance to IR in prostate, lung and oral squamous cancer cells.[61–63] Conversely, COX-2 inhibitors can synergise with IR in inducing apoptosis,[63,64] including in MB stem-like cells.[65,66] COX-2 inhibition has been suggested as a potential strategy in MB to decrease the production of prostaglandin E2 (PGE2) and ultimately promote tumour cell death.[67] Here, we showed that propranolol prevented the increase in COX-2 expression mediated by IR, but the involvement of the PGE2 pathway in improving response of MB cells to combinatorial therapy remains to be better characterised.

To conclude, our work highlights the interest of channeling the ability of β-blockers to inhibit mitochondrial bioenergetics to design new therapeutic combinations with radiotherapy that lower the dose while maintaining anti-tumour activity. Given the few druggable molecular targets identified in non-WNT MB and the fact that young age of patients limits treatment options, our work proposes an alternative approach in which drug repurposing could be quickly translated to the clinic to improve the efficacy of radiotherapy and/or decrease its toxicity.

Contributors

Conceptualisation: E.P., M.C. and N.A. Formal analysis: M.R., J.T., M.M., P.P., M.-P.M., E.A.-C., M., R.A. and D.W. Funding acquisition: N.A., M.R. and M.C. Methodology: J.T., C.K., D.B., L.P., P.P., M.-P.M., E.A.-C., R.A. and V.B. Project administration: M.C., S.C., O.A. and N.A. Supervision: M.C. and N.A. Validation: M.R., O.A.,J.T., M.L.G., P.P., E.P., D.B., M.-P.M. and M.M. Writing, review & editing: M.R., M.C., E.P., M.L.G., N.A., D.W. and J.T. All authors have read and approved the final manuscript.

Data sharing statement

Our RNA-seq information and raw data from ONS-76 cells are publicly available in GEO database (GEO accession numbers: GSE191165). The other data and materials are available from the corresponding authors upon reasonable request.

Declaration of interests

The authors have declared no conflict of interest.

Acknowledgements

We would like to thank Julie Desrousseaux, Sophie Capdeville and Stephanie Gempp for their availability and help in irradiating cells, Samy Vigier and Anne Rodallec for their help with animal experimentation, and Camille Cordero for defining the conditions of cell irradiation. We also thank Claire Lovo and Marie-Noëlle Soler from the Light Microscopy facility of Multimodal Imaging Center (CNRS UAR2016/Inserm US43/Institut Curie/Université Paris-Saclay), for IncuCyte imaging assistance, Christophe Alberti and Elodie Belloir for

mouse colony management, Hua Yu for mouse model monitoring and Sophie Heinrich from the RadExp platform for irradiation experiments assistance. We also thank the ICEP platform of IPC/CRCM for their help in immunohistochemistry experiments.

This work was supported by research funding from charities (RESOP, La Marie-Do, AROU, La Compagnie Après la Pluie, Société Française des Cancers de l'Enfant, Courir pour la Vie - Courir pour Curie, Ligue Contre le Cancer - Corse Sud) and institutions (Cancer Research UK, Canceropôle PACA, Institut National du Cancer and Région Sud). Sequencing was performed by the GenomEast platform, a member of the 'France Génomique' consortium (ANR-10-INBS-0009).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ebiom.2022.104149.

References

1 Schwalbe EC, Lindsey JC, Nakjang S, et al. Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study. *Lancet Oncol*. 2017;18(7):958–971.
2 Northcott PA, Buchhalter I, Morrissy AS, et al. The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. *Nature*. 2017;547(7663):311–317.
3 Sharma T, Schwalbe EC, Williamson D, et al. Second-generation molecular subgrouping of medulloblastoma: an international meta-analysis of Group 3 and Group 4 subtypes. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2019;138(2):309–326.
4 Massimino M, Biassoni V, Gandola L, et al. Childhood medulloblastoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;105:35–51.
5 Juraschka K, Taylor MD. Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: a review. *J Neurosurg Pediatr*. 2019;24(4):353–363.
6 Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(2):83–103.
7 Mulhern RK, Palmer SL, Merchant TE, et al. Neurocognitive consequences of risk-adapted therapy for childhood medulloblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005;23(24):5511–5519.
8 Lafay–Cousin L, Bouffet E, Hawkins C, Amid A, Huang A, Mabbott DJ. Impact of radiation avoidance on survival and neurocognitive outcome in infant medulloblastoma. *Curr Oncol*. 2009;16(6):21–28.
9 Rutkowski S, Gerber NU, von Hoff K, et al. Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy and deferred radiotherapy. *Neuro-Oncol*. 2009;11(2):201–210.
10 Padovani L, Horan G, Ajithkumar T. Radiotherapy advances in paediatric medulloblastoma treatment. *Clin Oncol R Coll Radiol G B*. 2019;31(3):171–181.
11 Bahmad HF, Elajami MK, El Zarif T, Bou-Gharios J, Abou-Antoun T, Abou-Kheir W. Drug repurposing towards targeting cancer stem cells in pediatric brain tumors. *Cancer Metastasis Rev*. 2020;39(1):127–148.
12 Bertolini F, Sukhatme VP, Bouche G. Drug repurposing in oncology–patient and health systems opportunities. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(12):732–742.
13 Pantziarka P, Verbaanderd C, Huys I, Bouche G, Meheus L. Repurposing drugs in oncology: from candidate selection to clinical adoption. *Semin Cancer Biol*. 2020.
14 Alabed S, Sabouni A, Al Dakhoul S, Bdaiwi Y. Beta-blockers for congestive heart failure in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;7:CD007037.
15 Léauté-Labrèze C, Dumas de la Roque E, Hubiche T, Boralevi F, Thambo JB, Taïeb A. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med*. 2008;358(24):2649–2651.
16 Pasquier E, Ciccolini J, Carre M, et al. Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and anti-tumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment. *Oncotarget*. 2011;2(10):797–809.
17 Pasquier E, André N, Street J, et al. Effective management of advanced angiosarcoma by the synergistic combination of propranolol and vinblastine-based metronomic chemotherapy: a bench to bedside study. *EBioMedicine*. 2016;6:87–95.
18 Pasquier E, Street J, Pouchy C, et al. β-blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic mechanisms in neuroblastoma. *Br J Cancer*. 2013;108(12):2485–2494.
19 MacDonald CR, Bucsek MJ, Qiao G, et al. Adrenergic receptor signaling regulates the response of tumors to ionizing radiation. *Radiat Res*. 2019;191(6):585–589.
20 Chaudhary KR, Yan SX, Heilbroner SP, et al. Effects of β-adrenergic antagonists on chemoradiation therapy for locally advanced non-small cell lung cancer. *J Clin Med*. 2019;8(5). [cited 2020 Apr 15].
21 Chen M, Qiao G, Hylander BL, et al. Adrenergic stress constrains the development of anti-tumor immunity and abscopal responses following local radiation. *Nat Commun*. 2020;11(1):1821–1832. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15676-0.
22 Liao X, Che X, Zhao W, et al. Effects of propranolol in combination with radiation on apoptosis and survival of gastric cancer cells in vitro. *Radiat Oncol Lond Engl*. 2010;5:98.
23 Liao X, Chaudhary P, Qiu G, Che X, Fan L. The role of propranolol as a radiosensitizer in gastric cancer treatment. *Drug Des Devel Ther*. 2018;12:639–645.
24 Pintea B, Kinfe TM, Baumert BG, Boström J. Earlier and sustained response with incidental use of cardiovascular drugs among patients with low- to medium-grade meningiomas treated with radiosurgery (SRS) or stereotactic radiotherapy (SRT). *Radiother Oncol*. 2014;111(3):446–450.
25 Wang HM, Liao ZX, Komaki R, et al. Improved survival outcomes with the incidental use of beta-blockers among patients with non-small-cell lung cancer treated with definitive radiation therapy. *Ann Oncol*. 2013;24(5):1312–1319.
26 Zindy F, Uziel T, Ayrault O, et al. Genetic alterations in mouse medulloblastomas and generation of tumors de novo from primary cerebellar granule neuron precursors. *Cancer Res*. 2007;67(6):2676–2684.
27 Garancher A, Lin CY, Morabito M, et al. NRL and CRX define photoreceptor identity and reveal subgroup-specific dependencies in medulloblastoma. *Cancer Cell*. 2018;33(3):435–449.e6.
28 Ariey-Bonnet J, Carrasco K, Le Grand M, et al. In silico molecular target prediction unveils mebendazole as a potent MAPK14 inhibitor. *Mol Oncol*. 2020;14(12):3083–3099.
29 xing Cao D, hao Wu G, ang Yang Z, et al. Role of beta1-adrenoceptor in increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer Sci*. 2010;101(7):1639–1645.
30 Henriques A, Huebecker M, Blasco H, et al. Inhibition of β-glucocerebrosidase activity preserves motor unit integrity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep*. 2017;7:5235.
31 Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 2011;17(1):10–12.
32 Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9(4):357–359.
33 Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15–21.
34 Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31(2):166–169.
35 Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
36 Rico M, Baglioni M, Bondarenko M, et al. Metformin and propranolol combination prevents cancer progression and metastasis in different breast cancer models. *Oncotarget*. 2017;8(2):2874–2889.
37 Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol*. 2018;25:101084.
38 Cheki M, Yahyapour R, Farhood B, et al. COX-2 in radiotherapy: a potential target for radioprotection and radiosensitization. *Curr Mol Pharmacol*. 2018;11(3):173–183.
39 Hammoud H, Saker Z, Harati H, Fares Y, Bahmad HF, Nabha S. Drug repurposing in medulloblastoma: challenges and recommendations. *Curr Treat Options Oncol*. 2020;22(1):6.
40 Hjalmarson A. Cardioprotection with beta-adrenoceptor blockers. Does lipophilicity matter? *Basic Res Cardiol*. 2000;95(suppl 1):I41–I45.

41 Wang HM, Liao ZX, Komaki R, et al. Improved survival outcomes with the incidental use of beta-blockers among patients with non-small-cell lung cancer treated with definitive radiation therapy. *Ann Oncol*. 2013;24(5):1312–1319.

42 Wang HM, Liao ZX, Komaki R, et al. Improved survival outcomes with the incidental use of beta-blockers among patients with non-small-cell lung cancer treated with definitive radiation therapy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013;24(5):1312–1319.

43 Zeeshan M, Hamidi M, O'Keeffe T, et al. Propranolol attenuates cognitive, learning, and memory deficits in a murine model of traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg*. 2019;87(5):1140–1147.

44 Fumagalli C, Maurizi N, Marchionni N, Fornasari D. β-blockers: their new life from hypertension to cancer and migraine. *Pharmacol Res*. 2020;151:104587.

45 Meijer TG, Naipal KA, Jager A, van Gent DC. Ex vivo tumor culture systems for functional drug testing and therapy response prediction. *Future Sci OA*. 2017;3(2):FSO190.

46 Bindra RS, Wolden SL. Advances in Radiation Therapy in Pediatric Neuro-oncology. *J Child Neurol*. 2016;31(4):506–516.

47 Banavali S, Pasquier E, Andre N. Targeted therapy with propranolol and metronomic chemotherapy combination: sustained complete response of a relapsing metastatic angiosarcoma. *Ecancermedicalscience*. 2015;9:499–502. https://doi.org/10.3332/ecancer.2015.499.

48 Stiles JM, Amaya C, Rains S, et al. Targeting of beta adrenergic receptors results in therapeutic efficacy against models of hemangioendothelioma and angiosarcoma. *PLoS One*. 2013;8(3):e60021.

49 Farrugia MK, Ma SJ, Mattson DM, Flaherty L, Repasky EA, Singh AK. Concurrent β-blocker use is associated with improved outcome in esophageal cancer patients who undergo chemoradiation: a retrospective matched pair analysis. *Am J Clin Oncol*. 2020;43(12):889–894.

50 Hwa YL, Shi Q, Kumar SK, et al. Beta-blockers improve survival outcomes in patients with multiple myeloma: a retrospective evaluation. *Am J Hematol*. 2017;92(1):50–55.

51 Zhang D, Ma QY, Hu HT, Zhang M. β2-adrenergic antagonists suppress pancreatic cancer cell invasion by inhibiting CREB, NFκB and AP-1. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(1):19–29.

52 Amaya CN, Perkins M, Belmont A, et al. Non-selective beta blockers inhibit angiosarcoma cell viability and increase progression free- and overall-survival in patients diagnosed with metastatic angiosarcoma. *Oncoscience*. 2018;5(3–4):109–119.

53 Overman J, Fontaine F, Wylie-Sears J, et al. R-propranolol is a small molecule inhibitor of the SOX18 transcription factor in a rare vascular syndrome and hemangioma. *eLife*. 2019;8:e43026–43040. https://doi.org/10.7554/eLife.43026.

54 Sasaki M, North PE, Elsey J, et al. Propranolol exhibits activity against hemangiomas independent of beta blockade. *NPJ Precis Oncol*. 2019;3:27–35. https://doi.org/10.1038/s41698-019-0099-9.

55 Seebauer CT, Graus MS, Huang L, McCann AJ, Wylie-Sears J, Fontaine FR, et al. Non-β-blocker enantiomers of propranolol and atenolol inhibit vasculogenesis in infantile hemangioma. *J Clin Invest*. 2021;132(3):e151109–151123. https://doi.org/10.1172/JCI151109.

56 Brohée L, Demine S, Willems J, Arnould T, Colige AC, Deroanne CF. Lipin-1 regulates cancer cell phenotype and is a potential target to potentiate rapamycin treatment. *Oncotarget*. 2015;6(13):11264–11280.

57 Brohée L, Peulen O, Nusgens B, et al. Propranolol sensitizes prostate cancer cells to glucose metabolism inhibition and prevents cancer progression. *Sci Rep*. 2018;8:7050.

58 Lucido CT, Miskimins WK, Vermeer PD. Propranolol promotes glucose dependence and synergizes with dichloroacetate for anticancer activity in HNSCC. *Cancers*. 2018;10(12):476.

59 Diehn M, Cho RW, Lobo NA, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 2009;458(7239):780–783.

60 Chen Y, Li N, Wang J, et al. Enhancement of mitochondrial ROS accumulation and radiotherapeutic efficacy using a Gd-doped titania nanosensitizer. *Theranostics*. 2019;9(1):167–178.

61 Anai S, Tanaka M, Shiverick KT, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 correlates with resistance to radiation in human prostate adenocarcinoma cells. *J Urol*. 2007;177(5):1913–1917.

62 Terakado N, Shintani S, Yano J, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with radioresistance in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2004;40(4):383–389.

63 Han ZQ, Liao H, Shi F, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 sensitizes lung cancer cells to radiation-induced apoptosis. *Oncol Lett*. 2017;14(5):5959–5965.

64 Salehifar E, Hosseinimehr SJ. The use of cyclooxygenase-2 inhibitors for improvement of efficacy of radiotherapy in cancers. *Drug Discov Today*. 2016;21(4):654–662.

65 Chen KH, Hsu CC, Song WS, et al. Celecoxib enhances radiosensitivity in medulloblastoma-derived CD133-positive cells. *Childs Nerv Syst ChNS Off J Int Soc Pediatr Neurosurg*. 2010;26(11):1605–1612.

66 Yang MY, Lee HT, Chen CM, Shen CC, Ma HI. Celecoxib suppresses the phosphorylation of STAT3 protein and can enhance the radiosensitivity of medulloblastoma-derived cancer stem-like cells. *Int J Mol Sci*. 2014;15(6):11013–11029.

67 Baryawno N, Sveinbjörnsson B, Eksborg S, et al. Tumor-growth–promoting cyclooxygenase-2 prostaglandin E2 pathway provides medulloblastoma therapeutic targets. *Neuro-Oncol*. 2008;10(5):661–674.

III. Perspectives

Au-delà du fait que ce dernier travail révèle la place de potentialisateurs de la radiothérapie que peuvent gagner les β-bloquants dans les MB, il souligne la faisabilité d'intégrer les protocoles de radiothérapie dans nos approches combinatoires.
Même s'ils sont minoritaires dans les MB, les essais cliniques incluant la radiothérapie envisagent de plus en plus une association simultanée avec des agents de chimiothérapie conventionnelle et des thérapies ciblées, voire des immunothérapies (source : clinicaltrials.gov). Un essai clinique de phase 1 propose même d'associer la radiothérapie à l'atovaquone, un antiparasitaire repositionné (NCT06624371). La collaboration de longue date de notre équipe avec le service clinique de Radiothérapie de l'hôpital de La Timone (Dir Pr Padovani, AP-HM) rend favorable l'exploration de ces nouvelles approches combinatoires. Cet environnement scientifique nous a permis de contourner le fait que la frontière entre le domaine de l'oncologie et celui de la radiothérapie reste encore peu perméable. Pourtant, l'enjeu est crucial puisque la radiothérapie occupe une place centrale dans le traitement des MB, à l'origine d'une part importante de l'efficacité anticancéreuse de la prise en charge mais également des effets secondaires sur le long terme.

Dans ce contexte, nous avons entrepris d'identifier des associations thérapeutiques permettant d'améliorer l'efficacité des rayonnements ionisants dans les cellules de MB non-WNT/non-SHH, avec pour but ultime une réduction des doses et ainsi des effets secondaires délétères. Pour ce faire, des étapes de mise au point des conditions expérimentales ont été réalisées en plaques 384 puits –adaptées au criblage haut débit–, afin d'optimiser la densité cellulaire, garantir l'homogénéité de l'irradiation dans chaque puits et nous assurer que la dose pertinente en clinique (*i.e.* 1.8 Gy) est compatible avec nos attentes. Les cellules HD-MB03 ont ensuite pu être exposées simultanément à la librairie HITCH et aux rayonnements ionisants (irradiateur Versa™). Les résultats de survie cellulaire ont été révélés après 72h (CellTiterGlo) et les différences d'AUC entre cellules irradiées et non irradiées ont été calculées pour les 110 composés. Ces tests, bien que préliminaires, révèlent que 25 % des composés de la librairie modifient de manière significative la réponse des cellules de MB à la radiothérapie (cut-off fixé à 0,1 ; Fig. 39A). Cette observation, en accord avec la composition ciblée de notre bibliothèque, confirme ainsi la pertinence du read-out utilisé pour évaluer cette modulation. En particulier, on note un effet de classe significatif pour les inhibiteurs des voies MAPK/mTOR, nous conduisant à sélectionner l'Omipalisib et le Ralimetinib, inhibiteur de PI3K/mTOR et MAPK14 respectivement, pour la suite des travaux. De même, les composés pro-apoptotiques de la catégorie des inhibiteurs de BCL2 sont présents parmi les potentialisateurs de la radiothérapie. Nous avons donc également sélectionné deux d'entre eux : le Vénétoclax et le Navitoclax.

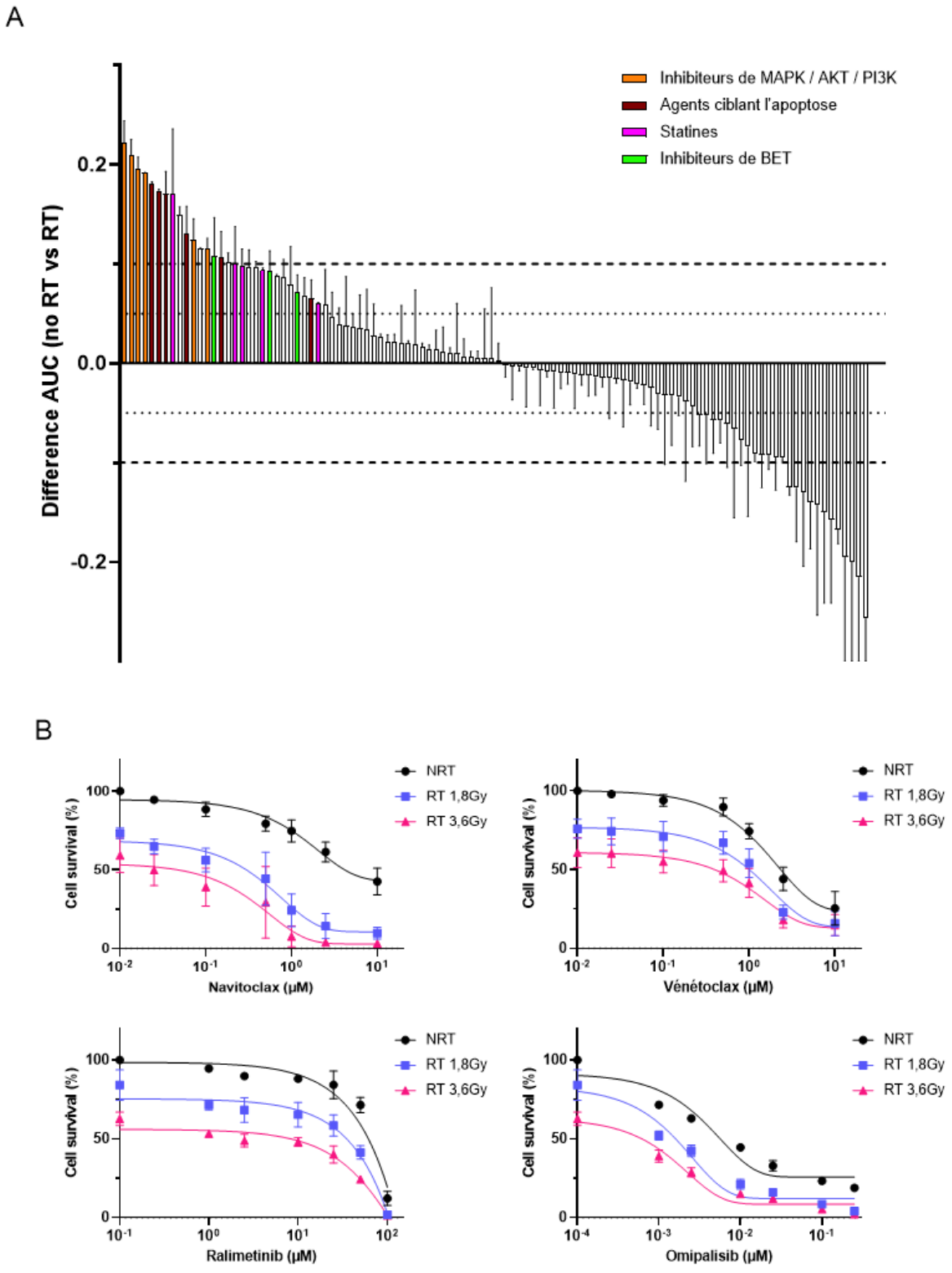


Figure 39 : Criblage de la librairie Hitch en association avec la radiothérapie (A) Waterfall plot représentant la différence de sensibilité des cellules HD-MB03 aux 110 agents de la bibliothèque HITCH en présence ou en absence de la radiothérapie (B) Courbes de cytotoxicité des cellules HD-MB03 représentant la survie cellulaire des HD-MB03, déterminé après 72 h de traitement par

radiothérapie (RT) à 1,8 et 3,6 Gy et Navitoclax, Venetoclax, Omipalisib et Ralimetinib, seuls ou en association.

Pour affiner ces résultats, une étape de validation a été nécessaire, reposant également sur une exposition concomitante des cellules aux rayonnements ionisants et à des concentrations croissantes des quatre anticancéreux choisis (Fig. 39B). Quelle que soit la dose de radiothérapie appliquée, les associations de traitements s'avèrent plus efficaces que les monothérapies, corroborant ainsi les observations initiales du criblage.

L'activation de la kinase PI3K dans les cellules cancéreuses est largement reconnue pour son action en faveur de la prolifération, la survie cellulaire et la réparation des dommages à l'ADN, contribuant ainsi à la radiorésistance [323]. Cibler cette voie pourrait donc restaurer la radiosensibilité des cellules traitées comme le montrent des études antérieures sur des cancers gastro-entéro-pancréatiques, de la prostate et de la tête et du cou [324–326], ainsi que nos résultats avec l'Omipalisib sur cellules de MB.
De plus, la radiothérapie conduit à la mort cellulaire par activation de plusieurs processus [327] dont l'activation de la voie apoptotique mitochondriale, due aux dommages à l'ADN induits par les radiations ionisantes. L'utilisation des inhibiteurs des membres anti-apoptotiques de la famille BCL2, tels que le Vénétoclax et le Navitoclax, pourraient soutenir le déclenchement du programme apoptotique et ainsi augmenter l'efficacité de la radiothérapie dans les cellules de MB. En accord avec cette hypothèse, des études ont démontré que le Vénétoclax réduisait la radiorésistance en stimulant l'induction de la mort cellulaire dans les lymphomes non hodgkinien [328] et les gliomes [329,330].

Dans l'espoir d'améliorer encore la pertinence clinique de nos modèles, il sera nécessaire à l'avenir *(i)* d'adapter le protocole de criblage aux conditions d'irradiations répétées (5 fois / semaine, comme explicité dans l'article précédent), *(ii)* d'utiliser des modèles tumoraux 3D (sphéroïdes ou organotypiques) et *(iii)* de suivre en temps réel la réponse au traitement pour optimiser encore la sélection des associations thérapeutiques. De façon complémentaire, les modèles de cellules de MB radio-résistantes développés ces dernières années [331,332], seront de précieux outils pour améliorer notre compréhension de l'efficacité des co-traitements choisis.

<u>Partie 4</u> : Autres travaux collaboratifs

Néosynthèse de candidats-médicaments efficaces dans les médulloblastomes

I. Avant-propos

Durant ma thèse, en marge de mon projet principal, j'ai eu l'opportunité de mettre à profit ma formation en synthèse organique (*cf.* article « Metal-Free Addition of Benzyl Halides to Aldehydes Using Super Electron Donors: Access to 3,4-Dihydroisocoumarins and 1,2-Diarylethanols » en annexe) en contribuant à deux études à l'interface chimie-biologie. Ces projets ont été réalisés en collaboration avec l'Institut de Chimie Radicalaire (ICR). Mon expertise dans le développement de modèles utilisés en onco-pharmacologie a ainsi été mobilisée pour tester de nouveaux candidats-médicaments synthétisés. La diversité et la flexibilité de nos modèles – depuis les cultures 2D jusqu'aux modèles organotypiques plus complexes – permettent ainsi de prédire l'efficacité et la toxicité des traitements, qu'il s'agisse de repositionnements de médicaments ou de molécules nouvellement synthétisées.

Face à des besoins thérapeutiques non couverts, le repositionnement de médicaments offre une solution pragmatique et rapide pour optimiser l'efficacité des traitements existants, tandis que la néo-synthèse permet de proposer de nouvelles options sur un horizon plus lointain. Ces deux approches se complètent donc parfaitement et augmentent les chances de développer des thérapies efficaces contre les cancers de mauvais pronostic, comme les tumeurs du SNC. La mise en évidence de vulnérabilités des cellules cancéreuses par l'étude de médicaments repositionnés pourrait d'ailleurs conduire à révéler des cibles exploitables dans le cadre de la conception de nouveaux médicaments. Les industries pharmaceutiques ne s'y trompent pas, puisque leurs pipelines contiennent de plus en plus des molécules synthétisées *de novo* et des médicaments repositionnés (ex : Thomson reuters, Anaxomics, GVK Bio, Camargo Pharmaceutical services).

Dans cette 4ème et dernière partie, l'utilisation d'une alcoxyamine comme agent anti-cancéreux a été explorée dans le traitement des tumeurs cérébrales agressives que sont les GB et les MB. Cette étude met en évidence ALK4 comme candidat-médicament potentiel, tout en ouvrant la voie à une approche innovante reposant sur la synthèse de bioconjugués destinés à être activés sélectivement dans l'environnement tumoral. À l'instar des alcoxyamines, la famille quinoxalines a également fait l'objet d'études d'activité dans des cellules de cancers intracrâniens. Ces molécules, connues pour leurs propriétés antivirales et antituberculeuses [333,334], ont révélé une activité anti-cancéreuse prometteuse, aboutissant au dépôt d'un brevet (Brevet EP23307268.5). Les données présentées ci-dessous se concentrent exclusivement sur les GB en raison du processus d'internationalisation de ce brevet en cours dans les tumeurs pédiatriques.

II. Résultats

- **Alcoxyamines**

Les alcoxyamines représentent une famille de petites molécules utilisées en chimie des polymères depuis plus de 40 ans, et qui trouve aujourd'hui de nouvelles applications dans différents domaines de la biologie. Dans l'article qui suit, nous proposons une nouvelle alcoxyamine (ALK4) en tant que candidat médicament anticancéreux. Nous montrons que son homolyse spontanée conduit à la libération de radicaux alkyles, déclenchant la génération d'espèces réactives de l'oxygène, la fragmentation du réseau mitochondrial et finalement l'apoptose. Afin de contrôler cette homolyse, ALK4 a également été bioconjuguée à un peptide sélectivement reconnu par les métalloprotéases matricielles présentes dans le microenvironnement tumoral.

Chemical Science

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

EDGE ARTICLE

View Article Online
View Journal | View Issue

Check for updates

Cite this: *Chem. Sci.*, 2023, **14**, 7988

All publication charges for this article have been paid for by the Royal Society of Chemistry

Open Access Article. Published on 29 June 2023. Downloaded on 10/20/2024 8:08:48 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

Conditional generation of free radicals by selective activation of alkoxyamines: towards more effective and less toxic targeting of brain tumors†

Patricia Piris, ‡[a] Duje Buric,‡[a] Toshihide Yamasaki, [b] Paul Huchedé,[c] Maïlys Rossi,[a] Mélanie Matteudi,[a] Marie-Pierre Montero, [a] Anne Rodallec,[a] Romain Appay,[d] Christine Roux,[a] Sébastien Combes,[ae] Eddy Pasquier,[a] Marie Castets,[c] Nicolas André,[af] Paul Brémond *[ae] and Manon Carré *[a]

Brain tumors are an important cause of suffering and death. Glioblastoma are the most frequent primary tumors of the central nervous system in adults. They are associated with a very poor prognosis, since only 10% of GBM patients survive 5 years after diagnosis. Medulloblastoma are the most frequent brain malignancies in childhood; they affect the cerebellum in children under 10 years of age in 75% of cases. The current multimodal treatment comes at the expense of serious and often long-lasting side effects. Herein, we propose the synthesis of a library of novel alkoxyamines as anticancer drug candidates. The most efficient molecule, ALK4, was selected based on its ability to inhibit both survival and migration of GBM and MB cells in 2D cultures and in 3D tumor spheroids. A fluorescent derivative was used to show the early cytosolic accumulation of ALK4 in tumor cells. Spontaneous homolysis of ALK4 led to the release of alkyl radicals, which triggered the generation of reactive oxygen species, fragmentation of the mitochondrial network and ultimately apoptosis. To control its homolytic process, the selected alkoxyamine was bioconjugated to a peptide selectively recognized by matrix metalloproteases. This bioconjugate, named ALK4-MMPp, successfully inhibited survival, proliferation, and invasion of GBM and MB tumor micromasses. We further developed innovative brain and cerebellum organotypic models to monitor treatment response over time. It confirmed that ALK4-MMPp significantly impaired tumor progression, while no significant damage was observed on normal brain tissue. Lastly, we showed that ALK4-MMPp was well-tolerated *in vivo* by zebrafish embryos. This study provides a new strategy to control the activation of alkoxyamines, and revealed the bioconjugate ALK4-MMPp bioconjugate as a good anticancer drug candidate.

Received 10th March 2023
Accepted 28th June 2023

DOI: 10.1039/d3sc01315d

rsc.li/chemical-science

Introduction

Alkoxyamines R^1–ONR^2R^3 are small molecules that can undergo homolysis to generate an alkyl radical $R^{1\bullet}$ and a nitroxide $R^2R^3NO^\bullet$. Based on this feature, alkoxyamines have various applications.[1] They have been widely used in polymer chemistry,[2] particularly as initiators and controls of nitroxide-mediated polymerization.[3] More recently, new strategies have been considered for using alkoxyamines in therapeutics. Alkoxyamines may represent novel theranostic agents since (i) the alkyl radical can trigger the cell death process in cancer cells and (ii) the nitroxide can be used to amplify the Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging (OMRI) signal[4,5] (Scheme 1).

We previously demonstrated the ability of the alkoxyamine 4-pyridin-(1-SG1)ethyl-*N*-methyl-1-ium to reduce the survival of melanoma cells, colon carcinoma cells, glioblastoma cells and leukemia cells.[4] We also showed that a series of imidazole-containing alkoxyamines, for which activation of homolysis was

[a]*Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Inserm UMR1068, CNRS UMR7258, Aix-Marseille Université UM105, Institut Paoli Calmettes – Faculté de Pharmacie, Marseille, France. E-mail: manon.carre@univ-amu.fr*

[b]*Institut de Chimie Radicalaire, CNRS UMR7273, Aix-Marseille Université – Faculté des Sciences, Marseille, France*

[c]*Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France*

[d]*Service D'anatomie Pathologique et de Neuropathologie, Hôpital de La Timone, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (APHM), Marseille, France*

[e]*DOSynth Platform, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Faculté de Pharmacie, Marseille, France*

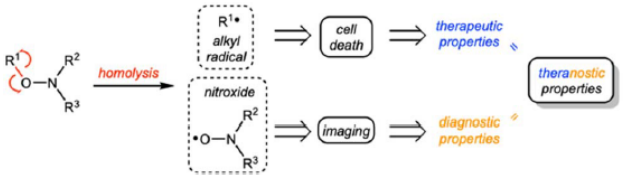
[f]*Service D'Hématologie & Oncologie Pédiatrique, Hôpital de La Timone, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (APHM), Marseille, France*

† Electronic supplementary information (ESI) available. CCDC 1413928 and 1413931. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: https://doi.org/10.1039/d3sc01315d

‡ Co-first authors.

© 2023 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry

Open Access Article. Published on 29 June 2023. Downloaded on 10/20/2024 8:08:48 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.



Scheme 1 General concept using alkoxyamines as theranostic agents.

conducted by protonation or methylation, exhibited proliferation inhibition properties in glioblastoma cells.[6] In addition, alkoxyamines are low molecular weight molecules whose charge, pK_a and log$D_{7.4}$ values can be modulated to regulate their passage across biological membranes.[7] This family of molecules may thus represent a new therapeutic option of choice.

This strategy of using alkoxyamines as anticancer agents could hold promise for the management of brain tumors, which are a major cause of suffering and death. Glioblastomas (GBM) are the leading example, accounting for 50% of all malignant tumors of the central nervous system in adults.[8,9] Standard treatment for newly diagnosed GBM involves surgical resection, followed by radiation therapy and chemotherapy.[10] However, despite this aggressive multimodal treatment, the median survival time is only 15 months and almost all GBMs relapse within or near the initial disease site.[11,12] Medulloblastomas (MB), embryonal tumors of the cerebellum, are the most common malignant brain tumors in childhood. With current multimodal therapy, long-term survival is now achieved in 60–75% of patients,[13] but it comes at the cost of serious side effects that considerably alter the quality of life of children in the long-term.[14] Thus, the common challenge of using alkoxyamines in these intracranial tumors is to maximize the inhibition of cancer cell proliferation and invasion while minimizing deleterious side effects.

In the present work, we synthesized a library of alkoxyamines, among which ALK4 was highlighted as the most effective against human GBM and MB cell lines in 2D culture as well as in 3D tumor spheroids. Fluorescent analogues showed that ALK4 rapidly accumulates in tumor cells and triggers apoptotic cell death mediated by endogenous oxidative stress. The activation of the homolysis was controlled by bioconjugating ALK4 to a short peptide selectively recognized by matrix metalloproteinases (MMPs), which are overexpressed in the tumor microenvironment.[15] Real-time follow-up of tumor progression in innovative brain and cerebellum organotypic models confirmed the benefits of the bioconjugate in inhibiting GBM and MB cell survival and invasion without altering the healthy tissue. Finally, the safety of this bioconjugate *in vivo* was shown in a zebrafish model, further strengthening the interest of this molecule in the future treatment of GBM and MB.

Results and discussion

Synthesis and characterization of new alkoxyamines

To generate the library of alkoxyamines, copper-catalyzed coupling of SG1 nitroxide (*N*-(2-methylpropyl)-*N*-(1-diethylphosphono-2,2-dimethylpropyl)-*N*-oxyl) and of benzylic bromide derivatives was performed to obtain thirteen alkoxyamines

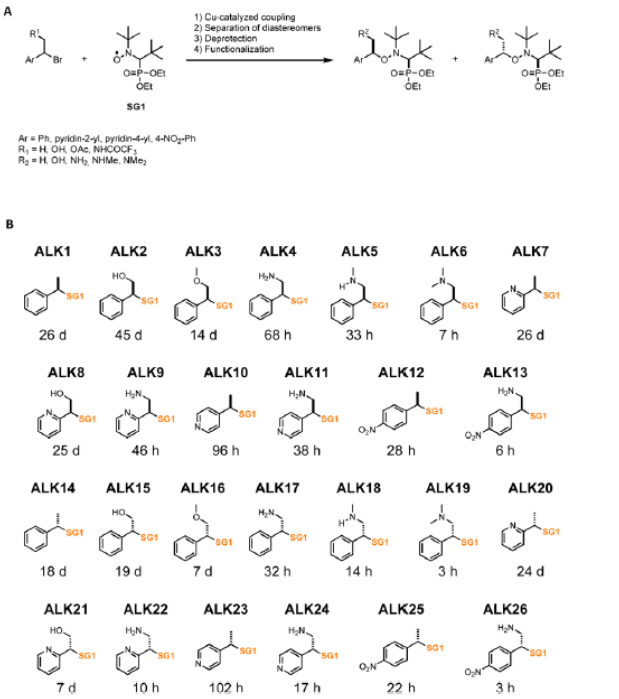


Fig. 1 Library of alkoxyamines. (A) Synthesis of alkoxyamines. (B) Name, structure and estimated half-life time of homolysis at 37 °C of the 26 alkoxyamines investigated in this work.

(Fig. 1A). The diastereoisomers were then separated by column chromatography to obtain pure and diastereoisomerically homogeneous compounds (Fig. 1B). When a protecting group was required, the trifluoroacetamide was preferred, as the deprotection step must be carried out in mild and non-acidic conditions to avoid potential undesired homolysis activated by protonation, which would have considerably altered yields. Therefore, each diastereoisomer were independently hydrolyzed in basic conditions to give deprotected alkoxyamines. We obtained a library of 26 molecules, all based on the same SG1 nitroxide but owning diverse alkyl parts, with aromatic rings (phenyl, 4-nitrophenyl, pyridin-2-yl, pyridin-4-yl) and functionalized methyl groups (Fig. 1B).

These compounds were characterized by NMR (^{1}H, ^{13}C, ^{31}P) and HRMS to ascertain their chemical structures. They were classified depending on their stereochemistry, ALK14 to ALK26 being the diastereoisomer counterparts of ALK1 to ALK13.

We characterized the kinetics of all alkoxyamines in water using EPR or HPLC. Homolysis rates (k_d) were determined, and the corresponding energies of activation (E_a) were calculated using Arrhenius equation and the averaged pre-exponential factor $A = 2.4 \times 10^{14}$ s^{-1} to obtain half-life times ($t_{1/2}$) values at 37 °C for each alkoxyamine (Fig. 1B).

Selection of the most effective alkoxyamines in inhibiting proliferation and migration of brain tumor cells

To evaluate the biological activity of the newly synthesized alkoxyamines, cytotoxicity assays were realized in the human U251-MG and U87-MG cells. ALK7 and ALK20 were excluded

Open Access Article. Published on 29 June 2023. Downloaded on 10/20/2024 8:08:48 PM. This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

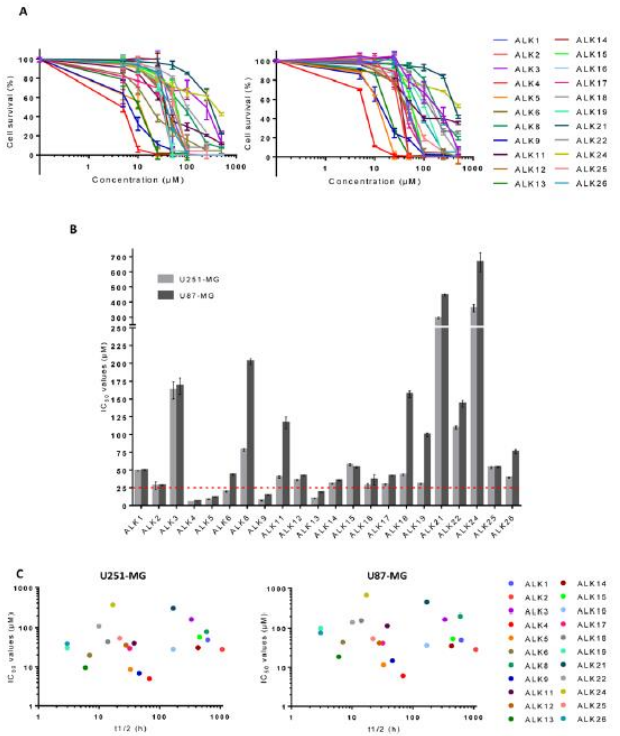


Fig. 2 Cytotoxicity assay of alkoxyamines in U87-MG and U251-MG cells in 2D culture. (A) Survival of U251-MG and U87-MG cells measured by MTT-assay in 2D-cultures, 72 h after treatment with alkoxyamines. (B) IC_{50} values of alkoxyamines measured by MTT-assay in U87-MG and U251-MG cells. Values are the average of at least three independent experiments Â± sem. (C) Correlation between IC_{50} values and half-life time of homolysis at 37 °C of the alkoxyamines.

because of their low aqueous solubility. All other alkoxyamines exerted a dose-dependent inhibition of cell survival in both GBM cell lines after 72 hours of treatment (Fig. 2A). However, the determination of IC_{50} values – *i.e.*, concentrations that reduce cell survival by 50% – showed significant variations, ranging from 5.0 ± 0.1 μM to 360 ± 42 μM in U251-MG and from 6.1 ± 0.1 μM to 664 ± 109 μM in U87-MG (Fig. 2B). It should be noted that the biological activity of these new alkoxyamines was not correlated to their half-time life, as we previously suggested for other alkoxyamines.[16] For instance, ALK9 whose homolysis process is 4.6 times slower than that of its diastereoisomer ALK22 ($t_{1/2}$ of 46 h and 10 h, respectively) is 10 times more active in U87-MG cells (IC_{50} of 14.5 ± 0.9 μM and 143.2 ± 8.5 μM, respectively) (Fig. 2C).

ALK4, ALK5, ALK9 and ALK13 were the most effective, with IC_{50} values below 25 μM in both cell lines (dotted line in Fig. 2B). ALK4 was identified as the most effective in inhibiting U251-MG and U87-MG cell survival, with IC_{50} of 5.0 ± 0.1 μM and 6.1 ± 0.1 μM, respectively (Fig. 2B). The enantiomers of ALK4 were obtained after separation on preparative chiral HPLC. The two enantiomers of ALK4 were tested towards U87-MG and U251-MG cells. No difference in activity was observed between (*RS*)-ALK4 and (*SR*)-ALK4 – IC_{50} of 9 and 7 μM in U87-MG ($p > 0.05$, data not shown) – so the study was continued using the racemic mixture of ALK4.

To determine whether ALK4 was effective in MB cells, we measured its cytotoxic capabilities in ONS-76, HDMB-03 and UW228-2 cell lines. Our data showed that ALK4 was also efficient against the three human MB cell lines, with IC_{50} of 16.5 ± 0.7 μM, 16.3 ± 2.2 μM and 15.2 ± 1.6 μM, respectively (Fig. S1A†).

Overall, ALK4, ALK5, ALK9 and ALK13 were significantly more active in tumor cells than any alkoxyamine previously reported in the literature. We previously demonstrated the ability of an alkoxyamine, 4-pyridin-(1-SG1)ethyl-*N*-methyl-1-ium, to reduce the survival of U87-MG cell cultures.[3] However, this first molecule required concentrations 50 times higher than ALK4 in the same cell model. Likewise, a series of imidazole-containing alkoxyamines exhibited less cytotoxic activity against glioblastoma cell lines.[5] More recently, Seren S. *et al.* reported a new series of alkoxyamines, based on phenol or aniline cores, that also inhibited U87-MG cell survival but with IC_{50} values 25 times higher than ALK4 in the same cell model.[16]

To further investigate ALK4, ALK5, ALK9 and ALK13 anticancer properties, a Transwell assay was carried out. It showed that the alkoxyamines were also effective in inhibiting GBM cell

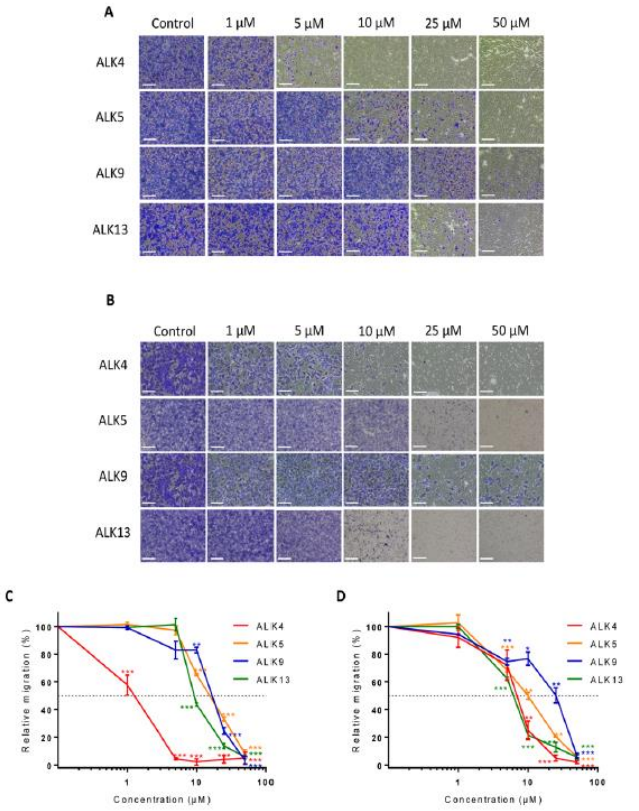


Fig. 3 Impact of ALK4, ALK5, ALK9 and ALK13 on the migration potential of U87-MG and U251-MG cells after 12 hours of treatment. Representative pictures of migrated (A) U87-MG and (B) U251-MG cells without treatment and after 12 hours of treatment with ALK4, ALK5, ALK9 and ALK13. Scale bar = 150 μm. Quantification of the anti-migratory effect of ALK4, ALK5, ALK9 and ALK13 in (C) U87-MG and (D) U251-MG cells. Results are expressed as a relative percentage of migrated cells after 12 hours of treatment *versus* migrated cells non-exposed to treatment. Values are the average of at least three independent experiments Â± sem. *$p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ***$p < 0.001$.

© 2023 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry

Open Access Article. Published on 29 June 2023. Downloaded on 10/20/2024 8:08:48 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

migration at low doses (Fig. 3A and B). The results support a superior activity of ALK4, which was able to completely suppress the migratory capacities of U87-MG and U251-MG cells from 5 and 25 μM, respectively (Fig. 3C and D). Thus, the four alkoxyamines revealed by these selection steps show both anti-proliferative and anti-migratory potential in brain tumor cells, making these compounds good candidates for further investigation.

ALK4 is highly active in GBM and MB tumor spheroids

Multicellular spheroids are 3D structures that are more relevant than cell monolayers to study growth and drug response of tumor masses. We exposed spheroids of DsRed-expressing GBM cells to ALK4, ALK5, ALK9 and ALK13. Fluorescence monitoring showed that each of the molecules reduced GBM spheroid growth over time in a concentration-dependent manner (Fig. 4 and S1†). ALK4 was the most active in both 3D models combined. After four days of treatment, it decreased by 55 ± 5% and 77 ± 3% the growth of U251-MG spheroids at 5 μM and 10 μM, respectively (Fig. 4A–C). The same ranking of the molecules was obtained when evaluated in U87-MG spheroids, with a decrease of growth by 56 ± 3% and

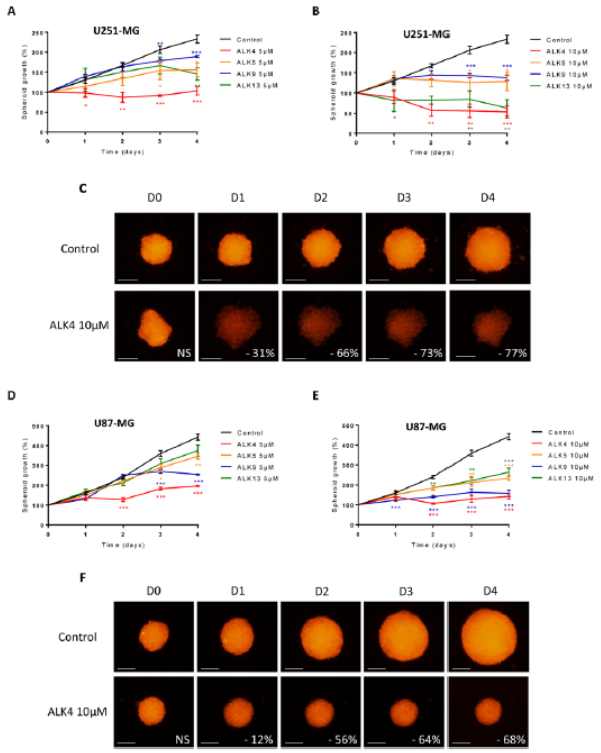


Fig. 4 Evaluation of the efficacy of ALK4, ALK5, ALK9 and ALK13 at 10 μm in U251-MG and U87-MG GBM spheroids. Monitoring of the growth of U251-MG spheroids (A and B) and U87-MG spheroids (D and E) by fluorescence quantification for 4 days after treatment with ALK4, ALK5, ALK9 and ALK13 at 5 μm and 10 μm. treatment efficacy was expressed as a percentage of spheroid growth inhibition *vs.* control spheroids. Values are the average of at least three independent experiments Â± sem. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. Representative pictures over time of (C) U251-MG and (F) U87-MG spheroids non-treated or exposed to ALK4 at 10 μm. Images were obtained by fluorescence microscopy (λ_{ex} 580 nm/λ_{em} 620 nm). Scale bar = 250 μm.

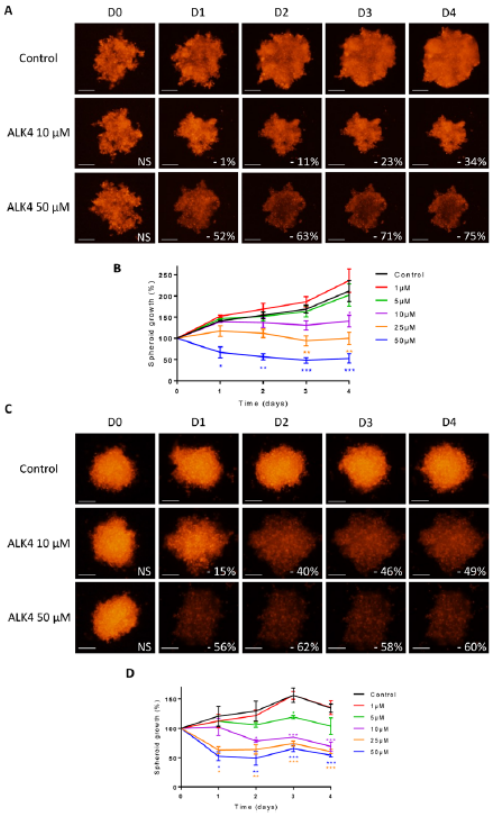


Fig. 5 Evaluation of the efficacy of ALK4 in MB spheroids. Representative pictures over time of (A) HD-MB03 and (C) ONS-76 spheroids non-treated or exposed to ALK4 at 10 μm and 50 μm. Images were obtained by fluorescence microscopy (λ_{ex} 580 nm/λ_{em} 620 nm). Scale bar = 250 μm. Monitoring of the growth of (B) HDMB-03 and (D) ONS-76 spheroids by fluorescence quantification for 4 days after treatment with ALK4 at growing concentrations. Treatment efficacy was expressed as a percentage of spheroid growth inhibition *vs.* control spheroids. Values are the average of at least three independent experiments Â± sem. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

68 ± 5% at day 4 for 5 μM and 10 μM, respectively (Fig. 4D–F). The exposure of the two GBM spheroid models to 1, 25 and 50 μM of ALK4 further confirmed that it is the most effective alkoxyamine in GBM tumor micromasses (Fig. S1B–D†).

The efficacy of ALK4 was then tested in MB 3D micromasses. HD-MB03 and ONS-76 spheroid growth were stably suppressed overtime from 10 μM of ALK4 (Fig. 5A–D), validating in these two MB spheroid models that ALK4 is highly active in brain tumor micromasses.

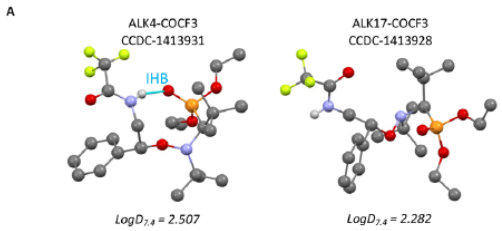
Until now, a few studies had revealed the anticancer potential of alkoxyamines in 2D cell cultures. Here, the use of 3D spheroids that recapitulate tumor architecture and biological characteristics has highlighted the superior anti-tumor activity of ALK4, which will be the focus of subsequent investigations.

ALK4 can pass through the plasma membrane thanks to its globular shape

While the efficacy of the alkoxyamines in tumor cells is not correlated with their respective half-life time (Fig. 2C), the most active alkoxyamines exhibit the same stereochemistry, rather

© 2023 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry

Open Access Article. Published on 29 June 2023. Downloaded on 10/20/2024 8:08:48 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.



B

Molecule	IHB	U251-MG IC_{50} (μM)	U251-MG Change in IC_{50}	U87-MG IC_{50} (μM)	U87-MG Change in IC_{50}
ALK4	Yes	5.0 +/- 0.1	5.9	6.1 +/- 0.1	6.9
ALK17	No	29.5 +/- 5.9		41.8 +/- 1.3	
ALK5	Yes	8.6 +/- 0.8	5.0	11.5 +/- 0.3	13.6
ALK18	No	43.4 +/- 2.4		156.8 +/- 9.0	
ALK9	Yes	6.9 +/- 0.5	15.9	14.5 +/- 0.9	9.9
ALK22	No	109.5 +/- 4.0		143.2 +/- 8.5	
ALK13	Yes	9.6 +/- 0.5	4.1	18.6 +/- 0.4	4.1
ALK26	No	39.1 +/- 1.1		75.6 +/- 4.8	
ALK8	Yes	78.4 +/- 2.9	3.8	202.2 +/- 7.5	2.2
ALK21	No	294.2 +/- 11.9		445.9 +/- 14.9	

Fig. 6 Comparison of activity between couple of diastereoisomers. (A) Structures of ALK4-COCF3 and ALK17-COCF3 obtained after X-ray crystallography, and their $logD_{7.4}$ (shake-flask method). (B) Table of IC_{50} values of alcoxyamines and ratio in IC_{50} values between diastereoisomers. IHB = intramolecular hydrogen bond.

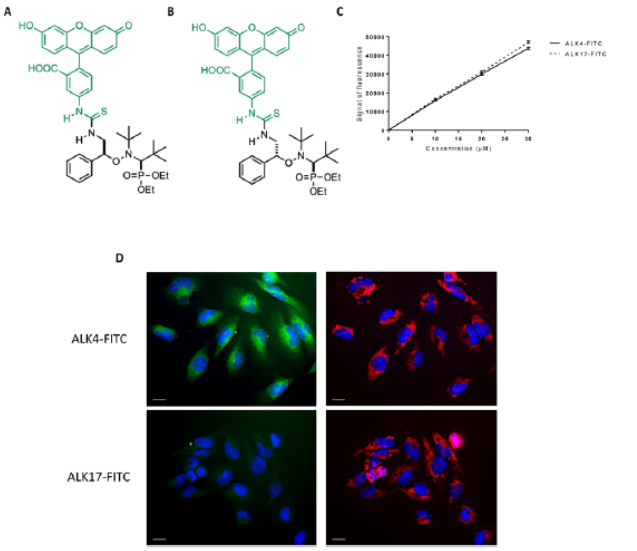


Fig. 7 Study of the intracellular incorporation of ALK4 in GBM cells. Structure of (A) ALK4-FITC and (B) ALK17-FITC. (C) Fluorescence calibration range of ALK4-FITC and ALK17-FITC measured by spectrofluorimetry (PHERAstar, λ_{ex} 495 nm/λ_{em} 519 nm). (D) Pictures of U251-MG cells observed by fluorescence microscopy (40X objective) after 2 hours of treatment with ALK4-FITC and ALK17-FITC at 15 μm. Left panel: nuclear staining by DAPI (λ_{ex} 340 nm/λ_{em} 450 nm) and ALK4-FITC analysis within cells (λ_{ex} 495 nm/λ_{em} 519 nm). Right panel: nuclear staining by DAPI (λ_{ex} 340 nm/λ_{em} 450 nm) and mitochondrial network analysis by using mtDsRed fluorescence (λ_{ex} 580 nm/λ_{em} 620 nm). Scale bar = 50 μm.

suggesting a stereochemical advantage. Indeed, single-crystal X-ray diffraction of the trifluoroacetamide of ALK4 revealed that it has a globular shape, while the trifluoroacetamide of its diastereomer ALK17 has an open shape (Fig. 6A). The globular conformation is likely to be due to the existence of an intramolecular hydrogen bond (IHB) between the NH and the P=O groups, thus locking the conformation of the alkoxyamine. Moreover, ^{31}P NMR spectroscopy showed significant differences in chemical shifts between ALK4 and ALK17 (see ESI†). Noteworthy, the IHB can also exist in the other three alkoxyamines of interest – ALK5, ALK9 and ALK13 – *versus* their corresponding diastereoisomers – ALK18, ALK22, ALK26 – as they all have the required stereochemistry and the required amine function (Fig. 6B). Thus, a globular shape induced by the presence of an IHB may result in alkoxyamines with increased cytotoxic properties, while an open shape may result in a significant loss of activity. This was illustrated, for example, by the 6- and 7-fold higher IC_{50} values of ALK17 compared with ALK4 in U251-MG and U87-MG cells, respectively (Fig. 6B). In support of the link between the stereochemistry and activity of the molecules, we previously reported an IHB by X-ray and ^{31}P NMR in ALK8,[17] the latter being also more cytotoxic than its diastereoisomer ALK21 in GBM cells (Fig. 6B).

To better understand how the globular form of ALK4 can result in an improved activity, we synthesized fluorescent derivatives of ALK4 and ALK17 by coupling the alkoxyamines with FITC (Fig. 7A and B). We first checked that the two FITC-derivatives emitted equal fluorescence signal intensity in cell culture medium (Fig. 7C). By fluorescence microscopy, we then observed the intracellular accumulation of ALK4-FITC in U251-MG cells expressing mitochondrial DsRed (mtDsRed), already 2 hours after treatment initiation (Fig. 7D). Thanks to DAPI staining of nuclei and mtDsRed labeling of mitochondria, we could observe that ALK4-FITC accumulates within the cytoplasm. In contrast, no fluorescence was observed in the GBM cells exposed to ALK17-FITC. The ability of ALK4 to penetrate cells and exert its activity is therefore linked to its globular form.

While the half-life is not a direct predictive factor of the cytotoxic potential of the alkoxyamines, the structure–activity relationship seems to be based mainly on their 3D structure. Thus, if the substituent linked to SG1 (such as NH2 or OH) leads to the formation of an IHB, it is very likely that the alkoxyamine will be able to cross biological membranes and therefore be active. This may explain why alkoxyamines in which the formation of the IHB is prevented, by elimination of the heteroatom or introduction of OMe for example, are low-activity molecules.

Alkyl radicals are responsible for ALK4-mediated oxidative stress and apoptosis of tumor cells

Since alkoxyamine homolysis leads to the release of a nitroxyl radical and an alkyl radical, we evaluated their relative roles in ALK4 activity on brain cancer cells. We first showed that the nitroxide SG1 did not significantly reduce U251-MG and U87-MG cell survival after 72 hours of treatment, even at high concentrations (Fig. 8A and S2A†). The same conclusion was

© 2023 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry

Open Access Article. Published on 29 June 2023. Downloaded on 10/20/2024 8:08:48 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

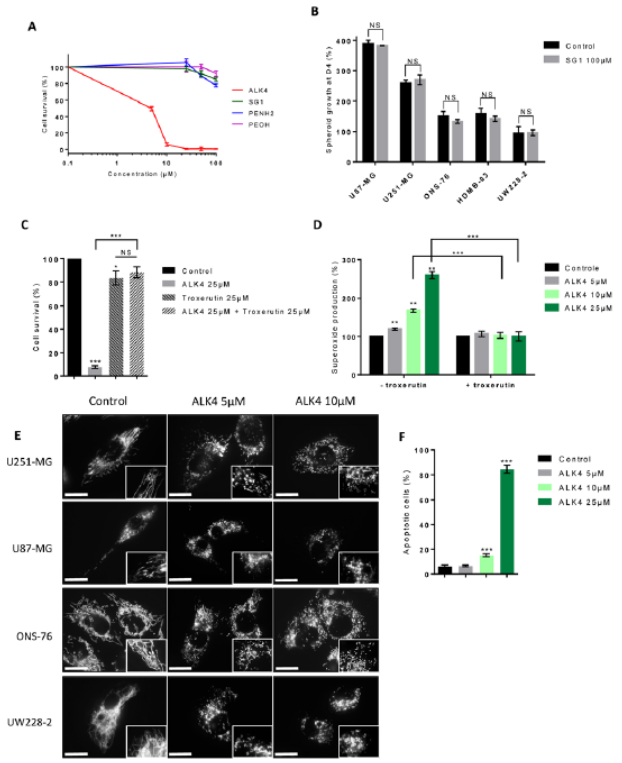


Fig. 8 Study of the mechanism of action of ALK4. (A) Cell survival measured by MTT-assay after 72 hours of treatment with ALK4, its nitroxide SG1 and its alkyl radical on inactive forms PEA and PEA-OH, in 2D-culture of U251-MG cells. (B) Measurement of glioblastoma and medulloblastoma spheroid growth 4 days after treatment with SG1 at 100 µm compared to control spheroid growth. (C) Survival of U251-MG cells co-exposed to ALK4 and the alkyl scavenger troxerutin (72 hours) in 2D-culture. (D) Superoxide production in 2D-cultures of U251-MG cells upon treatment with ALK4 alone and in combination with troxerutin at 25 µm for 6 hours. (E) Mitochondrial network of U87-MG, U251-MG, ONS-76 and UW228-2 cells observed by fluorescence microscopy (40X objective, mtDsRed fluorescence, λ_{ex} 580 nm/λ_{em} 620 nm) 6 hours after treatment with 5 µm and 10 µm of ALK4. (F) Measurement of apoptosis induction in U251-MG cells after a 48 hours-treatment with ALK4. Scale bar = 50 µm. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$.

obtained using two models of GBM spheroids and three models of MB spheroids exposed to SG1 (Fig. 8B), confirming that the alkoxyamine activity was not due to the nitroxide radical.

Then, to determine whether the alkyl radical of ALK4 was responsible of its cytotoxic effect, we used troxerutin, a flavonoid that acts as an alkyl radical scavenger. Troxerutin neutralized the effects of ALK4 (25 µM), inhibiting its impact on U251-MG and U87-MG cells by more than 80% (Fig. 8C and S2B†). This confirmed that, like most alkoxyamines, ALK4 is active in tumor cells *via* the release of alkyl radicals. In addition, we tested the alkyl part in two non-radical forms: a reduced form phenethylamine (PEA) and an oxidized form DL-β-hydroxyphenethylamine (PEA-OH). Both compounds showed low efficacy compared to ALK4, with IC_{50} values of 287 µM and 282 µM for for PEA and PEA-OH in U251-MG cells, respectively (Fig. 8A). Similar results were obtained in U87-MG cells (Fig. S2A†). Thus, the efficacy of ALK4 in the brain cancer cells results specifically from the alkyl moiety in its radical form.

Analysis of reactive oxygen species (ROS) levels with the WST1 probe further showed that ALK4 induced a dose-dependent overproduction of endogenous superoxides in cells after 6 hours of treatment (Fig. 8D and S2C†). This effect was counteracted by troxerutin, indicating that alkyl radicals from ALK4 homolysis are responsible for the induction of an oxidative stress in GBM cells.

High levels of ROS in cells can induce oxidative stress and lead to cell death by fragmentation xcxof the mitochondrial network and activation of the intrinsic mitochondrial pathway of apoptosis.[18,19] Accordingly, a fragmentation of the mitochondrial network was shown by fluorescent microscopy in GBM and MB cells after 6 hours of treatment with ALK4 (Fig. 8E).

While the target(s) of the alkyl radicals has not yet been identified, the WST-1 assay used here is specific for the production of superoxide anions by the mitochondrial respiratory chain, which strongly suggests that the alkyl radicals released by the alkoxyamines probably affect oxidative phosphorylation first. The fragmentation of the mitochondrial network a few hours after the start of treatment supports the hypothesis of early targeting of mitochondria and also suggests that the membranes of these organelles are affected by their own production of ROS.

Lastly, cell labelling with annexin V-FITC showed that tumor cell death occurs by induction of the apoptotic program following treatment with ALK4 (Fig. 8F and S2D†).

Bioconjugation of ALK4 with an MMP-targeted peptide controls its cytotoxic activity

Our strategy was then to control homolysis of the alkoxyamine by conjugation to a peptide specifically recognized by matrix metalloproteinases (MMPs), which are overexpressed by tumor cells *in vivo*.[14] Therefore, bioconjugation of ALK4 was conducted in order to control the release of its radical (Scheme 2).

The tripeptide Ac-Pro-Leu-Gly (Ac-PLG), referred as MMPp, is a well-known sequence recognised and cleaved by MMP enzymes.[20] The bioconjugate ALK4-MMPp was therefore synthesized (Fig. 9A). ALK4 was also bioconjugated to the peptide Suc-Ala-Ala-Pro-Phe (Suc-AAPF, referred as CHYMOp), specifically cleaved by chymotrypsin, an enzyme that is not expressed in GBM and MB microenvironment. The resulting bioconjugate ALK4-CHYMOp was used as a negative control (Fig. 9A).

Our data showed a significant loss of cytotoxicity of ALK4 when conjugated to CHYMOp peptide in two GBM spheroid



Scheme 2 Use of the MMPs to control the release of the alkoxyamines.

Open Access Article. Published on 29 June 2023. Downloaded on 10/20/2024 8:08:48 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

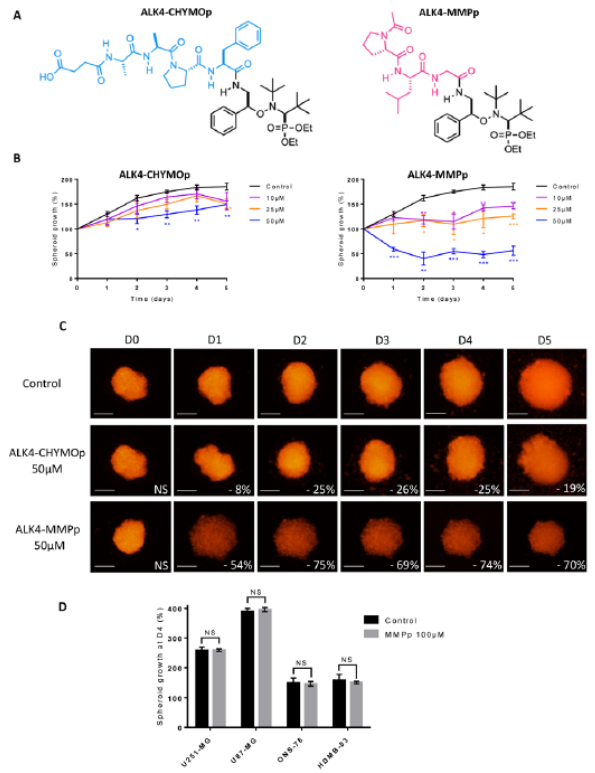


Fig. 9 Evaluation of the efficacy of the bioconjugates ALK4-CHYMOp and ALK4-MMPp in GBM spheroids. (A) Structure of the bioconjugates ALK4-CHYMOp and ALK4-MMPp. (B) Monitoring of the growth of U251-MG spheroids by fluorescence quantification for 4 days after treatment with ALK4-CHYMOp and with ALK-MMPp. Treatment efficacy was expressed as a percentage of spheroid growth inhibition *vs.* control spheroids. Values are the average of at least three independent experiments Å± sem. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. (C) Representative pictures over time of U251-MG spheroids non-treated or exposed to 50 µm of ALK4-CHYMOp and ALK4-MMPp. Images were obtained by fluorescence microscopy (λ_{ex} 580 nm/λ_{em} 620 nm). Scale bar = 250 µm. (D) Measurement of GBM and MB spheroid growth 4 days after treatment with MMPp peptide (100 µm) compared to control spheroid growth.

models and two MB spheroid models (Fig. 9B, C and S3A–D†), confirming that the bioconjugation with the peptide inactivates the alkoxyamine. More importantly, we showed that the treatment with the bioconjugate ALK4-MMPp induced a dose-dependent reduction in U251-MG spheroids growth (Fig. 9B and C). Similar results were obtained in U87-MG, ONS-76 and HD-MB03 spheroid models (Fig. S3A–D†). The peptide was not cytotoxic when used alone (Fig. 9D), thus confirming that only the alkoxyamine, once released from the bioconjugate, has an activity towards GBM and MB cells after its spontaneous homolysis.

This strategy of coupling alkoxyamines to a peptide to design prodrugs of interest is not limited to the targeting of MMPs and could be adapted to other enzymes overexpressed in the tumor microenvironment. It has been very recently shown that anilide- and phenol-alkoxyamines conjugated to the quadripeptide Ala-Ala-Pro-Val also released radicals upon activation by the human-neutrophil elastase.[15] Although the efficacy of these bioconjugates on 2D cultures of U87-MG cells was found to be 25-fold lower than the one proposed here, this work helps to pave the way for future discoveries on the unexplored potential of alkoxyamines.

The bioconjugate ALK4-MMPp significantly reduces tumor progression and does not induce damages to healthy brain tissues in organotypic models

To evaluate the potential of ALK4-MMPp in even more biologically-relevant conditions, we developed organotypic cultures in which GBM and MB spheroids stably expressing the fluorescent protein DsRed were grafted onto slices of mouse brain and cerebellum, respectively.

The presence of tumor masses induced a 3.1-fold overproduction of MMPs compared with healthy tissue (Fig. S4A†). These innovative co-cultures were exposed to ALK4-MMPp two times a week and tumor progression was analyzed over time.

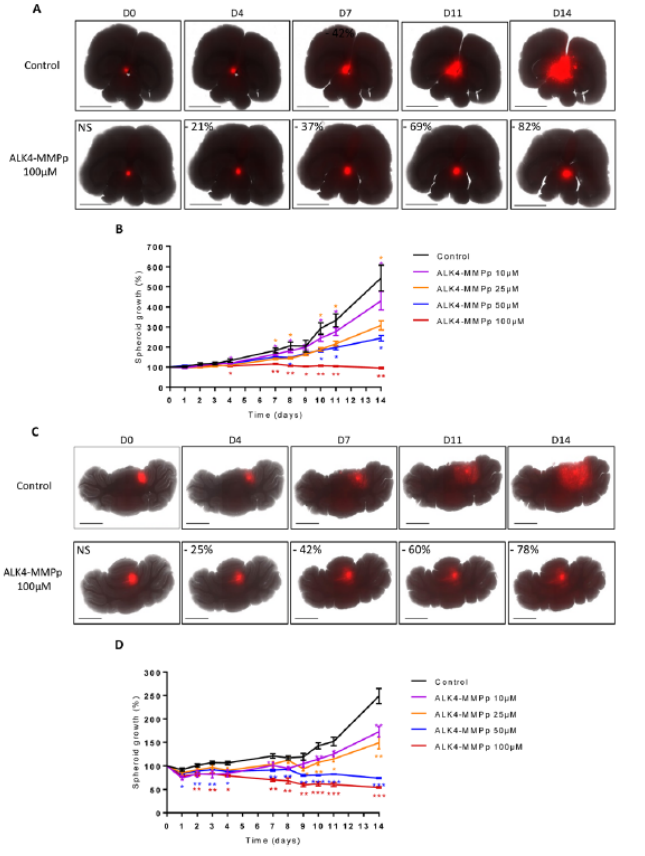


Fig. 10 Evaluation of the bioconjugate ALK4-MMPp in GBM and MB organotypic models. Representative pictures over 14 days of (A) U251-MG and (C) ONS-76 organotypic models non-treated or exposed to 100 µm of ALK4-MMPp (treatment at D0, D4, D7 and D10). Images were obtained using the JuLi™Stage live imaging system (λ_{ex} 580 nm/λ_{em} 620 nm, stitching mode 5 × 6). Scale bar = 2500 µm. Monitoring of the growth of (B) U251-MG and (D) ONS-76 spheroids in organotypic brain and cerebellar models by fluorescence quantification for 14 days after treatment with ALK4-MMPp. Values are the average of at least three independent experiments Å± sem. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$.

© 2023 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry

Open Access Article. Published on 29 June 2023. Downloaded on 10/20/2024 8:08:48 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

Our data showed that the bioconjugate reduced the progression of U251-MG tumor masses in a time and concentration-dependent manner (Fig. 10A and B). For instance, 25 μM of ALK4-MMPp reduced the growth of GBM masses in organotypic models by 23 ± 3% and 43 ± 3% after 7 days and 14 days respectively ($p < 0.05$). The benefits of ALK4-MMPp were confirmed in organotypic cerebellar models transplanted with ONS-76 tumor masses, with a significant inhibition of MB cell proliferation and invasion over time (Fig. 10C and D). Conversely, the ALK4-CHYMOp bioconjugate did not induce any reduction in tumor mass in this *ex vivo* model (Fig. S4B†), confirming that MMPs are required to regulate ALK4 homolysis and thus control its activation.

After completion of the experiment, organotypic cultures were fixed, sectioned, and subjected to HES staining (Fig. 11A). Microscopic analysis of this staining showed that ALK4-MMPp (even at 100 μM) did not induce histological damage in non-tumor brain tissue, including the periphery of the GBM mass. Moreover, the γH2AX staining of the organotypic models showed that the bioconjugate also did not induce DNA damage in non-tumor brain tissue either (Fig. 11A). Cells within the tumor mass exposed to ALK4-MMPp presented a highest degree of DNA damage, as evidenced by γH2AX staining (Fig. 11A-inset), which is consistent with the induction of the oxidative stress by the treatment.[21] This indicates that the treatment is effective in significantly reducing tumor masses without inducing additional damage to the brain.

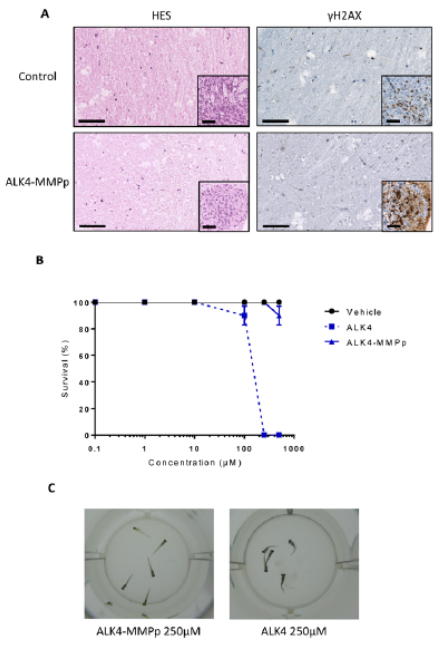


Fig. 11 Analysis of the toxicity of ALK4 and ALK4-MMPp. (A) HES staining and γH2AX immunostaining of U251-MG organotypic model after 14 days of treatment with the bioconjugate ALK4-MMPp. Scale bar = 100 μm. (B) Study of toxicity of ALK4 and ALK4-MMPp in zebrafish, 5 fishes per well. Values are the average of at least three independent experiments Å± sem. (C) Representative pictures of live (left) and dead (right) zebrafishes.

ALK4-MMPp is well-tolerated by zebrafish embryos *in vivo*

Zebrafish embryos can be employed as a powerful tool to assess toxicity of new pharmaceutical compounds *in vivo*.[22] After being exposed to ALK4 or ALK4-MMPp, from 0.1 to 500 μM for 72 h, surviving zebrafish embryos were counted. Our data show that ALK4 did not significantly impact their survival up to 100 μM, but that the molecule is uniformly lethal at higher concentrations (Fig. 11B and C). In contrast, ALK4-MMPp is not lethal to zebrafish embryos over the entire dose range tested ($p > 0.05$; Fig. 11B). Overall, our results indicate that the ALK4-MMPp bioconjugate is a well-tolerated new compound with anti-tumor activity.

Conclusions

Alkoxyamines have been widely used in polymer chemistry[2] but have only revealed their cytotoxic potential in the last decade. These molecules remained to be optimized, both to improve their efficacy in tumor cells, but also to control their activation in order to limit their side effects. In this study, we designed and characterized a panel of new alkoxyamines, and selected ALK4 as the molecule with the highest activity against GBM and MB cells and spheroids. Due to its globular shape, ALK4 can accumulate in tumor cells and efficiently trigger apoptosis in a ROS-dependent manner. By conjugating the alkoxyamine to a tripeptide selectively recognized by MMP enzymes, we were able to control its activity. The ALK4-MMPp bioconjugate inhibits the progression of GBM and MB tumor masses over time, without inducing damage to non-tumor tissue. Moreover, it is well tolerated by zebrafish embryos, even at high concentrations. Overall, we have highlighted a new alkoxyamine which, as a bioconjugate, has attractive anti-cancer properties. Our approach at the chemistry–biology interface thus paves the way for the development of future alkoxyamines with potential clinical applications.

Experimental section

Synthesis

All details regarding the synthesis of alkoxyamines are described in the ESI.†

Cell culture

The U87-MG and U251-MG human glioblastoma cancer cell lines were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). They were cultured in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum (FBS) and 100 μg mL^{-1} of penicillin–streptomycin (PS). The human MB cell lines HD-MB03 were kindly provided by Sonia Martial and Gilles Pagès from the Institute for Research on Cancer and Aging (Nice, France). The human ONS-76 and UW228-2 cell lines were kindly provided by Janet Lindsey and Steven Clifford from the Wolfson Childhood Cancer Research Center (New Castle, UK). ONS-76 cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), supplemented with 10% of FBS and 100 μg mL^{-1} of PS. HD-MB03 cells were maintained in RPMI medium supplemented with 10% of FBS, 100

Open Access Article. Published on 29 June 2023. Downloaded on 10/20/2024 8:08:48 PM. This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

μg mL^{-1} of PS and with 1% of non-essential amino acids. UW228-2 cells were maintained in DMEM/F12 medium supplemented with 10% of FBS and 100 μg mL^{-1}. All the cells were maintained at 37 °C and 5% CO_2.

A mtDsRed plasmid has been transfected in each cell line using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, ref. 11668019) following the manufacturer's protocol. Stable transfectants were obtained after Geneticin selection (0.8 mg mL^{-1}, Gibco, ref. 10131035) and two cycles of fluorescence-activated cell sorting (FACS).

All the cells were tested for the absence of mycoplasma contamination (MycoAlertTM, Lonza) at least once a month.

Cytotoxicity test

Stock solutions of each alkoxyamine were prepared in DMSO at 0.15 M and stored at −20 °C.

Cells were seeded in 96-well plates with 3000 cells per well for U87-MG and U251-MG cells, 2000 cells per well for ONS-76 and UW228-2 cells, 9000 cells per well for HD-MB03. After 24 hours, cells were treated with a range of concentrations of alkoxyamines (500, 250, 100, 50, 25, 10, 5 and 1 μM) in their respective growth medium for 72 h. The highest concentration of DMSO of which cells were exposed to was 0.002%.

After a 72 h-treatment, cell survival was measured by incubating the GBM and MB cells for 1 h in the medium replenished with 0.5 mg mL^{-1} of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Medium was replaced by DMSO and optical density (OD) was measured by a microplate spectrophotometer at 550 nm. For each dose of each alkoxyamine tested, results were expressed as percentage of survival cells, according to the following equation: $OD_{\text{treated cells}} \times 100/OD_{\text{control cells}}$. The IC_{50} values, *i.e.*, concentrations that inhibit 50% of cell survival, were determined using the GraphPad Prism software. All experiments were performed at least in triplicate.

The cytotoxicity test in the presence of the free radical scavenger was carried out with a ALK4 concentration of 25 μM and an incubation time of 1 h. U87-MG and U251-MG cell viability was measured *versus* equal concentration of the nontoxic radical scavenger trihydroxyethylrutin (troxerutin, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

Spheroid growth assay

DsRed-expressing GBM and MB cells were plated in round bottom 96-well microplates (1000 cells per well for U87-MG – 1200 cells per well for HD-MB03 – 1500 cells per well for UW228-2 and U251-MG – 2000 cells per well for ONS-76) in a culture medium containing 20% methyl cellulose (Sigma-Aldrich, ref. M7027) for 72 h. Spheroids were then exposed to the alkoxyamines. Spheroid growth over time was quantified by acquisition of DsRed fluorescence signal for 4 consecutive days using the PHERAstar® FS multi-plate reader (λ_{ex} 580 nm/λ_{em} 620 nm – "well scanning" mode 10 × 10). Images were captured with the 4X objective of the JuLI™Stage live imaging system (NanoEntek).

Transwell® migration assay

Migration potential of U87-MG and U251-MG cells was assessed using Transwell® migration assay during treatment with the selected alkoxyamines. In the upper chamber of the Transwell® system, 5×10^4 cells per chamber were plated on a filter (pore size of 8 μm) in 200 μL of medium without serum. Cells migrated for 12 hours towards the lower chamber of the Transwell® system containing medium with 10% FBS and the alkoxyamines. Non-migrating cells were removed from the upper side of the filter using a cotton swab. Filters were then fixed in 1% glutaraldehyde for 10 minutes, stained with Crystal Violet and imaged with a light microscope. To quantify the migration potential of the cells, filters were immersed in DMSO and concentration of Crystal Violet was determined by spectrometry at 550 nm. Data are expressed as the relative percentage of cells migrating in the presence of the alkoxyamines *versus* control, according to the following equation: $OD_{\text{treated cells}} \times 100/OD_{\text{control cells}}$.

Fluorescence microscopy of FITC derivatives

U251-MG GBM cells were seeded on LabTek II 8-well plates (4000 cells per well) for 48 hours and exposed to a range of concentration of the fluorescent derivatives ALK4-FITC and ALK17-FITC. Two hours after the initiation of the treatment, cell nuclei were stained with DAPI and a fixation of the cells was made, allowing their observation by fluorescence microscopy (40X objective, Leica Biosystems).

Observation of the mitochondrial network

Stably fluorescent GBM and MB cells were seeded on LabTek II 8-well plates (6000 cells per well for U87-MG and U251-MG cells, 4000 cells per well for ONS-76 and UW228-2 cells) for 48 h and exposed to a range of concentrations of ALK4. 2 hours after the initiation of the treatment, cells were observed by fluorescence microscopy (40X objective, Leica Biosystems).

Measurement of superoxide production

U251-MG and U87-MG GBM cells were seeded on 96-well microplates (3000 cells per well) for 24 h and exposed to ALK4 or to combination of ALK4 and Troxerutin alkyl scavenger for 6 h. Superoxide anion production was assessed by adding 10% v/v of WST-1 reagent (Roche, ref. 11644807001) in the wells for 30 min at 37 °C. Absorbance was measured at 450 nm with a PHERAstarFS multi-plate reader. To normalize superoxide production to the cell number in each condition, cells were fixed with 1% glutaraldehyde and stained with a solution of 1% (W/V) crystal-violet in 20% methanol (Sigma-Aldrich). The dye has finally been solubilized in DMSO to measure absorbance at 600 nm.

Annexin V-FITC/PI staining assay

Following a 48 h-treatment, cells were exposed to ApoScreen Annexin V-FITC apoptosis kit (Clinisciences) used according to the manufacturer's instructions. The fluorescence was analyzed by flow cytometry analysis on The Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter) and data were analyzed by Kaluza software (Beckman Coulter).

© 2023 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry

Open Access Article. Published on 29 June 2023. Downloaded on 10/20/2024 8:08:48 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

Brain and cerebellar organotypic models

To establish organotypic cultures of, we use immunocompetent Swiss mice over 12 weeks old. Brains and cerebellums were surgically harvested and sectioned into 250 μm thick slices using a vibrating blade microtome (Vibratome 2000s, Leica Biosystems). A spheroid formed from DsRed-expressing GBM (for brain) or MB (for cerebellum) cells was then grafted onto each cerebellum slice. These organotypic co-culture models were then placed on inserts with 0.4 μm pore size membranes (Falcon®, ref. 353090) and maintained in a medium containing 50% MEMa, 25% horse serum (Gibco, ref. 16050122), 25% Hanks' Ba lanced Salt Solution (HBSS; Gibco, ref. 14065056), 10 mM HEPES buffer (Gibco, ref. 15630106), 28 mM Glucose (Gibco, ref. 15023021), 1% L-Glutamine (Gibco, ref. 25030081) and 1% PS. Slices were exposed to a range of concentration of ALK4-MMPp or ALK4-CHYMOp every 4 days. Tumor growth and invasion within the cerebellum slices were analysed over time, using the JuLI™ Stage imaging system (λ_{ex} 580 nm/λ_{em} 620 nm – image acquisition with a 4X objective and automated stitching 5 × 6 images) and the PHERAstar® FS multi-plate reader (λ_{ex} 580 nm/λ_{em} 620 nm – fluorescence signal acquisition with a 15 × 15 matrix scanning mode).

Sample preparation and immunohistochemistry

Samples were fixed overnight at 4 °C with 4% formaldehyde and prepared for paraffin inclusion using automated tissue processor ASP 300 (RRID:SCR_018916). Dehydration, clarification, and infiltration steps were performed by successive absolute ethanol, histolemon and paraffin baths. After FFPE-embedding, samples were cut at 3 μm-thickness with HM340E microtome (Thermo Scientific). Hematoxylin Eosin Safran staining was performed using automated H&E staining Dako CoverStainer. Ki-67- and γH2AX-immunohistochemistry was carried out with rabbit anti-Ki67 antibody (RRID:AB_443209) and with mouse anti-gH2AX antibody (Merck Millipore, ref. JBW301) on a Ventana Discovery XT (RRID:SCR_018643). After deparaffinization, antigen retrieval was performed with Citrate-based buffer pH 6.5 (RiboCC Solution, CC2, ref. 760-107). The primary antibodies were incubated for 20 min at 37 °C then an OmniMap anti-Rabbit HRP Detection Kit (ref. 760-149) was used with DAB. Finally, the counterstaining was done with hematoxylin and slides were cleaned, dehydrated and mounted with permanent mounting media. The microscopic analysis of the tissues was carried out by the pathologists of the Neuropathology Department (Timone Hospital, AP-HM, France).

MMP dosage assay

The MMP assay was performed using the Amplite™ Universal Fluorimetric MMP Activity Assay Kit (AAT Bioquest), following the manufacturer's recommendations. 25 μL of the supernatants from the spheroid were collected after 7 days of growth and incubated with 25 μL MMP Green™ substrate working solution for 40 min. The fluorescence signal was then measured with the PHERAstar® FS multi-plate reader (λ_{ex} 490 nm/λ_{em} 525 nm). Values of active MMPs were normalized to the number of surviving MB cells within the spheroid, using the ratio MMP Green/DsRed.

The same procedure was performed with the supernatants of organotypic co-cultures at experiment completion (day 14). Values of active MMPs were normalized to the number of surviving MB cells within the organotypic cultures, using the ratio MMP Green/DsRed.

Zebrafish

For the *in vivo* toxicity study, AB/TU zebrafish (*Danio rerio*) were raised in a dedicated platform (Zebrafish Rockefeller, Université de Lyon). 48 h post-fertilization (hpf) zebrafish embryos were exposed to a range of concentrations of DMSO, ALK4 or ALK4-MMPp directly diluted in culture water (isotonic E3 medium composed of 5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM $CaCl_2$, 0.33 mM $MgSO_4$, methylene blue). Survival was determined by examining and counting alive zebrafish under the microscope (Evos, 10X objective) after 72 h of compound exposition.

Statistical analysis

All experiments were performed at least in three independent replicates and statistical significance was determined by ANOVA or Student's *t*-test using the GraphPad Prism 6 software. A significant difference between two conditions is defined as: $*p < 0.05$, $**p < 0.005$, $***p < 0.001$.

Data availability

All relevant data are available from the corresponding authors upon reasonable request.

Author contributions

P. Brémond and M. Carré conceived the idea and supervised the project. P. Piris and D. Buric carried out the chemistry, biology, and pharmacology experiments and analyzed the data. T. Yamasaki assisted in synthesizing and characterizing the alkoxyamines. M-P. Montero and M. Rossi assisted in cell culture and in evaluation of the molecules. A. Rodallec and M. Matteudi helped with the organotypic models. C. Roux conducted the enzymatic dosage. P. Huchedé performed the *in vivo* experiments in zebrafish. R. Appay analyzed the immunohistochemistry experiments. N. André, E. Pasquier, S. Combes and M. Castets assisted in establishing the experimental approach and finalizing the manuscript. M. Carré, P. Piris, P. Brémond, and D. Buric wrote the article. All authors have read, improved and given approval to the final version of the manuscript. P. Brémond, M. Carré and N. André were responsible for funding acquisition.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We would like to thank S. Vigier for his help with animal experimentation, the Spectropole for NMR and HRMS analyses, N. Vanthuyne for chiral HPLC experiments, M. Giorgi

for X-ray diffraction analyses and the ICEP platform of CRCM for their help in immunohistochemistry experiments. This work was supported by research funding from charities (GEFLUC, RESOP, La Marie-Do, AROU, Association de Recherche contre le Cancer, Ligue Contre le Cancer) and institutions (Canceropôle PACA, Institut National du Cancer and Région Sud). This project has also received funding from the Excellence Initiative of Aix-Marseille University – A*MIDEX, a French "Investissements d'Avenir" program.

Open Access Article. Published on 29 June 2023. Downloaded on 10/20/2024 8:08:48 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.

References

1 G. Audran, P. Brémond and S. R. A. Marque, *Chem. Commun.*, 2014, **50**(59), 7921–7928.
2 G. Audran, E. Bagryanskaya, S. Marque and P. Postnikov, *Polymers*, 2020, **12**(7), 1481.
3 A. Studer and T. Schulte, *Chem. Rec.*, 2005, **5**(1), 27–35.
4 D. Moncelet, P. Voisin, N. Koonjoo, V. Bouchaud, P. Massot, E. Parzy, G. Audran, J. M. Franconi, E. Thiaudière, S. Marque, P. Brémond and P. Mellet, *Mol. Pharm.*, 2014, **11**(7), 2412–2419.
5 G. Audran, P. Brémond, J. M. Franconi, S. R. A. Marque, P. Massot and P. Mellet, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**(5), 719–723.
6 T. Yamasaki, D. Buric, C. Chacon, G. Audran, D. Braguer, S. Marque, M. Carré and P. Brémond, *Bioorg. Med. Chem.*, 2019, **27**(10), 1942–1951.
7 M. Patel and B. Patel, *CNS Drugs*, 2017, **31**(2), 109–133.
8 T. Ostrom, H. Gittleman, G. Truitt, A. Boscia, C. Kruchko and J. Barnholtz-Sloan, *Neuro Oncol.*, 2018, **20**(suppl_4), iv1–iv86.
9 J. Thakkar, T. Dolecek, C. Horbinski, T. Ostrom, D. Lightner and J. Barnholtz-Sloan, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2014, **23**(10), 1985–1996.
10 M. Khabibov, A. Garifullin, Y. Boumber, K. Khaddour, M. Fernandez and F. Khamitov, *Int. J. Oncol.*, 2022, **60**(6), 69.
11 T. Tykocki and M. Eltayeb, *J. Clin. Neurosci.*, 2018, **54**, 7–13.
12 R. Lukas, D. Wainwright, E. Ladomersky, S. Sachdev, A. Sonabend and R. Stupp, *Oncology*, 2019, **33**(3), 91–100.
13 A. Thomas and G. Noël, *J. Multidiscip. Healthc.*, 2019, **12**, 335–347.
14 V. Bernier and O. Klein, *Neurochirurgie*, 2021, **67**(1), 83–86.
15 K. Kessenbrock, V. Plaks and Z. Werb, *Cell*, 2010, **141**(1), 52–67.
16 S. Seren, J. P. Joly, P. Voisin, V. Bouchaud, G. Audran, S. Marque and P. Mellet, *J. Med. Chem.*, 2022, **65**(13), 9253–9266.
17 G. Audran, R. Bikanga, P. Brémond, M. Edeleva, J. P. Joly, S. R. A. Marque, P. Nkolo and V. Roubaud, *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**(39), 8425–8439.
18 Y. Yang, S. Karakhanova, W. Hartwig, J. D'Haese, P. Philippov, J. Werner and A. Vazhin, *J. Cell. Physiol.*, 2016, **231**(12), 2570–2581.
19 U. Sai Srinivas, B. Tan, B. Vellayappan and A. Jeyasekharan, *Redox Biol.*, 2019, **25**, 101084.
20 T. Kline, M. Torgov, B. A. Mendelsohn, C. Cerveny and P. Senter, *Mol. Pharmacol.*, 2004, **1**(1), 9–22.
21 U. Sai Srinivas, B. Tan, B. Vellayappan and A. Jeyasekharan, *Redox Biol.*, 2019, **25**, 101084.
22 H. Brown, K. Schiavone, S. Tazzyman, D. Heymann and T. Ja Chico, *Expet Opin. Drug Discov.*, 2017, **12**(4), 379–389.

© 2023 The Author(s). Published by the Royal Society of Chemistry

- **Quinoxalines**

Le noyau quinoxaline, également appelé benzopyrazine, est présent dans la structure de nombreux composés bioactifs et possède des applications variées. Au cours de la dernière décennie, des dérivés de la quinoxaline dotés de propriétés antiprolifératives ont été développés, laissant présager des applications en tant qu'anticancéreux [335].

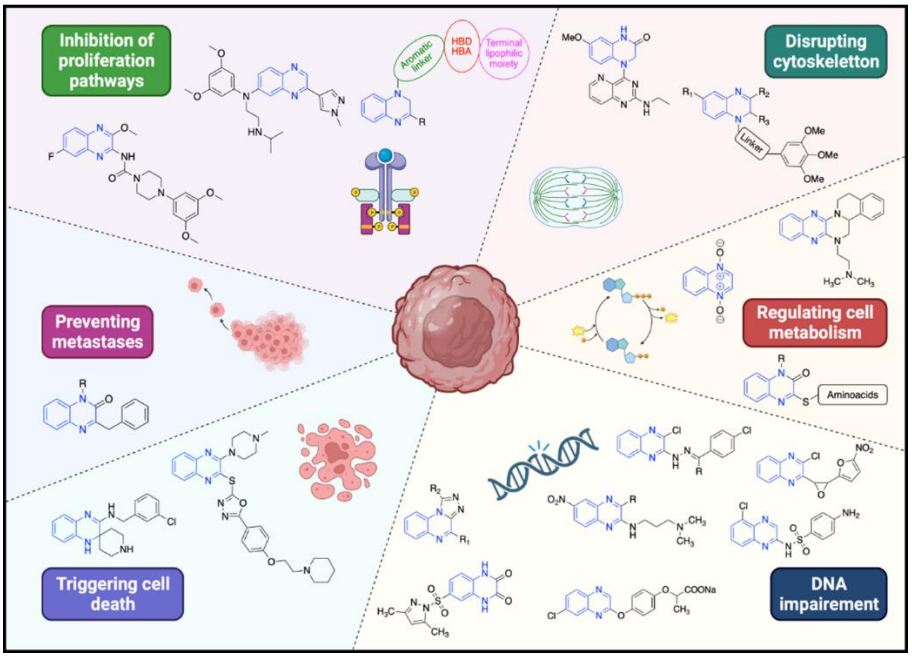


Figure 40 : Dérivés de quinoxaline comme agents anticancéreux potentiels [335]

Afin d'améliorer l'efficacité de cette famille de composés, notre équipe partenaire (Laboratoire de Pharmaco-Chimie) a réalisé dans le cadre de ce projet la synthèse d'une série de nouveaux dérivés de la quinoxaline, complétant leur banque d'analogues déjà disponibles [336–338]. Ces synthèses ont été réalisées par la stratégie TDAE, en intégrant notamment un cycle époxyde substitué par un groupe nitrofurane. Ce dernier est connu pour induire la genèse endogène d'espèces réactives de l'oxygène au sein des cellules, ce qui peut s'avérer d'un grand intérêt en thérapeutique anticancéreuse comme nous avons eu l'occasion de le montrer à plusieurs reprises [339–342]. Des atomes de chlore aux positions et nombre variables ont également été ajoutés sur le noyau quinoxaline afin d'améliorer leur capacité à traverser les membranes plasmiques, leur biodisponibilité et leur stabilité métabolique [343].

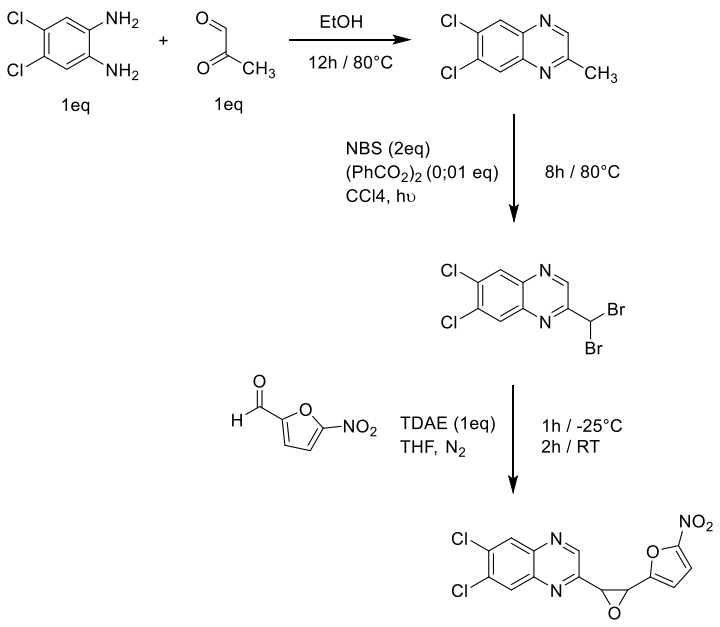
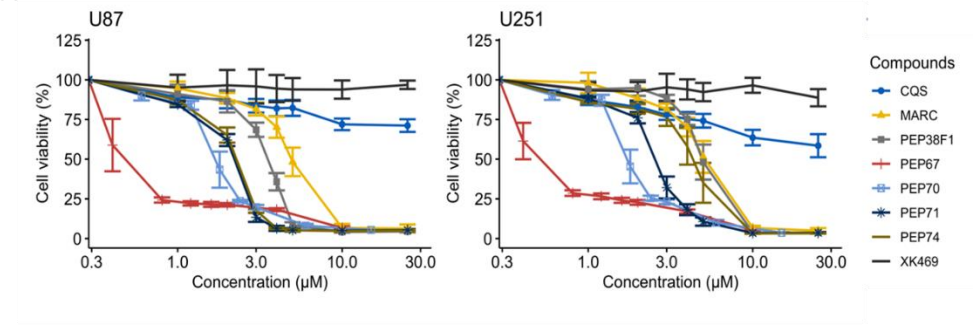


Figure 41 : Synthèse de PEP67, mise au point par l'équipe partenaire LPCR

Une exploration de la relation structure-activité a conduit à sélectionner le composé 6,7-dichloro-2-(3-(5-nitrofuran-2-yl)oxiran-2-yl)quinoxaline, dit « PEP67 », pour la suite des investigations, dont la synthèse est illustrée Fig. 41. L'activité biologique de ces nouvelles molécules a en effet été comparée à celle des molécules antérieures partageant le même squelette, ainsi qu'à XK469 et CQS, deux quinoxalines ayant atteint les premières étapes de développement clinique et ici utilisées comme références.

Les premiers tests effectués sur cellules humains de GB ont révélé l'activité cytotoxique significative de PEP67, avec des valeurs d'IC_{50} de l'ordre de 300 à 400 nM. Cette activité contre les cellules cancéreuses U251 et U87 est non seulement supérieure à celle de tous les dérivés de la quinoxaline de la banque de molécules du LPCR, mais également très supérieure à celle de XK469 et CQS (Fig. 42A&B). De plus, PEP67 a montré un indice de sélectivité particulièrement intéressant, puisque des concentrations 30 fois supérieures à la gamme efficace sur cellules cancéreuses n'ont pas affecté la survie de cellules astrocytaires non-cancéreuses (Fig. 42B).

A

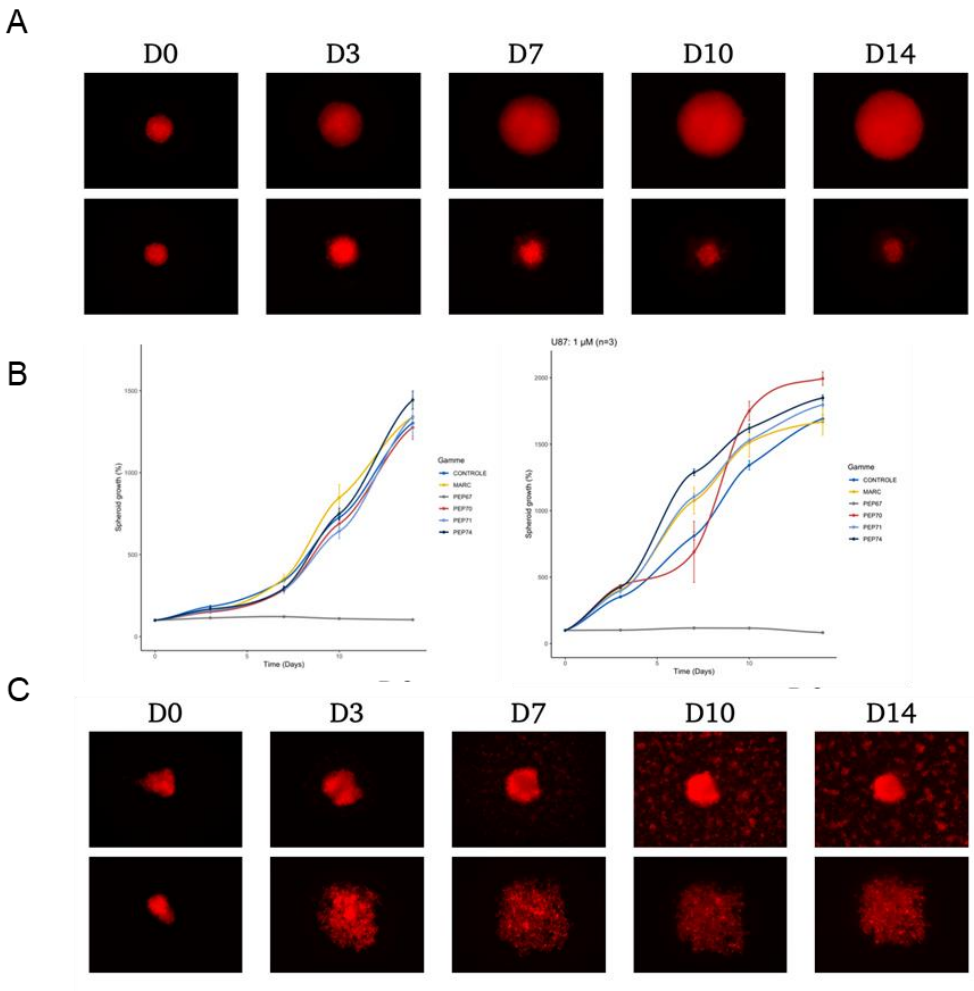


B

	U251-MG	SI	U87-MG	SI	C8-D1A
M44-F2	5.04 ± 0.72	3.47	4.88 ± 0.73	3.58	17.47 ± 2.29
PEP38F1	5.01 ± 0.71	3.44	3.50 ± 0.63	4.93	17.24 ± 1.44
PEP70	1.78 ± 0.22	8.43	1.73 ± 0.19	8.67	> 15
PEP71	2.59 ± 0.25	5.34	2.16 ± 0.09	6.40	13.82 ± 1.55
PEP74	4.33 ± 0.88	5.52	2.21 ± 0.16	10.8	23.9 ± 17.33
PEP67	0.38 ± 0.23	> 26	0.31 ± 0.33	> 32	> 10
XK-469	> 25		> 25		NA
CQS	> 25		> 25		NA

Figure 42 : Sélection de PEP67 dans des modèles cellulaires 2D (A) Courbes de cytotoxicité sur cellules humaines de GB (U251-MG et U87-MG) montrant l'activité supérieure de PEP67 vis-à-vis de 5 autres exemples de nouveaux dérivés synthétisés et des 2 références (CQS et XK469). Et (B) Valeurs des IC50 illustrant l'efficacité de 6 exemples de nouveaux dérivés quinoxalines sur cellules humaines de GB (U251-MG et U87-MG) et l'absence d'activité sur cellules astrocytaires humaines non-cancéreuses (C8-D1A). SI = Indice de sélectivité.

L'étude du potentiel anticancéreux de ces dérivés de la quinoxaline s'est étendue aux modèles de sphéroïdes. . Là encore, PEP67 est apparu comme le composé le plus actif dans ces modèles 3D, démontrant systématiquement une réduction substantielle de la croissance des sphéroïdes (Fig. 43A&B). Les traitements ont aussi mis en lumière les capacités de PEP67 à inhiber la migration péri-tumorale des cellules cancéreuses dans des modèles invasifs de GB (Fig. 43B&C), point essentiel au regard du fait que les capacités invasives des GB réduisent généralement leur réponse aux traitements standards.



<u>Figure 43</u> : Validation de l'efficacité supérieure de PEP67 sur sphéroïdes tumoraux (masses 3D) par acquisition du signal de fluorescence (DsRed) durant 14 jours. Les sphéroïdes formés à partir des cellules humaines U87-MG constituent un modèle hautement prolifératif

Enfin, pour caractériser le potentiel anticancéreux de PEP67 dans un contexte encore plus réaliste, nous l'avons évalué sur notre modèle organotypique cérébral. Ce dernier consiste à greffer une masse tumorale 3D dans une coupe épaisse de tissu cérébral sain. Ces expérimentations ont permis de valider les capacités de PEP67 à inhiber la croissance et l'invasion des GB, tout en préservant la structure des tissus sains voisins, et ce même 14 jours après le traitement (Fig 44A&B). Aucune quinoxaline n'avait jamais été évaluée dans de tels modèles *ex vivo*, fournissant de précieuses indications sur le potentiel anticancéreux de ces molécules dans un micro-environnement pertinent.

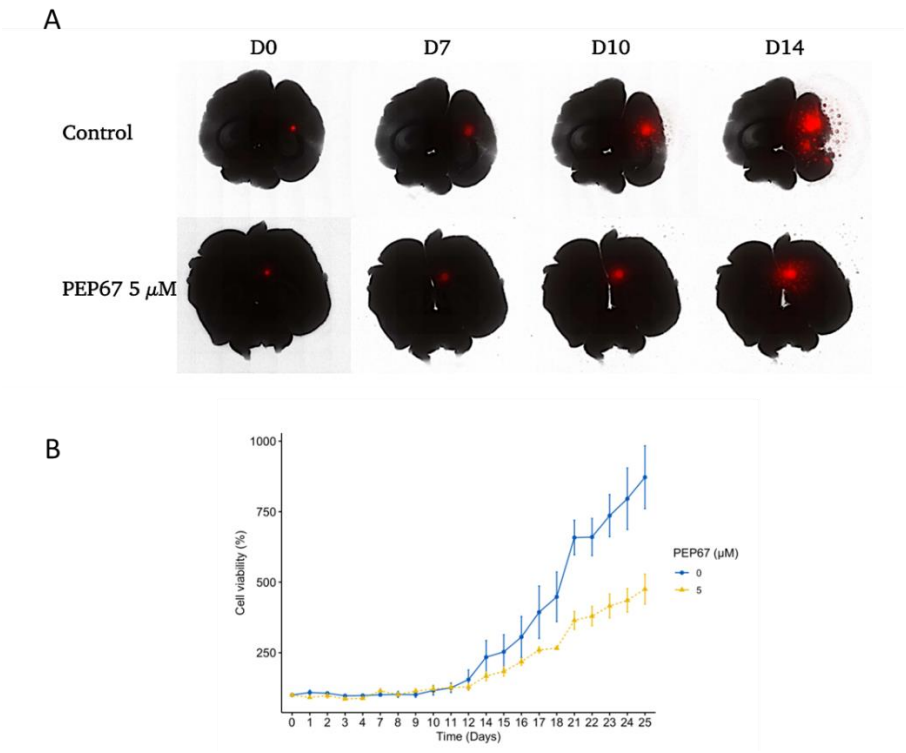


Figure 44 : Validation de l'efficacité de PEP67 dans des modèles organotypiques de cerveau (A) Images représentatives sur 14 jours des modèles organotypiques (masse de GB greffée dans du tissu cérébral sain) montrant une réduction significative de la progression tumorale suite au traitement par PEP67 5µM (à D0). (B) Suivi de la croissance des sphéroïdes U251-MG dans les modèles organotypiques de cerveau par quantification de la fluorescence après traitement par PEP67

Ces résultats nous ont incité à poursuivre les recherches sur les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les effets du PEP67 dans les GB. Nous avons ainsi montré par des tests *in silico* et *in vitro* que cette quinoxaline ciblait la topoisomérase IIβ (Fig. 45A) sélectivement dans les cellules cancéreuses (Fig. 45B), et induisait un blocage du cycle cellulaire (Fig. 45C) conduisant *in fine* à l'apoptose des cellules cancéreuses (Fig. 45D).

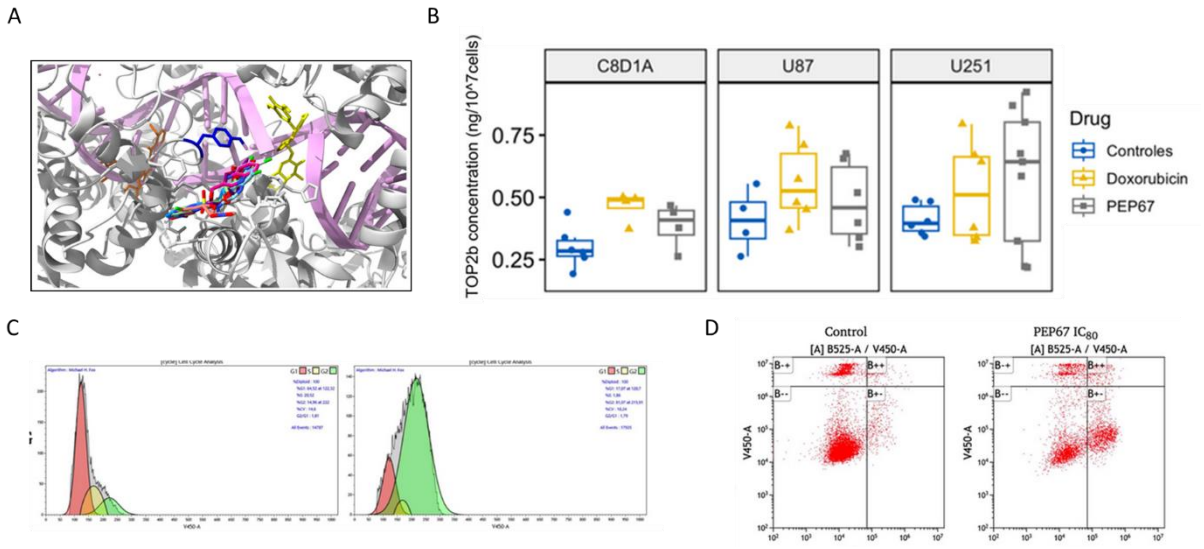


Figure 45 : Mécanisme d'action de PEP67. (A) Etude in silico de l'interaction de PEP67 avec la topoisomérase IIβ par docking moléculaire. (B) Niveaux d'expression de la topoisomérase IIβ dans des cellules traitées avec PEP67 et de la doxorubicine, topoisomérase IIβ de référence. Analyse du cycle cellulaire (C) et du mécanisme de mort cellulaire (D), dans des cellules de GB traitées par PEP67

Suite à ces découvertes, PEP67 a été identifié par la cellule de valorisation SATT Sud-Est comme un composé prometteur contre les cellules de GB (Brevet EP23307268.5). Un article scientifique, dans lequel je figure en troisième auteur, est actuellement en cours de rédaction.

III. Perspectives

Même si ces deux projets sont distincts, leurs stratégies de sélection « hit-to-lead » et d'optimisation moléculaire, ainsi que certaines de leurs perspectives sont similaires. La suite de ces travaux aura pour objectif commun d'établir une preuve de concept solide quant à l'intérêt de ces nouvelles molécules en thérapeutique anticancéreuse.

En premier lieu, des expérimentations animales seront nécessaires pour caractériser la pharmacocinétique des composés, incluant une étude de toxicité et de la dose maximale tolérée, après une administration intra-veineuse. L'étude de la pharmacocinétique des composés dans le plasma et le liquide céphalorachidien devra également être réalisée afin de déterminer leur biodisponibilité (fraction dans la circulation sanguine). Leur capacité à passer la BHE, soutenue jusqu'à présent par des analyses en modélisation PB-PK (Physiologically-Based Pharmacokinetics) et les caractéristiques physico-chimiques des molécules elles-mêmes, devra également être confirmée *in vivo*.

De façon complémentaire, les futures études *in vivo* permettront de démontrer le bon rapport bénéfices/risques des candidats-médicaments proposés, pour la prise en charge de tumeurs intracrâniennes. Les bénéfices, en termes de gain de survie et d'inhibition de

croissance tumorale, ainsi que l'absence de toxicité majeure, devront ainsi être validés chez des animaux porteurs de greffes orthotopiques de GB ou MB.

Enfin, l'avenir commun de ces deux projets pourra s'écrire au regard de leur capacité à déclencher un stress oxydatif dans les cellules cancéreuses. Cette propriété pourrait notamment permettre aux alkoxyamines et aux quinoxalines d'être des partenaires de choix des radiations ionisantes de la radiothérapie. Cette dernière, au cœur de la prise en charge thérapeutique des tumeurs intracrâniennes chez l'adulte comme chez l'enfant, doit en effet son efficacité à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Il en résulte une perturbation de l'homéostasie rédox, causant un stress oxydatif qui mène à la mort des cellules cancéreuses par apoptose, autophagie ou ferroptose [344]. Le piégeage des ROS en excès conduit à une radiorésistance et dégrade encore le pronostic de survie des patients, tandis qu'une amplification du stress oxydatif serait bénéfique aux patients présentant une radiorésistance [345]. Ainsi, il sera très informatif d'évaluer à quel point les alcoxyamines et les quinoxalines sont en mesure de potentialiser le stress oxydatif médié par les rayonnements ionisants, et en conséquence d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie sur GB et MB. Cette question est d'autant plus d'actualité que le stress oxydatif a été récemment impliqué dans la plasticité du microenvironnement tumoral, et en particulier dans la réponse immunitaire antitumorale [346].

Ainsi, l'ensemble de ces explorations futures définiront le plein potentiel des candidats-médicaments issus de la néosynthèse, caractériseront les mécanismes sous-jacents au stress oxydatif engendré et en identifieront les acteurs moléculaires clés, pour ouvrir la voie au développement de nouvelles options thérapeutiques pour les tumeurs du SNC.

Conclusion

La manière dont nous étudions et traitons les maladies pédiatriques doit continuer d'évoluer pour que le cancer ne soit plus l'une des principales causes de mortalité des enfants et adolescents. Un effort a été fait depuis 10 ans pour réserver des fonds spécifiquement à l'Oncopédiatrie, soutenant la création d'entités de recherche fondamentale et translationnelle, de réseaux d'échange d'expertises, et de centres d'essais cliniques spécialisés sur les cancers de l'enfant et de l'adolescent. Ces forces réunies commencent à porter leurs fruits, mais l'effort doit être encore amplifié, pour espérer à l'avenir mieux comprendre la genèse et l'évolution des cancers des plus jeunes, et ainsi les prendre en charge de façon plus adaptée.

Les tumeurs cérébrales progressant dans des tissus fragiles en développement, les enfants qui survivent à ces cancers souffrent d'effets secondaires qui durent toute leur vie et qui bouleversent leur existence. Le repositionnement de médicaments représente un espoir significatif pour le développement de traitements plus efficaces et mieux tolérés. Cette approche, porteuse de solutions innovantes, accélère l'accès à de nouvelles thérapies avec des coûts réduits. La néo-synthèse de médicaments est un processus long qui nécessite souvent des années de recherche et développement pour concevoir des molécules totalement nouvelles et spécifiques, mais demeure essentielle pour des thérapies réellement sur mesure et plus sûres. Ensemble, ces deux approches permettent d'assurer un équilibre entre réponse rapide et innovation à long terme, pour proposer des traitements qui améliorent les taux de survie et la qualité de vie des jeunes patients atteints de tumeurs cérébrales.

Parallèlement, la mutualisation et le partage des données au sein de la communauté scientifique sont essentiels afin de stimuler la recherche. A long terme, les nouveaux outils, mis à disposition de tous, pourraient transformer le paysage du repositionnement de médicaments dans les tumeurs cérébrales pédiatriques en rendant le processus encore plus rapide, plus ciblé et plus sûr. L'avantage d'exploiter les connaissances existantes, tout en en développant de nouvelles, réside dans la possibilité de stimuler l'innovation médicale en proposant des solutions accélérées et mieux adaptées, en particulier dans des domaines sensibles tels que l'oncologie pédiatrique, où chaque avancée peut sauver l'avenir d'un enfant.

Bibliographie

[1] Les cancers pédiatriques en France n.d. http://pediatrie.e-cancer.fr/chercheur/acteurs-de-la-recherche/les-cancers-pediatriques-en-france (accessed August 5, 2024).

[2] Le Plan cancer 2003-2007 - Les Plans cancer n.d. https://www.e-cancer.fr/Institut-national-du-cancer/Strategie-de-lutte-contre-les-cancers-en-France/Les-Plans-cancer/Le-Plan-cancer-2003-2007 (accessed August 5, 2024).

[3] Le Plan cancer 2009-2013 - Les Plans cancer n.d. https://www.e-cancer.fr/Institut-national-du-cancer/Strategie-de-lutte-contre-les-cancers-en-France/Les-Plans-cancer/Le-Plan-cancer-2009-2013 (accessed August 5, 2024).

[4] Le Plan cancer 2014-2019 - Les Plans cancer n.d. https://www.e-cancer.fr/Institut-national-du-cancer/Strategie-de-lutte-contre-les-cancers-en-France/Les-Plans-cancer/Le-Plan-cancer-2014-2019 (accessed August 5, 2024).

[5] La stratégie décennale de lutte contre les cancers 2021-2030 - Stratégie de lutte contre les cancers en France n.d. https://www.e-cancer.fr/Institut-national-du-cancer/Strategie-de-lutte-contre-les-cancers-en-France/La-strategie-decennale-de-lutte-contre-les-cancers-2021-2030 (accessed August 5, 2024).

[6] RNCE – Registre National des Cancers de l'Enfant n.d. https://rnce.inserm.fr/ (accessed August 10, 2024).

[7] LA LUTTE CONTRE LES CANCERS PÉDIATRIQUES EN FRANCE Enjeux, actions et perspectives - 2023. https://www.e-cancer.fr/Presse/Dossiers-et-communiques-de-presse/La-lutte-contre-les-cancers-pediatriques-en-France.-Enjeux-actions-et-perspectives-l-Institut-national-du-cancer-fait-le-point-sur-une-annee-d-actions-contre-les-cancers-pediatriques (accessed August 5, 2024).

[8] La ministre de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et le ministre de la Santé et de la Prévention présentent les trois lauréats de l'appel à candidatures labellisant les centres de recherche intégrée d'excellence sur les cancers des n.d. https://www.e-cancer.fr/Presse/Dossiers-et-communiques-de-presse/La-ministre-de-l-Enseignement-superieur-et-de-la-Recherche-et-le-ministre-de-la-Sante-et-de-la-Prevention-presentent-les-trois-laureats-de-l-appel-a-candidatures-labellisant-les-centres-de-recherche-integree-d-excellence-sur-les-cancers-des-enfants (accessed August 5, 2024).

[9] Les actions de recherche en cancérologie pédiatrique n.d. http://pediatrie.e-cancer.fr/professionnels-de-sante/la-recherche-scientifique-et-medicale/les-actions-de-recherche-en-cancerologie-pediatrique (accessed August 5, 2024).

[10] Déterminer le profil moléculaire des tumeurs de l'enfant qui résistent aux traitements : le programme MAPPYACTS | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer n.d. http://www.fondation-arc.org/projets/determiner-profil-moleculaire-tumeurs-enfant-resistent-traitements (accessed August 5, 2024).

[11] L'essentiel sur le programme AcSé - Le programme AcSé n.d. https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-la-recherche/Recherche-clinique/Le-programme-AcSe/L-essentiel (accessed August 5, 2024).

[12] Geoerger B, Paoletti X, Bautista F, Gatz SA, Marshall LV, André N, et al. AcSé-ESMART, a European precision cancer medicine proof-of-concept platform trial. Nat Med 2023;29:2985–7. https://doi.org/10.1038/s41591-023-02580-5.

[13] Molecular Characterization Initiative for Childhood Cancers - NCI 2022. https://www.cancer.gov/research/areas/childhood/childhood-cancer-data-initiative/programs/molecular-characterization (accessed August 26, 2024).

[14] Home. Zero Child Cancer n.d. https://www.zerochildhoodcancer.org.au (accessed September 3, 2024).
[15] Lau LMS, Khuong-Quang D-A, Mayoh C, Wong M, Barahona P, Ajuyah P, et al. Precision-guided treatment in high-risk pediatric cancers. Nat Med 2024;30:1913–22. https://doi.org/10.1038/s41591-024-03044-0.
[16] Gilbertson RJ, Behjati S, Böttcher A-L, Bronner ME, Burridge M, Clausing H, et al. The Virtual Child. Cancer Discov 2024;14:663–8. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-23-1500.
[17] Gore L, O'Brien MM. Only the beginning: 50 years of progress toward curing childhood cancer. Cell 2024;187:1584–8. https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.02.039.
[18] Aggarwal P, Luo W, Pehlivan KC, Hoang H, Rajappa P, Cripe TP, et al. Pediatric versus adult high grade glioma: Immunotherapeutic and genomic considerations. Front Immunol 2022;13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1038096.
[19] Pfister SM, Reyes-Múgica M, Chan JKC, Hasle H, Lazar AJ, Rossi S, et al. A Summary of the Inaugural WHO Classification of Pediatric Tumors: Transitioning from the Optical into the Molecular Era. Cancer Discov 2022;12:331–55. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1094.
[20] Henderson RH, French D, Stewart E, Smart D, Idica A, Redmond S, et al. Delivering the precision oncology paradigm: reduced R&D costs and greater return on investment through a companion diagnostic informed precision oncology medicines approach. J Pharm Policy Pract 2023;16:84. https://doi.org/10.1186/s40545-023-00590-9.
[21] Les tumeurs cérébrales n.d. http://pediatrie.e-cancer.fr/professionnels-de-sante/cancers-pediatriques/les-types-de-cancers-pediatriques/les-tumeurs-cerebrales (accessed July 25, 2024).
[22] Gliome Infiltrant du Tronc Cérébral. Amis Mikhy n.d. https://lesamisdemikhy.org/gliome-infiltrant-du-tronc-cerebral/ (accessed July 25, 2024).
[23] Medulloblastome et PNET. Gustave Roussy n.d. https://www.gustaveroussy.fr/fr/medulloblastome-et-pnet (accessed September 28, 2024).
[24] Northcott PA, Robinson GW, Kratz CP, Mabbott DJ, Pomeroy SL, Clifford SC, et al. Medulloblastoma. Nat Rev Dis Primer 2019;5:1–20. https://doi.org/10.1038/s41572-019-0063-6.
[25] Hovestadt V, Ayrault O, Swartling FJ, Robinson GW, Pfister SM, Northcott PA. Medulloblastomics revisited: biological and clinical insights from thousands of patients. Nat Rev Cancer 2020;20:42–56. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0223-8.
[26] Jessa S, Blanchet-Cohen A, Krug B, Vladoiu M, Coutelier M, Faury D, et al. Stalled developmental programs at the root of pediatric brain tumors. Nat Genet 2019;51:1702–13. https://doi.org/10.1038/s41588-019-0531-7.
[27] Phoenix TN, Patmore DM, Boop S, Boulos N, Jacus MO, Patel YT, et al. Medulloblastoma genotype dictates blood brain barrier phenotype. Cancer Cell 2016;29:508–22. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.002.
[28] Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/β-catenin signaling pathway in cancer. J Hematol OncolJ Hematol Oncol 2020;13:165. https://doi.org/10.1186/s13045-020-00990-3.

[29] Min HS, Lee JY, Kim S-K, Park S-H. Genetic Grouping of Medulloblastomas by Representative Markers in Pathologic Diagnosis. Transl Oncol 2013;6:265–72. https://doi.org/10.1593/tlo.12382.
[30] Waszak SM, Northcott PA, Buchhalter I, Robinson GW, Sutter C, Groebner S, et al. Spectrum and prevalence of genetic predisposition in medulloblastoma: a retrospective genetic study and prospective validation in a clinical trial cohort. Lancet Oncol 2018;19:785–98. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30242-0.
[31] Swarup A, Bolger TA. The Role of the RNA Helicase DDX3X in Medulloblastoma Progression. Biomolecules 2024;14:803. https://doi.org/10.3390/biom14070803.
[32] Zhukova N, Ramaswamy V, Remke M, Pfaff E, Shih DJH, Martin DC, et al. Subgroup-Specific Prognostic Implications of TP53 Mutation in Medulloblastoma. J Clin Oncol 2013;31:2927–35. https://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.5052.
[33] Cavalli FMG, Remke M, Rampasek L, Peacock J, Shih DJH, Luu B, et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. Cancer Cell 2017;31:737-754.e6. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.05.005.
[34] Hovestadt V, Smith KS, Bihannic L, Filbin MG, Shaw ML, Baumgartner A, et al. Resolving medulloblastoma cellular architecture by single-cell genomics. Nature 2019;572:74–9. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1434-6.
[35] Doheny D, Manore SG, Wong GL, Lo H-W. Hedgehog Signaling and Truncated GLI1 in Cancer. Cells 2020;9:2114. https://doi.org/10.3390/cells9092114.
[36] Kool M, Jones DTW, Jäger N, Northcott PA, Pugh TJ, Hovestadt V, et al. Genome Sequencing of SHH Medulloblastoma Predicts Genotype-Related Response to Smoothened Inhibition. Cancer Cell 2014;25:393. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.004.
[37] Sanghrajka RM, Koche R, Medrano H, El Nagar S, Stephen DN, Lao Z, et al. KMT2D suppresses Sonic hedgehog-driven medulloblastoma progression and metastasis. iScience 2023;26:107831. https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107831.
[38] Smith KS, Bihannic L, Gudenas BL, Haldipur P, Tao R, Gao Q, et al. Unified rhombic lip origins of Group 3 and Group 4 medulloblastoma. Nature 2022;609:1012–20. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05208-9.
[39] Hendrikse LD, Haldipur P, Saulnier O, Millman J, Sjoboen AH, Erickson AW, et al. Failure of human rhombic lip differentiation underlies medulloblastoma formation. Nature 2022;609:1021–8. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05215-w.
[40] Visvanathan A, Saulnier O, Chen C, Haldipur P, Orisme W, Delaidelli A, et al. Early rhombic lip Protogenin+ve stem cells in a human-specific neurovascular niche initiate and maintain group 3 medulloblastoma. Cell 2024;187:4733-4750.e26. https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.06.011.
[41] Nam DH, Wang KC, Kim YM, Chi JG, Kim SK, Cho BK. The effect of isochromosome 17q presence, proliferative and apoptotic indices, expression of c-erbB-2, bcl-2 and p53 proteins on the prognosis of medulloblastoma. J Korean Med Sci 2000;15:452–6.
[42] Robinson G, Parker M, Kranenburg TA, Lu C, Chen X, Ding L, et al. Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. Nature 2012;488:43–8. https://doi.org/10.1038/nature11213.
[43] Archer TC, Mahoney EL, Pomeroy SL. Medulloblastoma: Molecular Classification-Based Personal Therapeutics. Neurotherapeutics 2017;14:265–73. https://doi.org/10.1007/s13311-017-0526-y.
[44] Juraschka K, Taylor MD. Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: a review: JNSPG 75th Anniversary Invited Review Article. J Neurosurg Pediatr 2019;24:353–63. https://doi.org/10.3171/2019.5.PEDS18381.

[45] Northcott PA, Lee C, Zichner T, Stütz AM, Erkek S, Kawauchi D, et al. Enhancer hijacking activates GFI1 family oncogenes in medulloblastoma. Nature 2014;511:428–34. https://doi.org/10.1038/nature13379.
[46] Simeone A. Otx1 and Otx2 in the development and evolution of the mammalian brain. EMBO J 1998;17:6790–8. https://doi.org/10.1093/emboj/17.23.6790.
[47] Beby F, Lamonerie T. The homeobox gene *Otx2* in development and disease. Exp Eye Res 2013;111:9–16. https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.03.007.
[48] Lu Y, Labak CM, Jain N, Purvis IJ, Guda MR, Bach SE, et al. OTX2 expression contributes to proliferation and progression in Myc-amplified medulloblastoma. Am J Cancer Res 2017;7:647–56.
[49] Northcott PA, Buchhalter I, Morrissy AS, Hovestadt V, Weischenfeldt J, Ehrenberger T, et al. The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. Nature 2017;547:311–7. https://doi.org/10.1038/nature22973.
[50] Menyhárt O, Győrffy B. Molecular stratifications, biomarker candidates and new therapeutic options in current medulloblastoma treatment approaches. Cancer Metastasis Rev 2020;39:211–33. https://doi.org/10.1007/s10555-020-09854-1.
[51] Sharma T, Schwalbe EC, Williamson D, Sill M, Hovestadt V, Mynarek M, et al. Second-generation molecular subgrouping of medulloblastoma: an international meta-analysis of Group 3 and Group 4 subtypes. Acta Neuropathol (Berl) 2019;138:309–26. https://doi.org/10.1007/s00401-019-02020-0.
[52] Schmidt C, Cohen S, Gudenas BL, Husain S, Carlson A, Westelman S, et al. PRDM6 promotes medulloblastoma by repressing chromatin accessibility and altering gene expression. Sci Rep 2024;14:16074. https://doi.org/10.1038/s41598-024-66811-6.
[53] Dubuc AM, Remke M, Korshunov A, Northcott PA, Zhan SH, Mendez-Lago M, et al. Aberrant patterns of H3K4 and H3K27 histone lysine methylation occur across subgroups in medulloblastoma. Acta Neuropathol (Berl) 2013;125:373–84. https://doi.org/10.1007/s00401-012-1070-9.
[54] Lopez GY, Grant GA, Fuchs HE, Leithe LG, Gururangan S, Bigner DD, et al. Clinic-pathological description of three paediatric medulloblastoma cases with MLL2/3 gene mutations. Neuropathol Appl Neurobiol 2014;40:217–20. https://doi.org/10.1111/nan.12060.
[55] Chen Z, Ioris RM, Richardson S, Van Ess AN, Vendrell I, Kessler BM, et al. Disease-associated KBTBD4 mutations in medulloblastoma elicit neomorphic ubiquitylation activity to promote CoREST degradation. Cell Death Differ 2022;29:1955–69. https://doi.org/10.1038/s41418-022-00983-4.
[56] Brain Tumors in Children n.d. https://www.nationwidechildrens.org/conditions/brain-tumors (accessed July 25, 2024).
[57] Zumel-Marne A, Kundi M, Castaño-Vinyals G, Alguacil J, Petridou ET, Georgakis MK, et al. Clinical presentation of young people (10–24 years old) with brain tumors: results from the international MOBI-Kids study. J Neurooncol 2020;147:427–40. https://doi.org/10.1007/s11060-020-03437-4.
[58] Nikam RM, Yue X, Kaur G, Kandula V, Khair A, Kecskemethy HH, et al. Advanced Neuroimaging Approaches to Pediatric Brain Tumors. Cancers 2022;14:3401. https://doi.org/10.3390/cancers14143401.
[59] Chaturvedi A, Sadashiva N, Kalahasti S, Konar S, Krishna U, Ar P, et al. Safety and Efficacy of Biopsy in Patients with Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas. World Neurosurg 2024;187:e870–82. https://doi.org/10.1016/j.wneu.2024.05.003.

[60] Pediatric brain tumors - Diagnosis and treatment - Mayo Clinic n.d. https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/pediatric-brain-tumor/diagnosis-treatment/drc-20361706 (accessed July 26, 2024).
[61] Tang K, Gardner S, Snuderl M. The Role of Liquid Biopsies in Pediatric Brain Tumors. J Neuropathol Exp Neurol 2020;79:934–40. https://doi.org/10.1093/jnen/nlaa068.
[62] Syndrome de la fosse postérieure n.d. https://together.stjude.org/fr-fr/diagnostic-traitement/effets-secondaires/posterior-fossa-syndrome.html (accessed September 28, 2024).
[63] Tumeurs cérébrales. Gustave Roussy n.d. https://www.gustaveroussy.fr/fr/tumeurs-cerebrales (accessed July 29, 2024).
[64] Foster MT, Harishchandra LS, Mallucci C. Pediatric Central Nervous System Tumors: State-of-the-Art and Debated Aspects. Front Pediatr 2018;6:309. https://doi.org/10.3389/fped.2018.00309.
[65] Padovani L, Horan G, Ajithkumar T. Radiotherapy Advances in Paediatric Medulloblastoma Treatment. Clin Oncol 2019;31:171–81. https://doi.org/10.1016/j.clon.2019.01.001.
[66] Dendale R, Thariat J, Doyen J, Balosso J, Stefan D, Bolle S, et al. État des lieux de la protonthérapie en France en 2019. Cancer/Radiothérapie 2019;23:617–24. https://doi.org/10.1016/j.canrad.2019.07.129.
[67] Petr J, Platzek I, Hofheinz F, Mutsaerts HJMM, Asllani I, Osch MJP van, et al. Photon vs. proton radiochemotherapy: Effects on brain tissue volume and perfusion. Radiother Oncol 2018;128:121–7. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2017.11.033.
[68] Tonning Olsson I, Lundgren J, Hjorth L, Munck Af Rosenschöld P, Hammar Å, Perrin S. Neurocognitive development after pediatric brain tumor - a longitudinal, retrospective cohort study. Child Neuropsychol 2024;30:22–44. https://doi.org/10.1080/09297049.2023.2172149.
[69] Rose SR, Horne VE, Howell J, Lawson SA, Rutter MM, Trotman GE, et al. Late endocrine effects of childhood cancer. Nat Rev Endocrinol 2016;12:319–36. https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.45.
[70] HEO J, LEE HS, HWANG JS, NOH OK, KIM L, PARK JE. Prevalence of Endocrine Disorders in Childhood Brain Tumor Survivors in South Korea. In Vivo 2019;33:2287–91. https://doi.org/10.21873/invivo.11735.
[71] Huang Y, Zhou H, An F, Zhao A, Wu J, Wang M, et al. The relevance of ototoxicity induced by radiotherapy. Radiat Oncol Lond Engl 2023;18:95. https://doi.org/10.1186/s13014-023-02268-7.
[72] Michalski JM, Janss AJ, Vezina LG, Smith KS, Billups CA, Burger PC, et al. Children's Oncology Group Phase III Trial of Reduced-Dose and Reduced-Volume Radiotherapy With Chemotherapy for Newly Diagnosed Average-Risk Medulloblastoma. J Clin Oncol 2021;39:2685. https://doi.org/10.1200/JCO.20.02730.
[73] Cohen KJ, Munjapara V, Aguilera D, Castellino RC, Stapleton SL, Landi D, et al. A Pilot Study Omitting Radiation in the Treatment of Children with Newly Diagnosed Wnt-Activated Medulloblastoma. Clin Cancer Res 2023;29:5031–7. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-23-0348.
[74] Timmermann B, Alapetite C, Dieckmann K, Kortmann R-D, Lassen-Ramshad Y, Maduro JH, et al. ESTRO-SIOPE guideline: Clinical management of radiotherapy in atypical teratoid/rhabdoid tumors (AT/RTs). Radiother Oncol 2024;196. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2024.110227.

[75] Olsson IT, Perrin S, Lundgren J, Hjorth L, Johanson A. Long-Term Cognitive Sequelae After Pediatric Brain Tumor Related to Medical Risk Factors, Age, and Sex. Pediatr Neurol 2014;51:515–21. https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.06.011.
[76] Packer RJ, Gajjar A, Vezina G, Rorke-Adams L, Burger PC, Robertson PL, et al. Phase III Study of Craniospinal Radiation Therapy Followed by Adjuvant Chemotherapy for Newly Diagnosed Average-Risk Medulloblastoma. J Clin Oncol 2006;24:4202–8. https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.4980.
[77] Kortmann R-D, Kühl J, Timmermann B, Mittler U, Urban C, Budach V, et al. Postoperative neoadjuvant chemotherapy before radiotherapy as compared to immediate radiotherapy followed by maintenance chemotherapy in the treatment of medulloblastoma in childhood: results of the german prospective randomized trial hit '91. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000;46:269–79. https://doi.org/10.1016/S0360-3016(99)00369-7.
[78] Gajjar A, Chintagumpala M, Ashley D, Kellie S, Kun LE, Merchant TE, et al. Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma (St Jude Medulloblastoma-96): long-term results from a prospective, multicentre trial. Lancet Oncol 2006;7:813–20. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70867-1.
[79] Pasquier E, Kavallaris M, André N. Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions. Nat Rev Clin Oncol 2010;7:455–65. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.82.
[80] André N, Carré M, Pasquier E. Metronomics: towards personalized chemotherapy? Nat Rev Clin Oncol 2014;11:413–31. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.89.
[81] escp-medulloblastoma.pdf n.d.
[82] Martin AM, Raabe E, Eberhart C, Cohen KJ. Management of Pediatric and Adult Patients with Medulloblastoma. Curr Treat Options Oncol 2014;15:581–94. https://doi.org/10.1007/s11864-014-0306-4.
[83] Li G, Hu Y, Li D, Zhang Y, Guo H, Li Y, et al. Vincristine-induced peripheral neuropathy: A mini-review. NeuroToxicology 2020;81:161–71. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.10.004.
[84] Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. Kidney Int 2008;73:994–1007. https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002786.
[85] Médulloblastome - Pédiatrie. Édition Prof Man MSD n.d. https://www.msdmanuals.com/fr/professional/pédiatrie/cancers-pédiatriques/médulloblastome (accessed August 7, 2024).
[86] Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? Nat Rev Drug Discov 2014;13:513–32. https://doi.org/10.1038/nrd4233.
[87] Jing J, Wu Z, Wang J, Luo G, Lin H, Fan Y, et al. Hedgehog signaling in tissue homeostasis, cancers, and targeted therapies. Signal Transduct Target Ther 2023;8:315. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01559-5.
[88] Roussel MF, Robinson GW. Role of MYC in Medulloblastoma. Cold Spring Harb Perspect Med 2013;3:a014308. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014308.
[89] Byrne EM, Pascoe M, Cooper D, Armstrong TS, Gilbert MR. Challenges and limitations of clinical trials in the adolescent and young adult CNS cancer population: A systematic review. Neuro-Oncol Adv 2024;6:vdad159. https://doi.org/10.1093/noajnl/vdad159.
[90] Wang SS, Bandopadhayay P, Jenkins MR. Towards Immunotherapy for Pediatric Brain Tumors. Trends Immunol 2019;40:748–61. https://doi.org/10.1016/j.it.2019.05.009.

[91] Batista A, Riedemann L, Vardam T, Jain RK. Targeting the Tumor Microenvironment to Enhance Pediatric Brain Cancer Treatment. Cancer J 2015;21:307. https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000125.
[92] Levine AB, Nobre L, Das A, Milos S, Bianchi V, Johnson M, et al. Immuno-oncologic profiling of pediatric brain tumors reveals major clinical significance of the tumor immune microenvironment. Nat Commun 2024;15:5790. https://doi.org/10.1038/s41467-024-49595-1.
[93] Yao B, Delaidelli A, Vogel H, Sorensen PH. Pediatric Brain Tumours: Lessons from the Immune Microenvironment. Curr Oncol 2023;30:5024–46. https://doi.org/10.3390/curroncol30050379.
[94] Martin AM, Nirschl CJ, Polanczyk MJ, Bell WR, Nirschl TR, Harris-Bookman S, et al. PD-L1 expression in medulloblastoma: an evaluation by subgroup. Oncotarget 2018;9:19177–91. https://doi.org/10.18632/oncotarget.24951.
[95] Dunkel IJ, Doz F, Foreman NK, Hargrave D, Lassaletta A, André N, et al. Nivolumab with or without ipilimumab in pediatric patients with high-grade CNS malignancies: Safety, efficacy, biomarker, and pharmacokinetics—CheckMate 908. Neuro-Oncol 2023;25:1530–45. https://doi.org/10.1093/neuonc/noad031.
[96] Thompson EM, Landi D, Brown MC, Friedman HS, McLendon R, James E Herndon II, et al. Recombinant polio:rhinovirus immunotherapy for recurrent paediatric high-grade glioma: a phase 1b trial. Lancet Child Adolesc Health 2023;7:471. https://doi.org/10.1016/S2352-4642(23)00031-7.
[97] Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. Nat Rev Drug Discov 2004;3:673–83. https://doi.org/10.1038/nrd1468.
[98] Langedijk J, Mantel-Teeuwisse AK, Slijkerman DS, Schutjens M-HDB. Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. Drug Discov Today 2015;20:1027–34. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.05.001.
[99] Bakowski MA, Beutler N, Wolff KC, Kirkpatrick MG, Chen E, Nguyen T-TH, et al. Drug repurposing screens identify chemical entities for the development of COVID-19 interventions. Nat Commun 2021;12:3309. https://doi.org/10.1038/s41467-021-23328-0.
[100] Kabir A, Muth A. Polypharmacology: The science of multi-targeting molecules. Pharmacol Res 2022;176:106055. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106055.
[101] Peters J-U. Polypharmacology – Foe or Friend? J Med Chem 2013;56:8955–71. https://doi.org/10.1021/jm400856t.
[102] Weth FR, Hoggarth GB, Weth AF, Paterson E, White MPJ, Tan ST, et al. Unlocking hidden potential: advancements, approaches, and obstacles in repurposing drugs for cancer therapy. Br J Cancer 2024;130:703–15. https://doi.org/10.1038/s41416-023-02502-9.
[103] Parvathaneni V, Kulkarni NS, Muth A, Gupta V. Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. Drug Discov Today 2019;24:2076–85. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.06.014.
[104] Prasad S, Gupta SC, Aggarwal BB. Serendipity in Cancer Drug Discovery: Rational or Coincidence? Trends Pharmacol Sci 2016;37:435–50. https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.03.004.
[105] Mouysset B, Le Grand M, Camoin L, Pasquier E. Poly-pharmacology of existing drugs: How to crack the code? Cancer Lett 2024;588:216800. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216800.

[106] Parker CG, Pratt MR. Click Chemistry in Proteomic Investigations. Cell 2020;180:605–32. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.025.
[107] Patton EE, Zon LI, Langenau DM. Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. Nat Rev Drug Discov 2021;20:611–28. https://doi.org/10.1038/s41573-021-00210-8.
[108] Jiang S, Zhao H, Zhang W, Wang J, Liu Y, Cao Y, et al. An Automated Organoid Platform with Inter-organoid Homogeneity and Inter-patient Heterogeneity. Cell Rep Med 2020;1:100161. https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100161.
[109] Drug Repurposing for Rare Diseases. Trends Pharmacol Sci 2021;42:255–67. https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.01.003.
[110] Jang J, Yoo J-E, Lee J-A, Lee DR, Kim JY, Huh YJ, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells: a platform for human disease modeling and drug discovery. Exp Mol Med 2012;44:202–13. https://doi.org/10.3858/emm.2012.44.3.015.
[111] Driehuis E, Kretzschmar K, Clevers H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications. Nat Protoc 2020;15:3380–409. https://doi.org/10.1038/s41596-020-0379-4.
[112] Lago C, Gianesello M, Santomaso L, Leva G, Ballabio C, Anderle M, et al. Medulloblastoma and high-grade glioma organoids for drug screening, lineage tracing, co-culture and in vivo assay. Nat Protoc 2023;18:2143–80. https://doi.org/10.1038/s41596-023-00839-2.
[113] Lago C, Federico A, Leva G, Mack NL, Schwalm B, Ballabio C, et al. Patient- and xenograft-derived organoids recapitulate pediatric brain tumor features and patient treatments. EMBO Mol Med 2023;15:e18199. https://doi.org/10.15252/emmm.202318199.
[114] Yang R, Yu Y. Patient-derived organoids in translational oncology and drug screening. Cancer Lett 2023;562:216180. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216180.
[115] Wang S-W, Gao C, Zheng Y-M, Yi L, Lu J-C, Huang X-Y, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer. Mol Cancer 2022;21:57. https://doi.org/10.1186/s12943-022-01518-8.
[116] Wieder R, Adam N. Drug repositioning for cancer in the era of AI, big omics, and real-world data. Crit Rev Oncol Hematol 2022;175:103730. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103730.
[117] Applications of multi-omics analysis in human diseases - PMC n.d. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10390758/ (accessed July 15, 2024).
[118] Eckert H, Bajorath J. Molecular similarity analysis in virtual screening: foundations, limitations and novel approaches. Drug Discov Today 2007;12:225–33. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.01.011.
[119] Dudley JT, Deshpande T, Butte AJ. Exploiting drug–disease relationships for computational drug repositioning. Brief Bioinform 2011;12:303–11. https://doi.org/10.1093/bib/bbr013.
[120] Manolio TA. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. N Engl J Med 2010;363:166–76. https://doi.org/10.1056/NEJMra0905980.
[121] Pearson TA, Manolio TA. How to Interpret a Genome-wide Association Study. JAMA 2008;299:1335–44. https://doi.org/10.1001/jama.299.11.1335.
[122] EMBL-EBI. What are genome wide association studies (GWAS)? | GWAS Catalog n.d. https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/gwas-catalogue-exploring-

snp-trait-associations/what-is-gwas-catalog/what-are-genome-wide-association-studies-gwas/ (accessed August 10, 2024).
[123] Dahlin AM, Wibom C, Andersson U, Bybjerg-Grauholm J, Deltour I, Hougaard DM, et al. A genome-wide association study on medulloblastoma. J Neurooncol 2020;147:309. https://doi.org/10.1007/s11060-020-03424-9.
[124] Sanseau P, Agarwal P, Barnes MR, Pastinen T, Richards JB, Cardon LR, et al. Use of genome-wide association studies for drug repositioning. Nat Biotechnol 2012;30:317–20. https://doi.org/10.1038/nbt.2151.
[125] Reay WR, Cairns MJ. Advancing the use of genome-wide association studies for drug repurposing. Nat Rev Genet 2021;22:658–71. https://doi.org/10.1038/s41576-021-00387-z.
[126] Jarada TN, Rokne JG, Alhajj R. A review of computational drug repositioning: strategies, approaches, opportunities, challenges, and directions. J Cheminformatics 2020;12:46. https://doi.org/10.1186/s13321-020-00450-7.
[127] Muhammed MT, Aki-Yalcin E. Molecular Docking: Principles, Advances, and Its Applications in Drug Discovery. Lett Drug Des Discov n.d.;21:480–95. https://doi.org/10.2174/1570180819666220922103109.
[128] Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations | SpringerLink n.d. https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-9752-7_2 (accessed July 17, 2024).
[129] Elmchichi L, Tabti K, Rania K, El-Mernissi R, Aissouq A, En-nahli F, et al. 3D-QSAR study, docking molecular and simulation dynamic on series of benzimidazole derivatives as anti-cancer agents. J Indian Chem Soc 2022;99:100582. https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100582.
[130] Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. Nat Rev Drug Discov 2019;18:41–58. https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168.
[131] Bhinder B, Gilvary C, Madhukar NS, Elemento O. Artificial Intelligence in Cancer Research and Precision Medicine. Cancer Discov 2021;11:900–15. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0090.
[132] Mohi-ud-din R, Chawla A, Sharma P, Mir PA, Potoo FH, Reiner Ž, et al. Repurposing approved non-oncology drugs for cancer therapy: a comprehensive review of mechanisms, efficacy, and clinical prospects. Eur J Med Res 2023;28:345. https://doi.org/10.1186/s40001-023-01275-4.
[133] Fetro C, Scherman D. Drug repurposing in rare diseases: Myths and reality. Therapies 2020;75:157–60. https://doi.org/10.1016/j.therap.2020.02.006.
[134] Xia Y, Sun M, Huang H, Jin W-L. Drug repurposing for cancer therapy. Signal Transduct Target Ther 2024;9:92. https://doi.org/10.1038/s41392-024-01808-1.
[135] Deplanque D, Fetro C, Ferry A, Lechat P, Beghyn T, Bernard C, et al. Repositionnement des médicaments : de la découverte d'un effet pharmacologique utile à la mise à disposition du traitement pour le patient. Therapies 2023;78:1–9. https://doi.org/10.1016/j.therap.2022.12.001.
[136] Breckenridge A, Jacob R. Overcoming the legal and regulatory barriers to drug repurposing. Nat Rev Drug Discov 2019;18:1–2. https://doi.org/10.1038/nrd.2018.92.
[137] Autorisation de mise sur le marché pour les médicaments. ANSM n.d. https://ansm.sante.fr/page/autorisation-de-mise-sur-le-marche-pour-les-medicaments (accessed September 29, 2024).

[138] travail M du, solidarités de la santé et des, travail M du, solidarités de la santé et des. La fixation des prix et du taux de remboursement. Ministère Trav Santé Solidar 2024. https://sante.gouv.fr/soins-et-maladies/medicaments/le-circuit-du-medicament/article/la-fixation-des-prix-et-du-taux-de-remboursement (accessed July 12, 2024).
[139] Accès Précoce / Accès Compassionnel. OMEDIT Ile Fr n.d. https://www.omedit-idf.fr/ap_ac/ (accessed July 14, 2024).
[140] Accès précoce à un médicament. Haute Aut Santé n.d. https://www.has-sante.fr/jcms/r_1500918/fr/acces-precoce-a-un-medicament (accessed August 10, 2024).
[141] Accès précoce à un médicament. Haute Aut Santé n.d. https://www.has-sante.fr/jcms/r_1500918/fr/acces-precoce-a-un-medicament (accessed July 14, 2024).
[142] Toma M, Felisi M, Bonifazi D, Bonifazi F, Giannuzzi V, Reggiardo G, et al. Paediatric Medicines in Europe: The Paediatric Regulation—Is It Time for Reform? Front Med 2021;8:593281. https://doi.org/10.3389/fmed.2021.593281.
[143] Paediatric Regulation | European Medicines Agency n.d. https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/paediatric-medicines-overview/paediatric-regulation (accessed July 14, 2024).
[144] Plan d'investigation pédiatrique. ANSM n.d. https://ansm.sante.fr/vos-demarches/industriel/plan-dinvestigation-pediatrique (accessed July 14, 2024).
[145] Paediatric-use marketing authorisations | European Medicines Agency n.d. https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/marketing-authorisation/paediatric-medicines-marketing-authorisation/paediatric-use-marketing-authorisations (accessed July 14, 2024).
[146] Alabed S, Sabouni A, Al Dakhoul S, Bdaiwi Y. Beta-blockers for congestive heart failure in children. Cochrane Database Syst Rev 2020. https://doi.org/10.1002/14651858.CD007037.pub4.
[147] Léauté-Labrèze C, Roque ED de la, Hubiche T, Boralevi F, Thambo J-B, Taïeb A. Propranolol for Severe Hemangiomas of Infancy. N Engl J Med 2008;358:2649–51. https://doi.org/10.1056/NEJMc0708819.
[148] Christine L-L. Propranolol for Severe Hemangiomas of Infancy. N Engl J Med 2008:3.
[149] Léauté-Labrèze C, Hoeger P, Mazereeuw-Hautier J, Guibaud L, Baselga E, Posiunas G, et al. A Randomized, Controlled Trial of Oral Propranolol in Infantile Hemangioma. N Engl J Med 2015;372:735–46. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1404710.
[150] Pasquier E, André N, Street J, Chougule A, Rekhi B, Ghosh J, et al. Effective Management of Advanced Angiosarcoma by the Synergistic Combination of Propranolol and Vinblastine-based Metronomic Chemotherapy: A Bench to Bedside Study. EBioMedicine 2016;6:87–95. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.02.026.
[151] Pasquier E, Ciccolini J, Carre M, Giacometti S, Pouchy C, Montero M-P, et al. tumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast n.d.:13.
[152] Rico M, Baglioni M, Bondarenko M, Laluce NC, Rozados V, André N, et al. Metformin and propranolol combination prevents cancer progression and metastasis in different breast cancer models. Oncotarget 2017;8:2874–89. https://doi.org/10.18632/oncotarget.13760.
[153] Pasquier E, Street J, Pouchy C, Carre M, Gifford AJ, Murray J, et al. β-blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic

mechanisms in neuroblastoma. Br J Cancer 2013;108:2485–94. https://doi.org/10.1038/bjc.2013.205.
[154] Li Y-Q, Zheng Z, Liu Q-X, Lu X, Zhou D, Zhang J, et al. Repositioning of Antiparasitic Drugs for Tumor Treatment. Front Oncol 2021;11:670804. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.670804.
[155] Huang H, He Q, Guo B, Xu X, Wu Y, Li X. Progress in Redirecting Antiparasitic Drugs for Cancer Treatment. Drug Des Devel Ther 2021;15:2747–67. https://doi.org/10.2147/DDDT.S308973.
[156] Nath J, Paul R, Ghosh SK, Paul J, Singha B, Debnath N. Drug repurposing and relabeling for cancer therapy: Emerging benzimidazole antihelminthics with potent anticancer effects. Life Sci 2020;258:118189. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118189.
[157] Vítovcová B, Skarková V, Havelek R, Soukup J, Pande A, Caltová K, et al. Flubendazole exhibits anti-glioblastoma effect by inhibiting STAT3 and promoting cell cycle arrest. Sci Rep 2023;13:5993. https://doi.org/10.1038/s41598-023-33047-9.
[158] Michaelis M, Agha B, Rothweiler F, Löschmann N, Voges Y, Mittelbronn M, et al. Identification of flubendazole as potential anti-neuroblastoma compound in a large cell line screen. Sci Rep 2015;5:8202. https://doi.org/10.1038/srep08202.
[159] Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D, Sciences naturelles. Gallica 1976. https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k5748513m (accessed August 27, 2024).
[160] Mukhopadhyay T, Sasaki J, Ramesh R, Roth JA. Mebendazole Elicits a Potent Antitumor Effect on Human Cancer Cell Lines Both in Vitro and in Vivo n.d.
[161] Rushworth LK, Hewit K, Munnings-Tomes S, Somani S, James D, Shanks E, et al. Repurposing screen identifies mebendazole as a clinical candidate to synergise with docetaxel for prostate cancer treatment. Br J Cancer 2020;122:517–27. https://doi.org/10.1038/s41416-019-0681-5.
[162] Hegazy SK, El-Azab GA, Zakaria F, Mostafa MF, El-Ghoneimy RA. Mebendazole; from an anti-parasitic drug to a promising candidate for drug repurposing in colorectal cancer. Life Sci 2022;299:120536. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120536.
[163] Martarelli D, Pompei P, Baldi C, Mazzoni G. Mebendazole inhibits growth of human adrenocortical carcinoma cell lines implanted in nude mice. Cancer Chemother Pharmacol 2008;61:809–17. https://doi.org/10.1007/s00280-007-0538-0.
[164] Walf-Vorderwülbecke V, Pearce K, Brooks T, Hubank M, van den Heuvel-Eibrink MM, Zwaan CM, et al. Targeting acute myeloid leukemia by drug-induced c-MYB degradation. Leukemia 2018;32:882–9. https://doi.org/10.1038/leu.2017.317.
[165] Smith C, Touzart A, Simonin M, Tran-Quang C, Hypolite G, Latiri M, et al. Harnessing the MYB-dependent TAL1 5'super-enhancer for targeted therapy in T-ALL. Mol Cancer 2023;22:12. https://doi.org/10.1186/s12943-022-01701-x.
[166] Joe NS, Wang Y, Oza HH, Godet I, Milki N, Riggins GJ, et al. Mebendazole Treatment Disrupts the Transcriptional Activity of Hypoxia-Inducible Factors 1 and 2 in Breast Cancer Cells. Cancers 2023;15:1330. https://doi.org/10.3390/cancers15041330.
[167] Bai R-Y, Staedtke V, Aprhys CM, Gallia GL, Riggins GJ. Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. Neuro-Oncol 2011;13:974–82. https://doi.org/10.1093/neuonc/nor077.
[168] De Witt M, Gamble A, Hanson D, Markowitz D, Powell C, Al Dimassi S, et al. Repurposing Mebendazole as a Replacement for Vincristine for the Treatment of

Brain Tumors. Mol Med 2017;23:50–6. https://doi.org/10.2119/molmed.2017.00011.
[169] Jo SB, Sung SJ, Choi HS, Park J-S, Hong Y-K, Joe YA. Modulation of Autophagy is a Potential Strategy for Enhancing the Anti-Tumor Effect of Mebendazole in Glioblastoma Cells. Biomol Ther 2022;30:616. https://doi.org/10.4062/biomolther.2022.122.
[170] Patil VM, Bhelekar A, Menon N, Bhattacharjee A, Simha V, Abhinav R, et al. Reverse swing-M, phase 1 study of repurposing mebendazole in recurrent high-grade glioma. Cancer Med 2020;9:4676. https://doi.org/10.1002/cam4.3094.
[171] Gallia GL, Holdhoff M, Brem H, Joshi AD, Hann CL, Bai R-Y, et al. Mebendazole and temozolomide in patients with newly diagnosed high-grade gliomas: results of a phase 1 clinical trial. Neuro-Oncol Adv 2020;3:vdaa154. https://doi.org/10.1093/noajnl/vdaa154.
[172] Skibinski CG, Williamson T, Riggins GJ. Mebendazole and radiation in combination increase survival through anticancer mechanisms in an intracranial rodent model of malignant meningioma. J Neurooncol 2018;140:529–38. https://doi.org/10.1007/s11060-018-03009-7.
[173] Ariey-Bonnet J, Carrasco K, Le Grand M, Hoffer L, Betzi S, Feracci M, et al. In silico molecular target prediction unveils mebendazole as a potent MAPK14 inhibitor. Mol Oncol 2020;14:3083–99. https://doi.org/10.1002/1878-0261.12810.
[174] Kudaravalli S, den Hollander P, Mani SA. Role of p38 MAP kinase in cancer stem cells and metastasis. Oncogene 2022;41:3177–85. https://doi.org/10.1038/s41388-022-02329-3.
[175] Bodhinayake I, Symons M, Boockvar JA. Repurposing Mebendazole for the Treatment of Medulloblastoma. Neurosurgery 2015;76:N15. https://doi.org/10.1227/01.neu.0000460594.93803.cb.
[176] Bai R-Y, Staedtke V, Rudin CM, Bunz F, Riggins GJ. Effective treatment of diverse medulloblastoma models with mebendazole and its impact on tumor angiogenesis. Neuro-Oncol 2015;17:545–54. https://doi.org/10.1093/neuonc/nou234.
[177] Larsen AR, Bai R-Y, Chung JH, Borodovsky A, Rudin CM, Riggins GJ, et al. Repurposing the Antihelmintic Mebendazole as a Hedgehog Inhibitor. Mol Cancer Ther 2015;14:3–13. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0755-T.
[178] Liste des spécialités en accès dérogatoire - Vermox. ANSM n.d. https://ansm.sante.fr/tableau-acces-derogatoire/vermox (accessed August 27, 2024).
[179] Du M, Zhang L, Scorsone KA, Woodfield SE, Zage PE. Nifurtimox Is Effective Against Neural Tumor Cells and Is Synergistic with Buthionine Sulfoximine. Sci Rep 2016;6:27458. https://doi.org/10.1038/srep27458.
[180] Eslin D, Zage PE, Bergendahl G, Lewis E, Roberts W, Kraveka J, et al. A phase II trial of nifurtimox combined with topotecan and cyclophosphamide for refractory or relapsed neuroblastoma and medulloblastoma. Int J Cancer 2023;153:1026–34. https://doi.org/10.1002/ijc.34569.
[181] Ehteda A, Simon S, Franshaw L, Giorgi FM, Liu J, Joshi S, et al. Dual targeting of the epigenome via FACT complex and histone deacetylase is a potent treatment strategy for DIPG. Cell Rep 2021;35. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108994.
[182] Mudassar F, Shen H, O'Neill G, Hau E. Targeting tumor hypoxia and mitochondrial metabolism with anti-parasitic drugs to improve radiation response in high-grade gliomas. J Exp Clin Cancer Res 2020;39:208. https://doi.org/10.1186/s13046-020-01724-6.

[183] Aroosa M, Malik JA, Ahmed S, Bender O, Ahemad N, Anwar S. The evidence for repurposing anti-epileptic drugs to target cancer. Mol Biol Rep 2023;50:7667–80. https://doi.org/10.1007/s11033-023-08568-1.
[184] Shu Q, Antalffy B, Su JMF, Adesina A, Ou C-N, Pietsch T, et al. Valproic Acid Prolongs Survival Time of Severe Combined Immunodeficient Mice Bearing Intracerebellar Orthotopic Medulloblastoma Xenografts. Clin Cancer Res 2006;12:4687–94. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2849.
[185] Wu K-C, Liao K-S, Yeh L-R, Wang Y-K. Drug Repurposing: The Mechanisms and Signaling Pathways of Anti-Cancer Effects of Anesthetics. Biomedicines 2022;10:1589. https://doi.org/10.3390/biomedicines10071589.
[186] Gupta A, Kumar A, Abrari A, Patir R, Vaishya S. Successful Use of Dose Dense Neoadjuvant Chemotherapy and Sodium Valproate with Minimal Toxicity in an Infant with Medulloblastoma in Extremely Poor General Condition. World Neurosurg 2016;93:485.e1-485.e5. https://doi.org/10.1016/j.wneu.2016.07.044.
[187] Killick-Cole CL, Singleton WGB, Bienemann AS, Asby DJ, Wyatt MJ, Boulter LJ, et al. Repurposing the anti-epileptic drug sodium valproate as an adjuvant treatment for diffuse intrinsic pontine glioma. PLoS ONE 2017;12:e0176855. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176855.
[188] Szychot E, Walker D, Collins P, Hyare H, Shankar A, Bienemann A, et al. Clinical experience of convection-enhanced delivery (CED) of carboplatin and sodium valproate into the pons for the treatment of diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG) in children and young adults after radiotherapy. Int J Clin Oncol 2021;26:647–58. https://doi.org/10.1007/s10147-020-01853-0.
[189] Leblond P, Massimino M, English M, Ritzmann TA, Gandola L, Calaminus G, et al. Toward Improved Diagnosis Accuracy and Treatment of Children, Adolescents, and Young Adults With Ependymoma: The International SIOP Ependymoma II Protocol. Front Neurol 2022;13:887544. https://doi.org/10.3389/fneur.2022.887544.
[190] Grant CE, Flis AL, Ryan BM. Understanding the role of dopamine in cancer: past, present and future. Carcinogenesis 2022;43:517. https://doi.org/10.1093/carcin/bgac045.
[191] Elmaci I, Altinoz MA. Targeting the cellular schizophrenia. Likely employment of the antipsychotic agent pimozide in treatment of refractory cancers and glioblastoma. Crit Rev Oncol Hematol 2018;128:96–109. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.06.004.
[192] Zielke S, Meyer N, Mari M, Abou-El-Ardat K, Reggiori F, van Wijk SJL, et al. Loperamide, pimozide, and STF-62247 trigger autophagy-dependent cell death in glioblastoma cells. Cell Death Dis 2018;9:994. https://doi.org/10.1038/s41419-018-1003-1.
[193] Meyer N, Henkel L, Linder B, Zielke S, Tascher G, Trautmann S, et al. Autophagy activation, lipotoxicity and lysosomal membrane permeabilization synergize to promote pimozide- and loperamide-induced glioma cell death. Autophagy n.d.;17:3424–43. https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1874208.
[194] Ranjan A, Kaushik I, Srivastava SK. Pimozide Suppresses the Growth of Brain Tumors by Targeting STAT3-Mediated Autophagy. Cells 2020;9:2141. https://doi.org/10.3390/cells9092141.
[195] Wang Y, Wang X, Wang K, Qi J, Zhang Y, Wang X, et al. Chronic stress accelerates glioblastoma progression via DRD2/ERK/β-catenin axis and Dopamine/ERK/TH positive feedback loop. J Exp Clin Cancer Res CR 2023;42:161. https://doi.org/10.1186/s13046-023-02728-8.

[196] Oliva CR, Zhang W, Langford C, Suto MJ, Griguer CE. Repositioning chlorpromazine for treating chemoresistant glioma through the inhibition of cytochrome c oxidase bearing the COX4-1 regulatory subunit. Oncotarget 2017;8:37568–83. https://doi.org/10.18632/oncotarget.17247.
[197] Matteoni S, Matarrese P, Ascione B, Ricci-Vitiani L, Pallini R, Villani V, et al. Chlorpromazine induces cytotoxic autophagy in glioblastoma cells via endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response. J Exp Clin Cancer Res CR 2021;40:347. https://doi.org/10.1186/s13046-021-02144-w.
[198] Abbruzzese C, Matteoni S, Matarrese P, Signore M, Ascione B, Iessi E, et al. Chlorpromazine affects glioblastoma bioenergetics by interfering with pyruvate kinase M2. Cell Death Dis 2023;14:821. https://doi.org/10.1038/s41419-023-06353-3.
[199] Kurita J, Hirao Y, Nakano H, Fukunishi Y, Nishimura Y. Sertraline, chlorprothixene, and chlorpromazine characteristically interact with the REST-binding site of the corepressor mSin3, showing medulloblastoma cell growth inhibitory activities. Sci Rep 2018;8:13763. https://doi.org/10.1038/s41598-018-31852-1.
[200] Pace A, Lombardi G, Villani V, Benincasa D, Abbruzzese C, Cestonaro I, et al. Efficacy and safety of chlorpromazine as an adjuvant therapy for glioblastoma in patients with unmethylated MGMT gene promoter: RACTAC, a phase II multicenter trial. Front Oncol 2023;13:1320710. https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1320710.
[201] Otręba M, Stojko J, Kabała-Dzik A, Rzepecka-Stojko A. Perphenazine and prochlorperazine decrease glioblastoma U-87 MG cell migration and invasion: Analysis of the ABCB1 and ABCG2 transporters, E-cadherin, α-tubulin and integrins (α3, α5, and β1) levels. Oncol Lett 2022;23:182. https://doi.org/10.3892/ol.2022.13302.
[202] Liu Z, Zhang R, Sun Z, Yao J, Yao P, Chen X, et al. Identification of hub genes and small-molecule compounds in medulloblastoma by integrated bioinformatic analyses. PeerJ 2020;8:e8670. https://doi.org/10.7717/peerj.8670.
[203] Cheng H-W, Liang Y-H, Kuo Y-L, Chuu C-P, Lin C-Y, Lee M-H, et al. Identification of thioridazine, an antipsychotic drug, as an antiglioblastoma and anticancer stem cell agent using public gene expression data. Cell Death Dis 2015;6:e1753. https://doi.org/10.1038/cddis.2015.77.
[204] Huang X, He Y, Dubuc AM, Hashizume R, Zhang W, Reimand J, et al. EAG2 potassium channel with evolutionarily conserved function as a brain tumor target. Nat Neurosci 2015;18:1236–46. https://doi.org/10.1038/nn.4088.
[205] Lee S, Weiss T, Bühler M, Mena J, Lottenbach Z, Wegmann R, et al. High-throughput identification of repurposable neuroactive drugs with potent anti-glioblastoma activity. Nat Med 2024:1–13. https://doi.org/10.1038/s41591-024-03224-y.
[206] He J-J, Zhang W-H, Liu S-L, Chen Y-F, Liao C-X, Shen Q-Q, et al. Activation of β-adrenergic receptor promotes cellular proliferation in human glioblastoma. Oncol Lett 2017;14:3846–52. https://doi.org/10.3892/ol.2017.6653.
[207] Faudone G, Bischoff-Kont I, Rachor L, Willems S, Zhubi R, Kaiser A, et al. Propranolol Activates the Orphan Nuclear Receptor TLX to Counteract Proliferation and Migration of Glioblastoma Cells. J Med Chem 2021;64:8727–38. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00733.
[208] Ammons DT, Guth A, Rozental AJ, Kurihara J, Marolf AJ, Chow L, et al. Reprogramming the Canine Glioma Microenvironment with Tumor Vaccination plus Oral Losartan and Propranolol Induces Objective Responses. Cancer Res Commun 2022;2:1657. https://doi.org/10.1158/2767-9764.CRC-22-0388.

[209] Joseph JV, Conroy S, Pavlov K, Sontakke P, Tomar T, Eggens-Meijer E, et al. Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1α–ZEB1 axis. Cancer Lett 2015;359:107–16. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.01.010.
[210] ZEB1 Promotes Invasion in Human Fetal Neural Stem Cells and Hypoxic Glioma Neurospheres n.d. https://doi.org/10.1111/bpa.12240.
[211] Huang L, Injac SG, Cui K, Braun F, Lin Q, Du Y, et al. Systems biology-based drug repositioning identifies digoxin as a potential therapy for groups 3 and 4 medulloblastoma. Sci Transl Med 2018;10:eaat0150. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat0150.
[212] Berges R, Denicolai E, Tchoghandjian A, Baeza-Kallee N, Honore S, Figarella-Branger D, et al. Proscillaridin A exerts anti-tumor effects through GSK3β activation and alteration of microtubule dynamics in glioblastoma. Cell Death Dis 2018;9:984. https://doi.org/10.1038/s41419-018-1018-7.
[213] Denicolaï E, Baeza-Kallee N, Tchoghandjian A, Carré M, Colin C, Jiglaire CJ, et al. Proscillaridin A is cytotoxic for glioblastoma cell lines and controls tumor xenograft growth in vivo. Oncotarget 2014;5:10934–48. https://doi.org/10.18632/oncotarget.2541.
[214] Jiang W, Hu J-W, He X-R, Jin W-L, He X-Y. Statins: a repurposed drug to fight cancer. J Exp Clin Cancer Res CR 2021;40:241. https://doi.org/10.1186/s13046-021-02041-2.
[215] Afshari AR, Mollazadeh H, Henney NC, Jamialahmad T, Sahebkar A. Effects of statins on brain tumors: a review. Semin Cancer Biol 2021;73:116–33. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.08.002.
[216] Gordon RE, Zhang L, Peri S, Kuo Y-M, Du F, Egleston BL, et al. Statins Synergize with Hedgehog Pathway inhibitors for Treatment of Medulloblastoma. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res 2018;24:1375–88. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2923.
[217] Cash T, Jonus HC, Tsvetkova M, Beumer JH, Sadanand A, Lee JY, et al. A phase 1 study of simvastatin in combination with topotecan and cyclophosphamide in pediatric patients with relapsed and/or refractory solid and CNS tumors. Pediatr Blood Cancer 2023;70:e30405. https://doi.org/10.1002/pbc.30405.
[218] Leblond P, Tresch-Bruneel E, Probst A, Néant N, Solas C, Sterin A, et al. Phase I Study of a Combination of Fluvastatin and Celecoxib in Children with Relapsing/Refractory Low-Grade or High-Grade Glioma (FLUVABREX). Cancers 2023;15:2020. https://doi.org/10.3390/cancers15072020.
[219] Loubière C, Dirat B, Tanti J-F, Bost F. Metformine et cancer : de nouvelles perspectives pour un ancien médicament. Ann Endocrinol 2013;74:130–6. https://doi.org/10.1016/j.ando.2013.02.002.
[220] Evans JMM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. BMJ 2005;330:1304–5. https://doi.org/10.1136/bmj.38415.708634.F7.
[221] Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, Alessi DR, Morris AD, Evans JMM. New Users of Metformin Are at Low Risk of Incident Cancer: A cohort study among people with type 2 diabetes. Diabetes Care 2009;32:1620–5. https://doi.org/10.2337/dc08-2175.
[222] Fang H, Wang L, Yu L, Shen F, Yang Z, Yang Y, et al. Effects of metformin on Sonic hedgehog subgroup medulloblastoma progression: In vitro and in vivo studies. Front Pharmacol 2022;13:928853. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.928853.

[223] Di Magno L, Manni S, Di Pastena F, Coni S, Macone A, Cairoli S, et al. Phenformin Inhibits Hedgehog-Dependent Tumor Growth through a Complex I-Independent Redox/Corepressor Module. Cell Rep 2020;30:1735-1752.e7. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.024.
[224] Panwalkar P, Tamrazi B, Dang D, Chung C, Sweha S, Natarajan SK, et al. Targeting integrated epigenetic and metabolic pathways in lethal childhood PFA ependymomas. Sci Transl Med 2021;13:eabc0497. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc0497.
[225] Noch EK, Palma LN, Yim I, Bullen N, Qiu Y, Ravichandran H, et al. Insulin feedback is a targetable resistance mechanism of PI3K inhibition in glioblastoma. Neuro-Oncol 2023;25:2165–76. https://doi.org/10.1093/neuonc/noad117.
[226] Duchatel RJ, Jackson ER, Parackal SG, Kiltschewskij D, Findlay IJ, Mannan A, et al. PI3K/mTOR is a therapeutically targetable genetic dependency in diffuse intrinsic pontine glioma 2024. https://doi.org/10.1172/JCI170329.
[227] Fuentes-Fayos AC, G-García ME, Pérez-Gómez JM, Montero-Hidalgo AJ, Martín-Colom J, Doval-Rosa C, et al. Metformin and simvastatin exert additive antitumour effects in glioblastoma via senescence-state: clinical and translational evidence. eBioMedicine 2023;90:104484. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104484.
[228] Shen H, Yu M, Tsoli M, Chang C, Joshi S, Liu J, et al. Targeting reduced mitochondrial DNA quantity as a therapeutic approach in pediatric high-grade gliomas. Neuro-Oncol 2020;22:139–51. https://doi.org/10.1093/neuonc/noz140.
[229] Yuen N, Szulc-Lerch KU, Li Y-Q, Morshead CM, Mabbott DJ, Wong CS, et al. Metformin effects on brain development following cranial irradiation in a mouse model. Neuro-Oncol 2021;23:1523–36. https://doi.org/10.1093/neuonc/noab131.
[230] Ayoub R, Ruddy RM, Cox E, Oyefiade A, Derkach D, Laughlin S, et al. Assessment of cognitive and neural recovery in survivors of pediatric brain tumors in a pilot clinical trial using metformin. Nat Med 2020;26:1285–94. https://doi.org/10.1038/s41591-020-0985-2.
[231] Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF. Cyclooxygenase-2 Expression in Human Gliomas: Prognostic Significance and Molecular Correlations1. Cancer Res 2001;61:4375–81.
[232] Li J, Hao Q, Cao W, Vadgama JV, Wu Y. Celecoxib in breast cancer prevention and therapy. Cancer Manag Res 2018;10:4653–67. https://doi.org/10.2147/CMAR.S178567.
[233] Enhanced sensitivity of celecoxib in human glioblastoma cells: Induction of DNA damage leading to p53-dependent G1 cell cycle arrest and autophagy | Molecular Cancer | Full Text n.d. https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-8-66 (accessed March 22, 2024).
[234] Majchrzak-Celińska A, Misiorek JO, Kruhlenia N, Przybyl L, Kleszcz R, Rolle K, et al. COXIBs and 2,5-dimethylcelecoxib counteract the hyperactivated Wnt/β-catenin pathway and COX-2/PGE2/EP4 signaling in glioblastoma cells. BMC Cancer 2021;21:493. https://doi.org/10.1186/s12885-021-08164-1.
[235] Suzuki K, Gerelchuluun A, Hong Z, Sun L, Zenkoh J, Moritake T, et al. Celecoxib enhances radiosensitivity of hypoxic glioblastoma cells through endoplasmic reticulum stress. Neuro-Oncol 2013;15:1186–99. https://doi.org/10.1093/neuonc/not062.

[236] Chen K-H, Hsu C-C, Song W-S, Huang C-S, Tsai C-C, Kuo C-D, et al. Celecoxib enhances radiosensitivity in medulloblastoma-derived CD133-positive cells. Childs Nerv Syst 2010;26:1605–12. https://doi.org/10.1007/s00381-010-1190-2.
[237] Stempak D, Gammon J, Halton J, Moghrabi A, Koren G, Baruchel S. A Pilot Pharmacokinetic and Antiangiogenic Biomarker Study of Celecoxib and Low-dose Metronomic Vinblastine or Cyclophosphamide in Pediatric Recurrent Solid Tumors. J Pediatr Hematol Oncol 2006;28:720. https://doi.org/10.1097/01.mph.0000243657.64056.c3.
[238] Göbel C, Breitenbuecher F, Kalkavan H, Hähnel PS, Kasper S, Hoffarth S, et al. Functional expression cloning identifies COX-2 as a suppressor of antigen-specific cancer immunity. Cell Death Dis 2014;5:e1568–e1568. https://doi.org/10.1038/cddis.2014.531.
[239] Berland M, Padovani L, Rome A, Pech-Gourg G, Figarella-Branger D, André N. Sustained Complete Response to Metronomic Chemotherapy in a Child with Refractory Atypical Teratoid Rhabdoid Tumor: A Case Report. Front Pharmacol 2017;8:792. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00792.
[240] Verschuur A, Heng-Maillard M-A, Dory-Lautrec P, Truillet R, Jouve E, Chastagner P, et al. Metronomic Four-Drug Regimen Has Anti-tumor Activity in Pediatric Low-Grade Glioma; The Results of a Phase II Clinical Trial. Front Pharmacol 2018;9.
[241] Peyrl A, Chocholous M, Sabel M, Lassaletta A, Sterba J, Leblond P, et al. Sustained Survival Benefit in Recurrent Medulloblastoma by a Metronomic Antiangiogenic Regimen: A Nonrandomized Controlled Trial. JAMA Oncol 2023. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2023.4437.
[242] Heine VM, Priller M, Ling J, Rowitch DH, Schüller U. Dexamethasone Destabilizes Nmyc to Inhibit the Growth of Hedgehog-Associated Medulloblastoma. Cancer Res 2010;70:5220–5. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0554.
[243] Tsvankin V, Hashizume R, Katagi H, Herndon JE, Lascola C, Venkatraman TN, et al. ABC Transporter Inhibition Plus Dexamethasone Enhances the Efficacy of Convection Enhanced Delivery in H3.3K27M Mutant Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. Neurosurgery 2020;86:742–51. https://doi.org/10.1093/neuros/nyz212.
[244] Gorodezki D, Zipfel J, Queudeville M, Holzer U, Bevot A, Schittenhelm J, et al. Evaluating the safety of perioperative dexamethasone treatment: A retrospective analysis of a single center pediatric low-grade glioma cohort. Int J Cancer 2023;152:1875–83. https://doi.org/10.1002/ijc.34399.
[245] Afshari AR, Sanati M, Aminyavari S, Shakeri F, Bibak B, Keshavarzi Z, et al. Advantages and drawbacks of dexamethasone in glioblastoma multiforme. Crit Rev Oncol Hematol 2022;172:103625. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103625.
[246] Watson SS, Zomer A, Fournier N, Lourenco J, Quadroni M, Chryplewicz A, et al. Fibrotic response to anti-CSF-1R therapy potentiates glioblastoma recurrence. Cancer Cell 2024;42:1507-1527.e11. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2024.08.012.
[247] Lewison EF. Spontaneous regression of breast cancer. Prog Clin Biol Res 1977;12:47–53.
[248] Iljin K, Ketola K, Vainio P, Halonen P, Kohonen P, Fey V, et al. High-Throughput Cell-Based Screening of 4910 Known Drugs and Drug-like Small Molecules Identifies Disulfiram as an Inhibitor of Prostate Cancer Cell Growth. Clin Cancer Res 2009;15:6070–8. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1035.
[249] Allensworth JL, Evans MK, Bertucci F, Aldrich AJ, Festa RA, Finetti P, et al. Disulfiram (DSF) acts as a copper ionophore to induce copper-dependent oxidative

stress and mediate anti-tumor efficacy in inflammatory breast cancer. Mol Oncol 2015;9:1155–68. https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.02.007.
[250] Zhang H, Chen D, Ringler J, Chen W, Cui QC, Ethier SP, et al. Disulfiram Treatment Facilitates Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition in Human Breast Cancer Cells In vitro and In vivo. Cancer Res 2010;70:10.1158/0008-5472.CAN-09–3752. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3752.
[251] Lun X, Wells JC, Grinshtein N, King JC, Hao X, Dang N-H, et al. Disulfiram when Combined with Copper Enhances the Therapeutic Effects of Temozolomide for the Treatment of Glioblastoma. Clin Cancer Res 2016;22:3860–75. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1798.
[252] Li Y, Fu S-Y, Wang L-H, Wang F-Y, Wang N-N, Cao Q, et al. Copper improves the anti-angiogenic activity of disulfiram through the EGFR/Src/VEGF pathway in gliomas. Cancer Lett 2015;369:86–96. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.029.
[253] Skrott Z, Mistrik M, Andersen KK, Friis S, Majera D, Gursky J, et al. Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adapter NPL4. Nature 2017;552:194–9. https://doi.org/10.1038/nature25016.
[254] Serra R, Zhao T, Huq S, Gorelick NL, Casaos J, Cecia A, et al. Disulfiram and copper combination therapy targets NPL4, cancer stem cells and extends survival in a medulloblastoma model. PLOS ONE 2021;16:e0251957. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251957.
[255] Terashima Y, Toda E, Itakura M, Otsuji M, Yoshinaga S, Okumura K, et al. Targeting FROUNT with disulfiram suppresses macrophage accumulation and its tumor-promoting properties. Nat Commun 2020;11. https://doi.org/10.1038/s41467-020-14338-5.
[256] Wang Q, Zhu T, Miao N, Qu Y, Wang Z, Chao Y, et al. Disulfiram bolsters T-cell anti-tumor immunity through direct activation of LCK-mediated TCR signaling. EMBO J 2022;41:e110636. https://doi.org/10.15252/embj.2022110636.
[257] Meier S, Cantilena S, Niklison Chirou MV, Anderson J, Hargrave D, Salomoni P, et al. Alcohol-abuse drug disulfiram targets pediatric glioma via MLL degradation. Cell Death Dis 2021;12:785. https://doi.org/10.1038/s41419-021-04078-9.
[258] Beaudry A, Jacques-Ricard S, Darracq A, Sgarioto N, Garcia A, García TR, et al. Repurposing disulfiram, an alcohol-abuse drug, in neuroblastoma causes KAT2A downregulation and in vivo activity with a water/oil emulsion. Sci Rep 2023;13:16443. https://doi.org/10.1038/s41598-023-43219-2.
[259] Choi SA, Choi JW, Wang K-C, Phi JH, Lee JY, Park KD, et al. Disulfiram modulates stemness and metabolism of brain tumor initiating cells in atypical teratoid/rhabdoid tumors. Neuro-Oncol 2015;17:810–21. https://doi.org/10.1093/neuonc/nou305.
[260] Lee YE, Choi SA, Kwack PA, Kim HJ, Kim IH, Wang K-C, et al. Repositioning disulfiram as a radiosensitizer against atypical teratoid/rhabdoid tumor. Neuro-Oncol 2017;19:1079–87. https://doi.org/10.1093/neuonc/now300.
[261] Jangra A, Choi SA, Yang J, Koh EJ, Phi JH, Lee JY, et al. Disulfiram potentiates the anticancer effect of cisplatin in atypical teratoid/rhabdoid tumors (AT/RT). Cancer Lett 2020;486:38–45. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.05.006.
[262] Lu Y, Pan Q, Gao W, Pu Y, Luo K, He B, et al. Leveraging disulfiram to treat cancer: Mechanisms of action, delivery strategies, and treatment regimens. Biomaterials 2022;281:121335. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121335.
[263] Werlenius K, Kinhult S, Solheim TS, Magelssen H, Löfgren D, Mudaisi M, et al. Effect of Disulfiram and Copper Plus Chemotherapy vs Chemotherapy Alone on Survival in

Patients With Recurrent Glioblastoma. JAMA Netw Open 2023;6:e234149. https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.4149.
[264] Beylerli O, Beilerli A, Shumadalova A, Wang X, Yang M, Sun H, et al. Therapeutic effect of natural polyphenols against glioblastoma. Front Cell Dev Biol 2022;10:1036809. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1036809.
[265] Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK, Aggarwal BB. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. Biotechnol Adv 2014;32:1053–64. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.004.
[266] Lee SJ, Krauthauser C, Maduskuie V, Fawcett PT, Olson JM, Rajasekaran SA. Curcumin-induced HDAC inhibition and attenuation of medulloblastoma growth in vitro and in vivo. BMC Cancer 2011;11:144. https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-144.
[267] Volmar MNM, Cheng J, Alenezi H, Richter S, Haug A, Hassan Z, et al. Cannabidiol converts NF-κB into a tumor suppressor in glioblastoma with defined antioxidative properties. Neuro-Oncol 2021;23:1898–910. https://doi.org/10.1093/neuonc/noab095.
[268] Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortés ML, del Pulgar TG, Izquierdo M, Guzmán M. Anti-tumoral action of cannabinoids: Involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. Nat Med 2000;6:313–9. https://doi.org/10.1038/73171.
[269] Blázquez C, González-Feria L, Álvarez L, Haro A, Casanova ML, Guzmán M. Cannabinoids Inhibit the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Gliomas. Cancer Res 2004;64:5617–23. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3927.
[270] Guzmán M, Duarte MJ, Blázquez C, Ravina J, Rosa MC, Galve-Roperh I, et al. A pilot clinical study of Δ9-tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme. Br J Cancer 2006;95:197–203. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603236.
[271] Messinger D, Harris MK, Cummings JR, Thomas C, Yang T, Sweha SR, et al. Therapeutic targeting of prenatal pontine ID1 signaling in diffuse midline glioma. Neuro-Oncol 2022;25:54–67. https://doi.org/10.1093/neuonc/noac141.
[272] Andradas C, Byrne J, Kuchibhotla M, Ancliffe M, Jones AC, Carline B, et al. Assessment of Cannabidiol and Δ9-Tetrahydrocannabiol in Mouse Models of Medulloblastoma and Ependymoma. Cancers 2021;13:330. https://doi.org/10.3390/cancers13020330.
[273] Andradas C, Truong A, Byrne J, Endersby R. The Role of Cannabinoids as Anticancer Agents in Pediatric Oncology. Cancers 2021;13:157. https://doi.org/10.3390/cancers13010157.
[274] Russell MD, Young AM, Karri SK. Biomarkers of Pediatric Brain Tumors. Front Pediatr 2013;1. https://doi.org/10.3389/fped.2013.00007.
[275] Gröbner SN, Worst BC, Weischenfeldt J, Buchhalter I, Kleinheinz K, Rudneva VA, et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. Nature 2018;555:321–7. https://doi.org/10.1038/nature25480.
[276] Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. Nat Med 2013;19:1584–96. https://doi.org/10.1038/nm.3407.
[277] Cınar V, Hamurcu Z, Guler A, Nurdinov N, Ozpolat B. Serotonin 5-HT7 receptor is a biomarker poor prognostic factor and induces proliferation of triple-negative breast cancer cells through FOXM1. Breast Cancer 2022;29:1106–20. https://doi.org/10.1007/s12282-022-01391-9.

[278] Tu R-H, Wu S-Z, Huang Z-N, Zhong Q, Ye Y-H, Zheng C-H, et al. Neurotransmitter Receptor HTR2B Regulates Lipid Metabolism to Inhibit Ferroptosis in Gastric Cancer. Cancer Res 2023;83:3868–85. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-23-1012.
[279] Balakrishna P, George S, Hatoum H, Mukherjee S. Serotonin Pathway in Cancer. Int J Mol Sci 2021;22:1268. https://doi.org/10.3390/ijms22031268.
[280] Di Giovanni G, De Deurwaerdère P. Serotonin research: Crossing scales and boundaries. Neuropharmacology 2020;181:108340. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108340.
[281] Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. Neuropharmacology 1999;38:1083–152. https://doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00010-6.
[282] Chen L, Huang S, Wu X, He W, Song M. Serotonin signalling in cancer: Emerging mechanisms and therapeutic opportunities. Clin Transl Med 2024;14:e1750. https://doi.org/10.1002/ctm2.1750.
[283] Julius D, Livelli TJ, Jessell TM, Axel R. Ectopic Expression of the Serotonin 1c Receptor and the Triggering of Malignant Transformation. Science 1989;244:1057–62. https://doi.org/10.1126/science.2727693.
[284] Cattaneo MG, Fesce R, Vicentini LM. Mitogenic effect of serotonin in human small cell lung carcinoma cells via both 5-HT1A and 5-HT1D receptors. Eur J Pharmacol 1995;291:209–11. https://doi.org/10.1016/0922-4106(95)90145-0.
[285] Launay J-M, Birraux G, Bondoux D, Callebert J, Choi D-S, Loric S, et al. Ras Involvement in Signal Transduction by the Serotonin 5-HT2B Receptor (∗). J Biol Chem 1996;271:3141–7. https://doi.org/10.1074/jbc.271.6.3141.
[286] Expression of serotonin receptors and role of serotonin in human prostate cancer tissue and cell lines - Dizeyi - 2004 - The Prostate - Wiley Online Library n.d. https://onlinelibrary-wiley-com.lama.univ-amu.fr/doi/10.1002/pros.10374 (accessed October 18, 2024).
[287] Kang K, Wong K-S, Fong W-P, Tsang PW-K. Metergoline-induced cell death in Candida krusei. Fungal Biol 2011;115:302–9. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.01.001.
[288] Yang C, Song G, Lim W. Methiothepin mesylate causes apoptosis of human prostate cancer cells by mediating oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Free Radic Biol Med 2020;150:12–22. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.01.187.
[289] Lee J-Y, Yang C, Lim W, Song G. Methiothepin Suppresses Human Ovarian Cancer Cell Growth by Repressing Mitochondrion-Mediated Metabolism and Inhibiting Angiogenesis In Vivo. Pharmaceutics 2020;12:686. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070686.
[290] Segui F, Daher B, Gotorbe C, Pouyssegur J, Picco V, Vucetic M. Revealing the Ferroptotic Phenotype of Medulloblastoma. J Vis Exp JoVE 2024:e66645. https://doi.org/10.3791/66645.
[291] Sighel D, Notarangelo M, Aibara S, Re A, Ricci G, Guida M, et al. Inhibition of mitochondrial translation suppresses glioblastoma stem cell growth. Cell Rep 2021;35:109024. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109024.
[292] Li C-L, Fang Z-X, Wu Z, Hou Y-Y, Wu H-T, Liu J. Repurposed itraconazole for use in the treatment of malignancies as a promising therapeutic strategy. Biomed Pharmacother 2022;154:113616. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113616.
[293] Lin M-C, Chien P-H, Wu H-Y, Chen S-T, Juan H-F, Lou P-J, et al. C1GALT1 predicts poor prognosis and is a potential therapeutic target in head and neck cancer. Oncogene 2018;37:5780–93. https://doi.org/10.1038/s41388-018-0375-0.

[294] Wang W, Dong X, Liu Y, Ni B, Sai N, You L, et al. Itraconazole exerts anti-liver cancer potential through the Wnt, PI3K/AKT/mTOR, and ROS pathways. Biomed Pharmacother 2020;131:110661. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110661.
[295] Wei X, Liu W, Wang JQ, Tang Z. "Hedgehog pathway": a potential target of itraconazole in the treatment of cancer. J Cancer Res Clin Oncol 2020;146:297–304. https://doi.org/10.1007/s00432-019-03117-5.
[296] Tsubamoto H, Inoue K, Sakata K, Ueda T, Takeyama R, Shibahara H, et al. Itraconazole Inhibits AKT/mTOR Signaling and Proliferation in Endometrial Cancer Cells. Anticancer Res 2017;37:515–9. https://doi.org/10.21873/anticanres.11343.
[297] Liang G, Liu M, Wang Q, Shen Y, Mei H, Li D, et al. Itraconazole exerts its anti-melanoma effect by suppressing Hedgehog, Wnt, and PI3K/mTOR signaling pathways. Oncotarget 2017;8:28510–25. https://doi.org/10.18632/oncotarget.15324.
[298] Park AK, Lee JY, Cheong H, Ramaswamy V, Park S-H, Kool M, et al. Subgroup-specific prognostic signaling and metabolic pathways in pediatric medulloblastoma. BMC Cancer 2019;19:571. https://doi.org/10.1186/s12885-019-5742-x.
[299] JUCKER. Progress in Drug Research / Fortschritte der Arzneimittelforschung / Progrès des recherches pharmaceutiques: Tropical Diseases II / Tropische Krankheiten II / Maladies tropicales II. Birkhäuser; 2013.
[300] Ishii I, Harada Y, Kasahara T. Reprofiling a classical anthelmintic, pyrvinium pamoate, as an anti-cancer drug targeting mitochondrial respiration. Front Oncol 2012;2. https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00137.
[301] Thorne CA, Hanson AJ, Schneider J, Tahinci E, Orton D, Cselenyi CS, et al. Small-molecule inhibition of Wnt signaling through activation of casein kinase 1α. Nat Chem Biol 2010;6:829–36. https://doi.org/10.1038/nchembio.453.
[302] Shen C, Nayak A, Neitzel LR, Yang F, Li B, Williams CH, et al. The Casein kinase 1α agonist pyrvinium attenuates Wnt-mediated CK1α degradation via interaction with the E3 ubiquitin ligase component Cereblon. J Biol Chem 2022;298:102227. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102227.
[303] Li B, Fei DL, Flaveny CA, Dahmane N, Baubet V, Wang Z, et al. Pyrvinium attenuates Hedgehog signaling downstream of Smoothened. Cancer Res 2014;74:4811–21. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0317.
[304] Fan J, Reid RR, He T-C. Pyrvinium doubles against WNT-driven cancer. J Biol Chem 2022;298. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102479.
[305] Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. Nat Rev Clin Oncol 2018;15:81–94. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166.
[306] Cordani M, Dando I, Ambrosini G, González-Menéndez P. Signaling, cancer cell plasticity, and intratumor heterogeneity. Cell Commun Signal CCS 2024;22:255. https://doi.org/10.1186/s12964-024-01643-5.
[307] Ou A, Yung WKA, Majd N. Molecular Mechanisms of Treatment Resistance in Glioblastoma. Int J Mol Sci 2020;22:351. https://doi.org/10.3390/ijms22010351.
[308] Lei Z-N, Tian Q, Teng Q-X, Wurpel JND, Zeng L, Pan Y, et al. Understanding and targeting resistance mechanisms in cancer. MedComm 2023;4:e265. https://doi.org/10.1002/mco2.265.
[309] Calzetta L, Page C, Matera MG, Cazzola M, Rogliani P. Drug-Drug Interactions and Synergy: From Pharmacological Models to Clinical Application. Pharmacol Rev 2024;76:1159–220. https://doi.org/10.1124/pharmrev.124.000951.

[310] Yang J, Kang H, Lyu L, Xiong W, Hu Y. A target map of clinical combination therapies in oncology: an analysis of clinicaltrials.gov. Discov Oncol 2023;14:151. https://doi.org/10.1007/s12672-023-00758-4.
[311] Lang PY, Nanjangud GJ, Sokolsky-Papkov M, Shaw C, Hwang D, Parker JS, et al. ATR maintains chromosomal integrity during postnatal cerebellar neurogenesis and is required for medulloblastoma formation. Dev Camb Engl 2016;143:4038. https://doi.org/10.1242/dev.139022.
[312] Vlatkovic T, Veldwijk MR, Giordano FA, Herskind C. Targeting Cell Cycle Checkpoint Kinases to Overcome Intrinsic Radioresistance in Brain Tumor Cells. Cancers 2022;14:701. https://doi.org/10.3390/cancers14030701.
[313] Hauge S, Eek Mariampillai A, Rødland GE, Bay LTE, Landsverk HB, Syljuåsen RG. Expanding roles of cell cycle checkpoint inhibitors in radiation oncology. Int J Radiat Biol 2023;99:941–50. https://doi.org/10.1080/09553002.2021.1913529.
[314] Zubair T, Bandyopadhyay D. Small Molecule EGFR Inhibitors as Anti-Cancer Agents: Discovery, Mechanisms of Action, and Opportunities. Int J Mol Sci 2023;24:2651. https://doi.org/10.3390/ijms24032651.
[315] Wang Z-Q, Zhang Z-C, Wu Y-Y, Pi Y-N, Lou S-H, Liu T-B, et al. Bromodomain and extraterminal (BET) proteins: biological functions, diseases and targeted therapy. Signal Transduct Target Ther 2023;8:1–26. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01647-6.
[316] Gouda MA, Subbiah V. Precision oncology for BRAF-mutant cancers with BRAF and MEK inhibitors: from melanoma to tissue-agnostic therapy. ESMO Open 2023;8:100788. https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2023.100788.
[317] Thompson EM, Keir ST, Venkatraman T, Lascola C, Yeom KW, Nixon AB, et al. The role of angiogenesis in Group 3 medulloblastoma pathogenesis and survival. Neuro-Oncol 2017;19:1217. https://doi.org/10.1093/neuonc/nox033.
[318] Penco-Campillo M, Pages G, Martial S. Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Medulloblastoma Development. Biology 2023;12:1028. https://doi.org/10.3390/biology12071028.
[319] Zhao M, Wang X, Fu X, Zhang Z. Bevacizumab and stereotactic radiosurgery achieved complete response for pediatric recurrent medulloblastoma. J Cancer Res Ther 2018;14:S789. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_990_15.
[320] Lu KV, Bergers G. Mechanisms of evasive resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma. CNS Oncol 2012;2:49. https://doi.org/10.2217/cns.12.36.
[321] Peyrl A, Chocholous M, Sabel M, Lassaletta A, Sterba J, Leblond P, et al. Sustained Survival Benefit in Recurrent Medulloblastoma by a Metronomic Antiangiogenic Regimen: A Nonrandomized Controlled Trial. JAMA Oncol 2023;9:1688–95. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2023.4437.
[322] Pagnuzzi-Boncompagni M, Picco V, Vial V, Planas-Bielsa V, Vandenberghe A, Daubon T, et al. Antiangiogenic Compound Axitinib Demonstrates Low Toxicity and Antitumoral Effects against Medulloblastoma. Cancers 2021;14:70. https://doi.org/10.3390/cancers14010070.
[323] Deng H, Chen Y, Li P, Hang Q, Zhang P, Jin Y, et al. PI3K/AKT/mTOR pathway, hypoxia, and glucose metabolism: Potential targets to overcome radioresistance in small cell lung cancer. Cancer Pathog Ther 2023;1:56–66. https://doi.org/10.1016/j.cpt.2022.09.001.
[324] Chow Z, Johnson J, Chauhan A, Izumi T, Cavnar M, Weiss H, et al. PI3K/mTOR Dual Inhibitor PF-04691502 Is a Schedule-Dependent Radiosensitizer for

Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. Cells 2021;10:1261. https://doi.org/10.3390/cells10051261.
[325] Chang L, Graham PH, Hao J, Ni J, Bucci J, Cozzi PJ, et al. PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors enhance radiosensitivity in radioresistant prostate cancer cells through inducing apoptosis, reducing autophagy, suppressing NHEJ and HR repair pathways. Cell Death Dis 2014;5:e1437. https://doi.org/10.1038/cddis.2014.415.
[326] Horn D, Hess J, Freier K, Hoffmann J, Freudlsperger C. Targeting EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling enhances radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. Expert Opin Ther Targets 2015;19:795–805. https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1012157.
[327] Jiao Y, Cao F, Liu H. Radiation-induced Cell Death and Its Mechanisms. Health Phys 2022;123:376. https://doi.org/10.1097/HP.0000000000001601.
[328] O'Steen S, Green DJ, Gopal AK, Orozco JJ, Kenoyer AL, Lin Y, et al. Venetoclax Synergizes with Radiotherapy for Treatment of B-cell Lymphomas. Cancer Res 2017;77:3885. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0082.
[329] Ritter V, Krautter F, Klein D, Jendrossek V, Rudner J. Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-263 overcomes hypoxia-driven radioresistence and improves radiotherapy. Cell Death Dis 2021;12:1–11. https://doi.org/10.1038/s41419-021-03971-7.
[330] Madhavan K, Balakrishnan I, Lakshmanachetty S, Pierce A, Sanford B, Fosmire S, et al. Venetoclax Cooperates with Ionizing Radiation to Attenuate Diffuse Midline Glioma Tumor Growth. Clin Cancer Res 2022;28:2409–24. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-4002.
[331] Penco-Campillo M, Molina C, Piris P, Soufi N, Carré M, Pagnuzzi-Boncompagni M, et al. Targeting of the ELR+CXCL/CXCR1/2 Pathway Is a Relevant Strategy for the Treatment of Paediatric Medulloblastomas. Cells 2022;11:3933. https://doi.org/10.3390/cells11233933.
[332] Echavidre W, Durivault J, Gotorbe C, Blanchard T, Pagnuzzi M, Vial V, et al. Integrin-αvβ3 is a Therapeutically Targetable Fundamental Factor in Medulloblastoma Tumorigenicity and Radioresistance. Cancer Res Commun 2023;3:2483. https://doi.org/10.1158/2767-9764.CRC-23-0298.
[333] Montana M, Montero V, Khoumeri O, Vanelle P. Quinoxaline Derivatives as Antiviral Agents: A Systematic Review. Molecules 2020;25:2784. https://doi.org/10.3390/molecules25122784.
[334] Quinoxaline Moiety: A Potential Scaffold against Mycobacterium tuberculosis n.d. https://www.mdpi.com/1420-3049/26/16/4742 (accessed October 26, 2024).
[335] Montero V, Montana M, Carré M, Vanelle P. Quinoxaline derivatives: Recent discoveries and development strategies towards anticancer agents. Eur J Med Chem 2024;271:116360. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116360.
[336] Montana M, Correard F, Khoumeri O, Esteve M-A, Terme T, Vanelle P. Synthesis of New Quinoxalines Containing an Oxirane Ring by the TDAE Strategy and in Vitro Evaluation in Neuroblastoma Cell Lines. Molecules 2014;19:14987. https://doi.org/10.3390/molecules190914987.
[337] Montana M, Mathias F, Terme T, Vanelle P. Antitumoral activity of quinoxaline derivatives: A systematic review. Eur J Med Chem 2019;163:136–47. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.059.
[338] Montero V, Montana M, Khoumeri O, Correard F, Estève M-A, Vanelle P. Synthesis, In Vitro Antiproliferative Activity, and In Silico Evaluation of Novel Oxiranyl-Quinoxaline Derivatives. Pharmaceuticals 2022;15:781. https://doi.org/10.3390/ph15070781.

[339] Grand ML, Rovini A, Bourgarel-Rey V, Honore S, Bastonero S, Braguer D, et al. ROS-mediated EB1 phosphorylation through Akt/GSK3β pathway: implication in cancer cell response to microtubule-targeting agents. Oncotarget 2014;5:3408. https://doi.org/10.18632/oncotarget.1982.
[340] Bondarenko M, Grand ML, Shaked Y, Raviv Z, Chapuisat G, Carrère C, et al. Metronomic Chemotherapy Modulates Clonal Interactions to Prevent Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. Cancers 2021;13:2239. https://doi.org/10.3390/cancers13092239.
[341] Rossi M, Talbot J, Piris P, Grand ML, Montero M-P, Matteudi M, et al. Beta-blockers disrupt mitochondrial bioenergetics and increase radiotherapy efficacy independently of beta-adrenergic receptors in medulloblastoma. eBioMedicine 2022;82:104149. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104149.
[342] Piris P, Buric D, Yamasaki T, Huchedé P, Rossi M, Matteudi M, et al. Conditional generation of free radicals by selective activation of alkoxyamines: towards more effective and less toxic targeting of brain tumors. Chem Sci 2023;14:7988. https://doi.org/10.1039/d3sc01315d.
[343] Joshi S, Srivastava R. Effect of “magic chlorine” in drug discovery: an in silico approach. RSC Adv 2023;13:34922–34. https://doi.org/10.1039/D3RA06638J.
[344] Liu R, Bian Y, Liu L, Liu L, Liu X, Ma S. Molecular pathways associated with oxidative stress and their potential applications in radiotherapy (Review). Int J Mol Med 2022;49:65. https://doi.org/10.3892/ijmm.2022.5121.
[345] Hu J, Li Y, Li H, Shi F, Xie L, Zhao L, et al. Targeting Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1-mediated high oxidative stress suppresses EBV lytic reactivation and sensitizes tumors to radiation therapy. Theranostics 2020;10:11921. https://doi.org/10.7150/thno.46006.
[346] Zheng Z, Su J, Bao X, Wang H, Bian C, Zhao Q, et al. Mechanisms and applications of radiation-induced oxidative stress in regulating cancer immunotherapy. Front Immunol 2023;14:1247268. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1247268.

Annexes

JOC The Journal of Organic Chemistry

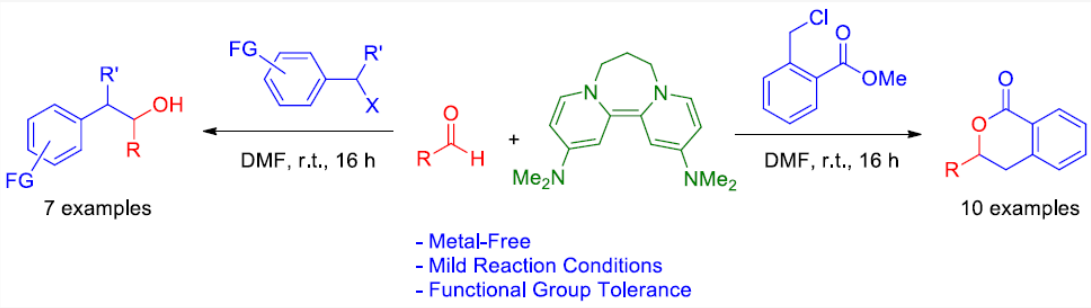
pubs.acs.org/joc Note

Metal-Free Addition of Benzyl Halides to Aldehydes Using Super Electron Donors: Access to 3,4-Dihydroisocoumarins and 1,2-Diarylethanols

Cédric Spitz,* Mélanie Matteudi, Guillaume Tintori, Julie Broggi, Thierry Terme, and Patrice Vanelle*

Cite This: https://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.0c02374 Read Online

ACCESS | Metrics & More | Article Recommendations | Supporting Information



ABSTRACT: We report here the intermolecular metal-free addition reaction of functionalized benzyl halides to aldehydes using a super electron donor (SED). The metal-free and mild conditions allowed the formation of 3,4-dihydroisocoumarins and 1,2-diarylethanols with unprecedented functional group tolerance.

Downloaded via AIX-MARSEILLE UNIV on November 25, 2020 at 11:11:51 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

The 3,4-dihydroisocoumarin scaffold is found in several natural products and is known for its antimalarial, antituberculous, antifungal, and antiproliferative properties.[1] The spatially related 1,2-diarylethanols are also structural motifs in natural products and biologically important molecules.[2] Thus, numerous strategies have been investigated to allow the construction of these skeletons.[3] Recently, the synthesis of a 3,4-dihydroisocoumarin was allowed by a metal-free intramolecular direct oxidative lactonization of carboxylic acids using iodine and a photoredox catalyst.[4] However, most methodologies synthesizing 3,4-dihydroisocoumarins or 1,2-diarylethanols still need the use of strong bases or organometallics. One major limitation of these bases and these reactive organometallics of Mg, Li, Zn, Mn, and Ti is their poor functional group tolerance.

Tetrakis(dimethylamino)ethylene (TDAE) is an organic reducing agent, which reacts with halogenated derivatives to generate a carbanion under mild conditions.[5] It was for a long period the most used organic electron donor (OED) thanks to its commercial availability. A comprehensive study of the reducing reactivity of TDAE revealed that a strong electron-withdrawing group (e.g., NO_2 or CN) is required on the benzylic substrate to reductively cleave the carbon−halogen bond. This constitutes the major drawback of this strategy. Since 2005, Murphy and co-workers developed new reducing agents with neutral organic structures and exceptionally negative redox potentials[6] (Figure 1). More recently, Dyker and co-workers, with a tetra(iminophosphorano)-substituted



Figure 1. Example of organic electron donors.

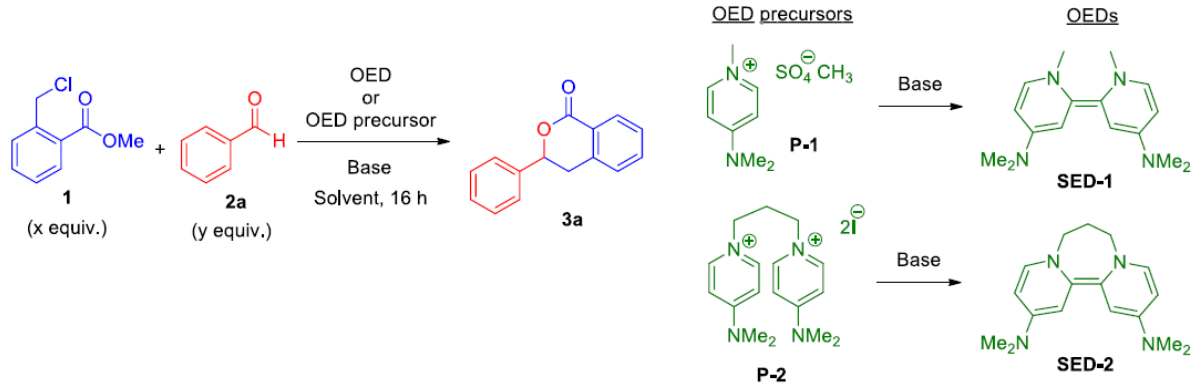
bispyridinylidene,[7] and Wenger and co-workers, using photoexcitation of TDAE,[8] improved even more the reduction potential of organic electron donors.

These "super electron donors" (SEDs) are capable of spontaneous single electron transfer (SET) and double electron transfer (DET), affording the formation of radicals or anions from nonactivated benzyl halides, aryl halides, sulfones, triflate esters, and triflamides.[9] They operate under mild conditions and are selective and tolerant to functional groups (nitro, carbonyl, ester, cyano, etc.) compared to metallic reducers. Furthermore, the use of expensive metal derivatives that cause environmental and economic problems can be avoided. This approach resulted in excellent reducing

Received: October 7, 2020

ACS Publications © XXXX American Chemical Society

Table 1. Optimization of Reaction Conditions



entry	*x* equiv	*y* equiv	OED or OED precursor (equiv)	base (equiv)	solvent [M]	*T* (°C)	yield (%)
1	1	3	TDAE (3)		DMF [0.04]	rt	0
2	1	3	P-1 (3)	KHMDS (3)	DMF [0.04]	rt	39
3	1	3	P-1 (3)	KHMDS (3)	MeCN [0.04]	rt	traces
4	1	3	P-1 (3)	KHMDS (3)	THF [0.04]	rt	traces
5	1	3	P-1 (10)	KHMDS (10)	DMF [0.04]	rt	20
6	1	3	P-1 (2)	KHMDS (2)	DMF [0.04]	rt	11
7	2	1	P-1 (4)	KHMDS (4)	DMF [0.04]	rt	12
8	1	3	P-1 (3)	KHMDS (3)	DMF [0.2]	rt	42
9	1	3	P-1 (3)	KHMDS (3)	DMF [0.2]	0	18
10	1	3	P-1 (3)	KHMDS (3)	DMF [0.2]	40	traces
11	1	3	P-1 (3)	NaH (3)	DMF [0.2]	rt	40
12	1	3	P-2 (1.5)	KHMDS (3)	DMF [0.2]	rt	45
13	1	3	SED-2 (1.5)		DMF [0.2]	rt	64

agents that could be used for organic transformations. However, despite this important gain in reduction power, the reactivity of SEDs has been scarcely studied for carbon−carbon bond-forming reactions. SEDs have been recently used as initiators of base-induced homolytic aromatic substitution (BHAS) for the carbon−carbon coupling of haloarenes and arenes.[10] However, in the role of reducer for the generation of key active species for addition reactions to electrophiles, only intramolecular reactions have been hitherto described.[6,11]

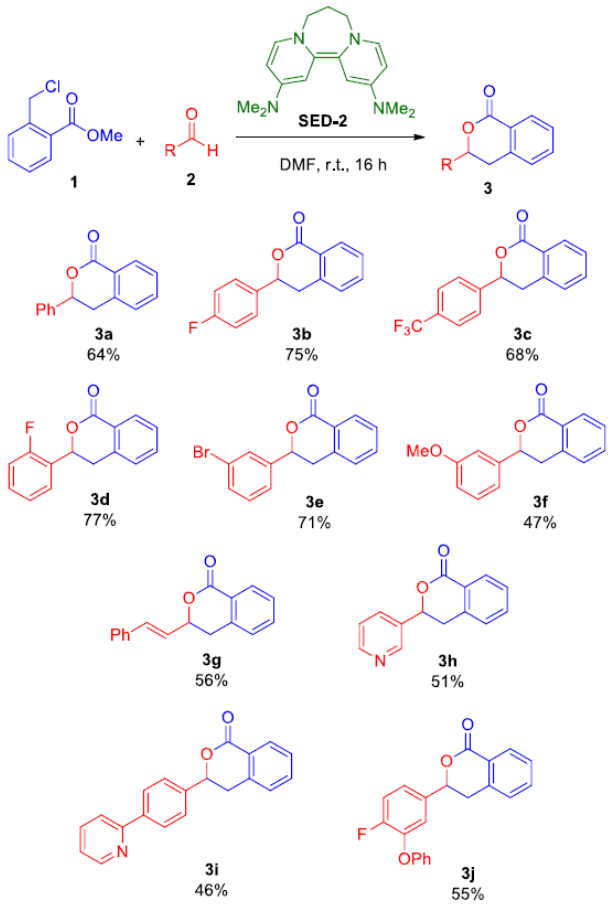
Our aim was to determine if these SEDs could allow intermolecular addition reactions of diversely functionalized benzyl halides to aldehydes under metal-free and mild conditions.

The reaction between methyl 2-(chloromethyl)benzoate **1** and benzaldehyde **2a** in the presence of an OED was selected as a benchmark reaction (Table 1). As expected, the commercially available TDAE was not powerful enough to reduce the benzyl chloride derivative **1** (Table 1, entry 1). The low reactivity of methyl 2-(chloromethyl)benzoate **1** to TDAE compared to nitro or cyano benzyl halides can be explained by the lower electron-withdrawing effect of ester compared to NO_2 or CN. This renders the methyl 2-(chloromethyl)-benzoate **1** more difficult to reduce compared to nitro or cyano benzyl halides. Interestingly, the more powerful **SED-1**, *in situ* generated from pyridinium precursor salt **P-1** and a strong base like KHMDS, allowed the reduction of the methyl 2-(chloromethyl)benzoate **1** in DMF. The nucleophilic addition of the benzylic anion to benzaldehyde **2a**, followed by intramolecular cyclization of the alcoholate on the ester, gave the 3,4-dihydroisocoumarin **3a** in 39% yield (entry 2). This nucleophilic addition on an aldehyde moiety of the reduced benzylic species confirms the generation of an anion by DET rather than a benzyl radical. Indeed, radical addition to carbonyls is a reversible process due to the formation of a thermodynamically unfavorable alkoxy radical.[12] We next investigated the effect of the solvent, and only traces of product were obtained in acetonitrile and tetrahydrofuran (entries 3 and 4). Using more equivalents (entry 5) or fewer equivalents (entry 6) of **P-1** and KHMDS were detrimental to the reaction. Using methyl 2-(chloromethyl)benzoate **1** in excess compared to benzaldehyde **2a** was not beneficial (entry 7). The amount of solvent slightly influenced the reaction (entry 2 vs entry 8). Changing the temperature of the reaction (entries 9 and 10) showed that room temperature advantageously remains the best choice. No significant influence of the base was observed using either KHMDS or NaH (entry 8 vs entry 11). **SED-2**, *in situ* generated from pyridinium precursor salt **P-2** and KHMDS, was also tested in the reaction, and a slightly better yield was obtained (45%, entry 12). Finally, directly using the isolated **SED-2** gave an improved yield of 64% (entry 13).

With the optimized conditions in hand, we next investigated the generality and scope of this reaction with a series of aldehydes **2a**−**j** (Scheme 1). To our delight, moderate to good yields of 3,4-dihydroisocoumarins were obtained with both electron-poor (**3b**−**e**) and electron-rich substituents (**3f**). The position of the substituent seemed to have little effect on the reaction. The use of cinnamaldehyde allowed the formation of the 3,4-dihydroisocoumarin **3g** resulting from a regioselective 1,2-addition; no 1,4-addition was observed. Interestingly, the reaction conditions are tolerant with the formation of isocoumarins **3h** and **3i**, respectively, from heteroaromatic aldehydes **2h** and **2i**. Finally, a disubstituted aldehyde **2j** allowed the formation of the 3,4-dihydroisocoumarin **3j** with a

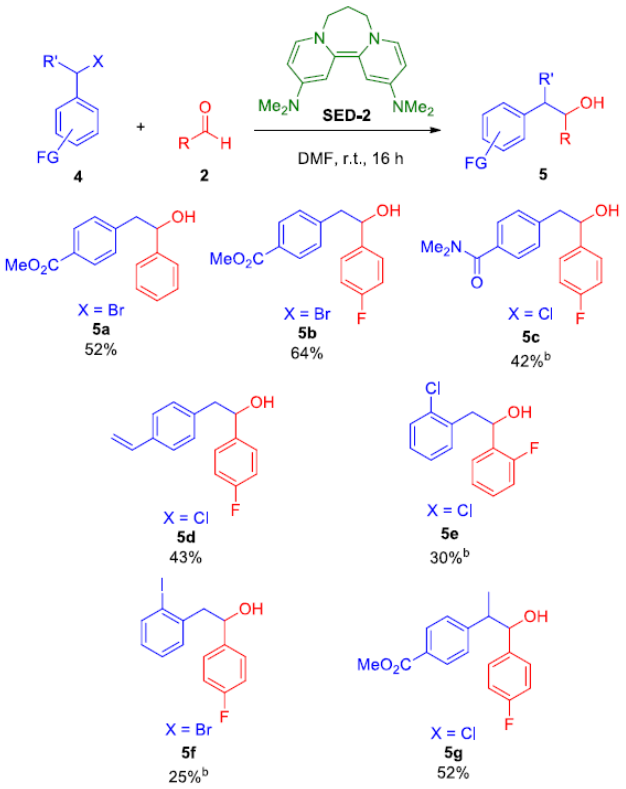
https://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.0c02374
J. Org. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

Scheme 1. Scope with Diverse Aldehyde Derivatives[a]



[a]Reaction conditions: **1** (0.2 mmol), **2** (0.6 mmol), and **SED-2** (0.3 mmol) in DMF (1 mL) were stirred at rt for 16 h under an inert atmosphere.

Scheme 2. Scope with Diverse Benzyl Halide Derivatives[a]



[a]Reaction conditions: **4** (0.2 mmol), **2** (0.6 mmol), and **SED-2** (0.3 mmol) in DMF (1 mL) were stirred at rt for 16 h under an inert atmosphere. [b]10 equiv of aldehyde was used.

55% yield. Thus, we showed that our reaction conditions are compatible with an ester moiety on the benzyl chloride derivative and diversely functionalized aldehydes. The intermolecular addition of the metal-free generated benzylic anion, followed by cyclization, allowed the synthesis of ten 3,4-dihydroisocoumarins in one-step.

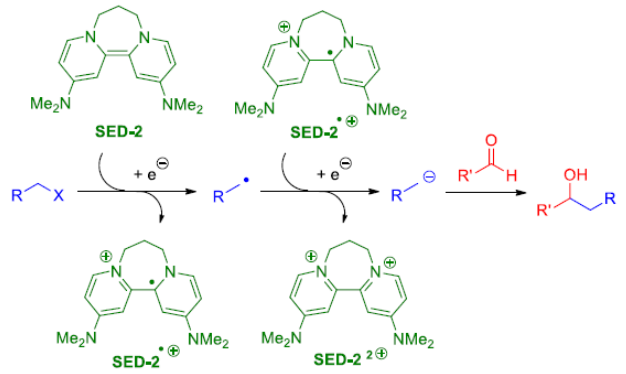
To further outline the utility of this method, we next examined the scope of the reaction with diversely functionalized benzyl halide derivatives (Scheme 2). Shifting the ester moiety from the *ortho* position to the *para* position allowed the synthesis of alcohol **5a** (52% yield) from benzaldehyde **2a** and alcohol **5b** (64% yield) from 4-fluorobenzaldehyde **2b**. Contrary to our previous observations with methyl 2-(chloromethyl)benzoate **1**, the intramolecular cyclization of the alcoholate on the ester was not observed with methyl 4-(bromomethyl)benzoate because, as expected, the alcoholate was too far to attack the ester. To our delight, an amide moiety was well tolerated and allowed the synthesis of alcohol **5c** in 42% yield. To the best of our knowledge, the addition of a benzyl halide derivative, possessing an amide function, on an aldehyde was never described. Interestingly, the super electron donor **SED-2** was very selective as it only reduced the chlorine atom of the 4-vinylbenzyl chloride to give alcohol **5d** in 43% yield. The addition on the double bond was not observed, so it confirmed that DET was rapid and that the benzyl radical lifetime is short. The challenging 2-chlorobenzyl chloride was also compatible with our metal-free reaction conditions as the benzylic chlorine atom was preferentially reduced to allow the synthesis of alcohol **5e** in 30% yield. The even more challenging 2-iodobenzyl bromide, as it was described that SDEs can reduce iodoaryl derivatives,[6a] allowed the alcohol **5f** in a modest 25% yield. Interestingly, a secondary benzylic halide was compatible with our strategy, and alcohol **5g** was obtained with a 52% yield. Here, we showed that diversely functionalized benzyl halide reagents can be selectively reduced by a super electron donor to form the corresponding benzylic carbanion under mild conditions. This anion can then be added to aldehydes to give the corresponding 1,2-diarylethanols.

To support a two consecutive electron transfer mechanism (Scheme 3), the reaction between methyl 2-(chloromethyl)-benzoate **1**, 4-fluorobenzaldehyde, and **SED-2** was carried out in the presence of TEMPO. The isocoumarin **3b** was obtained in only 17% yield, which confirms the intermediacy of a benzyl radical. Furthermore, the second electron transfer to form the anion was supposed to be fast as no complete inhibition was observed with TEMPO, and no addition on the double bond was observed during the synthesis of alcohol **5d**.

In conclusion, the intermolecular addition of functionalized benzyl halides to aldehydes using a super electron donor, **SED-2**, is documented. Thus, a range of 3,4-dihydroisocoumarins and 1,2-diarylethanols was obtained with unprecedented functional group tolerance using metal-free and mild conditions.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.0c02374
J. Org. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

Scheme 3. Proposed DET Reaction Mechanism



EXPERIMENTAL SECTION

General Information. All reactions were carried out under an argon atmosphere using oven-dried glassware. All solvents and chemicals were used as purchased without further purification. Melting points were determined on a Büchi melting point B-540 apparatus and are uncorrected. HRMS analyses were performed on a Synapt G2 HDMS (Waters) with a TOF mass analyzer type at the spectropole of Aix-Marseille University. Both ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were determined on a Bruker Avance NEO 400 MHz Nanobay spectrometer and on a Bruker AC 250 spectrometer at the Service de RMN de la Faculté de Pharmacie de Marseille of the Aix-Marseille University. The ^{1}H and the ^{13}C chemical shifts are reported from $CDCl_3$ peaks: ^{1}H (7.26 ppm) and ^{13}C (77.16 ppm). Multiplicities are represented by the following notations: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, a more complex multiplet or overlapping multiplets. The following adsorbents were used for column chromatography: silica gel 60 (particle size 0.063−0.200 mm, 70−230 mesh ASTM). TLC was performed on 5 × 10 cm aluminum plates coated with silica gel 60 F254 in an appropriate solvent.

Preparation of P-1. To a solution of DMAP (1.22 g, 10 mmol) in toluene (10 mL) was added dimethylsulfate (0.95 mL, 10 mmol) dropwise, and the reaction mixture was stirred at 100 °C for 3 h. After being cooled, the product was filtered, washed with toluene (20 mL), and dried *in vacuo* to give a white solid (2.21 g, 89%): mp 242−244 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.21 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 6.90 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.21 (s, 6H); $^{13}C\{^{1}H\}$ NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 156.2, 143.3, 108.2, 54.6, 45.0, 40.3; HRMS (ESI) m/z $[2C^{+} + A^{-}]^{+}$ calcd for $[C_{17}H_{29}N_4O_4S]^{+}$ 385.1904, found 385.1901.

Preparation of SED-2. The procedure, previously reported for the synthesis of SED-2,[11] was slightly modified: in the glovebox, sodium hydride (1.1 g, 46 mmol, 5 equiv) was added to a solution of the precursor bis-pyridinium salt[11] in extra dry *N*,*N*-dimethylformamide (20 mL). After 2 h of stirring at room temperature, the reaction mixture was filtrated to remove excess sodium hydride. The gray residue was washed with diethyl ether, and solvents were removed under a vacuum. Diethyl ether was then added in several fractions to redissolve the dark purple bispyridinylidene SED-2. The mixture was filtrated to remove excess sodium iodide. Evaporation of the filtrate afforded SED-2 as a well-defined dark purple solid (2.42 g, 92%). SED-2 was stable under an inert atmosphere and stored in a glovebox. Spectral data match those previously reported.[11]

General Procedures for the Synthesis of Isocoumarins 3a−j or Alcohols 5a−g. *General Procedure A: When the Benzyl Halide Derivative Is Liquid.* In a glovebox, to SED-2 (85 mg, 0.3 mmol, 1.5 equiv) was added dry DMF (1 mL). The previous solution was taken out of the glovebox, and the aldehyde (0.6 mmol, 3 equiv) was added, followed by the benzyl halide (0.2 mmol, 1 equiv) under an nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. Water was added (5 mL), and a 1 M solution of HCl was added until pH = 1. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 × 10 mL). The combined organic layer was dried over Na_2SO_4. Evaporation of the solvent furnished the crude product. Purification by silica gel chromatography afforded pure isocoumarins 3a−j or alcohols 5d−e.

General Procedure B: When the Benzyl Halide Derivative Is Solid. In a glovebox, to SED-2 (85 mg, 0.3 mmol, 1.5 equiv) was added dry DMF (0.5 mL), and 0.5 mL of dry DMF was put in another vial. The solid benzyl halide (0.2 mmol, 1 equiv) was weighed in a Schlenk glass and solubilized with the previous 0.5 mL of dry DMF under a nitrogen atmosphere. The vial containing SED-2 in DMF was taken out of the glovebox, and the aldehyde (0.6 mmol, 3 equiv) was added followed by the benzyl halide solution. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. Water was added (5 mL), and a 1 M solution of HCl was added until pH = 1. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 × 10 mL). The combined organic layer was dried over Na_2SO_4. Evaporation of the solvent furnished the crude product. Purification by silica gel chromatography afforded pure alcohols 5a−c and 5f−g.

*3-Phenyl-3,4-dihydroisocoumarin (**3a**).* Following general procedure A with 2-(chloromethyl)benzoate and benzaldehyde, 3a was purified by PE/EtOAc (90:10): 28.8 mg, 64% yield; white solid; mp 87−89 °C; ^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 8.16 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.61−7.31 (m, 8H), 5.57 (dd, J = 11.9, 3.2 Hz, 1H), 3.36 (dd, J = 16.4, 12.0 Hz, 1H), 3.14 (dd, J = 16.5, 3.2 Hz, 1H). Spectral data match those previously reported.[13]

*3-(4-Fluorophenyl)-3,4-dihydroisocoumarin (**3b**).* Following general procedure A with 2-(chloromethyl)benzoate and 4-fluorobenzaldehyde, 3b was purified by PE/EtOAc (90:10): 36.2 mg, 75% yield; pale-yellow solid; mp 84−86 °C; ^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 8.15 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 7.58 (td, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H), 7.52−7.39 (m, 3H), 7.29 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.18−7.05 (m, 2H), 5.54 (dd, J = 12.1, 3.2 Hz, 1H), 3.32 (dd, J = 16.5, 12.1 Hz, 1H), 3.11 (dd, J = 16.4, 3.2 Hz, 1H) Spectral data match those previously reported.[14]

*3-(4-(Trifluoromethyl)phenyl)-3,4-dihydroisocoumarin (**3c**).* Following general procedure A with 2-(chloromethyl)benzoate and 4-(trifluoromethyl)benzaldehyde, 3c was purified by PE/EtOAc (90:10): 39.7 mg, 68% yield; white solid; mp 106−108 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.17 (dd, J = 7.8, 0.9 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.62 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.59 (dd, J = 7.5, 1.3 Hz, 1H), 7.46 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.63 (dd, J = 11.9, 3.3 Hz, 1H), 3.31 (dd, J = 16.4, 11.9 Hz, 1H), 3.17 (dd, J = 16.4, 3.3 Hz, 1H); $^{13}C\{^{1}H\}$ NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 165.0, 142.6, 138.5, 134.3, 131.4 (C−F_3, $^{2}J_{C-F}$ = 33.3 Hz), 131.1 (C−F_3, $^{2}J_{C-F}$ = 33.3 Hz), 130.8 (C−F_3, $^{2}J_{C-F}$ = 33.3 Hz), 130.7, 130.5 (C−F_3, $^{2}J_{C-F}$ = 33.3 Hz), 128.3, 128.1 (C−F_3, $^{1}J_{C-F}$ = 272.7 Hz), 127.5, 126.5, 125.92 (C−F_3, $^{3}J_{C-F}$ = 3.37 Hz), 125.89 (C−F_3, $^{3}J_{C-F}$ = 3.37 Hz) 125.85 (C−F_3, $^{3}J_{C-F}$ = 3.37 Hz), 125.81 (C−F_3, $^{3}J_{C-F}$ = 3.37 Hz), 125.4 (C−F_3, $^{1}J_{C-F}$ = 272.7 Hz), 125.1, 122.7 (C−F_3, $^{1}J_{C-F}$ = 272.7 Hz), 120.0 (C−F_3, $^{1}J_{C-F}$ = 272.7 Hz), 79.1, 35.7; HRMS (ESI) m/z $[M + H]^{+}$ calcd for $[C_{16}H_{12}O_2F_3]^{+}$ 293.0784, found 293.0782.

*3-(2-Fluorophenyl)-3,4-dihydroisocoumarin (**3d**).* Following general procedure A with 2-(chloromethyl)benzoate and 2-fluorobenzaldehyde, 3d was purified by PE/EtOAc (90:10): 37.4 mg, 77% yield; pale-yellow solid; mp 85−87 °C; ^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 8.16 (dd, J = 7.7, 1.1 Hz, 1H), 7.69−7.54 (m, 2H), 7.46 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.38−7.32 (m, 1H), 7.29 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.25−7.20 (m, 1H), 7.13−7.05 (m, 1H), 5.87 (dd, J = 11.6, 3.6 Hz, 1H), 3.31 (dd, J = 16.4, 11.6 Hz, 1H), 3.17 (dd, J = 16.4, 3.6 Hz, 1H); $^{13}C\{^{1}H\}$ NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 165.3, 161.2 (C−F, $^{1}J_{C-F}$ = 219.9 Hz), 157.7 (C−F, $^{1}J_{C-F}$ = 219.9 Hz), 139.0, 134.1, 130.6, 130.3 (C−F, $^{3}J_{C-F}$ = 8.2 Hz), 130.2 (C−F, $^{3}J_{C-F}$ = 8.2 Hz), 128.1, 127.73 (C−F, $^{4}J_{C-F}$ = 3.2 Hz), 127.68 (C−F, $^{4}J_{C-F}$ = 3.2 Hz), 127.5, 126.2 (C−F, $^{2}J_{C-F}$ = 12.6 Hz), 126.0 (C−F, $^{2}J_{C-F}$ = 12.6 Hz), 125.1, 124.71 (C−F, $^{3}J_{C-F}$ = 3.5 Hz), 124.65 (C−F, $^{3}J_{C-F}$ = 3.5 Hz), 115.8 (C−F, $^{2}J_{C-F}$ = 21.4 Hz), 115.5 (C−F, $^{2}J_{C-F}$ = 21.4 Hz), 74.27 (C−F, $^{4}J_{C-F}$ = 3.4 Hz), 74.21 (C−F, $^{3}J_{C-F}$ = 3.4 Hz), 34.7 (C−F, $^{4}J_{C-F}$ = 1.4 Hz); HRMS (ESI) m/z $[M + H]^{+}$ calcd for $[C_{15}H_{12}O_2F]^{+}$ 243.0816, found 243.0815.

*3-(3-Bromophenyl)-3,4-dihydroisocoumarin (**3e**).* Following general procedure A with 2-(chloromethyl)benzoate and 3-bromobenzaldehyde, 3e was purified by PE/EtOAc (90:10): 42.8 mg, 71%

https://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.0c02374
J. Org. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

yield; white solid; mp 113−115 °C; ^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 8.15 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.66−7.55 (m, 2H), 7.52−7.39 (m, 3H), 7.32−7.27 (m, 2H), 5.52 (dd, J = 11.8, 3.4 Hz, 1H), 3.30 (dd, J = 16.4, 11.8 Hz, 1H), 3.13 (dd, J = 16.4, 3.4 Hz, 1H). Spectral data match those previously reported.[3d]

*3-(3-Methoxyphenyl)-3,4-dihydroisocoumarin (**3f**).* Following general procedure A with 2-(chloromethyl)benzoate and 3-methoxybenzaldehyde, **3f** was purified by PE/EtOAc (90:10): 24.1 mg, 47% yield; white solid; mp 98−99 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.16 (dd, J = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 7.57 (td, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H), 7.43 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.32 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.05−7.03 (m, 2H), 6.91 (ddd, J = 8.3, 2.5, 0.9 Hz, 1H), 5.54 (dd, J = 12.0, 3.2 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.34 (dd, J = 16.4, 12.0 Hz, 1H), 3.14 (dd, J = 16.4, 3.2 Hz, 1H). Spectral data match those previously reported.[15]

*3-Styryl-3,4-dihydroisocoumarin (**3g**).* Following general procedure A with 2-(chloromethyl)benzoate and cinnamaldehyde, **3g** was purified by PE/EtOAc (90:10): 28.2 mg, 56% yield; white solid; mp 73−75 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.13 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.56 (td, J = 7.5, 1.0 Hz, 1H), 7.46−7.27 (m, 7H), 6.79 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 6.34 (dd, J = 16.0, 6.4 Hz, 1H), 5.21 (td, J = 9.4, 4.7 Hz, 1H), 3.19 (dd, J = 16.3, 10.3 Hz, 1H), 3.11 (dd, J = 16.3, 4.0 Hz, 1H). Spectral data match those previously reported.[13]

*3-(Pyridin-3-yl)-3,4-dihydroisocoumarin (**3h**).* Following general procedure A with 2-(chloromethyl)benzoate and 3-pyridinecarboxaldehyde, **3h** was purified by PE/EtOAc (from 50:50 to 20:80): 22.9 mg, 51% yield; white solid; mp 80−82 °C; ^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 8.74−8.60 (m, 2H), 8.14 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.65−7.53 (m, 1H), 7.46 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.42−7.34 (m, 1H), 7.30 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 5.61 (dd, J = 11.9, 3.3 Hz, 1H), 3.35 (dd, J = 16.3, 12.0 Hz, 1H), 3.16 (dd, J = 16.4, 3.3 Hz, 1H); ^{13}C{^{1}H} NMR (63 MHz, $CDCl_3$) δ 164.9, 150.2, 147.8, 138.4, 134.34, 134.29, 134.1, 130.7, 128.3, 127.5, 125.0, 123.8, 77.8, 35.4; HRMS (ESI) m/z [M + H]$^+$ calcd for $[C_{14}H_{12}NO_2]^+$ 226.0863, found 226.0862.

*3-(4-(Pyridin-2-yl)phenyl)-3,4-dihydroisocoumarin (**3i**).* Following general procedure A with 2-(chloromethyl)benzoate and 4-(pyridin-2-yl)benzaldehyde, **3i** was purified by PE/EtOAc (from 90:10 to 80:20): 27.5 mg, 46% yield; white solid; mp 107−109 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.72 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 8.17 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.06 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.82−7.75 (m, 2H), 7.62−7.56 (m, 3H), 7.44 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.32−7.27 (m, 2H), 5.64 (dd, J = 11.8, 3.2 Hz, 1H), 3.37 (dd, J = 16.4, 11.9 Hz, 1H), 3.19 (dd, J = 16.5, 3.2 Hz, 1H); ^{13}C{^{1}H} NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 165.4, 156.8, 149.7, 139.6, 139.5, 139.0, 137.2, 134.1, 130.6, 128.1, 127.5, 127.4, 126.6, 125.3, 122.6, 120.9, 79.7, 35.7; HRMS (ESI) m/z [M + H]$^+$ calcd for $[C_{20}H_{16}NO_2]^+$ 302.1176, found 302.1172.

*3-(4-Fluoro-3-phenoxyphenyl)-3,4-dihydroisocoumarin (**3j**).* Following general procedure A with 2-(chloromethyl)benzoate and 4-fluoro-3-phenoxybenzaldehyde, **3j** was purified by PE/EtOAc (90:10): 36.6 mg, 55% yield; white solid; mp 88−90 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.11 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.55 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.41 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.32 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 7.28−7.14 (m, 4H), 7.10 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 5.46 (dd, J = 12.0, 2.9 Hz, 1H), 3.27 (dd, J = 16.3, 12.1 Hz, 1H), 3.08 (dd, J = 16.4, 3.0 Hz, 1H); ^{13}C{^{1}H} NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 165.1, 157.1, 155.6 (C−F, $^1J_{C-F}$ = 251.5 Hz), 153.1 (C−F, $^1J_{C-F}$ = 251.5 Hz), 144.2 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 11.7 Hz), 144.1 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 11.7 Hz), 138.7, 135.60 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 3.7 Hz), 135.57 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 3.7 Hz), 134.2, 130.6, 130.0, 128.1, 127.5, 125.0, 123.6, 122.7 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 7.2 Hz), 122.6 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 7.2 Hz), 119.83 (C−F, $^4J_{C-F}$ = 1.2 Hz), 119.82 (C−F, $^4J_{C-F}$ = 1.2 Hz), 117.6, 117.6 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 20.1 Hz), 117.4 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 20.1 Hz), 79.1, 35.6; HRMS (ESI) m/z [M + H]$^+$ calcd for $[C_{21}H_{16}O_3F]^+$ 335.1078, found 335.1074.

*Methyl 4-(2-Hydroxy-2-phenylethyl)benzoate (**5a**).* Following general procedure B with methyl 4-(bromomethyl)benzoate and benzaldehyde, **5a** was purified by PE/EtOAc (from 90:10 to 80:20): 26.7 mg, 52% yield; yellow solid; mp 75−77 °C; ^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.99 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.38−7.29 (m, 5H), 7.25 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.96 (m, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.17−3.06 (m, 2H), 2.15 (br s, 1H). Spectral data match those previously reported.[16]

*Methyl 4-(2-(4-Fluorophenyl)-2-hydroxyethyl)benzoate (**5b**).* Following general procedure B with methyl 4-(bromomethyl)-benzoate and 4-fluorobenzaldehyde, **5b** was purified by PE/EtOAc (from 90:10 to 80:20): 35.0 mg, 64% yield; white solid; mp 114−116 °C;^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.94 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.30−7.19 (m, 4H), 7.07−6.97 (m, 2H), 4.94−4.89 (m, 1H), 3.90 (s, 6H), 3.08−3.04 (m, 2H), 2.01 (s, 1H). Spectral data match those previously reported.[17]

*4-(2-(4-Fluorophenyl)-2-hydroxyethyl)-N,N-dimethylbenzamide (**5c**).* Following general procedure B with 4-(chloromethyl)-*N*,*N*-dimethylbenzamide and 4-fluorobenzaldehyde (10 equiv), **5c** was purified by PE/EtOAc (from 50:50 to 30:70): 24.2 mg, 42% yield; white solid; mp 96−98 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.34 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.31−7.27 (m, 2H), 7.18 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.03−6.99 (m, 2H), 4.90−4.86 (m, 1H), 3.15−2.95 (m, 8H), 1.87 (br s, 1H); ^{13}C{^{1}H} NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 171.7, 163.6 (C−F, $^1J_{C-F}$ = 246.4 Hz), 161.2 (C−F, $^1J_{C-F}$ = 246.4 Hz), 139.6, 139.49 (C−F, $^4J_{C-F}$ = 3.0 Hz), 139.46 (C−F, $^4J_{C-F}$ = 3.0 Hz), 134.7, 129.6, 127.74 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 8.1 Hz), 127.66 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 8.1 Hz), 127.5, 115.5 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 21.2 Hz), 115.3 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 21.2 Hz), 74.7, 46.0, 39.7, 35.5; HRMS (ESI) m/z [M + Na]$^+$ calcd for $[C_{17}H_{18}NO_2FNa]^+$ 310.1214, found 310.1208.

*1-(4-Fluorophenyl)-2-(4-vinylphenyl)ethanol (**5d**).* Following general procedure A with 4-vinylbenzyl chloride and 4-fluorobenzaldehyde, **5d** was purified by PE/EtOAc (from 95:5 to 85:15): 20.7 mg, 43% yield; yellow solid; mp 59−61 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.35−7.29 (m, 4H), 7.12 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.05−7.00 (m, 2H), 6.70 (dd, J = 17.6, 10.9 Hz, 1H), 5.72 (dd, J = 17.6, 0.9 Hz, 1H), 5.23 (dd, J = 10.9, 0.8 Hz, 1H), 4.88 (dd, J = 7.7, 5.6 Hz, 1H), 3.00−2.97 (m, 2H), 1.95 (br s, 1H); ^{13}C{^{1}H} NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 163.6 (C−F, $^1J_{C-F}$ = 246.4 Hz), 161.1 (C−F, $^1J_{C-F}$ = 246.4 Hz), 139.59 (C−F, $^4J_{C-F}$ = 3.0 Hz), 139.56 (C−F, $^4J_{C-F}$ = 3.0 Hz), 137.4, 136.6, 136.3, 129.8, 127.74 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 8.1 Hz), 127.66 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 8.1 Hz), 126.5, 115.5 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 22.2 Hz), 115.3 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 22.2 Hz), 113.7, 74.8, 46.0; HRMS (ESI) m/z [M + Na]$^+$ calcd for $[C_{16}H_{15}OFNa]^+$ 265.0999, found 265.0996.

*2-(2-Chlorophenyl)-1-(2-fluorophenyl)ethanol (**5e**).* Following general procedure A with 2-chlorobenzyl chloride and 2-fluorobenzaldehyde (10 equiv), **5e** was purified by PE/EtOAc (90:10): 15.1 mg, 30% yield; white solid; mp 48−50 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.50 (td, J = 7.6, 1.6 Hz, 1H), 7.42−7.34 (m, 1H), 7.30−7.25 (m, 1H), 7.24−7.14 (m, 4H), 7.05−7.00 (m, 1H), 5.34 (dd, J = 8.7, 4.5 Hz, 1H), 3.27 (dd, J = 13.7, 4.5 Hz, 1H), 3.14 (dd, J = 13.7, 8.8 Hz, 1H), 1.63 (br s, 1H); ^{13}C{^{1}H} NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 161.2 (C−F, $^1J_{C-F}$ = 247.5 Hz), 158.8 (C−F, $^1J_{C-F}$ = 247.5 Hz), 135.7, 134.7, 132.1, 130.9 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 13.1 Hz), 130.8 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 13.1 Hz), 129.8, 129.25 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 8.1 Hz), 129.17 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 8.1 Hz), 128.3, 127.52 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 4.5 Hz), 127.48 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 4.5 Hz), 126.9, 124.45 (C−F, $^4J_{C-F}$ = 3.5 Hz), 124.41 (C−F, $^4J_{C-F}$ = 3.5 Hz), 115.6 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 22.2 Hz), 115.4 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 22.2 Hz), 68.18 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 2.1 Hz), 68.15 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 2.1 Hz), 42.3; HRMS (ESI) m/z [M + Na]$^+$ calcd for $[C_{14}H_{12}OFClNa]^+$ 273.0453, found 273.0452.

*1-(4-Fluorophenyl)-2-(2-iodophenyl)ethanol (**5f**).* Following general procedure B with 2-iodobenzyl bromide and 4-fluorobenzaldehyde (10 equiv), **5f** was purified by PE/EtOAc (90:10): 16.8 mg, 25% yield; white solid; mp 69−71 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.86 (dd, J = 7.9, 1.1 Hz, 1H), 7.41−7.37 (m, 2H), 7.29−7.25 (m, 1H), 7.16 (dd, J = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 7.06−7.02 (m, 2H), 6.94 (td, J = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 5.01 (dd, J = 8.4, 4.9 Hz, 1H), 3.16−3.05 (m, 2H), 1.60 (br s, 1H); ^{13}C{^{1}H} NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 163.7 (C−F, $^1J_{C-F}$ = 246.4 Hz), 161.2 (C−F, $^1J_{C-F}$ = 246.4 Hz), 140.7, 139.9, 139.56 (C−F, $^4J_{C-F}$ = 3.0 Hz), 139.53 (C−F, $^4J_{C-F}$ = 3.0 Hz), 131.4, 128.8, 128.4, 127.6 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 8.1 Hz), 127.5 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 8.1 Hz), 115.5 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 21.2 Hz), 115.3 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 21.2 Hz), 101.2, 73.1, 50.7; HRMS (ESI) m/z [M + Na]$^+$ calcd for $[C_{14}H_{12}OFINa]^+$ 364.9809, found 364.9808.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.0c02374
J. Org. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

*Methyl 4-(1-(4-Fluorophenyl)-1-hydroxypropan-2-yl)benzoate (**5g**).* Following general procedure B with methyl 4-(1-bromoethyl)-benzoate and 4-fluorobenzaldehyde, **5g** was purified by PE/EtOAc (from 95:5 to 90:10) as a 1:1 ratio of diastereoisomers: 29.9 mg, 52% yield; white solid; mp 157−159 °C; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) (mixture of diastereoisomers) δ 8.00 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.29−7.25 (m, 2H), 7.14 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.12−7.08 (m, 2H), 7.05−7.00 (m, 2H), 6.93−6.89 (m, 2H), 4.76 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 4.71 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.13−3.04 (m, 2H), 1.79 (br s, 2H), 1.36 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.11 (d, J = 7.1 Hz, 3H); ^{13}C{^{1}H} NMR (101 MHz, $CDCl_3$) (mixture of diastereoisomers) δ 167.17, 167.14, 163.8 (C−F, $^1J_{C-F}$ = 246.4 Hz), 163.4 (C−F, $^1J_{C-F}$ = 246.4 Hz), 161.3 (C−F, $^1J_{C-F}$ = 246.4 Hz), 160.1 (C−F, $^1J_{C-F}$ = 246.4 Hz), 148.8, 138.43 (C−F, $^4J_{C-F}$ = 3.0 Hz), 138.40 (C−F, $^4J_{C-F}$ = 3.0 Hz), 138.22 (C−F, $^4J_{C-F}$ = 3.0 Hz), 138.19 (C−F, $^4J_{C-F}$ = 3.0 Hz), 130.0, 129.6, 128.9, 128.57 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 8.1 Hz), 128.54, 128.49 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 8.1 Hz), 128.3, 128.09 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 7.1 Hz), 128.02 (C−F, $^3J_{C-F}$ = 7.1 Hz), 115.5 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 21.2 Hz), 115.24 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 21.2 Hz), 115.15 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 22.2 Hz), 114.9 (C−F, $^2J_{C-F}$ = 22.2 Hz), 78.8, 78.3, 52.22, 52.17, 48.2, 47.7, 18.1, 15.8 (two aromatic carbons are missing due to overlap); HRMS (ESI) m/z [M + Na]$^+$ calcd for $[C_{17}H_{17}O_3FNa]^+$ 311.1054, found 311.1052.

Larger Scale Synthesis of 3d. Following general procedure A with 2-(chloromethyl)benzoate (155 μL, 1 mmol), 2-fluorobenzaldehyde (316 μL, 3 mmol), and SED-2 (427 mg, 1.5 mmol) in DMF (5 mL), **3d** was purified by PE/EtOAc (90:10): 167 mg, 69% yield.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.joc.0c02374.

^{1}H NMR spectra for known compounds and ^{1}H and ^{13}C NMR spectra for new compounds (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Cédric Spitz − *Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR CNRS 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, Cedex 05 13385 Marseille, France;* orcid.org/0000-0002-6473-3073; Email: cedric.spitz@univ-amu.fr

Patrice Vanelle − *Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR CNRS 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, Cedex 05 13385 Marseille, France;* Email: patrice.vanelle@univ-amu.fr

Authors

Mélanie Matteudi − *Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR CNRS 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, Cedex 05 13385 Marseille, France*

Guillaume Tintori − *Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR CNRS 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, Cedex 05 13385 Marseille, France*

Julie Broggi − *Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR CNRS 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, Cedex 05 13385 Marseille, France;* orcid.org/0000-0003-4309-8004

Thierry Terme − *Aix Marseille Univ, CNRS, ICR UMR CNRS 7273, Equipe Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, Cedex 05 13385 Marseille, France*

Complete contact information is available at: https://pubs.acs.org/10.1021/acs.joc.0c02374

Author Contributions

All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the CNRS and Aix-Marseille University. The authors thank the Spectropole team for elemental analysis. We express our thanks to V. Remusat for recording ^{1}H NMR and ^{13}C NMR spectra.

■ REFERENCES

(1) (a) Kongsaeree, P.; Prabpai, S.; Sriubolmas, N.; Vongvein, C.; Wiyakrutta, S. Antimalarial Dihydroisocoumarins Produced by *Geotrichum* sp., an Endophytic Fungus of *Crassocephalum crepidioides*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 709−711. (b) Chen, J.; Zhou, L.; Tan, C. K.; Yeung, Y.-Y. An Enantioselective Approach toward 3,4-Dihydroisocoumarin through the Bromocyclization of Styrene-type Carboxylic Acids. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 999−1009. (c) Guimarães, K. G.; de Freitas, R. P.; Ruiz, A. L. T. G.; Fiorito, G. F.; de Carvalho, J. E.; da Cunha, E. F. F.; Ramalho, T. C.; Alves, R. B. Synthesis, antiproliferative activities, and computational evaluation of novel isocoumarin and 3,4-dihydroisocoumarin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *111*, 103−113.

(2) (a) Baur, J. A.; Sinclair, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 493−506. (b) Cirla, A.; Mann, J. Combretastatins: from natural products to drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 558−564.

(3) (a) Qi, C.; Yang, S.; Gandon, V.; Lebœuf, D. Calcium(II)- and Triflimide-Catalyzed Intramolecular Hydroacyloxylation of Unactivated Alkenes in Hexafluoroisopropanol. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 7405−7409. (b) Nguyen, T. T.; Grigorjeva, L.; Daugulis, O. Cobalt-Catalyzed Coupling of Benzoic Acid C-H Bonds with Alkynes, Styrenes, and 1,3-Dienes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 1688−1691. (c) *Organometallics in Synthesis-A Manual*, 2nd ed.; Schlosser, M., Ed.; Wiley: Chichester, United Kingdom, 2004. (d) Khoumeri, O.; Terme, T.; Vanelle, P. First TDAE Reactivity Using Benzonitrile Derivatives as Substrates and Its Application to the Synthesis of 3-Substituted Isochroman-1-ones. *Synthesis* **2018**, *50*, 2617−2623.

(4) Duhamel, T.; Muniz, K. Cooperative iodine and photoredox catalysis for direct oxidative lactonization of carboxylic acids. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 933−936.

(5) (a) Giuglio-Tonolo, G.; Terme, T.; Médebielle, M.; Vanelle, P. Original reaction of *p*-nitrobenzyl chloride with aldehydes using tetrakis(dimethylamino)ethylene (TDAE). *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6433−6435. (b) Giuglio-Tonolo, G.; Terme, T.; Médebielle, M.; Vanelle, P. Nitrobenzylation of α-carbonyl ester derivatives using TDAE approach. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5121−5124. (c) Amiri-Attou, O.; Terme, T.; Vanelle, P. Functionalization of 6-Nitrobenzo-[1,3]dioxole with Carbonyl Compounds via TDAE methodology. *Molecules* **2005**, *10*, 545−551. (d) Montana, M.; Terme, T.; Vanelle, P. Original synthesis of α-chloroketones in azaheterocyclic series using TDAE approach. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6573−6576. (e) Khoumeri, O.; Terme, T.; Vanelle, P. Original and efficient synthesis of substituted 3,4-Dihydronaphtho[2,3-g]quinoline-2,6,11(1*H*)-triones. *Synthesis* **2009**, *2009*, 3677−3683. (f) Spitz, C.; Khoumeri, O.; Terme, T.; Vanelle, P. Diastereoselective Synthesis of *N*-tert-Butanesulfinylamines through Addition of *p*-Nitrobenzyl Chloride to *N*-tert-Butanesulfinimines Using a TDAE Strategy. *Synlett* **2013**, *24*, 1725−1727. (g) Spitz, C.; Lin, A.; Terme, T.; Vanelle, P. Mild and Metal-Free Diastereoselective Synthesis of *N*-tert-Butanesulfinylamines by Using Tetrakis(dimethylamino)ethylene. *Synthesis* **2014**, *46*, 3229−3232.

(6) (a) Murphy, J. A.; Khan, T. A.; Zhou, S.-Z.; Thomson, D. W.; Mahesh, M. Highly Efficient Reduction of Unactivated Aryl and Alkyl Iodides by a Ground-State Neutral Organic Electron Donor. *Angew.*

Chem., Int. Ed. **2005**, *44*, 1356−1360. (b) Broggi, J.; Terme, T.; Vanelle, P. Organic Electron Donors as Powerful Single-Electron Reducing Agents in Organic Synthesis. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 384−413. (c) Doni, E.; Murphy, J. A. Evolution of neutral organic super-electrondonors and their applications. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 6073−6087. (d) Murphy, J. A. Discovery and Development of Organic Super-Electron-Donors. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3731−3746.

(7) (a) Hanson, S. S.; Doni, E.; Traboulsee, K. T.; Coulthard, G.; Murphy, J. A.; Dyker, C. A. Pushing the Limits of Neutral Organic Electron Donors: A Tetra(iminophosphorano)-Substituted Bispyridinylidene. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 11236−11239. (b) Hanson, S. S.; Richard, N. A.; Dyker, C. A. Powerful Bispyridinylidene Organic Reducing Agents with Iminophosphorano π-Donor Substituents. *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 8052−8055. (c) Burgoyne, M. M.; MacDougall, T. M.; Haines, Z. N.; Conrad, J. W.; Calhoun, L. A.; Decken, A.; Dyker, C. A. A strong organic electron donor incorporating highly π-donating triphenylphosphonium ylidyl substituents. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 9726−9733.

(8) Glaser, F.; Larsen, C. B.; Kerzig, C.; Wenger, O. S. Aryl dechlorination and defluorination with an organic super-photoreductant. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2020**, *19*, 1035−1041.

(9) (a) Schoenebeck, F.; Murphy, J. A.; Zhou, S.-Z.; Uenoyama, Y.; Miclo, Y.; Tuttle, T. Reductive Cleavage of Sulfones and Sulfonamides by a Neutral Organic Super-Electron-Donor (S.E.D.) Reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (44), 13368−13369. (b) Jolly, P. I.; Fleary-Roberts, N.; O'Sullivan, S.; Doni, E.; Zhou, S.-Z.; Murphy, J. A. Reactions of triflate esters and triflamides with an organic neutral super-electron-donor. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5807−5810.

(10) Smith, A. J.; Poole, D. L.; Murphy, J. A. The role of organic electron donors in the initiation of BHAS base-induced coupling reactions between haloarenes and arenes. *Sci. China: Chem.* **2019**, *62*, 1425−1438.

(11) Murphy, J. A.; Garnier, J.; Park, S. R.; Schoenebeck, F.; Zhou, S.-Z.; Turner, A. T. Super-Electron Donors: Bis-pyridinylidene Formation by Base Treatment of Pyridinium Salts. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1227−1230.

(12) Wilsey, S.; Dowd, P.; Houk, K. N. Effect of Alkyl Substituents and Ring Size on Alkoxy Radical Cleavage Reactions. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8801−8811.

(13) Mandal, S. K.; Roy, S. C. Titanocene(III) chloride mediated radical-induced synthesis of 3,4-dihydroisocoumarins: synthesis of (±)-hydrangenol, (±)-phyllodulcin, (±)-macrophyllol and (±)-thunberginol G. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11050−11057.

(14) Crespi, S.; Jäger, S.; König, B.; Fagnoni, M. A Photocatalytic Meerwein Approach to the Synthesis of Isochromanones and Isochromenones. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 2147−2153.

(15) Bellinger, G. C. A.; Campbell, W. E.; Giles, R. G. F.; Tobias, J. D. Formation of some 3-Aryl-3,4-dihydroisocoumarins by Thermal Ring Closure of Stilbene-2-carboxylic Acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1982**, 2819−2825.

(16) Wang, J.; Xue, L.; Hong, M.; Ni, B.; Niu, T. Heterogeneous visible-light-induced Meerwein hydration reaction of alkenes in water using mpg-C_3N_4 as a recyclable photocatalyst. *Green Chem.* **2020**, *22*, 411−416.

(17) Liao, L.-L.; Cao, G.-M.; Ye, J.-H.; Sun, G.-Q.; Zhou, W.-J.; Gui, Y.-Y.; Yan, S.-S.; Shen, G.; Yu, D.-G. Visible-Light-Driven External-Reductant-Free Cross-Electrophile Couplings of Tetraalkyl Ammonium Salts. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 17338−17342.

https://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.0c02374
J. Org. Chem. XXXX, XXX, XXX−XXX

Résumé :

Les médulloblastomes (MB), tumeurs embryonnaires du cervelet, sont les cancers intracrâniens les plus fréquents chez l'enfant. Malgré des avancées dans la prise en charge thérapeutique – combinant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie –, 30 % des enfants restent sans traitement efficace et les survivants ont souvent des effets secondaires durables. Afin d'élargir l'éventail des options thérapeutiques cliniquement efficaces et mieux tolérées, notre stratégie consiste à appliquer le repositionnement de médicaments visant à utiliser des médicaments déjà approuvés dans de nouvelles indications. Ainsi, la première partie expérimentale de ce travail rapporte, sur plusieurs modèles cellulaires de MB, la découverte et la validation des propriétés anti-cancéreuses de la métergoline. Ce médicament – utilisé comme antagoniste sérotoninergique – s'est révélé efficace en monothérapie et en association avec un second médicament repositionnable : l'itraconazole, un agent anti-fongique. L'activité chimio-sensibilisatrice de la métergoline a également été mise en évidence avec une chimiothérapie conventionnelle (la vincristine) et avec des thérapies ciblées telles que l'osimertinib, un inhibiteur d'EGFR. La seconde partie expérimentale de ce manuscrit s'attache à démontrer la compatibilité entre médicaments repositionnés et protocoles de traitement standard. Enfin, nous abordons la nécessité de poursuivre, en parallèle du repositionnement de médicaments, une approche de néosynthèse de molécules issues de deux classes pharmaco-chimiques. Ces travaux ont en commun leur objectif à terme : accélérer l'innovation thérapeutique et augmenter les chances de trouver des solutions efficaces pour les patients atteints de MB.

Abstract :

Medulloblastomas (MB), embryonal tumors of the cerebellum, are the most common intracranial cancers in childhood. Despite advances in therapeutic management - combining surgery, radiotherapy and chemotherapy - 30% of children remain without effective treatment, and survivors frequently have long-lasting side effects. To broaden the range of clinically effective and better tolerated therapeutic options, our strategy is to apply drug repurposing which consists in using already approved drugs in new indications. Thus, the first experimental part of this work reports, on several MB cell models, the discovery and validation of the anti-cancer properties of metergoline. This serotonergic antagonist proved effective both as monotherapy and in combination with a second repurposable drug: anti-fungal agent itraconazole. The chemosensitizing activity of metergoline was also demonstrated with conventional chemotherapy (vincristine) and with targeted therapies such as EGFR inhibitor osimertinib. The second experimental part of this manuscript focuses on demonstrating the compatibility between repurposed drugs and standard treatment protocols. Finally, we explore the need to pursue, in parallel to drug repurposing, a more conventional approach to the neosynthesis of molecules from two pharmaco-chemical classes. The ultimate aim of this work is to accelerate therapeutic innovation and increase the chances of developing effective solutions for MB patients.