

# Rapport scientifique

## Heat activated drugs for improved treatment of retinoblastoma

Kseniya Glinkina (postdoctoral researcher) and Paul J. Dyson (project PI)

Institut des Sciences et Ingénierie Chimiques, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), 1015 Lausanne, Switzerland.

### 1. Contexte

Le rétinoblastome est une tumeur oculaire pédiatrique rare. Malgré le taux de survie élevé des patients dans les pays développés, la préservation à long terme de la vision reste un défi ainsi que la gestion des effets secondaires causés par la toxicité des chimiothérapies couramment utilisées telles que le carboplatine et le métophthalan. Dans de nombreux cas, la norme de soins combine soit une chimiothérapie intra-artérielle soit intra-vitréenne avec une thérapie focale, c'est-à-dire l'irradiation directe de la tumeur à l'aide d'un laser infrarouge proche pour chauffer la tumeur au-dessus de 42°C (associée à des médicaments non conçus pour la synergie avec les températures élevées). Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse qu'appliquer des dérivés thermo-réactifs des médicaments pourrait minimiser les effets secondaires toxiques sans perte significative d'efficacité. Le dérivé de médicament idéal activé par la chaleur sera inactif à 37°C alors qu'à des températures >41°C, le médicament natif sera libéré localement au site de la tumeur chauffée. Une telle stratégie devrait réduire la toxicité systémique.

L'évaluation des thérapeutiques activées par la chaleur nécessite l'utilisation de modèles prédictifs appropriés. Dans ce projet, nous développons un modèle préclinique *in vivo* rapide et simple pour tester les chimiothérapies en combinaison avec une thérapie focale, afin d'accélérer la requalification des médicaments et le développement de médicaments, et de faciliter la translation en clinique. Le modèle est basé sur la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) du poulet, une membrane extra-embryonnaire qui assure les échanges gazeux et fournit des nutriments, adaptée pour soutenir la croissance d'un explant tumoral. Le modèle CAM est actuellement étudié comme une alternative aux souris pour les études précliniques sur de nombreux types de cancer. Un avantage important du modèle CAM est l'immunodéficience au stade précoce du développement, permettant la croissance d'explants ou de lignées cellulaires d'origine humaine. De nombreux paramètres de la croissance tumorale peuvent être observés, notamment la taille de la tumeur, la dissémination métastatique, la vascularisation, la réponse à la thérapie, la caractérisation histologique et moléculaire.

Le modèle CAM permet un criblage à haut débit de diverses classes d'agents thérapeutiques par rapport à d'autres modèles *in vivo*. Nous utiliserons ce modèle afin d'évaluer des formulations thermoréactives des chimiothérapies (médicaments qui montrent une meilleure efficacité avec la chaleur), de nouveaux dérivés de médicaments activés par la chaleur (médicaments que nous modifions synthétiquement pour être inactifs à 37°C et activés par la chaleur) et des nanoparticules photothermiques (nanoparticules qui absorbent la lumière et produisent une chaleur extrême sur une zone limitée). La capacité à focaliser facilement un laser infrarouge proche sur la tumeur représente un avantage majeur du modèle.

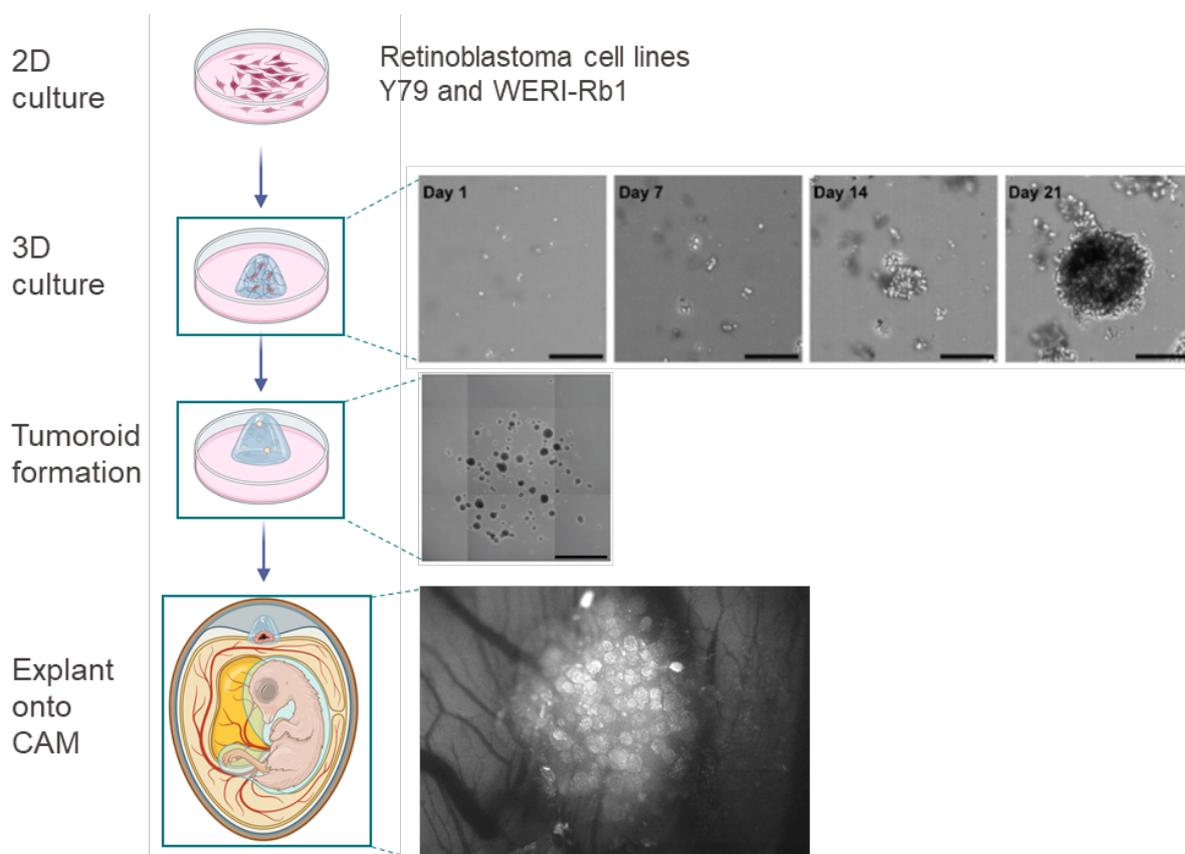
Il est important de noter qu'un embryon de poulet ne peut ressentir la douleur avant le 14<sup>e</sup> jour de développement embryonnaire (JDE14) et que l'essai CAM terminé avant le JDE14 n'est pas considéré comme une expérience animale par la législation suisse. Par conséquent, l'application du modèle CAM du poulet contribue à la mise en œuvre du principe des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement).

## 2. État actuel

### 2.1. Établissement du modèle CAM du rétinoblastome (configuration expérimentale #1)

La culture des œufs fécondés de poules Lohmann brunes a commencé en plaçant les œufs dans un incubateur humidifié à 37,7°C, avec une humidité de 47% et 2 rotations par heure (jour de développement embryonnaire 0, EDD0). Au jour EDD3, les œufs ont été perforés à l'extrémité pointue pour créer un sac à air artificiel, la perforation a été scellée avec du ruban adhésif, et les œufs ont été placés dans l'incubateur à 37,7°C, avec une humidité de 60% sans rotation. Au jour EDD7, une ouverture de 2 à 3 cm de diamètre a été pratiquée à l'extrémité pointue pour accéder à la membrane chorio-allantoïdienne.

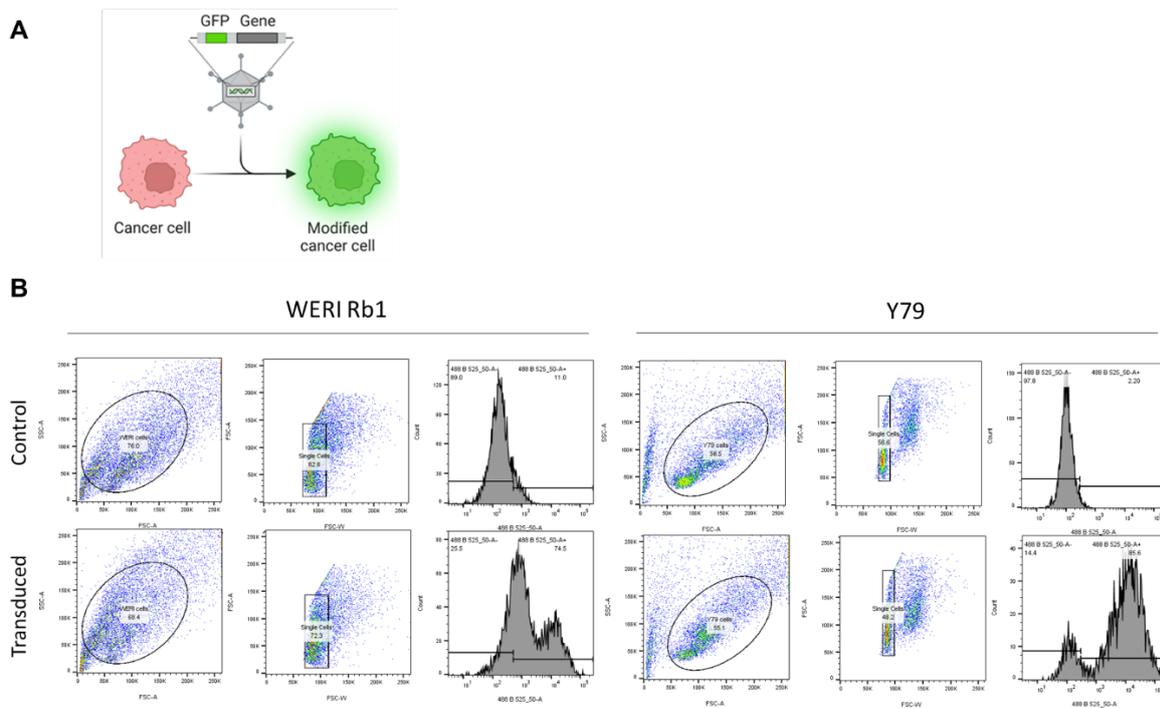
Selon la configuration expérimentale #1 (Figure 1), les cellules sont incorporées dans une matrice extracellulaire (ECM; Cultrex pour WERI-Rb1, Geltrex pour Y79) pour former des tumeurs en culture dans les 3 à 4 semaines suivantes. Ensuite, les tumeurs en ECM sont implantées sur la CAM de poulet au jour de développement embryonnaire 7 (EDD7). Après 5 jours d'incubation, les explants apparaissent sous forme de flocons plats et secs en surface de la CAM, et les tumeurs en forme de boule pouvaient être observées à l'intérieur des flocons sous le microscope. La prolifération cellulaire, les interactions entre les cellules et la CAM ou l'angiogenèse n'ont pas été observées dans cette expérience. De plus, la détection des explants sur la CAM était difficile en raison de la transparence des cellules et des changements dans la structure de la CAM au cours de l'expérience. En conclusion, cette stratégie n'a pas conduit à la formation de tumeurs sur la CAM, probablement en raison du manque de contact entre les tumeurs enrobées et la CAM.



**Figure 1.** Établissement du modèle CAM du rétinoblastome (configuration expérimentale #1). Les photos de microscopiques des tumeurs ont été reproduites à partir de la thèse de doctorat d'Irina Sinenko.

## 2.2. Génération de dérivés exprimant GFP des lignées cellulaires de rétinoblastome Y79 et WERI-Rb1

Afin de faciliter la détection des explants de rétinoblastome sur la CAM, nous avons généré des dérivés des lignées cellulaires Y79 et WERI-Rb1 exprimant la protéine fluorescente verte (GFP). Le gène codant pour la GFP a été intégré dans le génome des lignées cellulaires par transduction lentivirale (Figure 2A). La fraction principale des lignées cellulaires résultantes Y79-GFP (85%) et WERI-Rb1-GFP (75%) exprimait la GFP, comme le démontre la cytométrie en flux (Figure 2B). Nous avons utilisé ces lignées cellulaires polyclonales pour établir ultérieurement le modèle CAM.

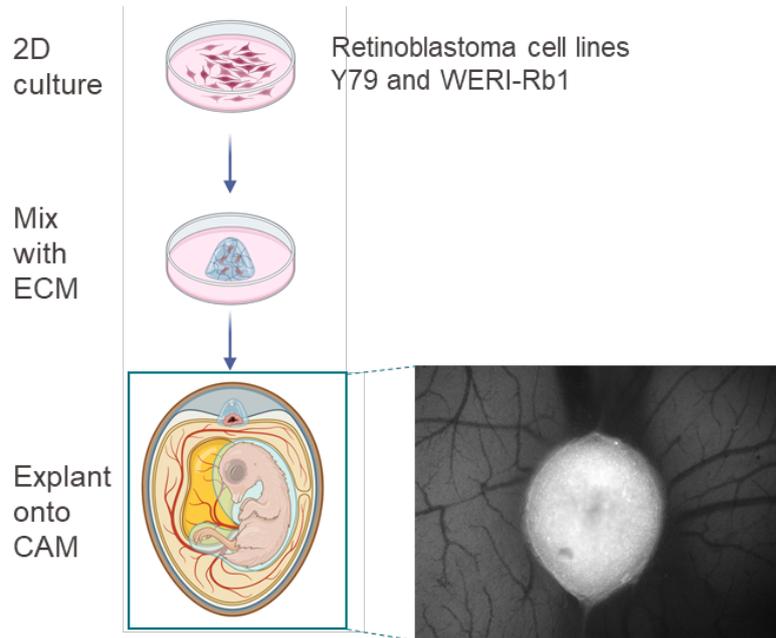


**Figure 2.** Génération du dérivé GFP+ des lignées cellulaires de rétinoblastome Y79 et WERI-Rb1. (A) Représentation schématique de la transduction lentivirale. (B) Analyse par cytométrie en flux des lignées cellulaires WERI-Rb1-GFP et Y79-GFP.

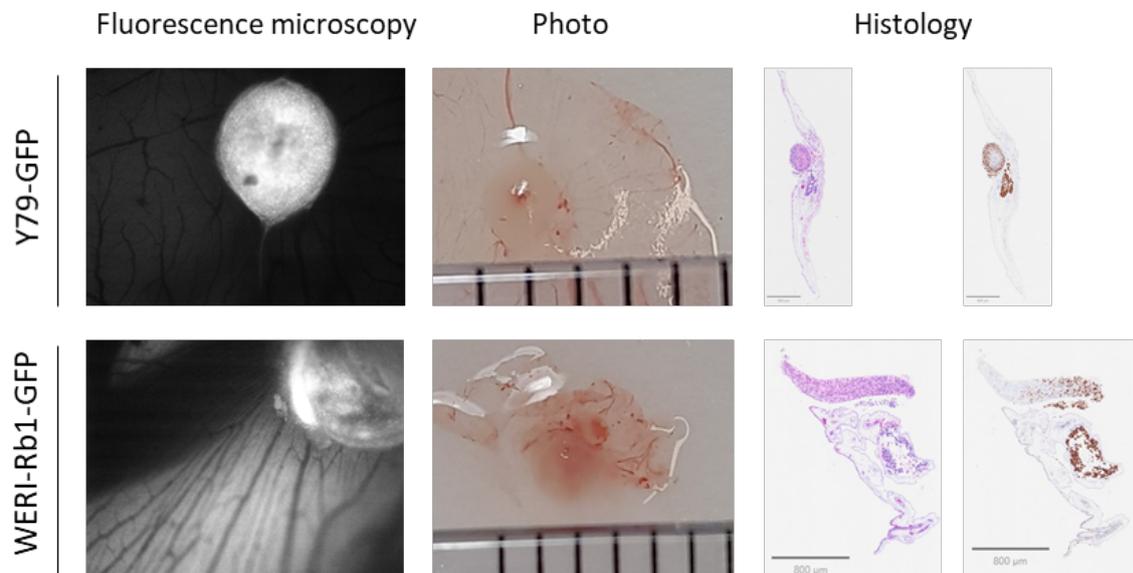
## 2.3. Établissement du modèle CAM du rétinoblastome (configuration expérimentale #2)

Dans la configuration expérimentale #2 (Figure 3), les lignées cellulaires Y79-GFP ou WERI-Rb1-GFP ont été mélangées avec de l'ECM, le mélange a été déposé en gouttes et incubé pendant 30 minutes à 37°C pour permettre à l'ECM de se solidifier. Les gouttes ont été transférées en surface de la CAM au jour de développement embryonnaire 7 (EDD7). La surface de la CAM a été préparée pour placer l'explant en grattant légèrement avec une spatule ou une lingette stérile. Les tumeurs résultantes ont été visualisées par microscopie de fluorescence (Figure 4) après 6 jours d'incubation (EDD13). L'expression de GFP par les cellules a permis une détection facile de l'emplacement de l'explant sur la CAM et a amélioré le contraste entre la tumeur et la CAM dans les images fluorescentes. Les explants apparaissaient sous forme de nodules denses entourés de vaisseaux sanguins. Dans certains cas, un signal fluorescent était détecté non seulement à l'emplacement exact de la tumeur, mais se propageait le long du vaisseau sanguin, comme le montre la Figure 5A. Dans un cas, le signal fluorescent a été détecté près du site de la tumeur sous la CAM (Figure 5B). La propagation n'a été observée que pour les explants Y79-GFP et peut être attribuée au potentiel migratoire et métastatique de cette lignée cellulaire, largement décrit dans la littérature.

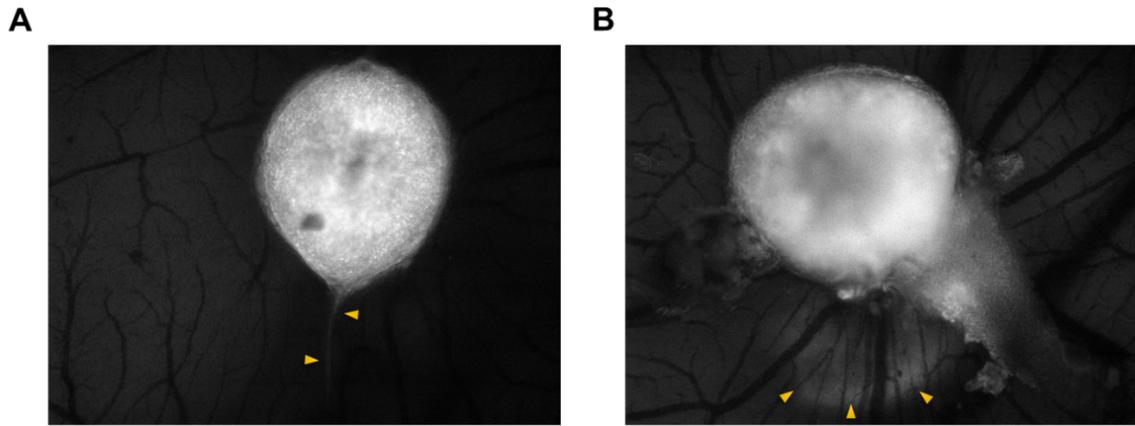
Après l'imagerie par microscopie de fluorescence, les embryons ont été refroidis sur de la glace pendant 30 minutes et l'explant tumoral avec le tissu de la CAM environnant a été excisé, photographiée et fixée pour examen histologique (Figure 4).



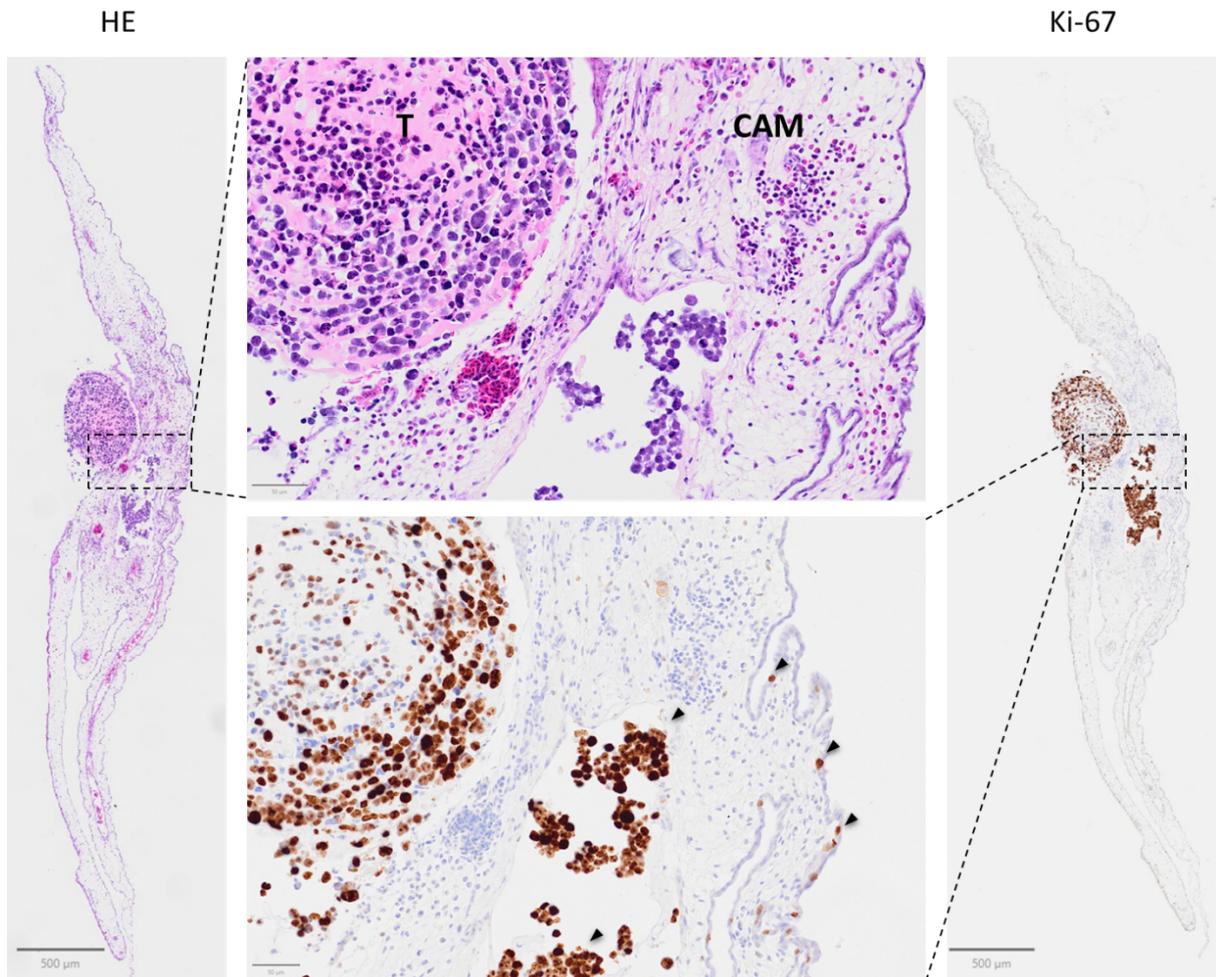
**Figure 3.** Établissement du modèle CAM du rétinoblastome (configuration expérimentale #2).



**Figure 4.** Caractérisation du modèle CAM par des techniques d'imagerie et d'histologie.



**Figure 5.** Propagation des cellules Y79-GFP à l'extérieur de l'explant. (A) Propagation le long du vaisseau sanguin. (B) Propagation sous la CAM.

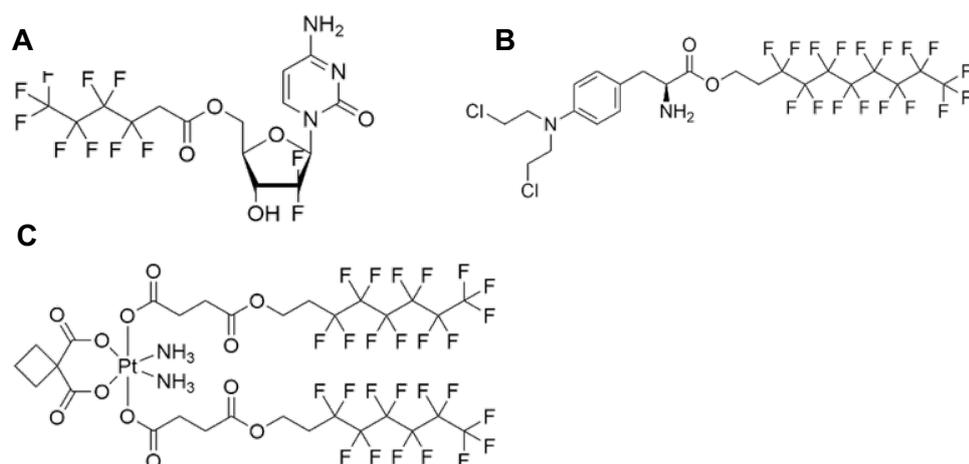


**Figure 6.** Images microscopiques représentatives de la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) et de Ki-67 de l'explant Y79-GFP sur la CAM; les flèches noires indiquent les cellules positives à Ki-67 en dehors du site de l'explant. T- explant tumoral, CAM- membrane chorio-allantoïdienne; grossissement 20x, les barres d'échelle indiquent 500  $\mu\text{m}$  pour les images générales et 50  $\mu\text{m}$  pour les images détaillées.

En utilisant la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE, Figure 6), nous pouvons visualiser les noyaux cellulaires colorés en bleu par l'hématoxyline et le cytoplasme, les parois cellulaires colorées en rose par l'éosine, ainsi qu'une matrice extracellulaire (ECM) intensément colorée en rose de l'explant tumoral. Pour évaluer la prolifération des cellules au sein des explants, nous avons appliqué une coloration avec un anticorps anti-Ki-67. Nous avons observé une coloration homogène avec l'anticorps anti-Ki-67 à la périphérie de l'explant et un signal moins intensif au cœur. Cette différence pourrait être attribuée à une concentration limitée de nutriments dans le centre de l'explant et à un degré d'interaction plus élevé entre les cellules au bord et la CAM. De plus, nous avons observé des cellules positives à Ki-67 en dehors du site de l'explant dans les couches mésodermiques et endodermiques de la CAM, comme indiqué par les flèches noires dans la Figure 6. Aucune réactivité croisée avec les tissus de poulet n'a été signalée pour le clone SP6 de l'anticorps anti-Ki-67 utilisé, cependant, nous aimerions réaliser une coloration supplémentaire, par exemple avec l'anticorps anti-GFP, afin de vérifier la propagation des cellules Y79-GFP dans les couches internes de la CAM.

### 3. Perspectives

Nous avons développé et caractérisé le modèle CAM du rétinoblastome et prévoyons de l'appliquer pour le criblage et l'évaluation des chimiothérapies combinées à une irradiation avec un laser infrarouge de 810 nm. Nous déterminerons les doses des chimiothérapies à appliquer sur le modèle CAM ainsi que la dose d'irradiation pour chauffer sélectivement les tumeurs, reproduisant ainsi l'approche utilisée en clinique. Les dérivés de médicaments activés par la chaleur (Figure 7) et les nanoparticules photothermiques pour les tests sur le modèle CAM sont actuellement en préparation.



**Figure 7.** Structures moléculaires suggérées de dérivés de médicaments activés par la chaleur; A- Gemcitabine, B-Melphalan, C- Carboplatin.

Divers paramètres de la croissance tumorale seront évalués en utilisant le modèle CAM du rétinoblastome, notamment la taille de la tumeur, la vascularisation, la réponse à la thérapie, la caractérisation histologique et moléculaire. Grâce à cette approche, les avantages des nouveaux traitements seront facilement établis.

Notez que le projet a été retardé en raison de la recherche d'un chercheur postdoctoral qualifié pour mener la recherche. Le financement fourni par la FORCE Fondation est grandement apprécié et nous avons pu obtenir des fonds supplémentaires pour garantir que le projet aboutisse à une conclusion réussie. Nous espérons que de nouveaux traitements pour le rétinoblastome seront identifiés. Parallèlement, nous travaillons vers un essai clinique basé sur un médicament découvert à partir du criblage à haut débit d'une bibliothèque exhaustive de médicaments suite à des tests *in vitro* sous chaleur, identifiant un composé qui agit en synergie avec la chaleur de manière sélective dans les cellules de rétinoblastome.