

## Rapport scientifique – 2023

### Laboratoire de recherche en hématologie oncologie pédiatrique CHUV-UNIL (Investigatrice principale : PD Dre Annick Mühlethaler PhD)

Le neuroblastome (NB) est la tumeur solide extra-cérébrale la plus fréquente chez le jeune enfant. C'est une tumeur d'origine embryonnaire issue des cellules progénitrices du système nerveux sympathique (SNS) qui se développe le plus souvent dans l'abdomen au niveau des glandes médullo-surrénales ou le long de la colonne vertébrale. Il se caractérise par une très grande hétérogénéité clinique et biologique et le pronostic des formes les plus agressives reste sombre malgré les traitements multimodaux actuels. Nous étudions au laboratoire les mécanismes moléculaires impliqués dans l'initiation et la progression tumorale afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

#### A. Analyse du rôle des mutations de ALK sur l'initiation de la formation du neuroblastome

Le gène ALK est impliqué dans le développement du système nerveux central et périphérique. Des mutations activatrices du gène ALK sont fréquentes dans les NB spontanés et certaines prédisposent au NB, mais leur mécanisme d'action sur l'initiation tumorale reste méconnu. Nous cherchons au laboratoire à comprendre comment les mutations de ALK perturbent le développement du SNS, en particulier celui de la glande médullo-surrénale.

Pour cela, nous utilisons deux modèles de souris génétiquement modifiées exprimant les mutations activatrices  $ALK^{-F1178L}$  ou  $ALK^{-R1279Q}$  dans les mêmes tissus et conditions que le gène ALK normal (ALK-wt). Des glandes surrénales d'embryons de souris ALK-wt,  $ALK^{-F1178L}$  et  $ALK^{-R1279Q}$  ont collectées à différents stades de développement embryonnaire et dissociées pour obtenir des cellules isolées. L'ensemble des gènes exprimés dans chaque cellule individuellement a ensuite été analysé par une méthode de séquençage d'ARN sur cellules uniques. Après des analyses bio-informatiques approfondies, nous avons pu observer que les mutations activatrices de ALK médient un accroissement du nombre de cellules de la médullo-surrénale et modifient leur mode de différenciation au cours du développement embryonnaire. En effet, ces mutations induisent une forte augmentation du nombre et de la prolifération des neuroblastes, qui représentent 60% de la médullo-surrénale à la naissance contre 10% dans les souris normales.

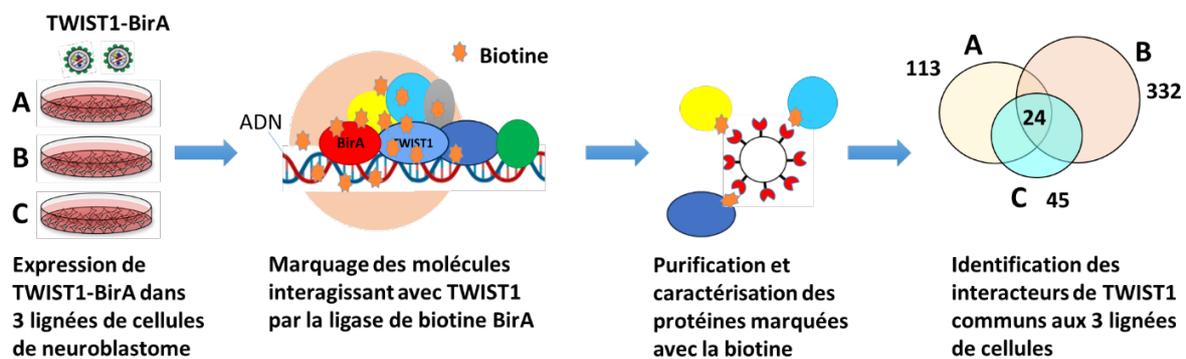
Ainsi, nos résultats démontrent que les mutations activatrices de ALK représentent un événement initiateur du NB en induisant des altérations de la différenciation et l'expansion d'un pool de neuroblastes précancéreux dans les glandes surrénales embryonnaires. Nous poursuivons nos travaux afin d'élucider les perturbations moléculaires médiées par ces mutations dans les neuroblastes embryonnaires, car certaines pourraient représenter de nouvelles cibles thérapeutiques.

#### B. Etude du mode d'action de TWIST1 dans la pathogénèse du neuroblastome

L'expression de l'oncogène TWIST1 est associée aux facteurs pronostiques défavorables du NB, tels que l'amplification de NMYC un oncogène majeur dans ces tumeurs. Nos travaux

précédents ont démontré que TWIST1 favorise la croissance des tumeurs primaires et des métastases en présence d'amplification de NMYC. De plus, TWIST1 représente un marqueur pronostic défavorable pour les NB de bas risque ou sans amplification de NMYC.

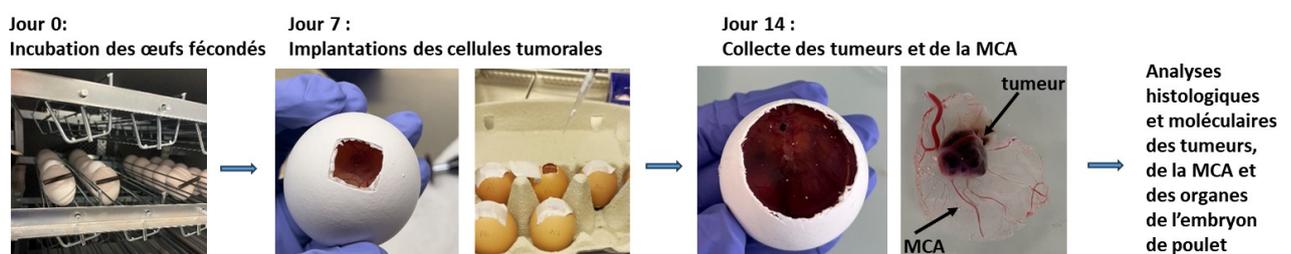
Nos travaux actuels ont pour but de caractériser le rôle de TWIST1 dans le contexte NMYC non-amplifié qui reste encore inexploité. D'autre part, nous cherchons à identifier et comparer dans les tumeurs NMYC amplifiées ou non-amplifiées les protéines interagissant avec TWIST1 et ses gènes cibles pour élucider son mode d'action dans ces deux différents contextes. Afin d'identifier les protéines interagissant avec TWIST1 et potentiellement nécessaires à sa fonction, nous avons marqué les protéines localisées à proximité de TWIST1 dans les cellules vivantes en leur ajoutant une petite molécule appelée biotine. Les protéines ainsi marquées ont ensuite été purifiées puis caractérisées par des analyses protéomiques (Figure 1). Cette méthode a révélé de nombreux interacteurs potentiels de TWIST1 dont 24 en commun entre les trois lignées cellulaires de NB NMYC amplifiées analysées. Ce sont principalement des protéines jouant un rôle clé dans le contrôle de l'expression des gènes ou impliqués dans le neuroblastome. Nos travaux se poursuivent pour caractériser les partenaires de TWIST1 dans le contexte sans amplification de NMYC et pour élucider les interactions nécessaires à la fonction de TWIST1. Ceci afin d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles permettant de bloquer la progression tumorale.



**Figure 1:** Identification des protéines interagissant avec TWIST1 par la méthode BioID. Trois différentes lignées de cellules de neuroblastome avec amplification de NMYC ont été modifiées génétiquement pour exprimer la protéine TWIST1 fusionnée à une ligase de biotine (BirA) pour marquer les protéines interagissant avec TWIST1. Les résultats de ces analyses après purification et caractérisation des protéines marquées à la biotine ont permis d'identifier 24 protéines en commun dans les 3 lignées de cellules.

### C. Mise en place d'un nouveau modèle *in vivo* pour l'étude du neuroblastome

Pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans les NB agressifs dont le rôle de TWIST1 ou de ses gènes cibles ou partenaires, nos recherches visent à établir au laboratoire un nouveau modèle *in vivo* basé sur l'embryon de poulet et la membrane chorio-allantoïque (MCA). Ce modèle *in ovo* représente une alternative reconnue aux modèles établis dans les souris pour l'étude de la biologie des cancers, dont la croissance tumorale, la dissémination métastatique ou la réponse aux traitements. La MCA est un tissu extra-embryonnaire très vascularisé situé sous la coquille de l'œuf, et aussi naturellement immunodéficient ce qui permet une greffe efficace des cellules tumorales et la formation de tumeurs en 7 à 10 jours (Figure 2).



**Figure 2.** Illustration du modèle de neuroblastome *in ovo* d'implantation de cellules tumorales sur la membrane chorio-allantoïque (MCA).

Afin de valider la fiabilité de ce modèle *in ovo* pour l'étude du NB et de vérifier qu'il représente une bonne alternative aux modèles de NB générés dans la souris, nous avons établi ce test en utilisant des cellules de NB TWIST1-positives et TWIST1-négatives précédemment injectées dans des souris. Nous avons comparé la capacité de croissance et le phénotype des tumeurs dérivées de ces cellules *in ovo* avec celles produites dans les souris. L'impact de TWIST1 sur l'augmentation de la croissance tumorale a pu être reproduit dans ce modèle *in ovo*. De plus, des analyses histologiques et moléculaires nous ont permis de confirmer que le phénotype des tumeurs obtenues *in ovo* et dans les modèles murins est comparable, de même que certaines altérations moléculaires médiées par TWIST1.

Ces résultats préliminaires suggèrent que ce nouveau modèle peut être utilisé pour étudier la biologie des NB. Nos expériences en cours visent à l'optimiser pour de futures études fonctionnelles de gènes d'intérêt, dont les gènes cibles ou partenaires de TWIST1, ou pour tester l'efficacité de nouvelles thérapies.