

Bilan scientifique du projet sur les tumeurs du tronc cérébral à l'Université de Bordeaux

Le projet de recherche sur les tumeurs du tronc cérébral (ou DIPG) a débuté en Septembre 2014 avec l'arrivée de Martin Hagedorn au sein de l'équipe de Christophe Grosset. Grace aux soutiens de l'association **Eva Pour La Vie** et de la **Fondation Groupama pour la Santé**, Angélique Desplat (Assistante Ingénieure d'octobre 2014 à avril 2016) et Caroline Capdevielle (étudiante en thèse de doctorat à l'Université de Bordeaux d'octobre 2015 à Septembre 2018) ont rejoint l'équipe. L'arrivée de ces deux personnes dans l'équipe a joué un rôle décisif dans le démarrage et le développement du projet sur les tumeurs cérébrales pédiatriques.

Fin 2014, nous avons acquis 6 lignées cellulaires de DIPG, dont 3 ont été fournies par le Dr. Jacques Grill de l'Institut Gustave Roussy à Paris et 3 par le Dr. Michèle Monje de l'Université de Stanford aux Etats-Unis (voir figure 1). Afin de conserver ces lignées au laboratoire, Angélique a mis au point la culture de ces cellules et les a amplifiées afin de générer des stocks suffisants pour travailler pendant les 5 prochaines années. Plus récemment, ces cellules ont été immortalisées par Caroline afin de les rendre plus promptes à croître dans un laboratoire de recherche. Le soutien de l'association **Kaëna et les Lapinours** a permis d'acheter les réactifs (milieux de cultures, facteurs de croissance, tests microbiologiques et génétiques) et le matériel stérile nécessaire à la culture, l'entretien périodique, l'immortalisation et l'analyse de ces cellules. L'association **Les Amis de Marius** a, quant à elle, financé l'achat d'un incubateur dédié à la culture de ces cellules et qui permet de les maintenir dans des conditions de culture optimales (voir en annexe la présentation du matériel scientifique acquis grâce aux soutiens des associations).

Parallèlement à l'entretien des cellules de lignées, Angélique a coordonné la mise en place de la plateforme « embryon de poulet », un modèle animal que Martin Hagedorn a utilisé dans le passé pour étudier certaines tumeurs malignes de l'adulte touchant le cerveau, l'os ou le pancréas. La création de cette plateforme a été possible grâce aux soutiens combinés de la **Fondation Flavien** et de l'association **Aidons Marina** qui ont respectivement financé l'achat d'un module de fluorescence pour visualiser les cellules tumorales implantées sur l'embryon de poulet (voir figure 3) et d'un incubateur à 37°C pour permettre le développement des embryons et des cellules.

Une fois la plateforme mise en place, nous avons travaillé à l'implantation des cellules de DIPG dans l'embryon de poulet afin de les étudier. Angélique et Caroline ont effectué plusieurs expériences d'implantation avec les 6 lignées à notre disposition. Leurs résultats ont montré que les cellules de DIPG survivent dans l'embryon de poulet mais ne poussent pas suffisamment vite pour permettre de tester de nouvelles drogues. Nous les avons donc modifiées selon des protocoles standards afin de les aider à se développer plus efficacement. Pour cela, nous avons introduit dans leur génome le gène VEGF (voir figure 2) qui est un facteur de croissance qui augmente le nombre de vaisseaux sanguins produits par l'embryon de poulet autour des cellules tumorales en croissance. Cette partie a été réalisée en collaboration avec une équipe en Angleterre et en Suisse, ainsi qu'avec l'aide de la plateforme de Vectorologie de notre unité INSERM U1035. Tout récemment, Caroline a réalisé une nouvelle série d'implantations de cellules de DIPG exprimant le VEGF sur l'embryon de poulet et a pu observer la formation de tumeurs richement vascularisées de manière reproductible (voir figure 4). Il est donc désormais possible d'étudier ces tumeurs de DIPG et de tester l'effet de drogues anticancéreuses dans ce modèle tumoral chez le poulet.

Parallèlement à ce projet sur les DIPG, nous avons établi une collaboration avec le CHU de Bordeaux afin de développer de nouvelles lignées cellulaires de tumeurs cérébrales pédiatriques à partir de fragments chirurgicaux de tumeur. Grâce au soutien de l'association **ESCAPE**, nous avons acquis un appareil permettant de dissocier les fragments de tissus et d'en extraire les cellules tumorales. Angélique a réussi à mettre en culture et à amplifier les cellules tumorales d'une dizaine de patients. Elles sont pour l'instant conservées au laboratoire et feront très prochainement l'objet d'études moléculaires et cellulaires.

Formation d'étudiantes à l'étude des tumeurs cérébrales pédiatriques

En plus du recrutement d'Angélique et de Caroline, 3 étudiantes de l'Université de Bordeaux ont effectué leur stage au laboratoire et ont été sensibilisées à l'étude des DIPG et des gliomes de l'enfant : Laetitia DARD, étudiante en Master 2 (Janvier-Juin 2015), Justine ROLANDO, étudiante en 3^{ème} année de licence (Mai-Juin 2015) et Kenza FOUAD, étudiante en Master 2 (Janvier-Juin 2016).

Travaux en cours et perspectives

Sur la base des résultats que nous avons obtenus au cours des deux dernières années, trois projets prometteurs émergent :

1) La caractérisation cellulaire et moléculaire des tumeurs de DIPG chez l'embryon de poulet. Pour cela, une analyse des tumeurs par des approches génétique (séquençage ARN) et histologique (études de la morphologie des cellules implantées et des protéines qu'elles expriment) va être menée. Cette analyse devrait conduire à l'identification des gènes essentiels au développement des tumeurs de DIPG et permettre de mieux comprendre le « dialogue » moléculaire qu'établissent les cellules tumorales avec les cellules normales du poulet. La disponibilité de ce modèle de tumeur de DIPG dans l'équipe est donc une réelle avancée pour notre projet. Nous allons désormais rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques et tester différentes drogues capables de bloquer la croissance des cellules tumorales de DIPG voire de les éliminer (voir ci-dessous). La première de ces drogues sera le Panobinostat qui est actuellement testée en clinique chez les patients atteints de DIPG.

2) Evaluation de l'efficacité de drogues sur la survie des cellules de DIPG par une technique innovante. L'activité de différentes drogues (dont le Panobinostat) va être analysée sur les cellules de DIPG par une nouvelle technique appelée « Dynamic BH3 profiling ». Cette technique a été développée aux Etats-Unis et mise au point au laboratoire par Caroline et moi-même grâce aux soutiens des associations **Kaëna et les lapinours, Aidons Marina et ESCAPE**. Le « Dynamic BH3 profiling » permet de savoir en 24 heures si une drogue va entraîner ou non la mort des cellules cancéreuses. Si le test est positif et que les cellules activent des mécanismes conduisant à leur mort, le traitement a de fortes chances d'être efficace en clinique. Ce test n'est pour l'instant utilisé qu'en laboratoire mais des essais cliniques ont démarré aux Etats-Unis pour vérifier si cette technologie permet de prédire si la tumeur d'un patient répond ou non à la drogue testée en laboratoire (notion de médecine « de précision » ou « personnalisée »). Notre ambition est de pouvoir appliquer dans quelques années cette technologie au traitement des patients atteints de DIPG à partir de cellules tumorales isolées d'une biopsie ou d'un fragment chirurgical.

3) Etude en laboratoire de l'efficacité du Panobinostat qui est un des médicaments les plus prometteurs dans le traitement des tumeurs du tronc cérébral. Plusieurs études cliniques ont récemment démarré pour évaluer son efficacité chez les

patients. Au laboratoire, nous avons débuté un projet visant à évaluer son effet sur les cellules tumorales de DIPG. Nous avons identifié deux protéines dont l'expression augmente fortement lorsque les cellules de DIPG sont traitées par le Panobinostat (voir figure 5). Il est possible que l'augmentation de ces deux protéines soit le signe de la bonne efficacité de ce médicament. A l'inverse, ces protéines pourraient indiquer la mise en place d'un mécanisme de résistance par les cellules afin de contourner l'effet délétère du Panobinostat. Grâce à un don conjoint de l'association **Eva Pour La Vie** et **Cassandra Contre la Leucémie**, un appareil d'Imagerie a été acheté. Cet appareil permet de comparer le niveau d'expression des protéines dans différentes conditions et est utilisé par tous les membres de l'équipe travaillant sur les tumeurs pédiatriques, le DIPG et également l'hépatoblastome, un cancer du foie chez l'enfant.

Remerciements aux associations et à tous les donateurs

Par ce rapport scientifique, l'équipe souhaite montrer aux associations et aux donateurs les avancées faites sur les cancers cérébraux de l'enfant au cours des deux dernières années. Nos travaux progressent et commencent à donner des résultats vraiment intéressants. Cette réussite, nous la devons exclusivement aux associations qui nous ont soutenu financièrement au cours des 3 dernières années. Christophe Grosset et moi-même tenons donc à remercier chaleureusement les associations **Aidons Marina**, **Cassandra Contre la Leucémie**, **ESCAPE**, **Eva Pour La Vie**, **Kaëna et les lapinours**, **Les Amis de Marius**, les **Fondations Flavien et Groupama pour la Santé**, ainsi que tous les bénévoles et tous les donateurs pour leur engagement, leur don et leur confiance. Nous espérons que notre collaboration permettra de faire des avancées notables dans le traitement de cette maladie infantile et de guérir de plus en plus d'enfants.



Dr Martin Hagedorn, co-responsable de l'équipe

Figures

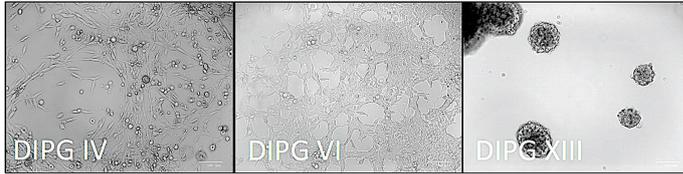


Fig 1 : Morphologie sous le microscope des cellules des 3 lignées de DIPG issues du laboratoire du Dr Michelle Monje.

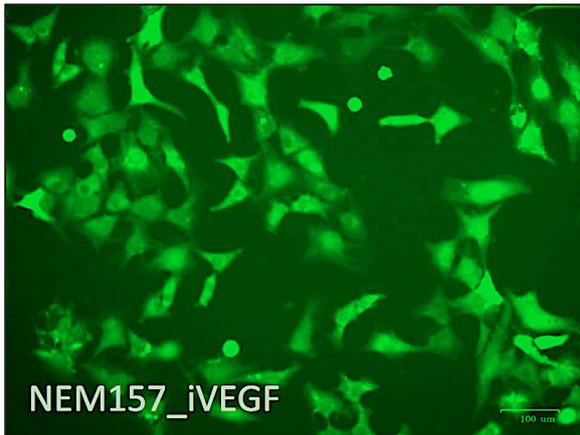


Fig 2 : Cellules de la lignée NEM157 immortalisées et produisant le facteur de croissance VEGF (en vert) facilitant leur implantation chez l'embryon de poulet.

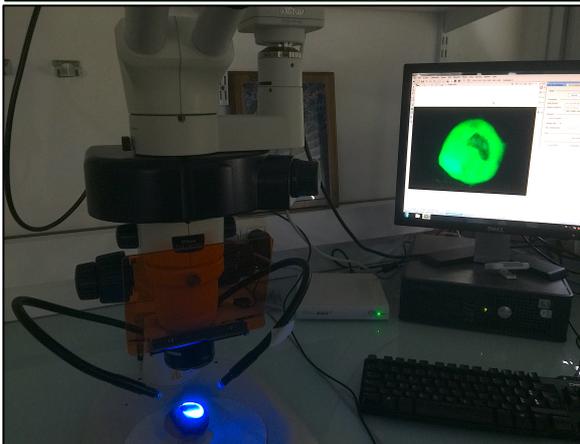


Fig 3 : Analyse des cellules de DIPG exprimant le VEGF et ayant formé une tumeur chez l'embryon de poulet

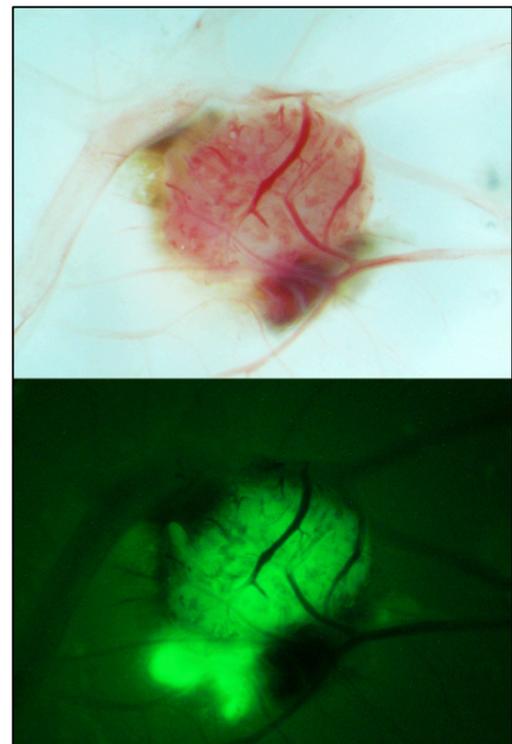


Fig 4 : Formation d'une tumeur de DIPG dans l'embryon de poulet après implantation des cellules NEM157_iVEGF et 7 jours de culture en laboratoire. La tumeur est alimentée par le système vasculaire de l'embryon (en rouge en haut; en noir en bas), ce qui facilite son développement en quelques jours.

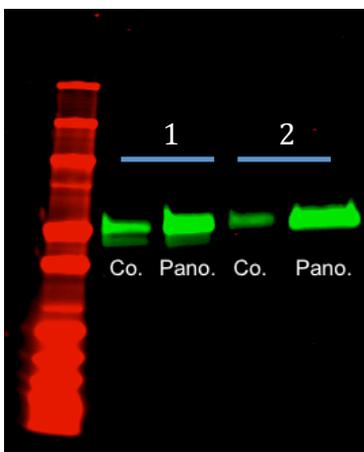


Fig 5 : Réaction des cellules de DIPG au traitement par le Panobinostat. Surexpression (signaux verts plus forts) d'une protéine d'intérêt dans deux lignées différentes de DIPG (Co = Control, Pano = Panobinostat).

Annexe : Matériel scientifique acquis grâce aux soutiens des associations



Incubateur à œufs



Appareil à fluorescence



Séparateur de cellules



Incubateur cellules DIPG



Station d'imagerie pour protéines et ADN

