

Sujet : Étude des désordres neurodéveloppementaux induits par le médulloblastome et ses traitements : du modèle organoïde à l'étude préclinique.

Acronyme : HandiOncoPedia

Direction de thèse : HILBER PASCAL

Unité de recherche : CBG

Etablissement : Université Rouen Normandie

Type de financement : Contrat doctoral Etablissement

Contact : pascal.hilber@univ-rouen.fr

Le projet Handi-OncoPedia concerne les **cancers pédiatriques du cerveau associés aux troubles du neurodéveloppement**. Le cancer du cerveau chez l'enfant et les traitements associés peuvent s'accompagner de séquelles à long terme, source de situations de handicap. Il est essentiel de considérer le cancer et ces séquelles comme source majeure de handicaps pour mettre en place des aménagements spécifiques précoces pour améliorer la qualité de vie (QdV) et les apprentissages des enfants. La chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie s'accompagnent parfois d'effets secondaires à long terme chez les enfants survivants : troubles moteurs et/ou émotionnels, altération de l'apprentissage, de l'attention et de la mémoire. L'origine précise des désordres demeure mal connue : les effets des traitements, de la maladie elle-même, et des troubles neurologiques précoces dans l'ontogenèse du système nerveux central interagissent durant des périodes critiques. Cette problématique est prégnante pour des cancers embryonnaires localisés au niveau du cervelet : les médulloblastomes de type Sonic HedgeHog (MB-SHH). Le projet a pour but de **1) de préciser l'origine et la cinétique des désordres cognitifs et émotionnels**, sources de situation de handicaps et d'altération de la QdV chez les enfants et les adolescents survivants aux tumeurs de type MB SHH et **2) d'éprouver une nouvelle méthode d'administration locale des thérapies médicamenteuses actuelles** (cyclophosphamide, cisplatine et vismodegib) avec un hydrogel afin de limiter les effets secondaires des traitements. Pour atteindre ces objectifs, nous développerons deux modèles d'étude : un modèle *in vitro* organoïde de cervelet en développement, cultivé en 3D et qui présente une micro-anatomie humaine de cervelet, et portant une mutation fréquente dans ce cancer (gène PTCH1) et un modèle animal jeune/adolescent avec délétion du gène PTCH1 pour évaluer les fonctions cognitivo-émotionnelles dans un contexte de MB SHH. Notre objectif est de tester une thérapie locale de traitement dans un modèle de prédisposition du MB SHH et concomitamment de vérifier les étapes de développement du cervelet, l'impact de la tumeur et des chimiothérapies sur les fonctions motrices, émotionnelles et cognitives, et l'intérêt d'un hydrogel local pour le traitement et la re fonctionnalisation cérébrale.

Le modèle organoïde cérébelleux sera créé à partir de cellules humaines (cellules hiPS), génétiquement modifiées pour l'inactivation du gène PTCH1, grâce à la technique CRISPR/Cas9. Grâce à des procédures longues de culture 3D en milieu défini, nous créerons un modèle récapitulant les processus cellulaires et moléculaires survenant lors d'un MB SHH. Nous suivrons le développement du cervelet et la survenue de processus oncogéniques à différents stades de culture. Nous réaliserons des résections *in vitro* pour y ajouter l'hydrogel (+/- les traitements). Des analyses biologiques permettront de suivre le développement de l'organoïde mais aussi le développement tumoral par imagerie en 2D et en 3D. Nous testerons ensuite ce mode d'administration chez des souris génétiquement modifiées, avec une inactivation du gène PTCH1 et qui développent un MB SHH. Le suivi comportemental individuel des animaux portera sur deux périodes : l'une du 4^{ème} au 16^{ème} jour post natal, au cours de laquelle des tests comportementaux et l'analyse des émissions ultrasonores des souriceaux nous permettra d'apprécier quotidiennement leur développement. L'autre, à partir de 30 jours post-natal pour évaluer les fonctions sensitivomotrices, émotionnelles et cognitives

des animaux adolescents à l'aide de tests standardisés. Nous déterminerons ainsi l'impact de la tumeur, de la résection et/ou des traitements dans l'hydrogel sur le statut cognitif et émotionnel et les compétences sociales au cours du développement et après chirurgie, chez les animaux adolescents.

The Handi-OncoPedia project focuses **on paediatric brain cancers associated with neurodevelopmental disorders**. Childhood brain cancer and associated treatments can be accompanied by long-term sequelae, which can lead to disability. It is essential to consider cancer and its sequelae as a major source of disabilities in order to develop early adaptations to improve children's quality of life (QoL) and learning. Surgery, chemotherapy and radiation therapy are sometimes accompanied by long-term side effects in surviving children: motor and/or emotional disorders, impaired learning, attention and memory. The precise origin of the disorders remains poorly understood: the effects of treatments, of the disease itself, and of early neurological disorders during the ontogeny of the central nervous system interact during critical periods. This problem is significant for embryonic cancers located in the cerebellum: Sonic HedgeHog medulloblastomas (MB-SHH). The aim of the project is to **1) clarify the origin and kinetics of cognitive and emotional disorders**, sources of disability and QoL alteration in children and adolescents surviving SHH MB tumors and **2) to test a new method of local administration of current** drug therapies (cyclophosphamide, cisplatin and vismodegib) with a hydrogel to limit the side effects of treatments. To achieve these objectives, we will develop two study models: an *in vitro organoid* model of a developing cerebellum, cultured in 3D and which presents a human micro-anatomy of the cerebellum, and carrying a frequent mutation in this cancer (PTCH1 gene) and a young/adolescent animal model with a deletion of the PTCH1 gene to evaluate cognitive-emotional functions in a context of SHH MB. Our objective is to test a local treatment therapy in a model of SHH MB and concomitantly to verify the stages of development of the cerebellum, the impact of tumor and chemotherapies on motor, emotional and cognitive functions, and the interest of a local hydrogel for the treatment and re-functionalization of the brain.

The cerebellar organoid model will be created from human cells (hiPS cells), genetically modified for the invalidation of the PTCH1 gene, using the CRISPR/Cas9 technique. Using long-term 3D media culture procedures, we will create a model summarizing the cellular and molecular processes occurring during an SHH MB. We will follow the development of the cerebellum and the occurrence of oncogenic processes at different stages of culture. We will perform *in vitro* resections to add the hydrogel (+/- treatments). Biological analyses will permit to monitor the development of the organoid but also the tumor development by 2D and 3D imaging. We will then test this mode of administration in genetically modified mice, with PTCH1 gene invalidation and developing SHH MB. The individual behavioural monitoring of the animals will cover two periods: one from the 4th to the 16th postnatal day, during which behavioural tests and the analysis of the mice's ultrasonic emissions will allow us to assess their development on a daily basis. The other, starting at 30 postnatal days, to assess the sensory-motor, emotional and cognitive functions of adolescent animals using standardized tests. We will thus determine the impact of tumor, resection and/or hydrogel treatments on cognitive and emotional status and social skills during development and after surgery, in adolescent animals.