



HAL
open science

Génération et caractérisation de tumeurs de rhabdomyosarcome pour mieux comprendre les mécanismes de tumorigenèse et la résistance aux traitements

Léa Luciana

► **To cite this version:**

Léa Luciana. Génération et caractérisation de tumeurs de rhabdomyosarcome pour mieux comprendre les mécanismes de tumorigenèse et la résistance aux traitements. Cancer. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10088 . tel-04649057

HAL Id: tel-04649057

<https://theses.hal.science/tel-04649057>

Submitted on 16 Jul 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE LYON 1

**Ecole Doctorale N°340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

Discipline : Oncologie

Soutenue publiquement le 15/06/2023, par :

Léa LUCIANA

Génération et caractérisation de tumeurs de rhabdomyosarcomes pour mieux comprendre les mécanismes de tumorigenèse et de résistance aux traitements

Devant le jury composé de :

Pr. Moyret-Lalle Caroline	PU	CRCL	Présidente
Pr. Gomez Anne	PUPH	CHU Toulouse	Rapportrice
Dr. Watson Sarah	Médecin-CR	Institut Curie	Rapportrice
Dr. Naquet Phillipe	DR	CIML	Examineur
Dr. Pasquier Eddy	CR	CRCM	Examineur
Pr. Surdez Didier	PU	Université de Zurich	Examineur
Dr. Broutier Laura	CR	CRCL	Directrice de thèse
Dr. Marcel Virginie	DR	CRCL	Invitée

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	Mme Céline BROCHIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directeur : M. Claude DUSSART

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Directeur : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

*« Si vous vivez un moment difficile, ne blâmez pas la vie.
Vous êtes juste en train de devenir plus fort. »*

- Gandhi

REMERCIEMENTS

Les travaux de recherches effectués au cours de ma thèse ont été réalisés au Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL, INSERM U1052-CNRS UMR5286). Je remercie le Dr **Patrick Mehlen** de m'y avoir accueillie, me permettant ainsi de réaliser mes stages de licence ainsi que cette thèse.

Je souhaite remercier chaleureusement les rapportrices de ma thèse, le **Pr. Anne Gomez** et le **Dr Sarah Watson** d'avoir accepté d'évaluer la qualité de mon manuscrit. Aussi, mes chers examinateurs, le **Pr. Caroline Moyret-Lalle**, le **Dr Philippe Naquet**, le **Dr Eddy Pasquier**, mais également le **Dr Didier Surdez** qui m'ont fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. Je remercie également le **Dr Virginie Marcel** d'avoir accepté d'être invitée des membres du jury.

Mention spéciale pour le Pr. Caroline Moyret-Lalle sans qui je ne serais jamais arrivée là. Merci de m'avoir accueillie dans votre Master et de m'avoir donnée l'opportunité de partir aux Pays-Bas pour y réaliser mes stages.

Je tiens également à remercier mes membres de comité de suivi de thèse ; le **Dr Eddy Pasquier** et le **Dr Virginie Marcel**, pour vos conseils, vos encouragements et votre écoute dès que j'en avais besoin. Merci d'avoir cru en moi plus que moi-même. Merci de m'avoir toujours soutenue et ce à des périodes où j'en avais le plus besoin. Je souhaite à tous les doctorants d'avoir des membres de CST aussi compétents, et humain que ce que j'ai pu avoir.

Je remercie **l'école doctorale BMIC** pour l'organisation et le bon déroulement de ma thèse. Merci pour les conférences scientifiques de grande qualité et les formations associées.

Je tiens à remercier sincèrement, mes chers collègues cliniciens et associés, pour leur professionnalisme, leur patience et leur intérêt pour la recherche. Mention spéciale pour le **Dr. Nadège Corradini**, le **Dr Cécile Picard**, **Isabelle Rochet**, le **Dr Amine Bouhamama** et le **Dr Mayeul Tabutin** de m'avoir accueillie, accompagnée et pris le temps de m'expliquer une partie de la recherche clinique au cours de consultations, RCP, ou de chirurgies en blocs opératoires.

Mes remerciements et mes pensées s'adressent **aux patients**, à **leurs enfants et leurs parents**, de comprendre la nécessité absolue de la mise à disposition d'échantillons, cruciale pour faire de la bonne recherche. Sans eux, mon projet n'aurait jamais pu aboutir.

Remerciements

Je remercie chaleureusement l'équipe C3C dirigée par le **Pr. Jean-Yves Blay** et le **Dr. Marie Castets**. Merci pour cette opportunité sans précédent, pour la qualité de recherche et l'aspect humain qui souvent manque à l'appel en recherche.

Merci aux cheffes ; le **Dr. Martine Cordier-Bussat**, le **Dr. Aurélie Dutour**, le **Dr Marie Castets** et bien sûr le **Dr. Laura Broutier** pour votre bonne humeur au quotidien, votre écoute et votre acharnement au travail qui porte toujours ses fruits. Bravo pour ce gang de *foufpower* inégalable au fil du temps et votre complémentarité dans tous les domaines.

Laura, tu savais que la seule condition au monde pour que je fasse une thèse c'était de la faire à Lyon et sur les organoïdes ? J'avais missionné Caroline de me dénicher quelqu'un qui travaillait sur les organoïdes. Après m'avoir envoyée chez Clevers, me voilà chez toi ! Tu connais déjà toute l'histoire mais ça vaut peut-être le coup de la re raconter en diagonale : j'ai démarré cette thèse sur les chapeaux de roues, encore sous l'emprise du rythme des Pays-Bas, et au rythme de « Wannabe » des Spice Girls. Tout mon entourage, *toi la première*, m'a dit que je devais ralentir la cadence si je ne voulais pas finir cette thèse sur les rotules. Alors bon, j'ai fini avec deux prothèses aux genoux parce qu'elle a été parsemée d'embuches diverses et variées, mais **ON L'A FAIT, J'AI REUSSI A FINIR CETTE THESE !!** (Mais je ne l'ai sûrement pas mis à jour sur le drive) et la réussite n'en est que plus savoureuse (#shootersss). Je n'ai jamais été aussi fière de moi de toute ma vie. Alors pour tout ça : M.E.R.C.I. Merci pour cette folie au quotidien et de m'avoir poussée au-delà de mes limites. J'ai compris que les seules limites qui existaient étaient celles que l'on s'impose. Merci d'avoir autant cru en moi que ce que j'ai été traumatisé des geneset #Onsautelahaie, merci de ton soutien et de ta bonne humeur au quotidien cavalefaire.fr. « Léa on ne va pas se mettre la rate au cours bouillon, ça passe pas ça passe pas ! » Puis on finit les APP/ERC/HDR/THESE et autres joyeusetés à 23h59mn59sec alors qu'on ne voulait pas y passer « la vie des rats » #jipépé. Yiiipahhh, banko la caravane, FoufP ! Enfin bref, MERCI pour ces trois années (de folie) difficiles mais qui m'ont construite (ou reconstruite). Je me suis notamment vue évoluer et m'élever pendant cette rédaction de thèse sûrement car j'ai réussi à dompter cette bête noire. Merci pour ton écoute, ta bienveillance, ta disponibilité et surtout ta flexibilité « Laura, on peut faire un point Vie ? ». On n'a pas tous des directeurs de thèse comme toi, et je suis très chanceuse de t'avoir eue pour la mienne. Alors encore une fois MERCI de m'avoir sortie de ma zone de confort, je n'en suis que plus forte à ce jour. Je te souhaite le meilleure dans ta belle carrière déjà bien accomplie, et aussi dans ta vie perso remplie d'amour, d'apéros, de bière, et de waterpolo. Pour toujours, ta pioupiou.

Marie ou « la tornade Castoch » merci pour cette capacité que tu as à TOUJOURS relativiser sur des moments où il est impossible de relativiser. BRAVO pour cette brillante carrière que tu es entrain de

Remerciements

consolider encore aujourd'hui. Merci de nous pousser toujours plus loin dans nos compétences. Tu crois en chacun de nous tous et c'est ce qui fait ta force de cheffe d'équipe. Merci de nous avoir fait vendre des cailloux peints, de m'avoir envoyée en flash éclair à Paris pour tourner un Tik-Tok ou de nous avoir fait tenir une buvette après un concert de clarinette ! Merci de savoir rester humaine, merci de m'avoir écoutée, remotivée et soutenue quand j'étais sous l'eau. Je n'aurais certainement pas fini cette thèse sans toi !

Aurélië, je te remercie du fond du cœur pour ton honnêteté, ta patience et tes conseils qui ont su résonner en moi. L'échos de tes mots ont pansé mes maux. Ton franc-parler et tes éternuements perchés sur du 12cm vont me manquer. « Oui allô bonjour ? Oui, c'est parfait merci ! » - *Raccroche* « Quelle connasse celle-là vraiment ! Je la déteste elle est incapable de faire son job ! ». Je te souhaite encore plus de meilleur pour la suite : de belles retraites de yoga où tu peux te reconnecter avec toi-même, de beaux voyages et surtout de Vivre de très bons moments avec Hugo. J'ai compris au fil de l'eau que l'essentiel d'une vie était de créer des souvenirs avec nos êtres les plus chers car c'est ce qui s'encre en nous pour toujours.

Martine, merci pour ta douceur et ta sérénité au quotidien, je te souhaite de joliment finir ta carrière, et je te souhaite le meilleur pour la retraite. Beaucoup de randonnées au Mont-Blanc et de nature !

La team #Organoids4ever : Arthur, Nina, Alejandro, Virginie, Claire, Clémence, Léna, Maëlle : MERCI pour notre travail de co-équipier durant cette thèse ! Cette cohésion et cet esprit d'équipe ! Mais ne me parlez plus jamais d'aliquoter des tubes pour le RNAseq... j'ai été traumatisée !!

Merci à **Solène, Clémence, Maman, Thomas, Lou** et **Tonton** d'avoir pris le temps de relire et de corriger ma thèse.

Et parce que rien n'aurait jamais été possible sans leur soutien incommensurable...

Anne-Lise : j'attendais ce moment depuis des années ! « A ma Mimi... » #voix qui tremble : **A ma Mimi**, et tout ce que tu m'as apportée depuis ces cinq dernières années ! On a partagé tellement de choses ensemble ! Je ne te refais pas l'histoire tu la connais déjà par cœur. Mais voici une liste non exhaustive... **Des cours de Master** où tu m'as détestée aux premiers regards en TP #J1, et quelques jours après tu essuyais mon vomi dans un Q5 blanc. « 48 rue des Charmettes, tiens, mes clés ». Je ne m'en souviens pas mais mon estomac oui (et mes siphons d'appart aussi), « Tu as noté ce qu'a dit le prof ? Non je n'ai rien écouté », « I LOVE YOU sur le double menton pendant les révisions ». **Aux soirées bien arrosées** (et aux vomis): « Moi je sais pas qui je suis HehHHe », « La fois où on a cassé les carreaux de la sdb sans jamais l'avoir assumé », « Water », « La fois où j'ai fini les 4 fers en l'air dans ta baignoire », « La fois où j'ai vomi dans la cour de Nanass et qu'on a accusé qqn d'autre », « La fois où

Remerciements

j'ai vomi dans le sceau à côté de là où tu dors sans n'avoir aucun souvenir», « La fois où tu es restée en TT chez toi parce que je décuais », **au sport** (et la procrastination) : rando à « Messimy rolling, petrol station », «La fois où on n'avait plus de batterie de voiture à Yzeron à cause des phares allumés, j'ai appelé mon père en visio pour démarrer la voiture de mon oncle, tu poussais la voiture ». **En passant par des voyages incroyables** : « Première destination la moins cher sur Skyscanner >>Lisbonne », « Il y a des espagnols dans le salon », « j'ai shooté dans un pppavé », « Inconnu au bitillon », « las patinetass », « Oh sorry, there is no ferry today », « the flight Glasgow>Lyon is full, sorry », « Casquette moustiquaire et midges », « Anne-Lise ne recule pas il y a un cerf ! », « rouler en première à 60km/h pour user l'essence », « Chivo, chivo ! Anne-Lise on hurle chèvre dans la voiture ». **Et des musiques incontournables** : « Je sais que toi t'aimes trop les Bimbo et que pour elle, t'as mis le turbo ! », « Oui ma gaté, RS4 gris nardo », « Elle s'appelle Andy, Fille de la nuit, elle a un mec qui vit sur Saint-Denis, j'ai pas fini, je les ai vus ensemble mardi », « Allelujia it's raining men *clap clap*, amen ! ». **Sans oublier la thèse** : où on a su être (un peu) sages, et réussir à bosser ensemble ! #Macrophage4ever « Sors le gyrophare on a une poche de sang ! ». Et bien sûr au-delà de tout ça, tu as été là pour moi à chacun des moments forts de ma Vie : « Léa, la vie est belle, regarde autour de toi ! », à toutes nos discussions, ivres, à 3h du mat dans toutes les sdb de la Terre. Tu vois et m'apportes de la lumière dans chacune de mes sombres pensées. J'admire ta façon de regarder le monde avec autant de simplicité, et c'est pour ça que j'ai besoin de toi au quotidien, pour ta spontanéité et ta joie de vivre. Alors MERCI pour ces années, et que les prochaines soient aussi belles et remplies que celles passées, je t'aime ma Mimi <3.

Solène : Ma Soso.. Je n'ai pas les mots assez forts et justes pour t'exprimer l'entièreté de mes remerciements. Merci de m'avoir récupérée quand j'étais au fin fond du trou, merci pour tes mots qui ont raisonné en moi et qui ont participé à ma reconstruction et ce sans jamais m'avoir jugée. Inconsciemment mais de très près tu as participé à la nouvelle personne que je suis aujourd'hui. Merci de croire en moi et surtout j'ai une chance inouïe d'avoir une amie comme toi qui me comprend aussi justement #4 qui raisonne en 1 et 2. Merci d'être là au quotidien, dans les bons comme les mauvais moments. Merci d'être la contre-balance de la folie d'Anne-Lise qui me permet de garder un équilibre sain (jtm AL hein) dans ma zone de confort. Ce solide noyau me permet de m'épanouir au quotidien. On partage de nombreuses valeurs communes, qui nous soudent un peu plus chaque jour. Que Nancy t'apporte tout ce qu'il te manque à Lyon ! On se retrouvera dans le Sud ou en Lorraine, c'est certain (d'ailleurs, tu fais quoi le 24 mars 2024 à 14h14 ?? #organisation #retroplanning) ! Prends soin de toi ma Soso, je t'aime ma Soso <3.

Adrien & Yannick : un grand merci à vous deux ! **Adrien** : Merci pour ton énergie de 50°C et ta spontanéité que je sirote sous 50°C au quotidien ! Une bouffée d'air frais tous les jours au travail, ça

Remerciements

n'a pas de prix ! As-tu déjà vu une Punto devenir décapotable en plein mois d'août à Montfermeil ?

Yannick : comment fais-tu pour le supporter au quotidien ? Merci à vous deux pour votre gentillesse, votre générosité et la joie de vivre que vous dégagez. Je vous souhaite le meilleur pour la suite, que vos projets basques aboutissent ! <3

Quentin : Quentin ? Non rien.

Bastien : le **MacKaniewski** qu'on rêve tous d'avoir dans nos vies... J'ai eu la chance de croiser ton chemin, et quelle rencontre ! Merci d'avoir comméré avec moi sur chacune des personnes qui le méritait (ou pas). Merci pour ta bienveillance et ta gentillesse. Et pour tous les bons conseils de la vie quotidienne ! Prend soin de toi mon Bastinus. <3

Virginie : Ma **Virg**, quelle belle découverte ! Je te remercie pour cette oreille attentive que j'ai pu avoir grâce à toi. Il est l'heure de prendre du temps pour soi-même, il est temps de se faire plaisir Virg, OSE ! On n'a qu'une vie, et personne d'autre que toi ne le fera mieux que toi ! OSE et VIS pleinement ! J'ai hâte de venir te voir dans ta chère Bretagne, où tu continueras de me faire découvrir cette belle région !! Kenavo !

Clémence : Je te remercie pour toutes ces confidences et ces remises en question (qui n'aboutiront peut-être jamais mais qui font du bien à l'esprit !). Je suis contente d'avoir pu partager ce gros projet de thèse avec une personne aussi minutieuse et perfectionniste que toi ! Merci de m'avoir poussée à avoir confiance pour ce manuscrit. Merci pour cette force ! Je te souhaite d'être heureuse dans le Nord ou ailleurs, mais il est temps de l'être... Ne perd espoir en rien et aies confiance en toi et en la Vie <3 !

Joseph : **Jojo**, un grand merci pour toutes ces discussions abstraites et philosophiques de la vie, ivre ou sobre. On n'a jamais rien résolu mais en parler est une thérapie qui permet d'amorcer la guérison. Je te souhaite et je nous souhaite d'être enfin heureux dans les domaines évoqués. Il est temps ! On se reverra à Nantes, au Canada ou en Islande qui sait... Bon vent Jojo, fait ce qu'il te plaît !

Quentin : #bout de cartax

Claire : Ma petite filleul, ma stagiaire, devenue maintenant... collègue de travail ! Bravissimo per tutto quello che hai fatto, sono fiero di te! Approfitti al massimo della vita. Piacere di vederti un giorno in italia ! Baci Chiara !

Quentin : « le coach sportif par excellence » (c'est faux). Merci pour tous tes conseils sportifs et ta force à me motiver et à toujours me *cheer-up* dans n'importe quel domaine. Pour tes blagues plus pourries les unes que les autres. Pour ton (non) talent de diapo, de montage, de blagues en tout genre. Hâte de te voir signer encore 8x un CDD chez la Castoch qui aura du coup eu gain de cause à te faire

Remerciements

faire une thèse, qui sait ! (N'en fait pas stp stp stp). Je te souhaite de belles aventures et de parcourir le monde à vélo ! A très vite en Ardèche avec du sauc', du Picodon et de la crème de marron ! <3

Laurène : Ma Laulau, merci pour toutes ces discussions philosophiques qu'on a pu avoir... et qu'on continuera d'avoir je l'espère ! Tu es une belle personne, crois en toi et en la vie ! Bravo encore pour ton poste bien mérité après toutes ces années. Je te souhaite de trouver une belle maison en campagne où tu pourras faire de belles randonnées. Je te souhaite d'être heureuse (mais plus dans l'ombre). Sois fière d'être qui tu es.

Paul H. : Yoooo grosse biaaaatcch, merci pour tous ces shooters qui n'en finissaient pas. Merci pour les presque-entorses, paraplégies, tétraplégies sur nos soirées déhanchées (en vrai j'ai encore des bleus sur le corps). HouhouuuUUhhhOouu. Je n'ai jamais douté de ton potentiel et peu importe où tu iras par la suite (j'irai où tu iraaaas (non c'est faux je ne veux plus jamais te revoir)), je reste persuadée que tu accompliras de belles choses. Bravo pour cette belle thèse (même si je n'ai jamais compris ce sur quoi tu bossais à part H3K27M dans les DIPG).

Clément & Léa : Les petits derniers zigotos de la team, un nouveau souffle (ou une tornade) dans l'équipe Castets. Je vous souhaite beaucoup de courage et de bravoure dans cette aventure qu'est la thèse, apprenez, partagez, accrochez-vous et faites de la belle science, soyez fiers ! #Continuezdeboireduricardetdesgrossshootersdeget27 <3

Arthur : Tutsineeeet, merci pour toutes les fois où « non mais au pire on s'en fout » quand j'étais en PLS. Tu as le don de tout rationaliser (ou de t'en foutre mais la limite entre les deux est très étroite). Aies confiance en toi, tu peux accomplir de belles choses, il suffit juste de croire en toi !

Maud : Merci pour ta spontanéité et ton franc parler ! Bonne chance pour ta thèse, et bon vent dans les plantes pour la suite ! (PS : Rdv en Amérique du Sud quand tu veux !).

Iveta : Merci pour tes conseils qui sont toujours de qualité, tu m'as toujours impressionnée dans ta façon de voir et de gérer les choses. Tant sur le perso que le pro. Je te souhaite que de belles choses pour la suite !

Léna : Merci de savoir toujours garder la tête froide au quotidien, ça a été un plaisir de travailler avec toi ! Je te souhaite des centaines de voyages qui continueront de t'enrichir. A bientôt !

Nina : Merci à toi Nins, pour toutes les fois où tu m'as remontée le moral (sauf les fois où tu nous as crié dessus au labo). Garde cette joie de vivre en toi, synonyme d'une belle énergie !

Le pôle bio-informatique : Clara, Thomas, Swann, Alexandra : merci pour votre aide et votre bon sens dans mes analyses, je vous souhaite bon vent pour la suite !

Remerciements

Laure Jebbari : Merci encore pour votre lettre qui m'a profondément touchée, notamment à une période de ma vie où j'avais besoin plus que n'importe quand, d'une source de motivation annexe qui me rappelle au combien mon sujet de thèse était important. Merci pour vos confidences et votre confiance. Je dédie en partie cette thèse à votre chère Mathilde.

A Mme Guerre ma prof de français de seconde, et ses propos « Léa doit se réorienter en bac pro, elle ne s'en sortira jamais autrement ! ». J'ai maintenant un bac+8 !

Marie-Laure Martin : MERCI pour votre soutien à mes côtés depuis quasiment la moitié de ma vie ! Je nous revois encore dans le minibus pour aller décrocher ce championnat de France à Brive-la-Gaillarde. Que de bons souvenirs. Il faut plus de profs comme vous dans l'éducation nationale !! Merci d'avoir été une si bonne prof, à toujours être fière de moi, même 15ans après. Promis j'essaierai d'utiliser les théorèmes de Pythagore et Thalès dans la vie courante (RAS durant ces 10 dernières années).

Antoine Poydatz : MERCI également pour votre soutien durant mes années lycées, mais je ne vous remercie pas de m'avoir terrorisée avec les identités remarquables... j'ai essayé de les intégrer à mon sujet de thèse mais : génération et caractérisation de $a^2+2ab+b^2$ dans les RMS cela ne sonnait pas vraiment bien... Vous m'excuserez !

Colette et Philippe : Merci pour toutes les fois où vous m'avez chaleureusement accueilli chez vous. Notamment à une période en particulier. Merci pour votre sympathie et bienveillance. Colette : à quand la prochaine tarte tatin svp ?? Je vous souhaite une belle retraite à tous les deux et de nombreux voyages bretons !

Anh: You cannot imagine how much grateful I am to have met you. My lovely housemate, I cannot thank you enough for all you teach me about life. Thank you for all your daily support, tea-time, cooking-time. Thank YOU for all your sweet advices, and confidence you gave me. You have participated to make me stronger every single day and still today. And for this, I will be forever grateful. I wish you and you both guys, all the best in your life. Love you.

Sebas: «I'm not crying, you are ! (but please do it in a cryroom, thanks)» Well... I do know that I wouldn't be able to handle the end of my internship in the NL if I hadn't met you! Now I know that «everything happens for a reason» and the best is coming next! Thank you for being who you are. Thank you for letting me discover your beautiful countries. I am so grateful to have you in my life. I will of course, welcome you anytime in France with your (omg omg omg) husband! Take care, xo <3.

Lou : Mgl, à l'heure où tu lis ces remerciements tu te prépares à partir à plus de 15.000km pour admirer la barrière de corail que tu attendais depuis tant d'années. Je ne te remercierai jamais assez pour nos dix dernières années passées ensemble ! On est loin des cours de chimie avec Mme Pirat et Mr Mirabel

Remerciements

et leur $\Delta A/\Delta B$. On est aussi loin de nos vendredis-sushi de Grand-Var et des révisions à la BU de la mécanique des fluides de Mr Frifri au magasin de la famille, Netto, Thon St Moret mâche, Massoud qui gratte sa caisse à 6h du mat' alors qu'on est rentrées de boîte il y a 20mn, loin de nos soirées Prosper en taillons 15cm. Tu es **mon alter ego**, tu connais mes sombres secrets comme les plus doux #boite noire. Et pour tout ça, MERCI. Merci d'être présente au quotidien, depuis toutes ces années. Je nous souhaite le meilleur pour la suite. Et je t'attends pour notre coloc' dans le Sud avec 3 hectares, des arbres fruitiers, un potager, des chevaux, Newt', Mi7, des cousins de Constance et Pumba où on ne mangera que du fromage, de la mozza, des noires de crimée, du basilic et de l'huile d'olive bien sûr. A très vite que tu me racontes ce voyage. A très vite, qu'on continue de se créer des souvenirs pour toujours. Je t'aime.

Ma famille & amis : Je remercie du fond du cœur ma famille et mes amis de m'avoir soutenue dans cette épreuve qu'est la thèse et ce même si vous n'avez jamais vraiment compris ce sur quoi je travaillais ? Merci à mes *précieuses* grands-mères, mes tantes et oncles, mes cousin(e)s que j'aime tant.

Mes oncles : Un grand merci à mes oncles, **Serge et Franck**, de toujours m'avoir soutenue dans cette démarche de thèse. Mention spéciale à Tonton Serge qui m'a soutenue depuis le post-bac. A toutes ces heures passées à modifier mes CV et mes lettres de motivation pour DUT, Licence, Jobs d'été, Masters, Thèse et même post-thèse ! A toutes ces discussions philosophiques de remise en question sur la vie. Merci pour les repas dominicaux entre bons plats chauds et journées passées avec Boboui !

A la moi d'il y a 15 ans : « Avertissement travail en 4^{ème} », j'entends encore les talons de maman qui raisonnent dans la cuisine au retour du conseil de classe. **On l'a fait ! Et même plus que ça !** Le parcours a été long et fastidieux mais quelle gloire à la fin ! « *Chi va piano va sano e va lontano* »

Mon frère : Merci **Cacato** de m'avoir soutenue dans une des étapes les plus difficiles de ma vie ! Et quelle étape !! Depuis petite j'essaie de m'aligner à ce que tu fais, parce que tu fais les choses bien. Alors merci d'avoir été ce modèle sur qui prendre exemple, qui m'a servi de tremplin pour aller au-delà de tout ce que j'aurais pu envisager un jour ! Merci aussi pour ces mois de confinement en région parisienne qui nous ont d'autant plus soudé entre PlayStation, guitare, Friends ou activités de couture, on ne s'est (presque) jamais ennuyés ! On se retrouve très bientôt dans notre chère Provence, autour d'un verre, entrain de danser la bachata sur une piste endiablée ou à choisir la couleur de mes murs ! (Mais je ne te laisserai pas choisir la couleur désolée #blancchampoussin)

Mes parents : **Papa, Maman**, C'est officiel, je passe en 5^{ème} ! Le mot MERCI n'a jamais eu autant de valeur dans ma vie. Merci de m'avoir transmis les valeurs fondamentales de la Vie tant sur le plan personnel que professionnel. Vous m'avez appris la justesse, la rigueur, et la détermination au travail,

Remerciements

qualités indéniables que j'ai appliqué au quotidien durant ma thèse. Merci de m'avoir toujours soutenue dans mes choix de vie et donc permis de devenir la personne que je suis aujourd'hui (même si à l'époque on n'aurait pas parié 1 franc sur mon avenir). Je ne vous remercierais jamais assez, je vous dois beaucoup. Après toutes ces années passées sur Lyon, il est temps de rentrer en Provence me retrouver et retrouver le noyau de ma chère famille. Je vous aime.

Je dédie une partie de cette thèse à Tatie Annie, Papi Joseph, Papé Guido. Je sais que vous veillez sur moi de là-haut.

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AJA : Adolescents Jeunes Adultes

ARID1A AT-rich interactive domain-containing protein 1A

ARMS : RMS Alvéolaire

B

BAF : BRM-associated factors

C

CCI : Childhood Cancer International

CD : Cellules Dendritiques

CDX : Xénogreffe Dérivée de lignée cellulaire

CS : Chondrosarcome

CSE : Cellule Souche Embryonnaire

CSPi : Cellule Souche Pluripotente induite

CSt : Cellule Souche de tissu

CTLA4 : Cytotoxique-T-Lymphocyte- Antigen 4 protein

CRISPR-Cas9 : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CSC : Cellule Souche Cancéreuse

D

2D : Deux dimensions

E

EFS : Etablissement Français du Sang

EpSSG : European Soft Tissues Sarcoma Study Group

ERMS : RMS Embryonnaire

EWSR1 : EWS RNA Binding Protein 1

F

FPRMS: Fusion Positive RMS

FNRMS : Fusion Négative RMS

FOXO1 : Forkhead Box O1

FOXO4 : Forkhead Box O4

G

H

I

IFN- γ : Interféron gamma

IL-4 : Interleukine 4

INO80D : INO80 Complex Subunit D

IPC : Inhibiteur de point de contrôle

IRSG : Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group

ITCC : Innovative therapies for children with cancer

IVADo : Ifosfamide-Vincristine-Dactinomycine-Doxorubicine

J

K

L

LMS : Léiomyosarcome

LPS : Lipopolysaccharide

LPS : Liposarcome

M

MCSF : Macrophage colony-stimulating factor

MYLPF : Myosin Light Chain 11

Liste des abréviations

N

NCOA1 : Nuclear Receptor Coactivator 1
NCOA2 : Nuclear Receptor Coactivator 2
NF1 : Neurofibromatose 1
NHEJ : Jonction d'Extrémités Non Homologues
NK : Natural Killer

O

OGM : Organisme génétiquement modifié
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OS : Ostéosarcome

P

PAX3 : Paired box 3
PAX7 : Paired box 7
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
PDX : Xénogreffe Dérivée de Patient
PTN : Pleiotrophin
PRMS : RMS pléomorphe

Q

R

Rag2 : Recombination Activating 2
RCP : Réunion Concertation Multidisciplinaire
RH : Recombinaison Homologue
ROS : Reactive oxygen species
RMS : Rhabdomyosarcome

S

SCID : Severe combined immuno deficient
SE: Sarcome d'Ewing
SGM : Souris Génétiquement Modifiée
SI : Système Immunitaire
SIOP : Société internationale d'oncologie pédiatrique
SNV : Single Nucleotide Variant

SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-Fermentable
SRF : Serum Response Factor
SRMS : RMS sclérosant
SS : Sarcome Synovial
STM : Sarcome des Tissus Mous
STM-NRMS : Sarcome des Tissus Mous Non RMS
SVF : Sérum de veau fétal

T

TEAD1 : TEA Domain Transcription Factor 1
TFCP2 : Transcription Factor CP2
TGF β : Transforming Growth Factor β
3D : Tri-dimensions
TP53 : Tumor Protein P53
TNNT : Troponine

U

V

VA : Vincristine-Dactinomycine
VAC : Vincristine Dactinomycine
Cyclophosphamide
VI : Vincristine Irinotecan
VGLL2 : Vestigial Like Family Member 2

W

X

XDC : Xénogreffe dérivée de cellules
XDP : Xénogreffe dérivée de patient

Y

Z

TABLE DES MATIERES

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
TABLE DES MATIERES	13
TABLE DES FIGURES & TABLEAUX.....	17
RESUME	21
SUMMARY	22
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	25
Préambule	25
I : Les cancers pédiatriques : les enfants ne sont pas de petits adultes	25
1. Généralités sur les cancers pédiatriques.....	25
a. Étiologie des cancers pédiatriques	27
i. Prédispositions et facteurs de risques des cancers pédiatriques.....	27
ii. Mutations génétiques et épigénétiques des cancers pédiatriques.....	28
b. Prise en charge des enfants atteints de cancers	31
2. Les sarcomes pédiatriques : généralités cliniques et cellulaires.....	33
a. Les sarcomes osseux.....	33
b. Les sarcomes des tissus mous	34
II : Les rhabdomyosarcomes : des tumeurs très hétérogènes	35
1. Généralités sur les rhabdomyosarcomes et évolution de leur classification clinique	35
2. Hétérogénéité inter-tumorale.....	37
a. Histologie des RMS	37
b. Classification moléculaire des RMS.....	38
i. Les FPRMS.....	38

Table des matières

ii. Les FNRMS	40
c. Epigénétique et cellule d'origine des RMS	41
d. Stratification par groupes de risque et prise en charge des patients	42
3. Hétérogénéité intra-tumorale.....	44
a. Les cellules souches cancéreuses : du dogme à la vision actuelle	45
i. Notion de clonalité cellulaire.....	45
ii. Notion de plasticité cellulaire	47
4. Rôle du système immunitaire dans les RMS	49
a. Impact du système immunitaire inné dans les RMS	50
b. Les macrophages	51
c. Les inhibiteurs de points de contrôle	52
III : Les modèles d'études des rhabdomyosarcomes.....	54
1. Tour d'horizon historique des modèles en cancérologie.....	54
a. Les lignées cellulaires, des cultures en 2 et 3 dimensions.....	54
b. Les modèles animaux	55
i. Les modèles de greffes	56
ii. Les organismes génétiquement modifiés.....	57
2. Les avantages et limites des modèles en cancérologie.....	58
3. Les modèles existants de RMS	60
4. Technologie organoïde et émergence de nouveaux modèles en cancérologie.....	63
a. Organoïdes vs. Tumoroides	63
i. Définition	63
ii. Génération des tumoroides.....	64
b. Application des tumoroides : un modèle novateur entre recherche fondamentale et translationnelle	65
OBJECTIFS DU PROJET DE THESE	73
RESULTATS.....	77
Résumé des résultats obtenus & publications associées	77

CONCLUSION.....	81
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	81
1. Les tumoroïdes : des modèles novateurs à l'interface entre les modèles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> pré-existants	81
2. Nécessité de définition et consensus : ne pas confondre tumoroïdes et « tumoroïdes »	83
3. Vers une bio-banque de FNRMS à la rechute ?.....	84
4. Efficacité de dérivation des RMS au diagnostic et tumoroïdes : un nouveau défi <i>in vitro</i> ?.....	84
5. Au-delà des limites du modèle organoïde : réductionniste vers organotypique.....	85
a. Tumoroïdes et micro-environnement tumoral	85
b. Vers une co-culture de tumoroïdes et de macrophages.....	86
6. : Vers des systèmes plus dynamiques	88
a. Tumoroïdes et biofluidiques.....	88
b. Tumoroïdes et modèles syngéniques.....	88
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	93
ANNEXES.....	118

TABLE DES FIGURES & TABLEAUX

Figure 1 : Estimation du taux de survie à 5 ans des cancers pédiatriques dans le monde. Disparité mondiale du taux de survie à 5 ans des cancers pédiatriques liée au manque crucial d'accès aux soins dans certains pays. Adaptée de Wand et al. 2019.....	26
Figure 2 : Proportion des cancers en fonction de l'âge. Les cancers pédiatriques les plus fréquents sont les cancers du sang et les tumeurs cérébrales. Le pourcentage de tumeurs épithéliales et mélanomes augmentent avec l'âge. Adaptée de Steliarova et al. 2017.	27
Figure 3 : « The Hallmark of Cancer » : Ensemble des quatorze caractéristiques des cellules tumorales. Au cours de la transformation tumorale, les cellules acquièrent des propriétés leur conférant des avantages sélectifs comparé aux cellules saines. Adaptée de Hanahan 2022.	29
Figure 4 : Modifications épigénétiques post-traductionnelles régulant l'expression des gènes. Les modifications épigénétiques permettent de moduler l'expression de certains gènes et participent activement à l'initiation et la progression tumorale. Adaptée et Kim et al. 2011.	30
Figure 5 : Evolution de la survie au cours du temps des principaux types de cancers pédiatriques. L'avènement des chimiothérapies dans les années 1960 a permis d'augmenter considérablement le taux de survie à 5 ans des cancers de l'enfant. Cependant, depuis près de 20 ans, le taux de survie stagne en moyenne autour de 60%. Adaptée de Chichra & Mahajan 2012.	32
Figure 6 : Evolution de la classification des rhabdomyosarcomes. Depuis les années 1960, la classification histologique des RMS ne cesse d'évoluer. A ce jour, il existe quatre sous-types de RMS : embryonnaire, alvéolaire, pléomorphe et sclérosant. Adaptée de Agaram 2022.....	36
Figure 7 : Translocation chromosomique des gènes PAX/FOXO1. La fusion des oncoprotéines intervient au niveau du domaine de transactivation des protéines PAX, leur conférant une activité constitutive, avec le domaine protéique « forkhead » de FOXO1. Cette fusion favorise notamment la croissance tumorale, la survie et participe à la migration et l'invasion des tissus à distance. Adaptée de Mahajan 2014 et Ramadan 2020.	39
Figure 8 : Hétérogénéité des statuts de fusion retrouvés dans les FPRMS. 85% des aRMS présentent un statut de fusion PAX-FOXO1 (A), mais d'autres fusions ont été récemment retrouvées dans différents sous-types de RMS notamment FUS-TFCP2 attribuant un profil clinique particulièrement agressif (B). Cette hétérogénéité complexifie d'autant plus la prise en charge des patients atteints de RMS. Adapté de Hettmer 2022.	40
Figure 9 : Classification des RMS selon leur profil méthylomique. L'étude du méthylome permet de redéfinir une classification des RMS difficilement classables en utilisant seulement leur profil histologique. Adaptée de Clay et al., 2021.....	42
Figure 10 : Représentation des différentes notions de l'hétérogénéité inter- et intra- tumorale : de la cellule d'origine à la génétique et à l'épigénétique en passant par le micro-environnement tumoral. Adapté de Melo et al., 2015.	45
Figure 11 : CSC et notion de clonalité. Au sein d'une tumeur, différentes cellules souches cancéreuses peuvent former différents clones tumoraux avec des propriétés et avantages tumoraux qui leur sont propres. Adaptée de Kreso et Dick, 2014.....	47

Figure 12 : Représentation schématique de la plasticité cellulaire. Les cellules tumorales sont capables de subir des transformations phénotypiques via des processus de dédifférenciation, différenciation ou transdifférenciation. Adapté de Shi et al., 2023..... 47

Figure 13 : La « souchitude » en tant que principal directeur régissant la réponse thérapeutique. Trois domaines de la biologie – la génétique, l'épigénétique et le micro-environnement tumoral se rejoignent pour clarifier l'organisation hiérarchique des tumeurs (A) et la résistance aux traitements qui en résulte (B). Adaptée de Kreso et Dick, 2014..... 49

Figure 14 : Théorie des 3 E dans l'échappement immunitaire dans les cancers. Dans un processus immunitaire physiologique où les cellules immunitaires dominent, les cellules tumorales sont éliminées. Lorsque les cellules tumorales présentent un trait plus agressif, le renforcement immunitaire permet de maintenir un équilibre entre les deux. Ces deux processus sont réversibles or, lorsque les cellules tumorales sont trop agressives, elles dominent de façon irréversible le contingent immunitaire conduisant à l'échappement tumoral. Adaptée de Ghiringhelli, 2013. 50

Figure 15 : Processus de différenciation des monocytes en macrophages, ainsi que les facteurs et cytokines respectivement sécrétés par les macrophages. Au cours de la différenciation terminale in vitro des monocytes en macrophages, les facteurs de type MCSF, LPS, IFN-g et IL4 sont indispensables pour obtenir respectivement des M0, M1 et M2. Il est à noter que chaque population de macrophage exprime des marqueurs membranaires communs et/ou propres, et que les M1 et les M2 présentent une capacité de plasticité très sensible aux facteurs environnementaux. 52

Figure 16 : Principes de xéno greffes orthotopiques et hétérotopiques de tumeur de patient (ici RMS) chez des animaux (ici rongeur). Les modèles de greffes peuvent être réalisés à partir de lignées cellulaires (XDC) ou de tissus tumoraux de patient (XDP) et peuvent être injectés en orthotopique pour une meilleure contextualisation de l'origine tumorale ou en hétérotopique pour des localisations difficiles (ex : rétro-orbital) Adapté de Steward et al., 2017. 56

Figure 17 : Avantages et limites des modèles en cancérologie. Chacun des modèles in vitro ou in vivo sont notés comme étant « très bon », « bon », « partiellement adapté » ou « non adapté » en fonction de la caractéristique détaillée. N/A : non applicable. Adaptée de Barbet et Broutier, 2021..... 60

Figure 18 : Ensemble des modèles utilisés pour étudier les rhabdomyosarcomes. Les RMS peuvent être modélisés à partir de lignées cellulaires ou sphéroïdes, de greffes d'animaux (rongeurs, poissons-zèbres ou drosophiles) ou à partir d'organismes génétiquement modifiés. 63

Figure 19 : Vue d'ensemble des processus de génération des tumoroïdes. Panel de gauche : les tumoroïdes peuvent être générés à partir de cellules souches pluripotentes ou de tissus sains après modifications génétiques, ou directement à partir de cellules tumorales issues de biopsies/résections ou fluides du patient. Panel du milieu : la composition du milieu fait intervenir des molécules inhibitrices, morphogènes et/ou des facteurs de croissance pour promouvoir l'auto-renouvellement, la prolifération et/ou la différenciation des cellules. Panel de droite : la mise en culture 3D peut être réalisée à partir de système rotationnel et avec ou sans recours à une matrice. ... 65

Figure 20 : Recensement des principaux types de tumeurs établis à partir de différents cancers chez l'adulte (panel de gauche) et l'enfant (panel de droite). A noter le manque crucial de développer des tumeurs pédiatriques. Adapté de(S. Kim et al., 2020)..... 66

Figure 21 : Applicabilité des modèles de tumeurs en recherche fondamentale et translationnelle. Adapté de Barbet et Broutier 2021..... 68

Figure 22 : Avantages et limites des modèles d'organoïdes/tumeurs vis à vis des modèles existants. Les modèles de tumeurs sont des modèles puissants et robustes permettant d'être à l'interface entre les modèles in vitro et in vivo déjà existants. Adapté de Barbet et Broutier 2021..... 82

Figure 23 : Mise en place d'un protocole de génération de macrophages humains sains et résultats préliminaires d'une co-culture avec des tumeurs de FNRMS pédiatriques et des macrophages. A) Protocole d'isolation et de différenciation de macrophages humains sains à partir de sang frais. B) Caractérisation des macrophages par méthode de cytométrie en flux. Certains macrophages expriment des marqueurs qui ne leur sont pas propres, reflétant leur grande plasticité. C) Co-culture en 3D entre des macrophages sains (rouge) et des FNRMS pédiatriques (vert). T=6h, (ratio 3 :1), échelle noire 200µm, échelle blanche 150µm. D) Imagerie à haute résolution des modèles de co-culture, permettant d'acquérir des images allant jusqu'à 70µm d'épaisseur. T=30h, (ratio3 :1). Noyau (bleu), RMS (vert), macrophages (rouge). Echelle 50µm. 87

Tableau 1: Caractéristiques histologiques et cliniques des sous-types de RMS. Chaque sous-type de RMS présente des traits histologiques et des localisations qui leur sont propres, permettant d'affiner le diagnostic. Adaptée de Kashi et al., 2017..... 38

Tableau 2 : Stratification des risques des patients atteints de RMS. Les patients sont classés en quatre sous-groupes allant d'un risque faible à très élevé. Cette stratification tient compte de paramètres cliniques tels que la taille, la localisation et le stade tumoral. Elle permet, à l'échelle européenne, d'uniformiser les protocoles de prise en charge des patients atteints de RMS. Adapté de FarRMS, Université de Birmingham, 2021. 43

Tableau 3 : Cohorte de patients utilisée pour dériver des tumeurs de FNRMS la rechute en milieu M3. 100% de nos échantillons ont pu être dérivés dans notre milieu M3. Le profil clinique de chaque patient est détaillé dans le tableau. 84

Tableau 4 : Récapitulatif des profils cliniques et moléculaires des lignées primaires de RMS au diagnostic, établies en milieu M5. 100% de nos lignées au diagnostic FP et FNRMS ont été générées utilisant le milieu basal M3, supplémenté, appelé M5. 85

RESUME

Les rhabdomyosarcomes sont des cancers rares de l'enfant mais représentent tout de même le premier cancer le plus fréquent des sarcomes des tissus mous, avec plus que 50% des cas. Malgré de nombreux essais cliniques, la survie globale des patients atteints de RMS n'a pas évolué depuis plus de 20 ans, et reste dramatique en cas de rechute. De plus, les thérapies actuelles ne sont pas dépourvues d'effets secondaires, à court ou moyen terme, impactant sévèrement la qualité de vie des patients. C'est pourquoi, il existe un réel besoin de développer des traitements plus efficaces et moins toxiques afin de soigner mieux et soigner plus les enfants atteints de RMS. Pour cela, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de l'initiation, de la progression mais aussi de la résistance aux traitements de ces tumeurs apparaît comme une nécessité absolue. Cependant, le manque de modèles expérimentaux mimant fidèlement les tumeurs retrouvées chez les patients, notamment lorsque l'on considère leur importante hétérogénéité inter- et intra- tumorale, complique la compréhension des caractéristiques biologiques des RMS. Dans ce contexte, nous avons mis en place des protocoles robustes pour générer et caractériser des modèles de tumoroïdes de FNRMS à la rechute. Ces modèles récapitulent les caractéristiques histologiques et moléculaires de leurs tumeurs d'origine et ce même après cryopréservation. Ils nous ont donc permis d'étudier l'impact de l'hétérogénéité tumorale dans la résistance aux traitements et nous avons validé leur potentiel préclinique en réévaluant les opportunités thérapeutiques de ciblage de l'apoptose dans les RMS. Ainsi, ces tumoroïdes de RMS, établis à partir de micro-biopsies résiduelles, sont à l'interface entre la recherche fondamentale et la recherche clinique et ont le potentiel d'ouvrir de nouveaux horizons thérapeutiques pour les patients atteints de RMS.

Mots clés : Rhabdomyosarcome, cancer pédiatrique, tumoroïdes, nouveaux modèles, thérapies.

SUMMARY

Rhabdomyosarcoma (RMS) constitute the most frequent form of soft tissue sarcomas among children, adolescents/young adults and represent a high-grade neoplasm of skeletal myoblast-like cells. Despite the use of a multimodal treatment and the implementation of several clinical trials, improvement in overall survival and quality of life of pediatric patients with RMS has been marginal. Moreover, intensive therapies are not devoid of long-term side effects including relapse due to resistance to treatment. Thus, there is an urgent need to develop more effective and less toxic treatments adapted to pediatric patients. To do so, a better understanding of the oncogenic pathways causing initiation, progression but also resistance to treatment represents a critical step for the development of new approaches increasing treatment efficacy. However, the diverse clinical behaviors of RMS and the lack of experimental models challenge the investigation of their biologic and clinical features. Increasing evidence supports that RMS are highly heterogeneous tumors between patients and in their intracellular composition also called intratumoral heterogeneity. The recent advances in *in vitro* 3D culture technologies, such as organoids, have offered the possibility for the development of novel, more physiological human cancer models and in particular mimicking faithfully inter- and intra-patient heterogeneity. We therefore decided to set up and characterize organoid models derived from patients with pediatric and adult metastatic or relapse FNRMS. Those models slightly recapitulate the histo architecture and molecular features of the patient they derived from, even after cryopreservation. They allowed us to study the impact of treatment resistance related to tumoral heterogeneity and they became a proof of concept to reevaluate therapeutic opportunities targeting apoptosis pathways in RMS. Thus, RMS organoids, established from micro-biopsies, can bridge the gap between basic and clinical research, opening new horizons to cure patients with RMS.

Keywords : Rhabdomyosarcoma, cancer, organoids, new model, therapies.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Préambule

*« A wife who loses a husband is called a widow. A husband who loses a wife is called a widower. A child who loses his parents is called an orphan. **There is no word for a parent who loses a child. That's how awful the loss is** ».* Jay Neugeboren

Les cancers pédiatriques restent à ce jour des maladies rares pouvant être parfois fatales pour certains enfants. Les cancers pédiatriques sont subdivisés en cancers dits « liquides » ou « solides ». Parmi les cancers dits « solides » on retrouve les rhabdomyosarcomes (RMS) comme étant le cancer le plus fréquent des tissus mous. En France, près de 100 nouveaux cas de rhabdomyosarcomes sont diagnostiqués chaque année.

*Les patients atteints de RMS sont généralement traités par des thérapies conventionnelles qui hélas, depuis près de 30 ans ont atteint un plateau avec un taux de survie à 5 ans de 80%, accompagné de lourds effets secondaires et de risques de rechute. En d'autres termes, **il est nécessaire de pouvoir soigner plus et soigner mieux.***

Dans le but de contextualiser mon sujet de doctorat, cette introduction sera divisée en trois sous-parties. Je commencerai par une présentation générale des cancers pédiatriques, suivi d'une description plus précise des rhabdomyosarcomes et enfin j'introduirai la notion de modèle en cancérologie en décrivant les modèles disponibles pour l'étude des RMS et définirai plus particulièrement les tumoroïdes, modèles innovants au cœur de mon projet de thèse.

I : Les cancers pédiatriques : les enfants ne sont pas de petits adultes

1. Généralités sur les cancers pédiatriques

Les cancers pédiatriques, tout comme ceux qui affectent les adultes, sont des tumeurs malignes résultantes d'une prolifération anarchique de cellules dans un tissu ou un organe. Dans certains cas, les tumeurs peuvent se disséminer et coloniser les tissus ou organes, adjacents ou à distance. On parle alors de métastases, la plupart du temps fatales pour les patients. Les cancers pédiatriques touchent des enfants et des adolescents jeunes adultes (AJA) allant respectivement de 0 à 14 ans puis de 15 à 19 ans avec une répartition des sexes de 1:1 ([World Health Organization, 2020](#)).

Bien que les cancers pédiatriques soient rares, ils représentent la première cause de décès par maladie chez les enfants et les AJA. Dans le monde, on estime que 400.000 nouveaux cas de cancers pédiatriques sont diagnostiqués chaque année ([World Health Organization, 2020](#)). Un enfant sur 440

développe un cancer avant ses 15 ans, et près d'un enfant sur 280 avant ses 19 ans. Cette dynamique de prévalence s'accroît chaque année notamment avec l'amélioration des diagnostics (Lam et al., 2019), (World Health Organization, 2020).

Le taux de survie à 5 ans atteint près de 80% dans les zones géographiques où l'accès aux soins est facilité, comme en Europe, en Amérique du Nord ou encore en Asie de l'Est, contre seulement 30% en Afrique ou en Asie du Sud (Figure 1) (World Health Organization, 2020).

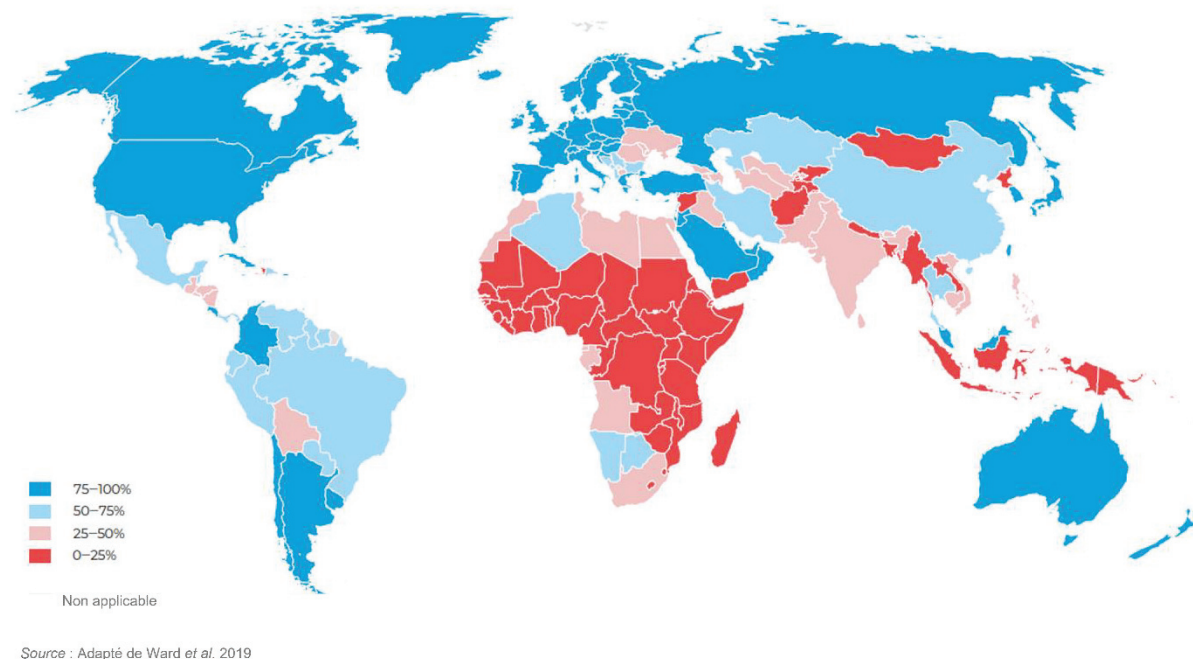


Figure 1 : Estimation du taux de survie à 5 ans des cancers pédiatriques dans le monde. Disparité mondiale du taux de survie à 5 ans des cancers pédiatriques liée au manque crucial d'accès aux soins dans certains pays. Adaptée de Wand et al. 2019.

Les adultes développent majoritairement des carcinomes dérivés du tissu épithélial bien différencié, ce qui reste très rare chez les enfants (Steliarova-Foucher et al., 2005). En effet, le top trois des cancers développés par les hommes sont les cancers pulmonaires (15.3%), prostatiques (15.1%) et colorectaux (11.4%). Chez la femme, les cancers majoritairement développés sont le cancer du sein (1 femme sur 4), le cancer colorectal (près de 10%) suivi de près par les cancers du poumon (8.9%) (Torre et al., 2016). A contrario, les principaux cancers de l'enfant sont les leucémies (36%), les cancers cérébraux (10-15%) et les sarcomes qui représentent 10% des cas par an. Le taux de tumeurs épithéliales et de mélanomes représente moins de 1% chez les enfants de 0 à 4 ans contre plus de 20% chez les AJA (Figure 2). Cette massive différence de cancers épithéliaux retrouvés chez les adultes et qui augmente avec l'âge des enfants, pourrait se traduire par une accumulation d'anomalies de ces tissus, beaucoup plus exposés aux facteurs externes (Steliarova-Foucher et al., 2017).

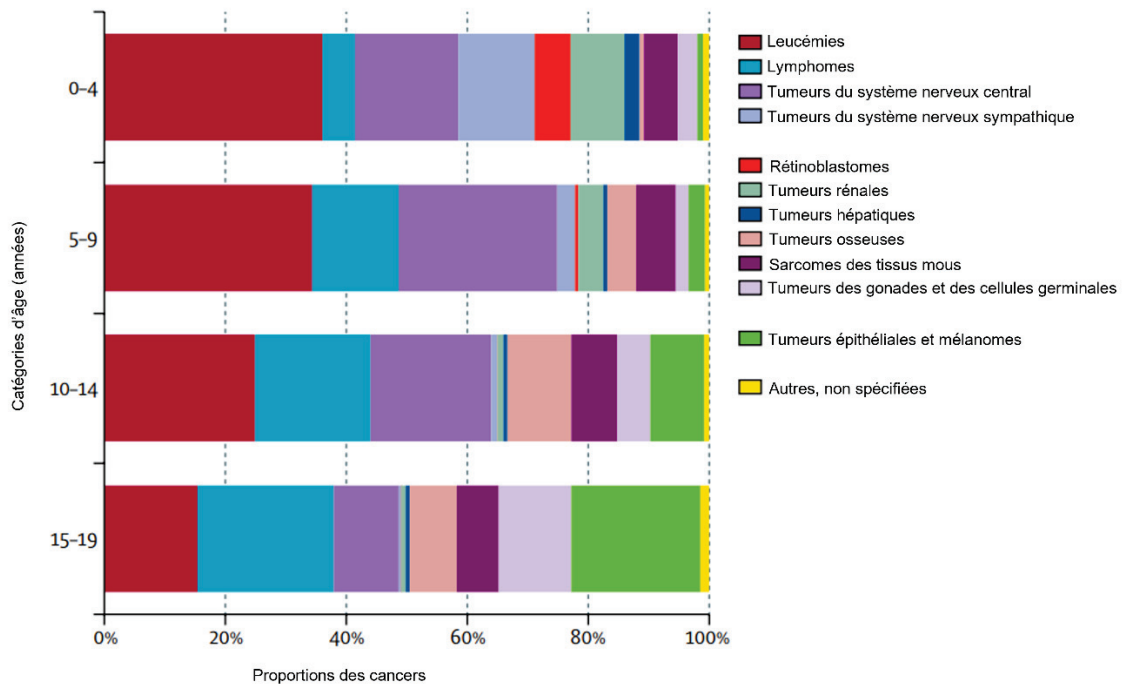


Figure 2 : Proportion des cancers en fonction de l'âge. Les cancers pédiatriques les plus fréquents sont les cancers du sang et les tumeurs cérébrales. Le pourcentage de tumeurs épithéliales et mélanomes augmente avec l'âge. Adaptée de Steliarova et al. 2017.

Les cancers pédiatriques représentent près de 400.000 nouveaux cas par an à l'échelle mondiale. Contrairement aux adultes qui développent principalement des carcinomes, le top cinq des cancers de l'enfant sont : les leucémies, les neuroblastomes, les néphroblastomes, les cancers cérébraux et les sarcomes. **En France, les sarcomes pédiatriques représentent 10% des cas.**

a. Étiologie des cancers pédiatriques

i. Prédispositions et facteurs de risque des cancers pédiatriques

L'étiologie des cancers pédiatriques est encore mal connue à ce jour. Peu de cancers pédiatriques peuvent être évités tandis que près de 40% des cancers de l'adulte le sont puisqu'ils sont directement liés à l'hygiène de vie (tabac, alcool, alimentation) ou à l'exposition à des facteurs environnementaux (ultra-violet, pollution, infections virales) (*Santé Publique France, 2015*).

Les enfants sont généralement moins exposés à ces facteurs externes nocifs, cependant, les rayonnements ionisants à haute dose (médicaux ou accidentels), certaines chimiothérapies ou une immunodéficience peuvent être considérés comme des facteurs de risque de développer certains types de cancers (*Strahm & Malkin, 2006*), (*Lacour et al., 2011*). Aussi, l'exposition aux pesticides et hydrocarbures ou l'alimentation (au cours de la gestation ou pendant l'allaitement), semblent pouvoir jouer un rôle pour certaines tumeurs cérébrales (*Lacour et al., 2011*). Enfin, l'exposition aux virus, notamment celui à l'Epstein-Barr serait à l'origine de la majorité des lymphomes de Burkitt et

Hodgkinien (*Strahm & Malkin, 2006*), (*Lacour et al., 2011*).

D'un point de vue intrinsèque, les prédispositions génétiques sont faiblement responsables (1-10%) des cancers de l'enfant (*Strahm & Malkin, 2006*), (*Capasso et al., 2020*). Toutefois, certains gènes tels que *PTCH1* et *SUFU*, impliqués dans la voie de signalisation Sonic Hedgehog au cours du développement du cervelet (*Bourdeaut et al., 2012*), (*Capasso et al., 2020*) ou bien *RB1* présent dans les rétinoctytes, jouent un rôle prépondérant dans les tumeurs embryonnaires (respectivement dans les médulloblastomes et les rétinoblastomes) lorsqu'ils sont mutés (*Strahm & Malkin, 2006*), (*Lacour et al., 2011*), (*Capasso et al., 2020*). Par ailleurs, l'anémie de Fanconi, une mutation du gène *FANC*, se traduisant par une aplasie médullaire progressive, ou encore la trisomie 21, sont associées à un risque très élevé de leucémie (*Strahm & Malkin, 2006*), (*Lacour et al., 2011*). Aussi, le syndrome de Li-Fraumeni, caractérisé par une mutation du gène suppresseur de tumeur *TP53* est retrouvé dans près de 10% des sarcomes pédiatriques, tels que les ostéosarcomes ou les rhabdomyosarcomes (*Strahm & Malkin, 2006*). Également, les syndromes *DICER1*, syndrome de Costello (associé au variant *HRAS*) et le syndrome de Noonan (associés aux RASopathies) peuvent être à l'origine de certains rhabdomyosarcomes (*Hettmer et al., 2022*).

ii. Mutations génétiques et épigénétiques des cancers pédiatriques

Il existe plusieurs types de mutations, les mutations spontanées et les mutations induites, causées respectivement par des facteurs intrinsèques ou externes. Le taux de mutations somatiques retrouvé dans les tumeurs des adultes est beaucoup plus élevé que chez les enfants, en particulier dû à l'accumulation de mutations au cours de la vie, notamment *via* une exposition répétée et/ou excessive à de nombreux mutagènes. En effet, plus de 200 mutations sont retrouvées dans les mélanomes ou tumeurs pulmonaires dues respectivement aux ultra-violets et au tabac (*Vogelstein et al., 2013*). Chez l'enfant, on parle plutôt de mutations sporadiques ou stochastiques, liées en partie à l'ontogénèse. Durant l'embryogénèse, la taille de l'embryon passe de 3 millimètres à 90 millimètres en 9 semaines de gestation, avec un fœtus atteignant en moyenne 50 centimètres à la naissance. Ce qui signifie que la taille de l'embryon augmente en moyenne 170 fois, au travers d'une massive expansion de prolifération cellulaire durant le développement prénatal (*Monje, 2018*). En effet, au cours du développement embryonnaire et jusqu'à l'âge de 19 ans, les mécanismes de prolifération, différenciation, et régulation du cycle cellulaire sont perpétuellement sollicités entraînant parfois des erreurs dans le code génétique. Ces erreurs peuvent être réparées par des systèmes de réparation à l'ADN, ou si irréparables, les cellules trop endommagées sont éliminées (*Monje, 2018*), (*Khokhlova et al., 2020*). Outre les rares mutations génétiques spontanées survenues au cours de l'embryogénèse, un autre mécanisme semble jouer un rôle crucial dans l'apparition de ces cancers : l'épigénétique (*Monje, 2018*).

En 2000, Hanahan et Weinberg publient la célèbre revue « The hallmarks of Cancer » (*Hanahan & Weinberg, 2000*) récapitulant les caractéristiques des cellules cancéreuses. Onze ans plus tard, ils intègrent quatre nouveaux concepts dans une deuxième revue « The hallmarks of Cancer : Next generation » (*Hanahan & Weinberg, 2011*) incluant notamment « les mutations et l'instabilité génomique ». Puis en 2022, Hanahan ajoute de nouveau quatre autres spécificités liées aux développements des cancers (**Figure 3**) en plus des dix précédentes (*Hanahan, 2022*), en faisant la distinction entre « les mutations et l'instabilité génomique » et « la reprogrammation épigénétique ».

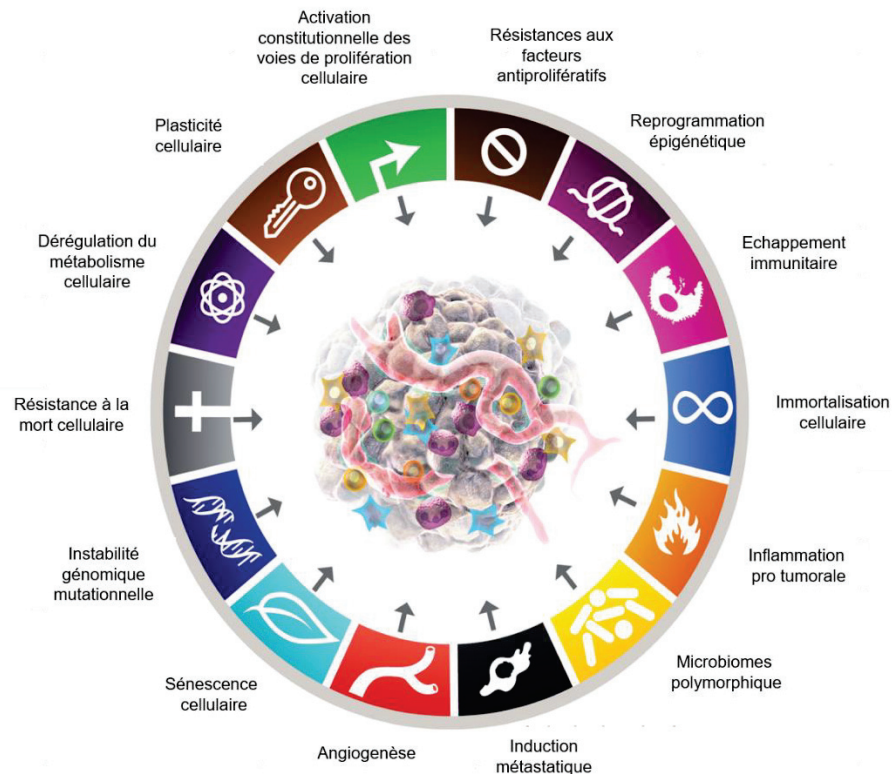


Figure 3 : « The Hallmark of Cancer » : Ensemble des quatorze caractéristiques des cellules tumorales. Au cours de la transformation tumorale, les cellules acquièrent des propriétés leur conférant des avantages sélectifs comparé aux cellules saines. Adaptée de Hanahan 2022.

Conrad Waddington a été le premier à définir la notion d'épigénétique au début des années 1940 en plaçant le préfixe « épi » qui signifie « autour » de « génétique » pour évoquer un mécanisme adjacent à la régulation de l'expression des gènes (*Waddington, 2012*). L'ADN est enroulé toutes les 147 paires de base autour d'un complexe de huit protéines d'histones, donnant la formation d'un nucléosome. Les sous unités d'histones, appelées H2A, H2B, H3 et H4 sont chacune au nombre de deux formant ainsi un octamère (*Lawrence et al., 2016*), (*Millán-Zambrano et al., 2022*). Chaque sous unité d'histone contient une queue émergeant du nucléosome, contenant une multitude de résidus d'acides aminés pouvant subir des modifications post-traductionnelles (*Lawrence et al., 2016*). Ces modifications peuvent être de différents types : phosphorylation, méthylation, acétylation,

ubiquitination ou encore sumoylation et participent étroitement à la régulation de l'expression des gènes (Millán-Zambrano et al., 2022) (Figure 4).

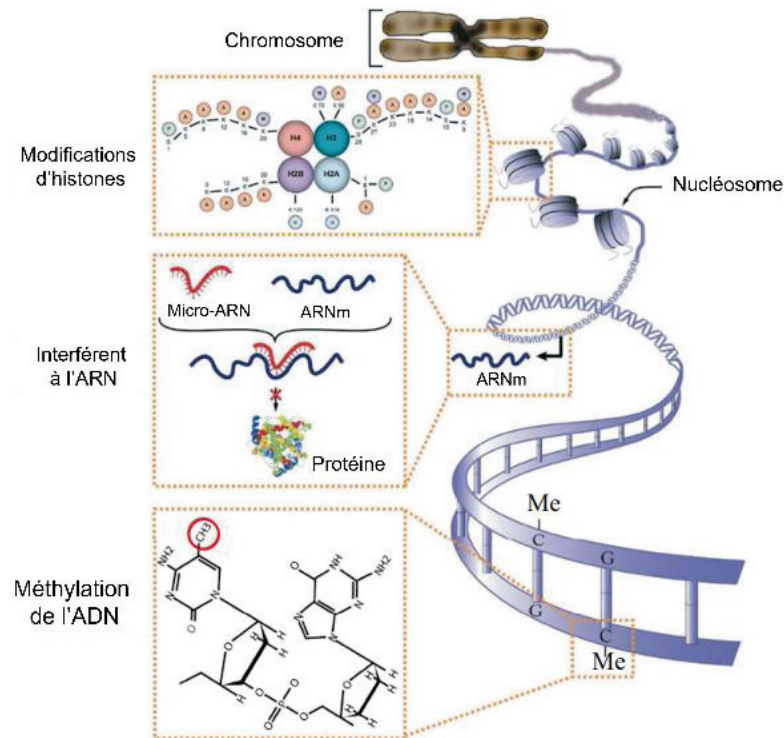


Figure 4 : Modifications épigénétiques post-traductionnelles régulant l'expression des gènes. Les modifications épigénétiques permettent de moduler l'expression de certains gènes et participent activement à l'initiation et à la progression tumorale. Adaptée et Kim et al. 2011.

Ces modifications post-traductionnelles sont impliquées dans la régulation physiologique du développement embryonnaire, ou pathologique de type maladies neurologiques, cardiopulmonaires et des cancers (G. H. Kim et al., 2011). Notamment, les enzymes acétyltransférase *HBO1* et désacétyltransférase *HDAC6* participent aux modifications d'histones, promouvant l'activation de certains mécanismes à l'origine de la progression tumorale. Leur inhibition induit l'arrêt de croissance cellulaire *in vitro* et *in vivo* respectivement dans l'ostéosarcome (OS) (Gao et al., 2021), les sarcomes d'Ewing (SE) (García-Domínguez et al., 2021) et les rhabdomyosarcomes (Pham et al., 2020).

D'autres modifications de type méthylation de l'ADN ou interférences liées aux micro RNA participent également à la régulation de l'expression des gènes (G. H. Kim et al., 2011), (L. Zhang et al., 2020) (Figure 4). Par exemple, selon le profil de méthylation de l'ADN, les lymphomes lymphoblastiques de type T et les astrocytomes pilocytiques peuvent être respectivement distingués de la leucémie lymphoblastique et des tumeurs leptoméningées diffuses (Gaál, 2023). De ce fait, l'épigénétique représente donc une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des cancers, et notamment des cancers pédiatriques (Gaál, 2023).

Avec un faible taux de prédispositions génétiques chez l'enfant ainsi qu'une moindre exposition aux facteurs environnementaux comparé aux adultes : les mutations sporadiques et l'épigénétique dans un contexte ontogénique semblent jouer un rôle clé dans l'étiologie des cancers pédiatriques.

b. Prise en charge des enfants atteints de cancers

En France chaque année, près de 3000 enfants sont diagnostiqués d'un cancer et près de 500 en meurent (*Enfants sans Cancer, n.d.*). Depuis les années 1960, le taux de survie à 5 ans est passé de 30 à 80% dans les pays où l'accès aux soins est favorisé. Malheureusement, tous les enfants ne sont pas égaux face à ces améliorations de prise en charge et de soins curatifs. En effet, cela dépend du type de cancer, de l'âge, de la localisation tumorale, du stade de la maladie et s'il y a, de ses mutations génétiques (*Erdmann et al., 2021*).

Les protocoles de traitements pédiatriques sont similaires à ceux des cancers de l'adulte. Ils reposent principalement sur la chirurgie, les chimiothérapies parfois très agressives et peu spécifiques, et la radiothérapie. Le traitement des cancers hématologiques pédiatriques, se fait principalement par administration d'une ou plusieurs chimiothérapies conventionnelles (*Erdmann et al., 2021*). La chirurgie étant impossible dans les cancers liquides, l'allogreffe de moelle osseuse se révèle être une alternative ou un complément de traitement dans certains cas cliniques (*Mehta, 2009*). A contrario, pour les tumeurs solides, comme les sarcomes, la chirurgie sera favorisée en fonction de la localisation et de l'étendue tumorale en addition d'une ou de plusieurs chimiothérapies néo-adjuvantes. Si la chirurgie s'avère impossible, la chimiothérapie peut être proposée en premier lieu afin de diminuer la taille de la tumeur permettant potentiellement une résection totale ou partielle de la tumeur *a posteriori* (*Mehta, 2009*).

Ces protocoles de traitements multimodaux permettent d'augmenter significativement le taux de survie chez le patient (*Chichra & Mahajan, 2012*), (*Erdmann et al., 2021*). Depuis les années 2000, et dans le cadre du Plan Cancer, ces protocoles sont décidés au sein de réunions de concertation multidisciplinaires (RCP) faisant intervenir des chirurgiens, oncologues, radiologues et autres personnels du pan médical, comme les attachés de recherche clinique. Les décisions médicales évoquées durant ces RCP visent à structurer et harmoniser la prise en charge des patients atteints de cancer. Ces réunions ont pour but de passer de la décision individuelle à la décision collective permettant d'adapter au mieux le traitement chez le patient (*Orgerie et al., 2010*).

Par ailleurs, les traitements ne sont pas sans conséquence sur l'organisme. Les effets secondaires majeurs, aigus ou chroniques, peuvent avoir des répercussions physiques (risque de rechutes, cancer(s) secondaire(s), complications cardio-pulmonaires), mentales (impact

psychologique, anxiété, dépression) mais également sociologiques (troubles des interactions sociales) (Landier et al., 2018), (Sundberg et al., 2009).

Cependant, l'évolution des protocoles cliniques et des essais cliniques depuis ces 20 dernières années, permet d'atteindre un taux de survie à 5 ans de près de 80%. Depuis, il y a une stagnation dans l'amélioration de la prise en charge des enfants (Figure 5) (Chichra & Mahajan, 2012).

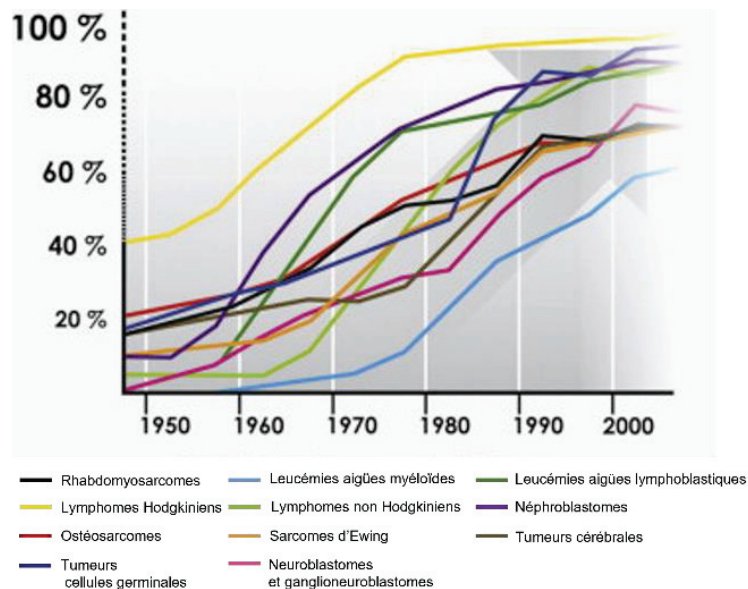


Figure 5 : Evolution de la survie au cours du temps des principaux types de cancers pédiatriques. L'avènement des chimiothérapies dans les années 1960 a permis d'augmenter considérablement le taux de survie à 5 ans des cancers de l'enfant. Cependant, depuis près de 20 ans, le taux de survie stagne en moyenne autour de 60%. Adaptée de Chichra & Mahajan 2012.

Comme évoqué précédemment, les cancers des adultes et des enfants sont très différents mais sont pour autant traités avec les mêmes thérapies. Plus de 50% des traitements dont les essais cliniques ont été réalisés sur des adultes, sont appliqués aux enfants. C'est notamment en raison de la rareté des cancers pédiatriques que les essais cliniques ne sont pas développés par les industries pharmaceutiques, explique le Pr Gilles Vassal, ancien directeur de la Recherche Clinique de l'Institut Gustave Roussy, à Paris (Enfants sans Cancer, n.d.).

Depuis 2004, il existe des campagnes de dépistage précoce organisées par la sécurité sociale visant à diagnostiquer les cancers des adultes les plus courants à savoir : les cancers du côlon ou du sein (Santé Publique France, 2015). Cependant, il n'existe pas de campagne de prévention ou de dépistages précoces pour les enfants. Toutefois depuis 2001, l'association des Cancers Pédiatriques Internationaux (CCI) met en place une journée mondiale, le 15 février, permettant de sensibiliser aux cancers pédiatriques. Aussi, depuis 2016, la France participe au mois « Septembre en Or » qui permet de se mobiliser pour les cancers de l'enfant et apporter un soutien à la recherche.

*Depuis près de 30 ans le taux de survie à 5 ans des cancers pédiatriques stagne autour de 80%. Pour causes : une **compréhension partielle** de l'étiologie et des spécificités des cancers pédiatriques ainsi qu'un **manque d'intérêt de l'industrie pharmaceutique en raison de la rareté des cas**. De ce fait, les **protocoles thérapeutiques** mis en place **chez l'adulte** sont globalement **les mêmes** que **chez l'enfant**, à l'exception des dosages adaptés au prorata du poids.*

*Il est donc urgent de développer des traitements adaptés et spécifiques aux enfants et à leurs types de tumeurs pour **soigner plus et soigner mieux**.*

2. Les sarcomes pédiatriques : généralités cliniques et cellulaires

Bien que les sarcomes représentent seulement 1 à 2 % des cancers, tous âges confondus ([Ferrari et al., 2016](#)), ils concernent entre 10 à 20% des cancers des enfants et AJA ([Burningham et al., 2012](#)), ([Williams et al., 2016](#)). En France chaque année, près de 4000 nouveaux cas sont diagnostiqués ([Institut Curie - Centre de Recherche et Traitement Du Cancer En France, n.d.](#)).

Les sarcomes pédiatriques constituent un groupe très hétérogène de tumeurs issues du mésenchyme et peuvent être subdivisés en deux grands sous-types : les sarcomes osseux et les sarcomes des tissus mous ([Ferrari et al., 2016](#)). L'objectif de cette partie n'est pas l'exhaustivité mais de pouvoir contextualiser mon projet de thèse, c'est pourquoi je décrirai les principaux sous-types de sarcomes pédiatriques osseux et des tissus mous en me focalisant sur leurs principales caractéristiques cliniques, histologiques et moléculaires.

a. Les sarcomes osseux

Les ostéosarcomes (OS) sont les tumeurs les plus fréquentes des sarcomes osseux. Ils se manifestent majoritairement aux alentours de 15 ans chez les AJA et 65 ans chez les adultes ([Williams et al., 2016](#)), ([Capasso et al., 2020](#)) et touchent préférentiellement les individus de sexe masculin ([Ferrari et al., 2016](#)). Les OS pédiatriques se développent principalement dans la partie métaphysaire des os longs situés aux extrémités des membres. Les OS présentent une haute instabilité génomique, notamment par l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs *TP53* et *RB*, ou par le gain de fonction des télomérases responsables du raccourcissement des chromosomes ainsi que des gènes impliqués dans la voie de signalisation *PI3K* ([Jones et al., 2019](#)). Lors du diagnostic, 15 à 20% des enfants présentent des métastases pulmonaires, décrit comme étant le site métastatique préférentiel des OS ([Ferrari et al., 2016](#)).

A *contrario* des OS qui ont une instabilité génomique très élevée, les sarcomes d'Ewing (SE), deuxième sous-type de sarcomes osseux les plus fréquents, sont caractérisés par une protéine de fusion entre le gène *EWSR1* et des facteurs de transcription de type *FLI1* (85% des cas) ou *ERG* (10%

des cas) (*Jones et al., 2019*). Ils se développent préférentiellement dans la partie diaphysaire de l'os (*Bernstein et al., 2006*) et touchent principalement des individus âgés de 5 à 25 ans. Dans certains cas cliniques, le diagnostic peut être confondu avec un sarcome des tissus mous, de par sa localisation parfois ambiguë à l'interface entre l'os et les tissus mous (*Williams et al., 2016*). L'analyse de la protéine de fusion et de l'immunohistochimie permettent cependant de trancher sur le type de sarcome.

Dans les années 1970, les tumeurs osseuses étaient traitées principalement par résection locale voire amputation des membres concernés résultant d'un taux de survie d'environ 10% (SE) à 20% (OS). Depuis l'avènement des chimiothérapies et des traitements multimodaux, le taux de survie atteint aujourd'hui près de 60% pour les SE et 80% pour les OS (*Williams et al., 2016*).

b. Les sarcomes des tissus mous

Les sarcomes des tissus mous (STM) font partie d'un groupe très hétérogène de plus de 50 sous types histologiques dérivés de cellules mésenchymateuses (*Ferrari et al., 2016*). La répartition de ces tumeurs varie selon l'âge : les sarcomes synoviaux, les liposarcomes, les léiomyosarcomes et les sarcomes pléomorphes indifférenciés sont fortement rencontrés chez les adultes (*Ferrari et al., 2016*), (*Health, 2017*). En revanche, plus de 50% des cas pédiatriques et AJA sont des rhabdomyosarcomes (*Ferrari et al., 2016*), (*Fan et al., 2022*). Je m'intéresserai aux rhabdomyosarcomes, au cœur de mon projet de thèse, dans une partie dédiée « II : Les rhabdomyosarcomes : des tumeurs très hétérogènes ».

Brièvement, les autres types de cancers pédiatriques/AJA sont classés comme étant des sarcomes de tissus mous « non-rhabdomyosarcome » (STM-NRMS) (*Ferrari et al., 2016*) incluant principalement les sarcomes synoviaux, les dermatofibrosarcomes protubérants, les tumeurs malignes des gaines nerveuses ou encore les fibrosarcomes (*Spunt et al., 2008*). Ces STM-NRMS comptent pour moins de 4% des cancers pédiatriques et sont pour la plupart très peu étudiés (*Jones et al., 2019*).

Les sarcomes synoviaux (SS) représentent la forme la plus connue des STM-NRMS chez les enfants, avec près de 30% des cas, tous âges confondus (*Gazendam et al., 2021*). Bien que la plupart des SS émergent des structures articulaires, l'origine de la tumeur ne semble pas se développer à partir du liquide synovial intra-articulaire mais plutôt des cellules mésenchymateuses (*Jo & Fletcher, 2014*). Ils sont caractérisés par une translocation chromosomique (tX;18) conduisant à la formation de protéine de fusion SS18:SSX dans plus de 95% des cas. Le taux de survie à 5 ans est estimé entre 60 à 75% à ce jour contre 25 à 50% dans les années 1960 (*Gazendam et al., 2021*). Cependant, bien qu'ils fassent partie des STM, un nouveau cas clinique de SS a été diagnostiqué dans l'os, chez un patient de 33 ans (*Caracciolo et al., 2019*). Cette découverte ajoute un degré de complexité supplémentaire quant

à la classification et au diagnostic des sarcomes et nécessite d'être plus investigué afin d'affiner le diagnostic et la prise en charge des patients.

*Les sarcomes pédiatriques représentent 10% des cancers pédiatriques en France. On distingue les **sarcomes osseux** incluant majoritairement les ostéosarcomes et les sarcomes d'Ewing, et les **sarcomes des tissus mous** dont les **2 sous-types majoritaires** sont les **RMS** et les **SS** représentant respectivement **50%** et **30%** des cas chez les enfants/AJA.*

II : Les rhabdomyosarcomes : des tumeurs très hétérogènes

1. Généralités sur les rhabdomyosarcomes et évolution de leur classification clinique

Les rhabdomyosarcomes (RMS) représentent plus de 50% des STM chez les enfants et AJA ([Ferrari et al., 2016](#)), ([Fan et al., 2022](#)) mais restent relativement peu courants chez les adultes ([Dehner et al., 2020](#)), ([Fan et al., 2022](#)). Ce sont des tumeurs très hétérogènes tant sur le plan clinique, histologique ou moléculaire ([Yechieli et al., 2021](#)). Leur dénominateur commun est l'expression de certains marqueurs musculaires squelettiques tels que Desmine, Myogénine et MyoD1 ([Yechieli et al., 2021](#)).

Les premiers cas de RMS ont été diagnostiqués entre le milieu du 19^{ème} et du 20^{ème} siècle. Guersant fut le premier à diagnostiquer un cas de RMS chez une jeune fille, qu'il nomma « sarcome botryoïde ». Puis, Bérard, Stout et les chercheurs Riopelle et Theriault ont diagnostiqué différentes entités de RMS qu'ils ont respectivement nommées : RMS embryonnaire, pléomorphique et alvéolaire ([Stout, 1946](#)), ([Riopelle & Theriault, 1955](#)), ([Parham, 2001](#)).

Suite à ces découvertes, Horn et Enterline ont décidé d'établir une première classification des RMS, basée sur les caractéristiques cliniques et pathologiques de 39 échantillons de patients pédiatriques. Cette classification incluait les entités nommées par les chercheurs les ayant découvertes ([Horn & Enterline, 1957](#)) (**Figure 6**).

Dans les années 1980, un groupe français publie une nouvelle classification des RMS issue de la société internationale de l'oncologie pédiatrique (SIOP) contenant cette fois-ci plus de 500 échantillons de patients pédiatriques. Cette classification regroupe notamment les RMS botryoïdes qui s'ajoutent à la liste des sous-types de RMS embryonnaires (eRMS), les RMS alvéolaires (aRMS), les RMS pléomorphiques (pRMS) et les non spécifiés ([Caillaud et al., 1989](#)) (**Figure 6**). Quelques années plus tard, l'Institut national du cancer intègre la notion de pronostic indiquant que les eRMS sont favorables à un bon pronostic, contrairement aux aRMS et pRMS ([Tsokos et al., 1992](#)), ([Silen, 1996](#)) (**Figure 6**).

Aujourd’hui, selon l’Organisation Mondiale de Santé (OMS) (WHO, 2019), il existe quatre différents sous-types de RMS : les RMS embryonnaires (eRMS), les plus fréquents (>60% des cas), les RMS alvéolaires (aRMS) comptant pour 25% des diagnostics de RMS et les RMS pléomorphes (pRMS) et sclérosants (sRMS) représentant les 15% restants (Jo & Fletcher, 2014), (Agaram, 2022), (Fan et al., 2022) (Figure 6). Les eRMS, aRMS et sRMS sont majoritairement retrouvés chez les enfants et AJA, tandis que les pRMS sont fortement retrouvés chez les adultes (Fan et al., 2022). Néanmoins, quelques rares cas de pRMS ont déjà été diagnostiqués chez les enfants et les AJA (<1% des cas de RMS) (Furlong & Fanburg-Smith, 2001).

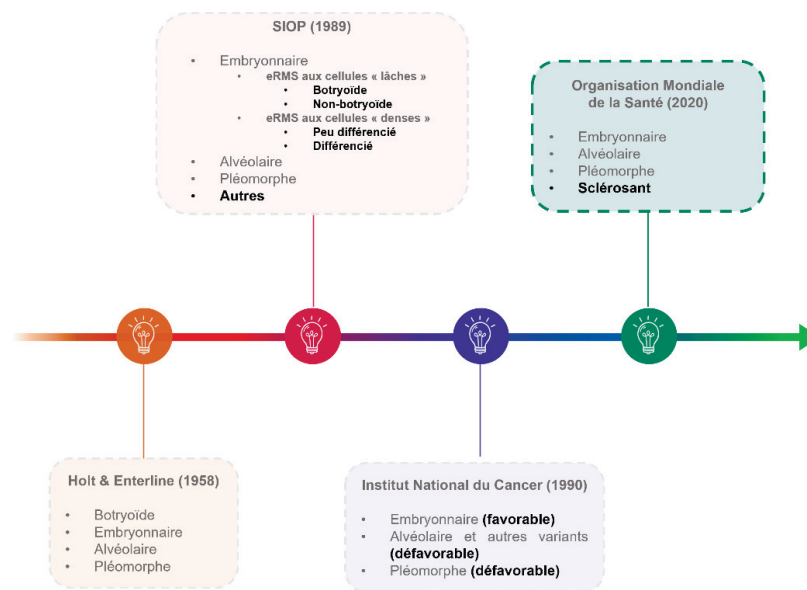


Figure 6 : Evolution de la classification des rhabdomyosarcomes. Depuis les années 1960, la classification histologique des RMS ne cesse d’évoluer. A ce jour, il existe quatre sous-types de RMS : embryonnaire, alvéolaire, pléomorphe et sclérosant. Adaptée de Agaram 2022.

Bien que les RMS puissent se développer dans n’importe quelle partie du corps, et ce même dans les zones dénuées de muscles squelettiques, chaque sous-type de RMS présente des localisations préférentielles. Les eRMS sont généralement retrouvés dans la zone « tête et cou », le tractus génito-urinaire ou au niveau des voies biliaires (Cadas, 2017), tandis que les aRMS et les pRMS se développent plutôt au niveau des extrémités inférieures et supérieures, ou encore au niveau de la région parasternale pour les sRMS (Agaram, 2021), (Fan et al., 2022). Les RMS présentent un risque métastatique vers les ganglions, les poumons ou les organes voisins. La forme métastatique au diagnostic reste rare mais non négligeable (10%) (Cadas, 2017).

La plupart du temps les phénomènes d’apparition de masses palpables (au niveau d’un membre ou du tronc) ou visibles (exophtalmie), de rétention urinaire aiguë, de douleurs osseuses ou de maux de tête sont des signes évocateurs de RMS (Cadas, 2017). De ce fait, la prise en charge thérapeutique

se fait généralement dans un centre spécialisé où le diagnostic fait l'objet d'un débat au cours de réunions de concertation pluridisciplinaire (Cadas, 2017).

2. Hétérogénéité inter-tumorale

a. Histologie des RMS

L'histologie des RMS reflète une première facette de l'hétérogénéité inter-tumorale des RMS. En effet, les eRMS récapitulent généralement le phénotype des différentes cellules du *continuum* de différenciation du muscle squelettique en cours de régénération, avec une densité de cellules qui varie entre un état hypo- ou hyper- cellulaire, souvent mixoïde. Les cellules sont souvent allongées ou ovoïdes (Dehner et al., 2020), mais d'autres ont une morphologie très ronde avec un cytoplasme éosinophile démesuré, caractéristique de rhabdomyoblastes en cours de différenciation (Parham & Ellison, 2006) (Tableau 1).

Les aRMS se démarquent drastiquement des eRMS. En effet, les cellules sont arrangées sous formes de « nids » et sont généralement séparées par des septa fibreux avec perte de cohésion cellulaire au centre, faisant visuellement référence à une « croissance alvéolaire » (Dehner et al., 2020). De nombreuses régions cystiques et mitotiques peuvent être observées à l'histologie. Les aRMS sont aussi caractérisés par la présence de cellules géantes multinucléées dispersées dans plusieurs régions de la tumeur (Dehner et al., 2020), (Agaram, 2022) (Tableau 1).

Les pRMS sont généralement représentés par de larges cellules, rondes ou pléomorphes, mal agencées avec un noyau hyperchromatique ainsi qu'un marquage cytoplasmique éosinophile prononcé. Ainsi, les pRMS peuvent être confondus avec des sarcomes pléomorphes indifférenciés (Dehner et al., 2020). Le diagnostic des sRMS à l'histologie est particulièrement complexe car il est caractérisé par une croissance fasciculaire de cellules fusiformes ressemblant à du léiomyosarcome. D'autre part, certaines cellules présentent parfois des caractéristiques de hyalinisation cellulaire évoquant une origine ostéoïde ou cartilagineuse primitive (Dehner et al., 2020) (Tableau 1).

En tenant compte seulement de l'aspect phénotypique des cellules, le diagnostic peut être confus. Le recours aux marqueurs d'immunohistochimie, consensus des RMS, à savoir : desmine, myogénine et myoD1, est indispensable pour affiner le diagnostic en faveur d'un RMS (Dehner et al., 2020).

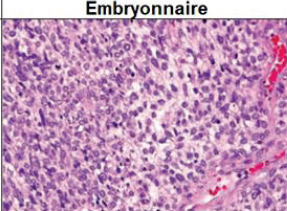
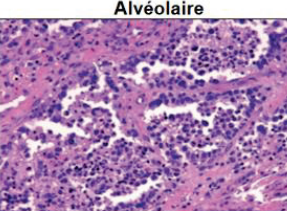
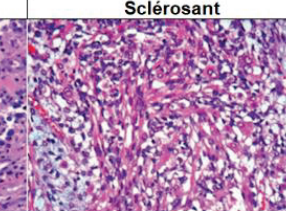
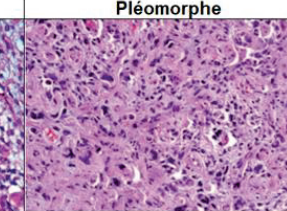
Sous-type	Embryonnaire	Alvéolaire	Sclérosant	Pléomorphe
Histologie				
	Densité variable entre hypo et hypercellulaire, souvent myxoïde. Cellules allongées ou ovoïdes, ou rondes avec un cytoplasme éosinophile (rhabdomyoblastes).	Cellules arrangées en "nids", séparées par des septas fibreuses et perte de cohésion donnant un phénotype alvéolaire. Régions cystiques/mitotiques. Cellules géantes multinucléées.	Croissance fasciculaire de cellules fusiformes ressemblant à du léiosarcome.	Larges cellules, rondes ou pléomorphes, mal agencées avec un noyau hyperchromatique.
Localisations	Tractus génito-urinaire, Tête et cou non paraméningé, vessie, prostate, tractus biliaire, abdomen, pelvis, rétropéritoine	Extrémités, tête et cou non paraméningé, poitrine, abdomen, organes génitaux et région anale	Enfant : tête et cou, paratesticulaire, Adulte : tête et cou	Extrémités, poitrine et abdomen
Âge (années)	<10	10-25	<10, >45	60-80
% des cas de RMS	60	25	15	

Tableau 1: Caractéristiques histologiques et cliniques des sous-types de RMS. Chaque sous-type de RMS présente des traits histologiques et des localisations qui leur sont propres, permettant d'affiner le diagnostic. Adaptée de Kashi et al., 2017.

b. Classification moléculaire des RMS

Depuis l'avènement des outils moléculaires, le diagnostic des RMS ne se base plus uniquement sur l'aspect histologique mais devient complémentaire à l'analyse moléculaire faite sur les biopsies, permettant de confirmer un type de sarcome. A ce jour, les RMS sont plutôt classés selon leur profil de fusion moléculaire : les RMS dits « fusions positives » RMS (FPRMS) et les RMS dits « fusions négatives » RMS (FNRMS) (Terezakis & Ladra, 2018).

i. Les FPRMS

85% des aRMS sont des FPRMS présentant une translocation chromosomique entre les gènes *PAX3* (situé sur le chromosome 2) ou *PAX7* (situé sur le chromosome 1) et *FOXO1* (situé sur le chromosome 13) codant tous les trois des facteurs de transcription. Les translocations t(2;13) et t(1;13) entraînent la création de protéines de fusion chimériques, au pouvoir oncogénique, respectivement nommées PAX3-FOXO1 et PAX7-FOXO1 (Barr et al., 1993) (Figure 7).

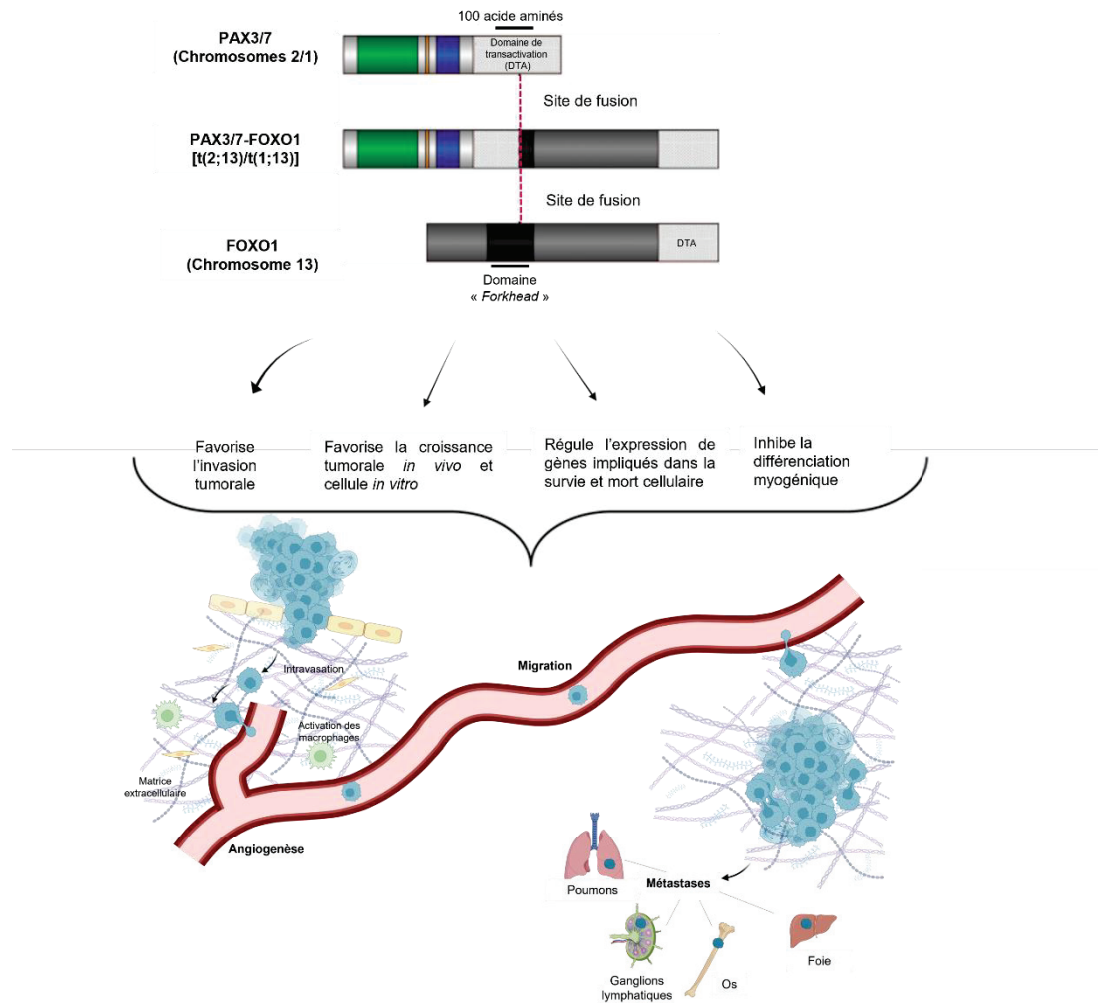


Figure 7 : Translocation chromosomique des gènes PAX/FOXO1. La fusion des oncoprotéines intervient au niveau du domaine de transactivation des protéines PAX, leur conférant une activité constitutive, avec le domaine protéique « forkhead » de FOXO1. Cette fusion favorise notamment la croissance tumorale, la survie et participe à la migration et l'invasion des tissus à distance. Adaptée de Mahajan 2014 et Ramadan 2020.

La fusion PAX3-FOXO1 est retrouvée dans la majorité des aRMS : 60% des cas, contre 25% pour la fusion PAX7-FOXO1 (Marshall & Grosveld, 2012). Ces protéines de fusion entraînent i) la perte de la région cis-répressive du domaine de transactivation en C-terminal des gènes PAX ainsi ii) qu'une altération de la régulation transcriptionnelle permettant son activation constitutive (Bennicelli et al., 1996), (Davis & Barr, 1997). Le complexe PAX-FOXO1 agit comme un précurseur dans l'expression d'autres facteurs de transcription de type MYOD1 ou MYOG entraînant ainsi une reprogrammation du profil transcriptionnel et épigénétique de la tumeur (Gryder et al., 2017). En conséquence, ces protéines de fusion abrogent une différenciation musculaire squelettique normale et conduit à un processus de division cellulaire anarchique tout en favorisant la survie des cellules tumorales (Marshall & Grosveld, 2012). De plus, ces oncoprotéines facilitent la dissémination métastatique (Mahajan et al., 2014), (Ramadan et al., 2020) (Figure 7).

D'autres translocations de gènes impliquant les facteurs de transcription PAX ont été identifiées, notamment *PAX3-FOXO4*, *PAX3-NCOA1*, *PAX3-NCOA2* ou encore *PAX3-INO80D* (**Figure 8**) (*Hettmer et al., 2022*). De façon intéressante, d'autres protéines de fusion n'impliquant pas les facteurs de transcription PAX, ont également été recensées dans le diagnostic de RMS de type sRMS (*SRF-TAED1* ou *VGLL2-NCOA2*) (*Mosquera et al., 2013*), (*Alaggio et al., 2017*), souvent diagnostiqués chez des jeunes enfants avec d'excellents taux de survie (*Mosquera et al., 2013*), (*Alaggio et al., 2017*), (*Whittle et al., 2019*), (*Butel et al., 2020*) (**Figure 8**).

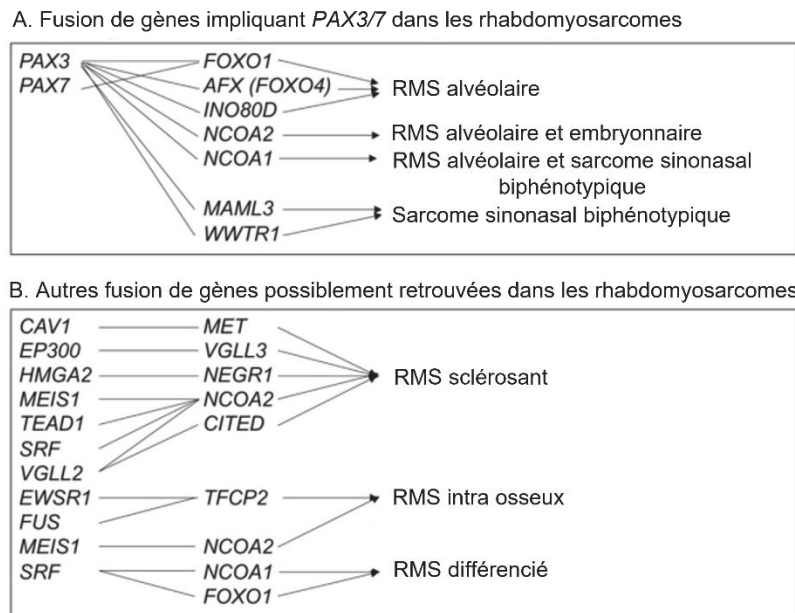


Figure 8 : Hétérogénéité des statuts de fusion retrouvés dans les FPRMS. 85% des aRMS présentent un statut de fusion PAX-FOXO1 (A), mais d'autres fusions ont été récemment retrouvées dans différents sous-types de RMS notamment *FUS-TFCP2* attribuant un profil clinique particulièrement agressif (B). Cette hétérogénéité complexifie d'autant plus la prise en charge des patients atteints de RMS. Adapté de Hettmer 2022.

Quelques cas atypiques de RMS primaires à l'aspect de cellules fusiformes osseuses présentent un profil de fusion peu commun de type *EWSR1/FUS-TFCP2*. Ces hybrides morphologiques entre cellules fusiformes et épithéliales expriment des marqueurs de cytokératines (*Kallen & Hornick, 2022*). Ils sont rares mais foudroyants et sont majoritairement retrouvés chez les jeunes adultes et adultes (*Watson et al., 2018*), (*Dashti et al., 2018*), (*Chrisinger et al., 2020*), (*Hettmer et al., 2022*) (**Figure 8**).

ii. Les FNRMS

Par opposition aux FPRMS, sont classés dans les FNRMS tous les types de RMS ne présentant pas de translocation chromosomique. De façon intéressante, alors que 85% des aRMS sont des FPRMS, les 15% restants présentent un profil d'expression de gènes similaire aux tumeurs de type eRMS (*Davicioni et al., 2009*), (*Williamson et al., 2010*).

Les FNRMS peuvent être associés à plusieurs syndromes pouvant être pris en compte pour établir le diagnostic. Comme évoqué dans la partie « 1 : Généralités sur les cancers pédiatriques – b) étiologie des cancers pédiatriques », les syndromes les plus fréquents associés au développement d'un RMS sont i) le syndrome de Li-Fraumeni (*TP53*), ii) la neurofibromatose de type 1 (*NF1*), iii) le syndrome de carcinome basocellulaire névoïde (*PTCH1* ou *SUFU*) ou encore iv) le syndrome DICER1 (*DICER1*), (*Hettmer et al., 2022*).

Contrairement aux FPRMS, les FNRMS n'ont pas de signature mutationnelle permettant de les caractériser, ce qui rend leur diagnostic parfois difficile. Les mutations dans les gènes *TP53*, *NF1*, *NRAS*, *KRAS*, ou encore *HRAS* sont les plus fréquemment décrites (*Dehner et al., 2020*). D'autres types d'anomalies génétiques font leur apparition depuis quelques années, notamment la mutation homo- ou hétérozygote p.Leu122Arg (c.T365G) dans le gène *MYOD1*, retrouvée dans presque 45% des cas de sRMS (*Agaram et al., 2014*). Cette mutation induit une activation constitutive de la protéine, qui présente alors des fonctions similaires à celle de l'oncogène *MYC*. Il est à noter que ces tumeurs présentent un profil plutôt agressif, avec un faible taux de survie (*Agaram et al., 2014*), (*Agaram et al., 2019*), (*Dehner et al., 2020*).

c. Epigénétique et cellule d'origine des RMS

L'épigénétique joue un rôle clé dans la régulation de la différenciation physiologique des muscles squelettiques (*Cieśła et al., 2014*), (*Dehner et al., 2020*) et pourrait donc également jouer un rôle important dans l'initiation et la progression des RMS (*Cieśła et al., 2014*). Par exemple, les facteurs épigénétiques de type « *polycomb repressive complexes* » 1 et 2 (*PRC1* et *PRC2*) semblent jouer un rôle important dans les RMS (*Cieśła et al., 2014*), (*Dehner et al., 2020*). En effet, *YY1* et *EZH2*, appartenant respectivement aux complexes *PRC1* et *PRC2*, agissent comme des répresseurs de la transcription et pourraient moduler les voies de signalisation myogénique dans les RMS (*Cieśła et al., 2014*). D'autres modifications épigénétiques, telles que la méthylation ou la désacétylation semblent jouer un rôle clé dans le développement des RMS, puisque l'inhibition des enzymes impliquées dans la mise en place de ses modifications permet, par exemple, de restaurer les fonctions pro-apoptotiques des cellules *PAX3-FOXO1* (*Hecker et al., 2010*). De plus, *ARID1A*, une sous-unité protéique appartenant au complexe *BAF*, lui-même appartenant à la famille *SWI/SNF*, est surexprimée dans les RMS par rapport aux muscles sains et influencerait sur la capacité des FPRMS à sortir du cycle cellulaire et à activer des mécanismes de différenciation myogénique (*Laubscher et al., 2021*).

La méthylation de l'ADN, notamment sur les îlots CpG, représente l'évènement épigénétique le plus étudié à ce jour. Il est désormais clair que, tout comme le transcriptome, le méthylome diffère selon les sous-types des tumeurs voire même selon le stade tumoral (*Clay et al., 2021*). Ceci offre de

nouvelles possibilités de reclassification des RMS (*Clay et al., 2021*) (**Figure 9**) et de réflexion sur leur(s) cellule(s) d'origine, un sujet encore controversé mais qui pourrait également faciliter la compréhension de leur grande hétérogénéité inter-patients (*Savary, 2022*).

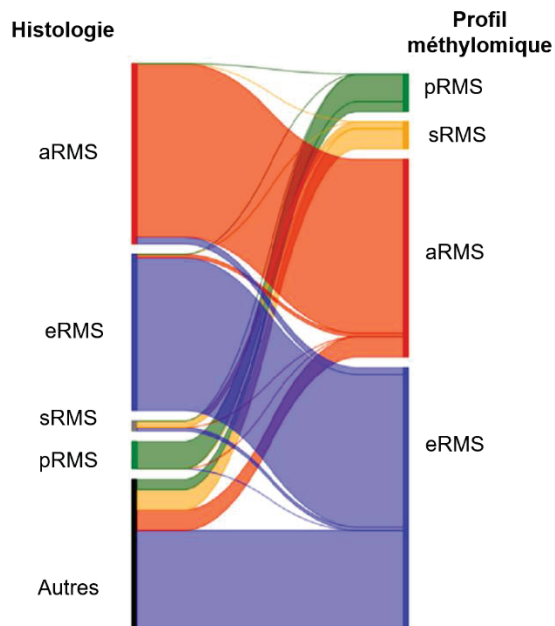


Figure 9 : Classification des RMS selon leur profil méthylomique. L'étude du méthylome permet de redéfinir une classification des RMS difficilement classables en utilisant seulement leur profil histologique. Adaptée de *Clay et al., 2021*.

d. Stratification par groupes de risque et prise en charge des patients

Le système de stratification des risques des patients tient compte de l'hétérogénéité décrite dans les paragraphes précédents mais aussi du profil clinique et pathologique du patient (*Skapek et al., 2019*). En effet il s'appuie sur l'histologie, le statut de fusion, la prédisposition génétique, la localisation, la résection post-chirurgicale, la présence ou non de nodule, la taille de la masse, l'âge et le stade tumoral. Il permet de sous-classer les différents types de RMS pour les prendre en charge indépendamment. De nombreuses institutions, telles que le groupe international des rhabdomyosarcomes (IRSG) (*Beverly Raney et al., 2001*), le groupe européen des sarcomes des tissus mous pédiatriques (EpSSG) (*Jenney, 2005*) ou encore l'université de Birmingham (*University of Birmingham, 2021*) ont permis la création, l'évolution et l'amélioration des tableaux de stratification des risques. Ces classifications recensent la majeure partie des cas de RMS possibles dans quatre catégories : risque faible (*Low Risk*), risque intermédiaire (*Standard Risk*), risque élevé (*High Risk*) et risque très élevé (*Very High Risk*) (*University of Birmingham, 2021*). Cette stratification des risques à l'échelle internationale permet d'uniformiser les protocoles de prise en charge des patients atteints de RMS (**Tableau 2**).

Groupe de risque	Sous-groupe	Statut de fusion	Groupe selon l'IRS	Localisation	Stade nodulaire	Taille de la tumeur et âge du patient au diagnostic
Risque faible	A	Négative	I	Toutes localisations	N0	Les deux critères sont favorables
Risque intermédiaire	B	Négative	I	Toutes localisations	N0	Au moins un des deux critères est favorable
	C	Négative	II, III	TGU*, TCNP*, Orbite, voies biliaires	N0	Les deux critères sont défavorables
Risque élevé	D	Négative	II, III	Toutes autres localisations excluant : TGU*, TCNP*, Orbite, voies biliaires	N0	Les deux critères sont défavorables
	E	Négative	II, III	Toutes localisations	N1	Les deux critères sont défavorables
	F	Positive	I, II, III	Toutes localisations	N0	Les deux critères sont défavorables
Risque très élevé	G	Positive	II, III	Toutes localisations	N1	Les deux critères sont défavorables
	H	Positive ou Négative	IV	Toutes localisations	N0 ou N1	Les deux critères sont défavorables

TGU : Tractus génito-urinaire

TCNP : Tête et cou non paraméningé

Age : Favorable = entre 1 à 10 ans

Taille de la tumeur : Favorable = tumeur <5 cm

Tableau 2 : Stratification des risques des patients atteints de RMS. Les patients sont classés en quatre sous-groupes allant d'un risque faible à très élevé. Cette stratification tient compte de paramètres cliniques tels que la taille, la localisation et le stade tumoral. Elle permet, à l'échelle européenne, d'uniformiser les protocoles de prise en charge des patients atteints de RMS. Adapté de FarRMS, Université de Birmingham, 2021.

Les traitements conventionnels de chimiothérapie des RMS sont de type vincristine, dactinomycine, cyclophosphamide, ifosfamide, irinotecan, doxorubicine et sont souvent associés en combinaison : VA (Vincristine-Dactinomycine), VAC (Vincristine-Dactinomycine-Cyclophosphamide), IVA (Ifosfamide-Vincristine-Dactinomycine), IVADo (Ifosfamide-Vincristine-Dactinomycine-Doxorubicine), VI (Vincristine-Irinotecan) (Yeichieli et al., 2021).

Les patients de faible risque reçoivent généralement des cures de VA ou VAC sur 9 à 12 semaines, tandis que les patients de risque intermédiaire peuvent recevoir une cure d'IVA suivie de VA (Yeichieli et al., 2021). Aussi, ces patients de risque intermédiaire peuvent combiner les cures de chimiothérapie avec de la radiothérapie (Yeichieli et al., 2021). De plus, une technique de radiothérapie ultra précise, appelée protonthérapie, peut être utilisée sur des régions sensibles telles que l'orbite ou la zone génito-urinaire afin de limiter au maximum l'irradiation des tissus sains environnants (Dong et al., 2023).

Par ailleurs, les patients de haut et très haut risque reçoivent respectivement des cures plus longues d'IVA ainsi que des cures de VAC supplémentées d'ifosfamide. A noter que, le traitement IVADo/IVA semble être le meilleur pour les RMS métastatiques. (Yeichieli et al., 2021).

A savoir qu'une mauvaise réponse aux traitements peut entraîner une re-stratification du patient permettant de réorienter la stratégie thérapeutique. L'ensemble de ces décisions est discuté au cours de réunions de concertation pluridisciplinaire.

Enfin, de nouvelles stratégies émergent pour affiner cette classification et établir un diagnostic fiable le plus précoce possible. C'est le cas notamment de l'analyse de « molécules tumorales

circulantes » (ou biomarqueurs) dans les fluides tels que le sang, l'urine ou la salive. Cette approche peu invasive, aussi appelée « biopsie liquide », pourrait permettre d'établir un diagnostic précoce ou d'aiguiller un premier diagnostic dans les cas où la localisation tumorale ne permet pas de biopsie. De plus, cette approche pourrait être réalisée facilement à différents temps donnés d'un traitement pour suivre l'évolution de la tumeur et adapter en temps réel la prise en charge thérapeutique du patient ([Hettmer et al., 2022](#)).

*La **classification actuelle des RMS** est essentiellement basée sur **leur statut de fusion et leur histologie**. Cependant, les RMS ont **des localisations très variables** soulignant la possibilité **d'origines cellulaires différentes** qui font débat à l'heure actuelle mais pourraient aider à affiner leur classification. Ceci souligne l'importance de mieux comprendre la biologie de ces tumeurs afin d'améliorer leur prise en charge thérapeutique, qui repose aujourd'hui principalement sur un **protocole de stratification des risques des patients** qui a fait ses preuves mais montre aussi des limites.*

3. Hétérogénéité intra-tumorale

Les tumeurs ont longtemps été considérées comme des masses de cellules à croissance rapide et porteuses de mutations semblables que les chercheurs pourraient cibler pour éliminer efficacement et durablement les cellules tumorales. Cependant, il est désormais établi qu'en plus de varier d'un patient à l'autre, les tumeurs sont également constituées en leur sein de différentes populations tumorales. On parle alors d'hétérogénéité intra-tumorale pour désigner ces différences de formes et de structures relatives aux cellules cancéreuses, à l'expression de leurs gènes, à leur métabolisme, ainsi qu'à leur capacité à proliférer et à migrer ([Melo et al., 2013](#)). Plusieurs paramètres jouent un rôle dans la mise en place de cette hétérogénéité : les caractéristiques intrinsèques de la cellule d'origine, la génétique, l'épigénétique et le microenvironnement tumoral ([Melo et al., 2013](#)) (**Figure 10**).

Je décrirai dans cette partie, l'impact de la génétique et de l'épigénétique sur l'hétérogénéité tumorale. Je m'intéresserai également à l'impact du microenvironnement tumoral sur cette dernière et enfin, je discuterai ses conséquences sur le plan clinique.

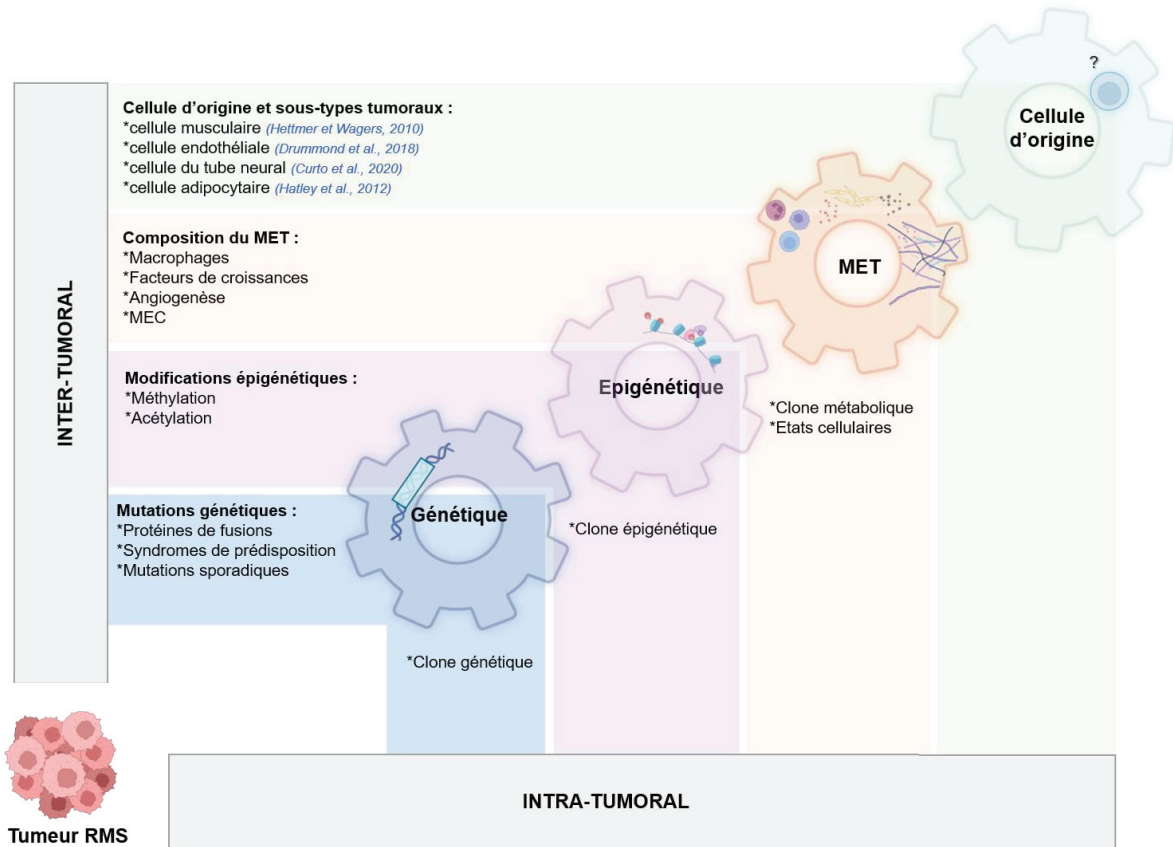


Figure 10 : Représentation des différentes notions de l'hétérogénéité inter- et intra- tumorale : de la cellule d'origine à la génétique et à l'épigénétique en passant par le micro-environnement tumoral. Adapté de Melo et al., 2015.

a. Les cellules souches cancéreuses : du dogme à la vision actuelle

Le concept de cellules souches et leur application au cancer remontent à plusieurs décennies (Kreso & Dick, 2014). Dans les années 1960, le modèle des cellules souches cancéreuses (CSC) a émergé sur la base des propriétés qui faisaient écho aux caractéristiques des cellules souches saines. Tout d'abord, une fraction significative de l'hétérogénéité cellulaire observée dans les tumeurs résulte de son organisation hiérarchique qui rappelle souvent la hiérarchie des cellules souches normales (cellules souches, cellules progénitrices et cellules différenciées). De plus, les CSC -souvent quiescentes- sont capables, tout comme les cellules souches pour un tissu sain, de reconstituer à elles seules une tumeur grâce à leur capacité d'auto-renouvellement (Dick, 2008).

Le concept de CSC a beaucoup évolué ces dernières années et est désormais associé à deux notions qui ajoutent un degré de complexité important : la **clonalité cellulaire** et la **plasticité cellulaire**.

i. Notion de clonalité cellulaire

Dans un contexte réductionniste, le cancer est une maladie génique. Le développement tumoral résulte d'une accumulation d'altérations de l'ADN d'une seule cellule, qui acquiert le plus souvent des mutations de gènes ou une altération de leur expression *via* des processus épigénétiques, lui conférant

des avantages oncogéniques par rapport aux cellules voisines (Solary, 2014). De ce fait, la cellule initialement altérée et ses descendances constituent le clone tumoral. Les tumeurs sont hétérogènes, notamment à cause de l'accumulation au cours du temps de mutations somatiques et d'altérations épigénétiques dans une population de cellules, définissant ainsi la notion de sous-clones aux propriétés tumorales différentes (Solary, 2014). Certains de ces avantages oncogéniques participent activement à la progression tumorale tandis que d'autres (dits passagers ou neutres) n'ont que peu ou pas d'impact sur l'évolution de la tumeur. Les caractéristiques initiales de la cellule affectée, la fonction des gènes altérés, l'environnement tissulaire et la pression thérapeutique vont sculpter l'architecture moléculaire des clones tumoraux au cours du temps (Solary, 2014) (Figure 11).

Pendant longtemps, les CSC ont été étudiées comme une population de cellules homogènes présentant les mêmes instabilités génétiques et épigénétiques (Notta et al., 2011), (Chow et al., 2014) or, les CSC *-garantissant l'auto-renouvellement d'un clone-*, sont *per se* génétiquement et/ou épigénétiquement hétérogènes, ce qui influence leur fréquence et leurs propriétés oncogéniques (Notta et al., 2011), (Chow et al., 2014). Certains sous-clones peuvent présenter une hiérarchie de développement abrupte, où seules quelques CSC auto-renouvelables existent parmi de nombreuses non-CSC (Figure 11 A). D'autres sous-clones peuvent présenter une hiérarchie intermédiaire, où le nombre de CSC est relativement élevé, mais où il existe néanmoins une hiérarchie (Figure 11 B). ou encore, certains sous-clones peuvent présenter des altérations génétiques qui leur confèrent un potentiel d'autorenouvellement élevé, alors que la plupart des cellules sont tumorigènes. Dans ce dernier scénario, l'application du concept de CSC n'est pas justifiée car la plupart des cellules peuvent s'auto-renouveler (Figure 11 C).

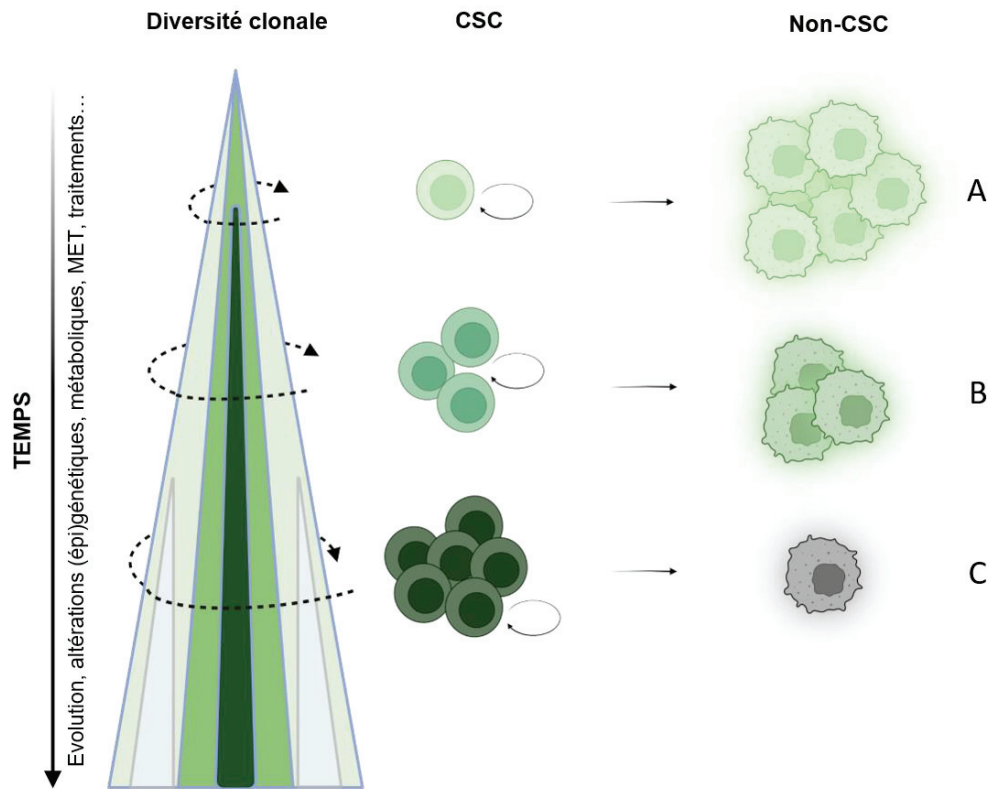


Figure 11 : CSC et notion de clonalité. Au sein d'une tumeur, différentes cellules souches cancéreuses peuvent former différents clones tumoraux avec des propriétés et avantages tumoraux qui leur sont propres. Adaptée de Kreso et Dick, 2014.

ii. Notion de plasticité cellulaire

La plasticité cellulaire correspond à la capacité d'une cellule à passer d'une identité à une autre, passant par exemple d'un état indifférencié à différencié (différenciation), ou inversement (dédifférenciation) ou encore d'un état différencié d'une cellule A en un état différencié d'une cellule B (transdifférenciation) (Shi et al., 2023) (Figure 12).

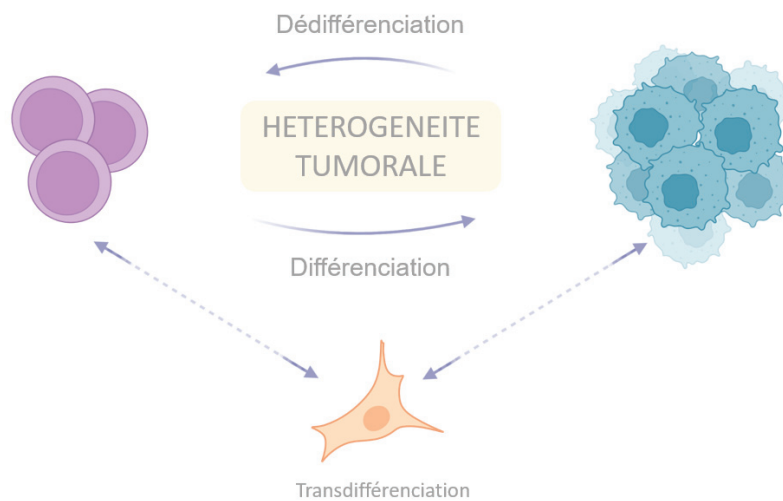


Figure 12 : Représentation schématique de la plasticité cellulaire. Les cellules tumorales sont capables de subir des transformations phénotypiques via des processus de dédifférenciation, différenciation ou transdifférenciation. Adapté de Shi et al., 2023.

Avec la mise en place de nouvelles technologies permettant d'analyser les CSC dans leur environnement intact, comme la technologie organoïde, que je détaillerai dans la partie « III) Les modèles d'études des rhabdomyosarcomes » section « 4) Technologie organoïde et émergence de nouveaux modèles en cancérologie », et l'imagerie intra-vitale, il est devenu évident que les CSC ne sont pas forcément rares, quiescentes ou programmées pour se différencier de façon unilatérale. En effet, ces dernières années, plusieurs équipes ont réalisé des expériences de traçage cellulaire *in vitro* et *in vivo* et ont ainsi révélé que les cellules tumorales étaient plastiques. Par exemple, dans les cancers colorectaux, les cellules tumorales différenciées peuvent redonner, par dédifférenciation, des CSC en cas de ciblage thérapeutique spécifique de ces dernières ([Thankamony et al., 2020](#)).

De façon intéressante, cette plasticité a été récemment mise en évidence dans les RMS *via* des études de séquençage de l'ARN à l'échelle de la cellule unique, qui ont permis de mieux comprendre l'hétérogénéité intra-tumorale des RMS ([Wei et al., 2022](#)), ([Danielli et al., 2023](#)). Notamment, CD44, un marqueur de cellules mésenchymales mais aussi progénitrices musculaires, semble être impliqué dans l'initiation et la progression tumorale des RMS. En effet, après avoir trié et séparé les populations CD44⁺ et CD44⁻, les auteurs se sont rendus compte que les cellules CD44⁻ étaient capables de changer de phénotype vers un profil CD44⁺, et inversement, dans des proportions différentes sur un même laps de temps ([Danielli et al., 2023](#)). De plus, il semblerait que la proportion de cellules CD44⁺ soit plus élevée après traitement *in vivo*, suggérant la mise en place de mécanismes d'échappement thérapeutique par un changement de trajectoire de différenciation cellulaire des cellules tumorales ([Danielli et al., 2023](#)). Ces résultats suggèrent que les cellules de RMS sont capables de naviguer entre un phénotype CD44⁺ et CD44⁻ et que cela pourrait leur conférer la possibilité d'échapper à un traitement donné.

Il est en effet maintenant bien décrit que les cellules tumorales peuvent adapter leur phénotype et leur comportement, *via* des mécanismes de plasticité réversibles, et dépendants des stimuli externes (micro-environnement tumoral (MET), pression thérapeutique...) auxquels elles sont confrontées ([Hass et al., 2020](#)). Par exemple, pour échapper à la pression thérapeutique de l'antagoniste BCL-2 (Venetoclax), les CSC utilisent leur plasticité métabolique, permettant de réguler à la hausse leur métabolisme des acides gras pour survivre à la thérapie ([Stevens et al., 2020](#)). Les stimuli micro-environnementaux jouent également un rôle dans la résistance adaptative aux médicaments, car les cellules d'une même isogénie peuvent être sensibles ou résistantes vis-à-vis d'une drogue. De récentes études indiquent également que le MET peut initier des programmes semblables à ceux des cellules souches dans les cellules cancéreuses. Par exemple, Charles et collègues ont montré que l'oxyde nitrique activait la voie Notch pour renforcer le phénotype de CSC dans des cellules de gliome humain *in vitro* ([Charles et al., 2010](#)).

Ainsi, le modèle des CSC doit désormais prendre en compte la plasticité cellulaire comme étant une caractéristique commune et critique des cellules tumorales (*Aktipis & Nesse, 2013*), (*Kreso & Dick, 2014*). En d'autres termes, le caractère souche d'une cellule cancéreuse n'est pas une caractéristique intrinsèque d'une sous-population de cellules tumorales mais plutôt un état gouverné et dirigé par des caractéristiques du MET à une échelle temporelle et spatiale (**Figure 13**).

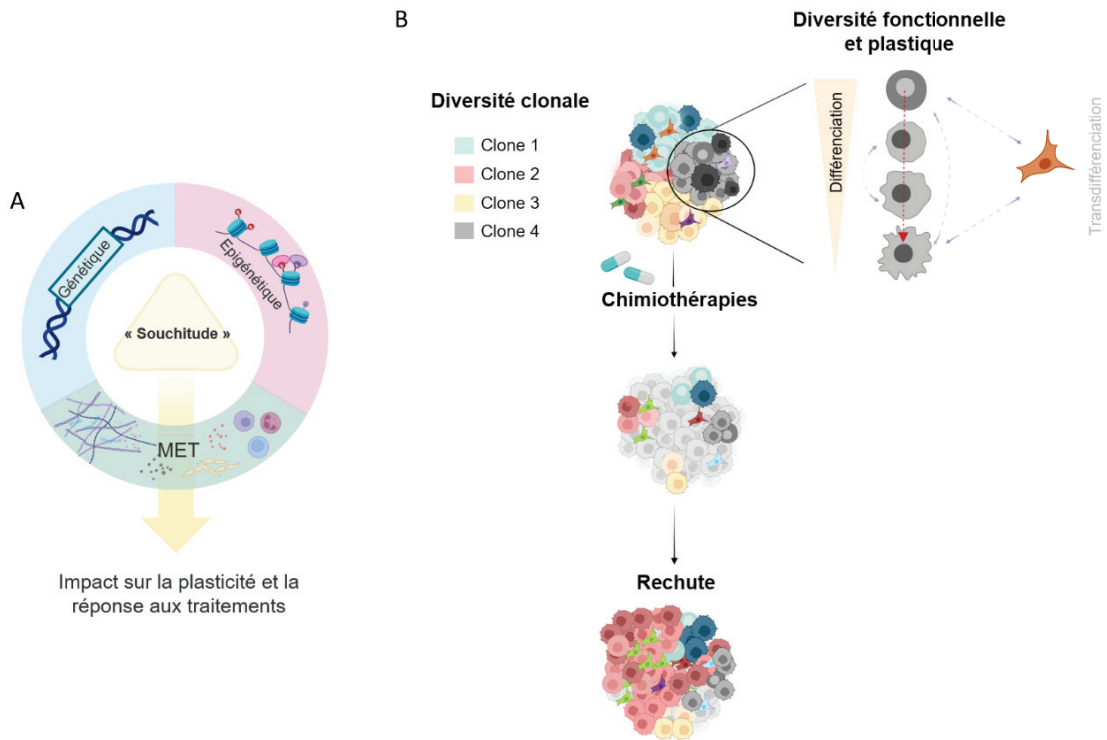


Figure 13 : La « souchitude » en tant que principal directeur régissant la réponse thérapeutique. Trois domaines de la biologie – la génétique, l'épigénétique et le micro-environnement tumoral se rejoignent pour clarifier l'organisation hiérarchique des tumeurs (A) et la résistance aux traitements qui en résulte (B). Adaptée de Kreso et Dick, 2014.

Une tumeur peut être considérée comme un écosystème constitué de plusieurs sous-populations de cellules malignes avec leur architectures génétique et épigénétique spécifiques et évoluant dans ses niches géographiques et temporelles distinctes. Le cancer est donc un microcosme darwinien dont il s'agit de mieux comprendre les règles de fonctionnement afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique.

4. Rôle du système immunitaire dans les RMS

Le développement d'une tumeur dépend de l'équilibre entre une réponse immunitaire antitumorale capable d'éliminer les cellules tumorales, et les mécanismes d'échappement immunitaire, *via* leurs capacités à perdre certaines molécules membranaires nécessaires à leur reconnaissance par le système immunitaire (*Ghiringhelli, 2013*). L'hypothèse d'une surveillance immunitaire est basée sur une théorie des trois E : Elimination des cellules cancéreuses par le système

immunitaire, Equilibre entre cellules tumorales et immunitaires, Echappement immunitaire (Ghiringhelli, 2013) (Figure 14).

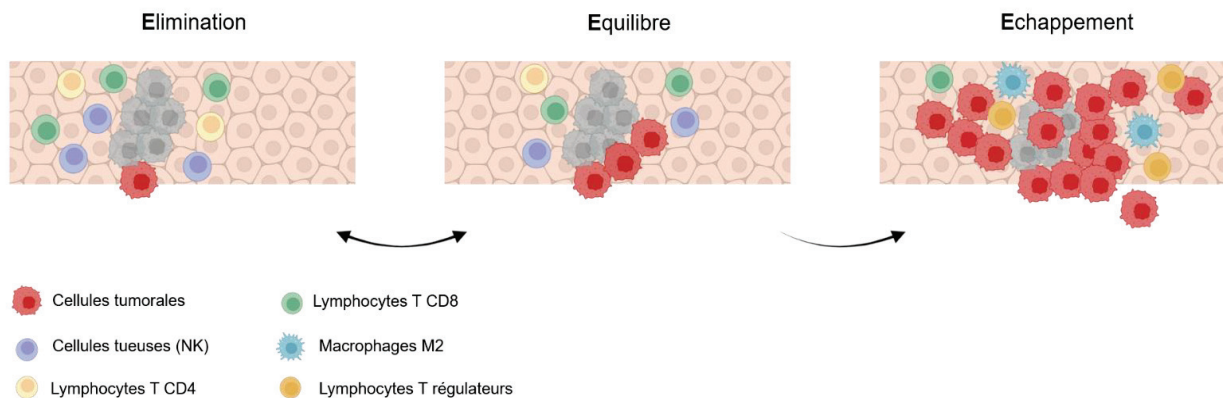


Figure 14 : Théorie des 3 E dans l'échappement immunitaire dans les cancers. Dans un processus immunitaire physiologique où les cellules immunitaires dominent, les cellules tumorales sont éliminées. Lorsque les cellules tumorales présentent un trait plus agressif, le renforcement immunitaire permet de maintenir un équilibre entre les deux. Ces deux processus sont réversibles or, lorsque les cellules tumorales sont trop agressives, elles dominent de façon irréversible le contingent immunitaire conduisant à l'échappement tumoral. Adaptée de Ghiringhelli, 2013.

De ce fait, il semblerait que le micro-environnement immunitaire joue un rôle clé dans le développement et la progression des tumeurs. Dans cette partie, j'ai choisi d'évoquer uniquement l'impact du système immunitaire (SI) dans les cancers pédiatriques et ce pourquoi il représente une cible thérapeutique intéressante dans les RMS.

a. Impact du système immunitaire inné dans les RMS

Plusieurs études ont comparé qualitativement et quantitativement le type de cellules immunitaires infiltrées dans des tumeurs solides pédiatriques en comparaison avec des tumeurs adultes (Vakkila et al., 2006), (Apps et al., 2013), (McEachron & Helman, 2021), (Thakur et al., 2022). L'ensemble de ces résultats suggère que, dans les cancers pédiatriques, il y a une forte prédominance de macrophages CD163⁺/CD68⁺ -en moyenne 70% au sein de la tumeur dans la partie nécrotique et 63% en périphérie- contre très peu de lymphocytes T, de cellules tueuses « Natural Killer » (NK) ou de cellules dendritiques (CD) (Vakkila et al., 2006), (Apps et al., 2013), (McEachron & Helman, 2021) a contrario des tumeurs adultes qui présentent préférentiellement des lymphocytes T, NK ou CD infiltrants (Vakkila et al., 2006). Cela pourrait s'expliquer par le fait que la période pré-néoplasique des cancers pédiatriques est souvent beaucoup plus courte que celle des adultes, ne laissant pas place à une inflammation chronique (Vakkila et al., 2006).

Dans les sarcomes pédiatriques, les macrophages sont quinze fois plus retrouvés que les CD et deux fois plus retrouvés que les lymphocytes T (Vakkila et al., 2006). De plus, le peu de lymphocytes présents sont généralement inactifs (Thakur et al., 2022). Par ailleurs, Thakur et collègues ont montré

une prépondérance de macrophages de type anti-inflammatoire dits « M2 » dans les OS, les SE et dans les RMS (*Thakur et al., 2022*).

Plus précisément dans les RMS, d'autres équipes ont retrouvé majoritairement des cellules CD68⁺ (macrophages) contre quelques rares CD3⁺ (lymphocytes) et ce dans la partie tumorale nécrotique ainsi que dans le stroma tumoral (*Apps et al., 2013*), (*McEachron & Helman, 2021*). Ces résultats ont été confirmés à l'échelle de la cellule unique sur des tumeurs de RMS pédiatriques qui suggèrent que les macrophages de type M2 sont majoritairement retrouvés (*Demartino et al., 2022*). De plus, une étude a montré que l'agressivité des RMS pourrait être dépendante du SI. En effet, en comparant des RMS pédiatriques et AJA, les auteurs ont montré une augmentation de l'infiltrat immunitaire des cellules de types CD4⁺/CD8⁺ (infiltration lymphocytaire), CD14⁺ et CD68⁺ (infiltration macrophagique) contribuant à la croissance tumorale. Ces résultats décrivent la complexité du microenvironnement immunitaire des RMS, qui pourrait influencer directement les cellules tumorales et leur agressivité. De ce fait, l'étude du microenvironnement immunitaire est primordial pour améliorer la prise en charge clinique des patients atteints de RMS (*Gasparini et al., 2019*).

b. Les macrophages

Les cellules souches hématopoïétiques issues de la moelle osseuse permettent de générer trois types de précurseurs : les précurseurs érythrocytaires, lymphoïdes et myéloïdes. Parmi la lignée myéloïde, sont retrouvés les polynucléaires (neutrophiles, basophiles et éosinophiles) et les mononucléaires à savoir : les monocytes. Les monocytes, cellules circulantes, sont les précurseurs de différenciation des macrophages (*Kloc et al., 2019*). Dans une vision simplifiée, les macrophages sont divisés en trois phénotypes différents : les M0 dits « naïfs » qui expriment notamment CD14, les M1 dits « pro-inflammatoires » qui expriment CD68, CD80/CD86 et les M2 dits « anti-inflammatoires » qui expriment CD163, CD200R ou encore CD206 (*Kloc et al., 2019*). Ces macrophages peuvent être présents au sein du MET dans des proportions variables et promouvoir la progression tumorale (*Sica et al., 2008*). En effet, les différents sous-types de macrophages, pro- et anti- inflammatoires peuvent sécréter différents facteurs ou cytokines pouvant jouer un rôle important dans la progression tumorale et/ou la réponse aux traitements (**Figure 15**). Cet aspect paradoxal pourrait s'expliquer par la grande plasticité des macrophages permettant de passer d'un état pro- à anti-inflammatoire sous l'influence du micro-environnement tumoral (*Shapouri-Moghaddam et al., 2018*) (**Figure 15**).

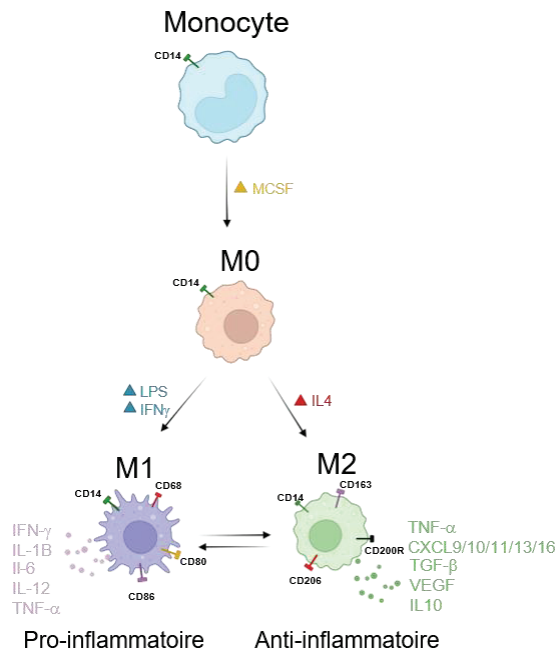


Figure 15 : Processus de différenciation des monocytes en macrophages, ainsi que les facteurs et cytokines respectivement sécrétés par les macrophages. Au cours de la différenciation terminale in vitro des monocytes en macrophages, les facteurs de type MCSF, LPS, IFN-g et IL4 sont indispensables pour obtenir respectivement des M0, M1 et M2. Il est à noter que chaque population de macrophage exprime des marqueurs membranaires communs et/ou propres, et que les M1 et les M2 présentent une capacité de plasticité très sensible aux facteurs environnementaux.

c. Les inhibiteurs de points de contrôle

Les inhibiteurs de point de contrôles sont des mécanismes retrouvés à l'état physiologique permettant de moduler la réponse immunitaire (He & Xu, 2020). Dans le cadre de l'échappement tumoral, les cellules cancéreuses acquièrent des avantages leur permettant de dépasser ces points de contrôle. Elles peuvent ainsi perdre ou surexprimer des molécules de surface pour empêcher leur élimination par les lymphocytes T ou les macrophages (Ghiringhelli, 2013). Ce détournement du système immunitaire promeut ainsi la progression tumorale.

La découverte de ces mécanismes d'échappement tumoral a permis de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, ne ciblant pas directement la tumeur et ses mécanismes, mais modulant plutôt le système immunitaire afin de rétablir ses fonctions (Ghiringhelli, 2013). Ainsi, depuis le début du 21^{ème} siècle, les inhibiteurs de points de contrôles (IPC) comptent parmi les traitements anti tumoraux les plus répandus (Kabir et al., 2018). Ces nouvelles stratégies présentent moins de toxicité que la chimiothérapie, puisqu'elles ont pour but de forcer une réponse immunitaire, tolérée par le patient (Kabir et al., 2018). Notamment, de nombreux anticorps ont été développés comme l'anticorps anti-CTLA4 (joue un rôle d'anticorps leurre pour la reconnaissance avec les CD80/86 présents à la surface des cellules présentatrices d'antigènes) qui permet de lever l'inhibition en restaurant l'activation des lymphocytes T effecteurs (Kabir et al., 2018). PD1(récepteur à la surface des lymphocytes T) /PDL1 (ligand à la surface des cellules tumorales) est un autre mécanisme d'inhibition

de l'activation des lymphocytes T bien connu de l'immunothérapie. En effet l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-PD1 ou anti-PDL1 permet de restaurer les fonctions immunitaires et d'éliminer les cellules tumorales (*Kabir et al., 2018*). Lors de l'échappement immunitaire, certaines cellules tumorales surexpriment le récepteur CD47 permettant d'agir avec le marqueur membranaire SIRP- α , présent sur les macrophages, engendrant un message de « *don't eat me* » inhibant ainsi la phagocytose. L'utilisation d'un anticorps anti-CD47, permet de lever l'inhibition des macrophages et de restaurer leur fonction phagocytaire pour éliminer les cellules tumorales (*Matlung et al., 2017*), (*Logtenberg et al., 2020*).

Il est à noter qu'à ce jour, plusieurs essais cliniques sur les sarcomes impliquant des IPC existent, notamment COTESARC qui utilise un anti-PDL1 combiné à un traitement ciblant les voies de signalisation de type tyrosine kinases (anti MEK), SPARTO ou PEMBROSARC utilisant un anti-PDL1 combiné respectivement à une chimiothérapie de type pazopanib ou endoxan (*Institut National Du Cancer, n.d.*). Cependant, il est encore trop tôt pour conclure sur l'efficacité de ces traitements puisque les essais cliniques COTESARC et SPARTO sont engagés jusqu'à au moins 2026. En revanche, l'essai clinique PEMBROSARC a notamment fait ses preuves chez des patients atteints de cancers des tissus mous au stade avancé. Précisément, les patients qui présentaient des structures tertiaires lymphoïdes intra-tumoraux répondaient mieux aux traitements anti-PDL1/endoxan, pouvant être considérés comme un futur critère d'inclusion à recevoir ce traitement (*Italiano et al., 2022*). Cela dit, étant donné que les macrophages représentent la population immunitaire majoritairement infiltrante dans les sarcomes et sachant que le récepteur CD47 est surexprimé dans les RMS (*Herrmann et al., 2012*), (*Dancsok et al., 2020*) le développement d'immunothérapies ciblant CD47 semble particulièrement pertinent pour traiter les patients atteints de sarcomes.

*Dans les cancers, le système immunitaire est parfois détourné en faveur de la tumeur, on parle d'échappement tumoral. Dans les sarcomes pédiatriques, les cellules de l'immunité les plus fréquemment rencontrées sont les **macrophages**.*

*Les **macrophages** sont physiologiquement impliqués dans la réponse immunitaire innée. Il existe trois grands phénotypes différents (**M0, M1 et M2**) que l'on retrouve dans les tissus sains et tumoraux dans des proportions variables sous l'influence du micro-environnement.*

*Certaines stratégies thérapeutiques faisant intervenir le système immunitaire ont été développées depuis le début du siècle, appelées **inhibiteurs de point de contrôle**. La protéine de surface **CD47 se liant à SIRP α** , une IPC présente à la surface des macrophages, est surexprimée dans les RMS et pourrait donc constituer **une cible thérapeutique intéressante pour (ré)activer la phagocytose dans les RMS.***

III : Les modèles d'études des rhabdomyosarcomes

En cancérologie, l'utilisation des modèles d'études – *allant des lignées cellulaires tumorales in vitro aux modèles animaux in vivo*- ont permis de belles avancées scientifiques. Ces modèles permettent une meilleure compréhension des voies de signalisations oncogéniques, l'identification de cibles thérapeutiques ou encore le développement de certains candidats médicaments. L'évolution et l'amélioration de nouveaux modèles d'études en oncologie n'ont cessé de progresser tout au long du siècle dernier et encore aujourd'hui, de nombreuses équipes mettent tout en œuvre pour développer des modèles toujours plus complexes, puissants et innovants permettant de mimer le plus fidèlement possible la physio-pathologie de la maladie étudiée (*Barbet & Broutier, 2021*).

Après un tour d'horizon historique des différents modèles en cancérologie, je présenterai une vue d'ensemble *-non exhaustive-* des différents modèles de rhabdomyosarcomes existants et discuterai leurs limites. Enfin, je m'intéresserai plus particulièrement aux modèles d'organoïdes/tumoroïdes, au cœur de mon sujet de thèse.

1. Tour d'horizon historique des modèles en cancérologie

a. Les lignées cellulaires, des cultures en 2 et 3 dimensions

Les premières lignées cellulaires ont vu le jour au début du 20^{ème} siècle avec notamment la technique du « *hanging drop* » développée par Ross G. Harrison. Cette technique consiste à utiliser une goutte de lymphes issues de grenouilles adultes sur un morceau de tissu de poulet permettant de maintenir en vie les cellules entre une à quatre semaines (*Harrison, 1906*). Quelques années plus tard, Carrel et Burrows mettent en place un protocole basique permettant de standardiser les cultures cellulaires issues de différents tissus d'origine, en particulier à partir de sarcomes et carcinomes (rongeur, canin ou humain) utilisant un milieu de culture contenant du sérum de cheval ou de bovin (*Carrel & Burrows, 1911*). Au cours des années suivantes, les techniques de culture et les milieux utilisés n'ont cessé d'être améliorées, jusqu'en 1952 où Gey établit la première lignée cellulaire tumorale, dérivée d'un adénocarcinome du col de l'utérus : la célèbre lignée HeLa (*Gey G., 1952*). Cette lignée est à ce jour mondialement connue notamment pour son rôle décisif dans le développement d'un vaccin contre la poliomyélite ou encore le développement des chimiothérapies (*Ursano, 2012*). Il est également important de s'attarder sur la polémique engendrée autour de cette lignée cellulaire, dérivée sans le consentement de la patiente, Henrietta Lacks, une jeune afro-américaine âgée de 30 ans. Le mouvement politique massif qui en a découlé a permis de mettre en avant les enjeux éthiques et l'intégrité scientifique dans le développement de nouveaux modèles (*Jordan, 2021*), (*Ursano, 2012*).

Il faudra attendre courant des années 1960 pour que les premières lignées de cellules de cancers pédiatriques voient le jour, notamment avec les travaux de Pulvertaft qui a établi une lignée cellulaire dérivée d'un lymphome de Burkitt, issu d'un enfant de 11 ans ([Pulvertaft, 1964](#)). Depuis, des centaines de lignées, tous types de tissus confondus, ont été établies. De multiples bio-banques de lignées cellulaires ont été générées permettant de stocker et de partager dans le monde entier, les différents modèles établis. La plus connue est ATCC, qui répertorient à ce jour plus de 4.000 lignées humaines et animales différentes.

En plus des lignées cellulaires primaires directement établies à partir de tumeurs de patients, d'autres techniques permettent de modifier génétiquement les cellules pour créer des modèles d'études du cancer. Les cellules peuvent par exemple être immortalisées par la présence d'un oncogène (*via* transformation virale la plupart du temps). Cette technique permet d'obtenir des lignées avec un potentiel de divisions illimitées, ce qui facilite certaines expérimentations au laboratoire ([Carter & Shieh, 2015](#)). Il est également possible aujourd'hui en routine de déchiffrer les voies de signalisation oncogéniques en activant ou inactivant des gènes par insertions ou délétions de séquences d'ADN ([Gupta & Shukla, 2016](#)), ([Ovchinnikov, 2020](#)) ou encore de faire des modifications plus fines à l'aide de nouvelles techniques toujours plus performantes telles que le CRISPR-Cas9, technique qui a valu le prix Nobel de Chimie à Doudna et Charpentier, en 2020 ([Charpentier & Doudna, 2013](#)), ([Doudna & Charpentier, 2014](#)).

Les premiers modèles *in vitro* en trois-dimensions (3D) ont été développées dans le but de recréer un environnement physiologique similaire à celui de la tumeur/tissu d'origine. Les sphéroïdes sont définis comme des agrégats de cellules, applicables à divers types de cellules telles que les lignées cellulaires primaires, immortalisées ou génétiquement modifiées ([Edmondson et al., 2014](#)), ([Costa et al., 2016](#)). Ces sphéroïdes peuvent être cultivés selon différentes méthodes ; ayant recours à un support physique, sans support physique *via* leurs capacités à s'auto-assembler ou encore grâce à une circulation rotative permanente ([Edmondson et al., 2014](#)), ([Costa et al., 2016](#)). L'ensemble de ces techniques permet une interaction cellule-cellule et/ou cellule-matrice indispensable pour mimer une situation *in vivo*.

b. Les modèles animaux

Depuis les cinquante dernières années, les modèles animaux ont représenté des modèles pré-cliniques majeurs permettant de mieux comprendre les mécanismes d'oncogénèse, de développer des nouveaux traitements et dans certains cas, de découvrir des mécanismes à l'origine de la résistance aux traitements.

Différentes espèces animales sont utilisées en laboratoire, les plus courantes sont les rongeurs, les poissons-zèbres et les drosophiles (Lopez, 2013). Dans cette partie, je présenterai succinctement les principales techniques et modèles animaux utilisés.

i. Les modèles de greffes

Les lignées cellulaires établies et les tissus de patients ont pu très vite être greffés chez des animaux et sont connus sous le nom de « xénogreffe dérivée de lignée cellulaire » (XDC) ou bien « xénogreffe dérivée de patient » (XDP). En oncologie, la particularité de ces modèles est que l'architecture tumorale et la proportion de cellules tumorales/stromales permettent de contextualiser un microenvironnement plus physiologique qu'*in vitro*. Il existe deux types de greffe à savoir, orthotopique (injectée sur une localisation identique à celle du patient) ou hétérotopique (injectée sur une localisation différente à celle du patient) (Figure 16). Les modèles orthotopiques sont intéressants car ils représentent plus intimement le contexte tumoral du patient d'origine (Stewart et al., 2017), (Zarzosa et al., 2017).

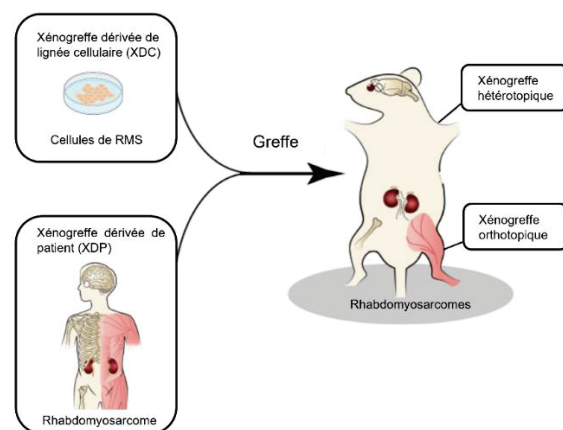


Figure 16 : Principes de xénogreffes orthotopiques et hétérotopiques de tumeur de patient (ici RMS) chez des animaux (ici rongeur). Les modèles de greffes peuvent être réalisés à partir de lignées cellulaires (XDC) ou de tissus tumoraux de patient (XDP) et peuvent être injectés en orthotopique pour une meilleure contextualisation de l'origine tumorale ou en hétérotopique pour des localisations difficiles (ex : rétro-orbital) Adapté de Stewart et al., 2017.

Dans les années 1950, Toolan réalise des XDP hétérotopiques de plus de cent tumeurs humaines adultes chez des rongeurs immunodéprimés (déficit en lymphocytes T après exposition aux radiations) avec une prise tumorale dans près de 90% des animaux (Toolan, 1953). Mais il faudra attendre près de 20 ans pour que les premières xénotransplantations avec des tumeurs pédiatriques voient le jour. C'est l'œuvre de Cobb, qui fut le premier à xénogreffer des carcinomes et des sarcomes (dont les RMS) en hétérotopique sur des hamsters. En alliant une thymectomie et un traitement antithymocyte, il a observé une prise tumorale chez 40% des rongeurs et des métastases pulmonaires dans presque 30% des cas au cours des 3 mois qui ont suivi le début des expériences (Cobb, 1972).

Quelques années après, le premier modèle de xénogreffe à partir de lignées cellulaires pédiatriques (neuroblastomes) sur des souris immunodéprimées a été mis en place par Helson et collègues (*Helson et al., 1975*).

D'autres animaux non-rongeurs sont également utilisés pour créer des modèles novateurs de XDP/XDC. On peut citer les embryons de poulet *-et leur membrane chorioallantoïde-* ou bien les poissons-zèbres et leurs larves *-au phénotype transparent et système immunitaire précoce immature-*, qui ont permis de nombreuses études sur l'angiogenèse, le processus métastatique ou encore l'exploration de nouvelles stratégies thérapeutiques (*Murphy, 1914*), (*Haldi et al., 2006*).

Dans les modèles de greffes dites syngéniques, l'animal est greffé avec une tumeur provenant d'un animal de la même espèce, ce qui permet de recontextualiser une composante immunitaire complète et mature (*Lopez, 2013*). Les modèles syngéniques murins sont les plus fréquemment développés, en effet, plusieurs modèles syngéniques dérivés de carcinomes adultes ont été établis, par exemple, Kruse et collègues ont développé un modèle syngénique dérivé de cancer colorectal dans lequel ils ont pu observer que les macrophages promouvaient la croissance tumorale et la formation de métastases hépatiques (*Kruse et al., 2013*). Également, une étude sur des modèles syngéniques de chondrosarcomes a permis de mettre en évidence que les déplétions des lymphocytes T et des macrophages engendraient respectivement une surcroissance tumorale ou bien un ralentissement de croissance tumorale (*Simard et al., 2017*). Par conséquent, ces modèles syngéniques permettent de contextualiser et d'étudier le rôle du micro-environnement immunitaire sur la progression tumorale.

ii. Les organismes génétiquement modifiés

Les animaux génétiquement modifiés représentent une alternative aux modèles cités précédemment, permettant notamment de maintenir un profil immunitaire complet. Dans ce contexte, de nombreux organismes génétiquement modifiés (OGM), majoritairement des souris, ont émergé dans les années 1980. Ces souris génétiquement modifiées (SGM) ont, entre autres, permis d'améliorer les connaissances sur les altérations génétiques liées à la tumorigénèse. Un large panel de modèles dérivés de différents cancers adultes ont émergé dans les années 50 (*Barbet & Broutier, 2021*) mais une fois encore, ce n'est que bien plus tard, dans les années 1990, que les premiers modèles de SGM pédiatriques ont été mis en place. Ces modèles ont permis d'obtenir des tumeurs de rétinoblastomes (*Windle et al., 1990*), neuroblastomes (*Weiss et al., 1997*), médulloblastomes, (*Fults, 2005*), ostéosarcomes et sarcomes d'Ewing (*Sampson et al., 2013*).

D'autres organismes peuvent être utilisés au laboratoire pour l'étude des mécanismes oncogéniques. Par exemple, au début du 20^{ème} siècle, il a été découvert que les drosophiles étaient capables de développer des masses tumorales (*Gateff & Schneiderman, 1969*). L'évolution des voies

de signalisation de prolifération, de différenciation et d'invasion entre les drosophiles et l'humain ainsi que la facilité de croisement, reproduction et de mutagenèse chez la drosophile en ont fait un modèle particulièrement attrayant pour étudier les mécanismes de tumorigenèse (*Barbet & Broutier, 2021*). Ainsi, plusieurs modèles tumoraux de drosophile génétiquement modifiés ont été créés tels que ; la thyroïde, le poumon, la prostate ou encore le cerveau (*Gateff & Schneiderman, 1974*). De plus, les drosophiles peuvent modéliser une ou plusieurs mutations spécifiques d'un patient donné et peuvent donc être utilisées pour tester différents traitements à des fins de médecine personnalisée. (*Bangi et al., 2019*).

Bien que les modèles animaux représentent une force indéniable depuis près de 100 ans, leur génomique et leur profil immunitaire ne miment pas fidèlement la biologie humaine.

De plus, l'éthique scientifique tend à réduire considérablement l'utilisation des modèles en laboratoire avec la règle des 3R : Remplacer, Réduire, Raffiner.

*Depuis le début du 20ème siècle, la mise en place de modèles de cancers -in vitro ou in vivo a permis de nombreuses découvertes scientifiques et cliniques concernant un large spectre de pathologies de l'adulte. Mais il **existe un véritable retard de transfert technologiques vers les cancers pédiatriques**. Il est donc indispensable de développer **des modèles pédiatriques innovants pour déchiffrer les spécificités de ces cancers et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques**.*

2. Les avantages et limites des modèles en cancérologie

L'ensemble des modèles *in vitro* en 2D et 3D ou *in vivo*, présentent de nombreux avantages mais aussi des limites (**Figure 17**). L'utilisation d'un modèle plus qu'un autre dépend notamment de la question scientifique qui est adressée. Par la suite, seront résumés les avantages et limites des modèles en cancérologie et le besoin permanent de développer des nouveaux modèles toujours plus ingénieux et proches de la réalité.

Les lignées cellulaires présentent plusieurs avantages. Tout d'abord, elles sont facilement cultivables en 2D dans des flasques adhérentes ou en 3D sous forme de sphéroïdes, dans des milieux simples souvent supplémentés en sérum de veau fœtal (SVF) et en antibiotiques à large spectre de type pénicilline/streptomycine (*Petragnano et al., 2020*). Ainsi, leur coût est relativement abordable. De plus, considérées comme homogènes, elles sont souvent facilement génétiquement modifiables et leur grande capacité de prolifération et d'expansion en font des modèles de choix pour du criblage de drogues à haut débit (*Barbet & Broutier, 2021*) (**Figure 17**). Cependant, les interactions non physiologiques entre les cellules et la matrice extracellulaire inhérente à la culture 2D, les changements de morphologie et de polarité des passages et la quasi systématique non reproduction de la diversité

génétique présente au sein d'une tumeur entière rend ces modèles particulièrement limitants pour mimer l'hétérogénéité inter et intra tumorale. En effet, au cours des passages, sous l'influence du SVF notamment, les lignées cellulaires ont tendance à perdre les caractéristiques de leurs tumeurs d'origine, notamment par une sélection clonale de cellules ayant acquis des avantages de croissance en 2D *in vitro*, engendrant ainsi des changements génétiques et/ou morphologiques qui ne peuvent pas être anticipés ([Lee et al., 2006](#)). En conclusion, bien que ces modèles aient permis de nombreuses avancées scientifiques et cliniques en cancérologie adulte et pédiatrique, leurs limites physiopathologiques invitent à développer de nouveaux modèles *in vitro*, capable de mimer au plus proche les conditions *in vivo* ([Ryu et al., 2019](#)) (**Figure 17**).

Concernant les modèles animaux, ils présentent tous des avantages et limites qui leurs sont propres. Les souris miment souvent mieux la pathologie retrouvée chez l'homme que les autres modèles mais ont un coût plus élevé que les poissons-zèbres ou les drosophiles par exemple, qui, de par leur facilité et vitesse de reproduction, permettent une multitude d'expériences en des temps record. Certains modèles comme les modèles syngéniques, permettent de contextualiser un environnement immunitaire, là où d'autres sont nécessairement immunodéprimés (ex. xénogreffes) (**Figure 17**). On retrouve également des modèles qui présentent l'avantage d'être transparents, permettant ainsi que de suivre le comportement des cellules tumorales en temps réel et à l'échelle d'un organisme entier ([Ignatius et al., 2016](#)). Le principal défaut des modèles animaux et que, très logiquement, ils ne peuvent pas refléter complètement la complexité de la biologie humaine (**Figure 17**).

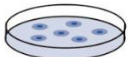
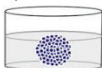


	Complexité du modèle				
	Lignées cellulaires	Sphéroïdes	XDC	XDP	OGM
					
FAISABILITE					
Dérivation à partir de micro-biopsies	Difficile	Partiellement adapté	N/A	Difficile	N/A
Manipulabilité	Très bon	Bon	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Partiellement adapté
Modifications génétiques	Très bon	Bon	Non adapté	Non adapté	Bon
Coût relatif	Très bon	Bon	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Partiellement adapté
REPRESENTATIVITE DES CRITERES TUMORAUX « HALLMARKS »					
Maintien de l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Très bon	Partiellement adapté
Maintien des caractéristiques génétiques et phénotypiques	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Très bon	Bon
REPRESENTATIVITE DE LA BIOLOGIE HUMAINE					
Modélisation de la pathologie humaine	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Très bon	Partiellement adapté
Contingent immunitaire et vasculaire	Non adapté	Partiellement adapté (ie. Co-culture)	Bon pour vascularisation	Bon pour vascularisation	Très bon
REPRESENTATIVITE DE LA BIOLOGIE HUMAINE					
Bio-banque	Très bon	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Bon	Partiellement adapté
Criblage de drogues à haut débit	Très bon	Bon	Partiellement adapté	Non adapté	Partiellement adapté
Outils pré-cliniques	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Très bon	Partiellement adapté

Figure 17 : Avantages et limites des modèles en cancérologie. Chacun des modèles *in vitro* ou *in vivo* sont notés comme étant « très bon », « bon », « partiellement adapté » ou « non adapté » en fonction de la caractéristique détaillée. N/A : non applicable. Adaptée de Barbet et Broutier, 2021.

Depuis presque 15 ans, l'émergence de la technologie des organoïdes appliquée au cancer (tumoroïdes) a obtenu une attention particulière au niveau mondial. Ces outils représentent un haut potentiel pour dépasser certaines des limites des modèles existants puisqu'ils sont à l'interface entre les modèles *in vitro* actuels, et les modèles *in vivo*. Je prendrai soin de détailler ces modèles en plus amples détails dans la « partie 4 : Technologie organoïdes et émergence de nouveaux modèles en cancérologie ».

3. Les modèles existants de RMS

Les cellules du muscle squelettique sur le plan structural et fonctionnel sont particulièrement stables au cours de l'évolution (Kashi et al., 2015). Cet avantage permet l'utilisation d'un large panel d'espèces pour le développement de modèles de RMS. De ce fait, les cellules humains (dérivées de tumeurs ou génétiquement modifiées), les souris, poissons-zèbres et les drosophiles ont pu être utilisés pour développer des modèles de RMS (Kashi et al., 2015) (Figure 18).

Au sein des bio-banques commerciales, plusieurs dizaines de lignées cellulaires de RMS sont actuellement répertoriées, étant issues de sous-types, localisations tumorales, caryotypes et histologies différentes. Hinson et collègues ont répertorié une vue d'ensemble non exhaustive, des

lignées les plus fréquemment utilisées ainsi que leurs caractéristiques (*Hinson et al., 2013*). Cette variabilité permet d'adapter le modèle à convenance selon le type d'hypothèses scientifiques adressées (*Hinson et al., 2013*). Parmi ces lignées, les plus connues sont les RH30 (FPRMS) et RD (FNRMS) qui sont utilisées depuis les années 1970. Encore aujourd'hui de nombreuses publications scientifiques ont recours à ces lignées. Par exemple, Petragnano et collègues, ont développé des lignées cellulaires de RMS radio-résistantes (RMS-RR) à partir de deux lignées commerciales. Les cellules ont été irradiées selon les mêmes protocoles appliqués en clinique et comparées aux cellules parentales isogéniques respectives. Ils ont ainsi démontré que les RMS-RR étaient capables de i) se détoxifier des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) ii) réparer des dommages à l'ADN par des voies non-canoniques de NHEJ/RH, iii) de réactiver le cycle cellulaire en phase G2/M engendrant une re-prolifération cellulaire et iv) même d'exprimer certains caractères souches (*Petragnano et al., 2020*).

Par ailleurs, des rhabdosphères en suspension ont été développées à partir de lignées cellulaires commerciales (FNRMS) (**Figure 18**). Ces rhabdosphères préservent une identité souche intéressante pour le criblage de drogues (*Walter et al., 2011*). Plus récemment, d'autres modèles 3D de RMS ont été établis par Meister *et al.*, à partir de lignées primaires de RMS préalablement cultivées en 2D. Leurs résultats montrent que ces sphéroïdes sont capables de mimer le statut de fusion (et l'expression de gènes qui en découle) de la tumeur dont ils sont dérivés. Ces modèles présentent un potentiel préclinique intéressant pour le criblage de drogues (*Meister et al., 2022*).

De nombreux modèles murins de RMS sont maintenant développés et utilisés. Sharp *et al.*, ont notamment démontré que la perte de fonction *Ink4/Arf* et l'activation constitutive de la voie de signalisation c-Met dans des souris, promouvaient le développement de RMS (*Sharp et al., 2002*) (**Figure 18**). D'autres équipes ont développé des modèles similaires faisant intervenir d'autres mécanismes oncogéniques avec des déplétions totales ou partielles d'oncogènes dans des souris génétiquement modifiées, obtenant des FNRMS (*Brown et al., 2005*), (*Haldar et al., 2008*), (*Nishijo et al., 2009*) ou des FPRMS (*Keller & Capecchi, 2005*). D'autre part, des modèles murins syngéniques de RMS ont été établis, permettant d'ouvrir à de nouvelles stratégies thérapeutiques dans un contexte immunocompétent (*Mckinnon et al., 2015*), (*Mckinnon et al., 2018*) (**Figure 18**).

L'avènement des XDP murins a pris une telle envergure qu'un réseau de collecte, d'établissement et de bio-banque de XDP pédiatriques (cancers pédiatriques et autres maladies infantiles) a ouvert au sein de l'hôpital du St Jude, aux États-Unis, répertoriant plus de 280 sous types de cancers pédiatriques et AJA, dont 47 de RMS aux caractéristiques d'âge, sexe, localisation, statut moléculaire, et stade tumoral différents. L'ensemble de ces modèles est facilement et gratuitement accessible sur simple requête. Cette bio banque unique à l'échelle mondiale, redéfinit les possibilités

d'études en oncologie pédiatriques (*Cancer Biology Program | St. Jude Research, n.d.*). Également, à l'échelle européenne, le consortium de thérapies innovantes pour les cancers pédiatriques (ITCC) créé en 2003, et faisant intervenir 63 institutions de 18 pays différents vise, notamment grâce au XDP, à développer de nouvelles thérapies pour lutter contre les cancers pédiatriques et AJA, en coopération avec des industries pharmaceutiques (*ITCC : Innovative Therapies for Children with Cancer, n.d.*) (**Figure 18**).

D'autres modèles sont utilisés de façon plus isolée. Par exemple, un modèle de poisson-zèbre de FNRMS a été développé en utilisant le promoteur *rag2* qui permet une activation constitutive du gène *KRAS^{G12D}* dans les cellules satellites des muscles (*Langenau et al., 2007*). Après caractérisation par analyse d'hybridation *in situ* d'ARN avec des marqueurs de RMS humains, le profil génomique de la tumeur du poisson-zèbre ressemblait fortement à une tumeur de FNRMS humaine, validant ainsi le modèle. De plus, cette équipe a développé une nouvelle technique transgénique par co-injection permettant de fluoromarquer différentes sous population de cellules, permettant d'identifier les cellules souches cancéreuses dans leur modèle (*Langenau et al., 2007*). Kendall *et al.*, ont mis au point un modèle de poisson-zèbre capable d'exprimer le gène de fusion *PAX3-FOXO1* en utilisant le promoteur viral CMV sur un fond génétique *TP53* muté, entraînant ainsi un développement tumoral de type FPRMS. A partir de ces modèles, ils ont mis en évidence que le gène *Her3* (*HES3* chez l'humain), surexprimé dans les FPRMS comparé aux FNRMS, pourrait être impliqué dans l'inhibition de la myogenèse retrouvée dans les FPRMS. (*Kendall et al., 2018*). Pour finir, en 2006, une équipe aux États-Unis a généré une lignée de drosophiles transgéniques qui expriment constitutivement la protéine de fusion humaine *PAX-FOXO1*. Dans ce modèle, l'oncogène *Ras* semble intimement interagir avec la protéine de fusion lui conférant une activité constitutive lui permettant d'impacter la différenciation myogénique. Ce modèle apparaît donc très intéressant pour cibler les conséquences de l'introduction de la protéine de fusion *PAX-FOXO1* dans l'initiation des FPRMS (*Galindo et al., 2006*) (**Figure 18**).

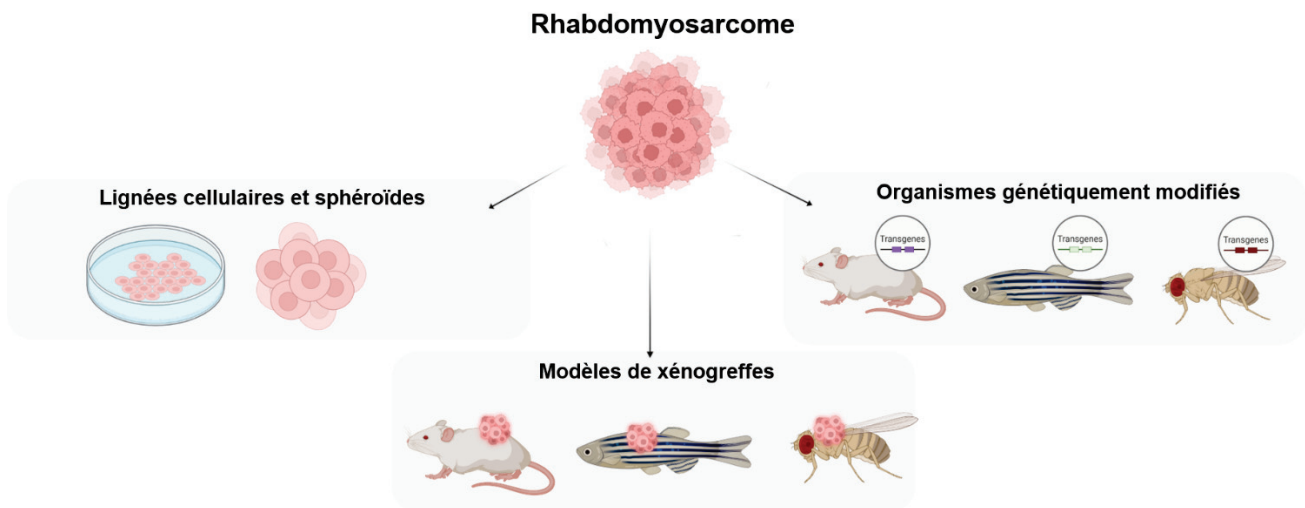


Figure 18 : Ensemble des modèles utilisés pour étudier les rhabdomyosarcomes. Les RMS peuvent être modélisés à partir de lignées cellulaires ou sphéroïdes, de greffes d'animaux (rongeurs, poissons-zèbres ou drosophiles) ou à partir d'organismes génétiquement modifiés.

4. Technologie organoïde et émergence de nouveaux modèles en cancérologie

a. Organoïdes vs. Tumoroides

i. Définition

Le suffixe *-oïde* du mot organoïdes signifie « ressemble ». De ce fait, un organoïde est grammaticalement défini comme un modèle qui ressemble à un organe. Plus précisément, les organoïdes sont définis comme des modèles en 3D avec des caractéristiques précises. Ils sont dérivés de cellules souches pluripotentes ou de cellules souches d'un tissu spécifique. Ils sont constitués de cellules souches (capables d'auto-renouvellement) et de cellules plus différenciées permettant ainsi de mimer une architecture et des fonctions proches de l'organe qu'ils modélisent ([Lancaster & Knoblich, 2014](#)), ([Clevers, 2016](#)). De nombreux organoïdes ont été créés par l'équipe de Clevers *-leader mondial dans le domaine des organoïdes-*, notamment des organoïdes de glandes lacrymales humaines et murines ou encore des organoïdes de glandes venimeuses dérivées de reptile qui miment les fonctions physiologiques des organes dont ils sont originaires : sécrétion de larmes (sous stimulation de neurotransmetteurs de type acétylcholine, noradrénaline) ou d'un large spectre de toxines venimeuses, respectivement ([Bannier-Hélaouët et al., 2021](#)), ([Post et al., 2020](#)). Ces modèles permettent d'étudier en profondeur les mécanismes physio-pathologiques associés à chaque organe.

Par analogie aux organoïdes, les tumoroides sont des modèles *in vitro* en 3D qui miment la tumeur dont ils sont dérivés. Pour être considérés comme tumoroides, ils doivent présenter des propriétés définies : i) être dérivés de cellules tumorales avec des caractéristiques de cellules souches, donc capables de s'auto-renouveler et en conséquence doivent pouvoir s'amplifier en 3D sur le long

terme et ii) récapituler les profils histologiques et moléculaires de leur tumeur d'origine, notamment leur statut de différenciation (*Barbet & Broutier, 2021*).

ii. Génération des tumoroides

Les tumoroides peuvent être générés à partir de cellules souches pluripotentes (cellules souches embryonnaires (CSE) ou induites (CSPi)) ou de cellules souches de tissus (CSt) après modifications génétiques, ou bien à partir de cellules tumorales directement issues de biopsies, de résections ou de fluides tumoraux de patient (*Barbet & Broutier, 2021*) (**Figure 19, panel de gauche**).

Les cellules souches pluripotentes sont généralement modifiées génétiquement avec des altérations génétiques d'intérêt, puis soumises à des protocoles de différenciations spécifiques - *contenant un cocktail de facteurs de croissance, d'inhibiteurs ou de morphogènes adéquats*-, et sont enfin cultivées en 3D, pour s'agréger et former les tumoroides désirés (*M. Zhang et al., 2020*), (*Turhan et al., 2021*), (*Wuputra et al., 2021*). Les cellules tumorales issues de biopsies quant à elles, doivent être préalablement mécaniquement et enzymatiquement dissociées à partir des tumeurs fraîches avant d'être mises en culture en présence des meilleures conditions physiques et chimiques possibles (*i.e* mimant leur niche tumorale chez le patient) (**Figure 19, panel du milieu**).

Indépendamment de la source de cellules souches choisie, le processus de génération des tumoroides implique deux étapes clés : leurs capacités à s'auto-renouveler mais aussi à générer des cellules différenciées. De ce fait, la composition du milieu de culture doit être équilibrée et faire intervenir des facteurs permettant de maintenir le profil souche tout en activant certaines voies de signalisation de prolifération et de différenciation des cellules (**Figure 19, panel du milieu**). Pour finir, la condition physique de la culture 3D est primordiale et peut se faire au travers de modèles rotationnels, en agrégation et avec ou sans **matrice** extracellulaire (**Figure 19, panel de droite**).

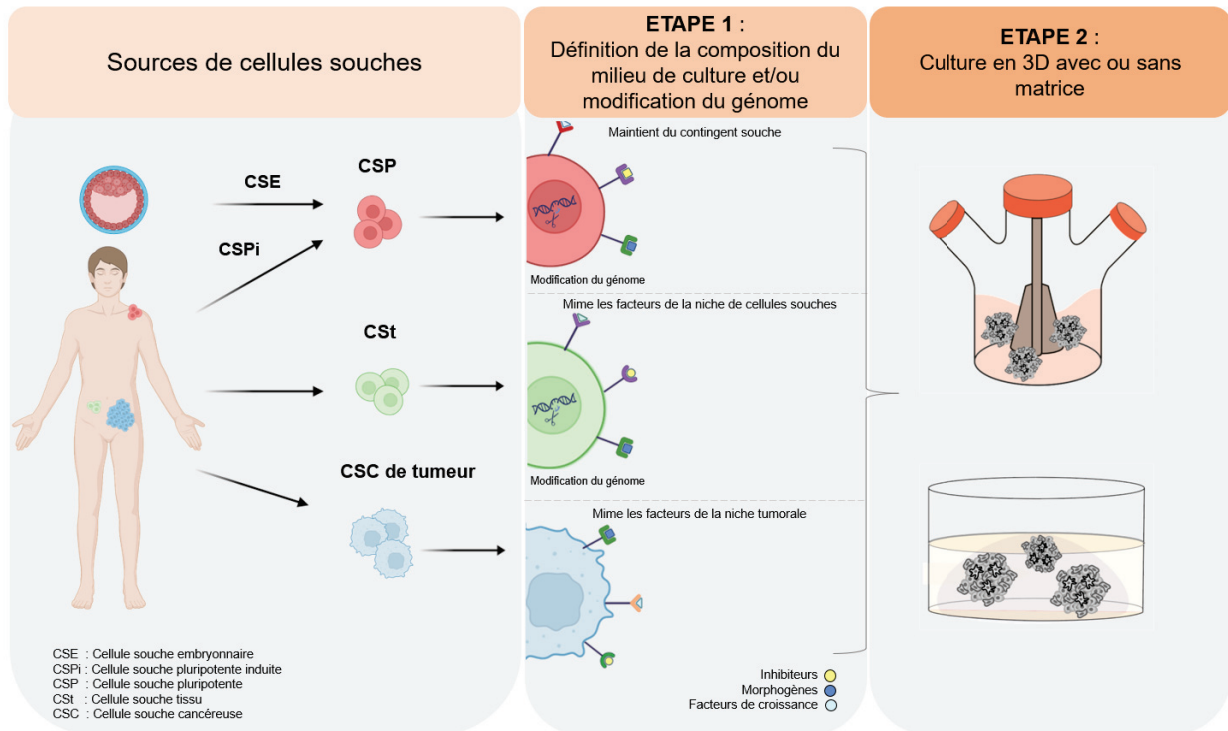


Figure 19 : Vue d'ensemble des processus de génération des tumoroides. Panel de gauche : les tumoroides peuvent être générés à partir de cellules souches pluripotentes ou de tissus sains après modifications génétiques, ou directement à partir de cellules tumorales issues de biopsies/résections ou fluides du patient. Panel du milieu : la composition du milieu fait intervenir des molécules inhibitrices, morphogènes et/ou des facteurs de croissance pour promouvoir l'auto-renouvellement, la prolifération et/ou la différenciation des cellules. Panel de droite : la mise en culture 3D peut être réalisée à partir de système rotationnel et avec ou sans recours à une matrice.

b. Application des tumoroides : un modèle novateur entre recherche fondamentale et translationnelle

Les tumoroides peuvent être utilisés selon deux grands axes de travail : une perspective ascendante « *Bottom-up* » permettant de modéliser les étapes d'initiation et de progression tumorale en modifiant génétiquement des cellules saines pour former des tumoroides et une perspective dite descendante « *Top-down* » qui permet d'étudier les mécanismes de progression tumorale à partir de cellules tumorales en elles-mêmes.

Etant donné que la majorité des cancers résultent d'une accumulation de mutations, la modélisation d'une perspective ascendante permet d'introduire des mutations de façon séquentielles au sein d'un organoïde pour modéliser et étudier les mécanismes d'initiation et de progression tumorale (Barbet & Broutier, 2021). Par exemple, un ensemble de trois voire quatre mutations à savoir, *TP53*, *APC*, *KRAS^{G12D}* plus ou moins *SMAD4* dans des organoïdes de côlon humain permet une croissance cellulaire avec notamment perte de dépendance de la niche de cellules souches pour les quadri-mutants. De plus, ces tri- ou quadri-mutants ont développé respectivement des nodules de type adénome ou un carcinome invasif *in vivo* permettant de faire le lien entre l'indépendance de la niche souche et l'agressivité tumorale (Drost et al., 2015).

Cette stratégie pourrait être particulièrement appropriée pour déchiffrer les mécanismes d'initiation et transformation tumorale dans les cancers pédiatriques, d'autant plus que leur paysage mutationnel est très pauvre comparé à ceux des adultes. De ce fait, un ou deux évènements oncogéniques pourraient être suffisants pour transformer une cellule saine en cellule aux propriétés plus agressives. Cela est particulièrement intéressant dans l'étude de la corrélation entre les syndromes de prédispositions tels que NF1 ou Li-fraumeni et l'apparition de cancers pédiatriques (*Barbet & Broutier, 2021*).

Les cancers pédiatriques ne présentent pas nécessairement de mutations génétiques à l'origine de leur développement (*Mack et al., 2014*) et leur cellule d'origine est rarement clairement connue. Il est donc important de pouvoir également développer des tumoroides pédiatriques directement à partir de modèles de patient afin d'étudier la tumeur d'intérêt. Ces tumoroides peuvent être établis à partir de micro-biopsies (*Nuciforo et al., 2018*), de résection chirurgicale (*Broutier et al., 2017*) ou de fluides tumoraux (*Hill et al., 2018*). De nombreux modèles de tumoroides épithéliaux adultes ont été développés ; cancer du côlon (*Sato et al., 2011*), cancer du foie (*Broutier et al., 2017*), cancer du sein (*Ranftl & Calvo, 2017*), cancer de la prostate (*Puca et al., 2018*) ou encore du pancréas (*Seino et al., 2018*) (**Figure 20**). Mais à ce jour, très peu de modèles de tumoroides pédiatriques existent (*Ballabio et al., 2020*), (*Calandrini et al., 2021*), (*Norrie et al., 2021*) soulignant une fois de plus le retard de transfert technologique retrouvé en oncologie pédiatrique (**Figure 20**).

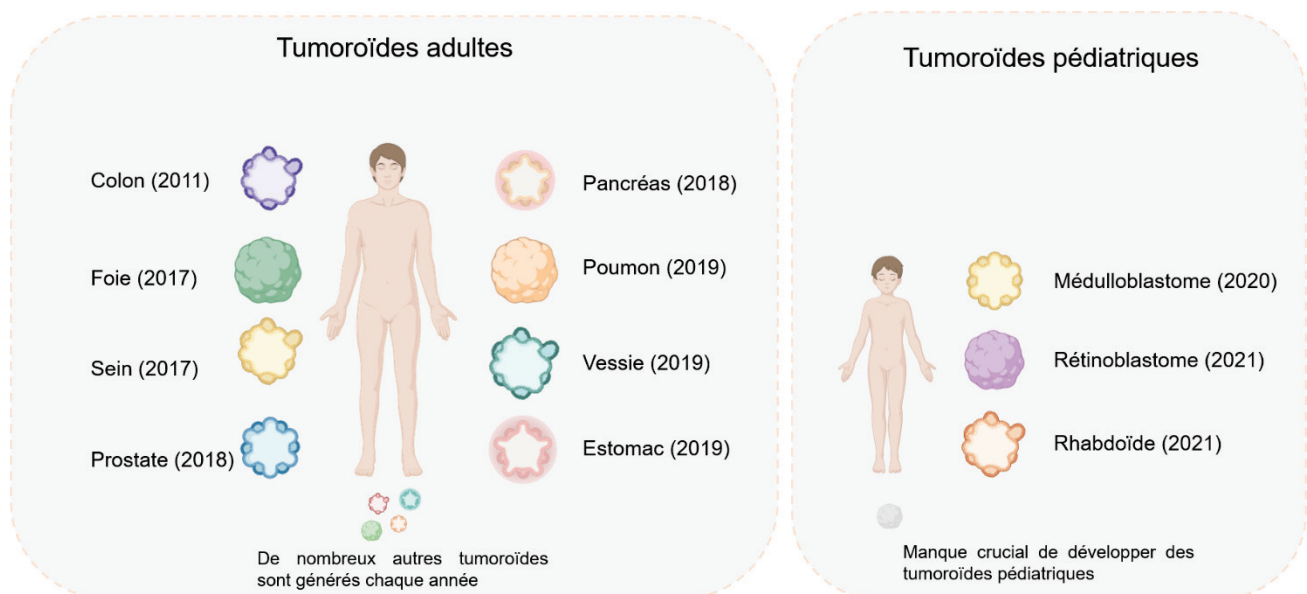


Figure 20 : Recensement des principaux types de tumoroides établis à partir de différents cancers chez l'adulte (panel de gauche) et l'enfant (panel de droite). A noter le manque crucial de développer des tumoroides pédiatriques. Adapté de S. Kim et al., 2020

Ces tumoroides, en accord avec leur définition, s'amplifient en 3D sur plusieurs mois, voire même années selon les modèles, et ils récapitulent l'histo-architecture et les profils génétiques,

transcriptomiques et méthylomiques dont ils sont dérivés, et en conséquence l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale ([Barbet & Broutier, 2021](#)).

Ce sont donc des outils puissants qui permettent une multitude de recherche en laboratoire (**Figure 21**). Par exemple, parce qu'ils peuvent être dérivés à partir de très peu de matériels et amplifiés, ils permettent le profilage multi-omiques des cellules tumorales ([Lindeboom et al., 2018](#)). Ceci est particulièrement intéressant dans le cas des cancers pédiatriques où la quantité de matériel disponible pour la recherche est souvent très limitée ; ils pourraient ainsi constituer une opportunité unique de réaliser une cartographie tumorale de chaque patient permettant de constituer un atlas de référence représentatif de l'hétérogénéité inter- et intra- tumorale. Parce qu'ils conservent l'hétérogénéité intra-tumorale, ils permettent également d'étudier la plasticité des cellules tumorales et leur rôle dans la résistance aux traitements comme le montre également l'étude de Sato et al., dans les cancers colorectaux ([Shimokawa et al., 2017](#)). Les tumoroïdes sont également très utiles en criblage de drogues car ils miment de façon robuste la tumeur d'origine et ont donc une meilleure valeur prédictive de la réponse aux drogues que les lignées classiques en 2D souvent utilisées dans ce type d'approche ([S. Kim et al., 2020](#)). Notamment, les modèles de tumoroïdes deviennent encore plus intéressants puisqu'ils peuvent être utilisés à des fins de co-cultures pour complexifier le milieu et se rapprocher des conditions *in vivo*. Par exemple, des cocultures de tumoroïdes et de fibroblastes associés aux cancers ont permis de mettre en évidence des voies de signalisation responsables du recrutement de sous-types de fibroblastes spécifiques, devenant alors une cible thérapeutique du stroma tumoral ([Bose et al., 2021](#)). Enfin, ces modèles de tumoroïdes peuvent être utilisés pour déterminer les aberrations moléculaires et la réponse aux traitements de chaque patient permettant d'ouvrir des possibilités de médecine personnalisée ([Tuveson & Clevers, 2019](#)).

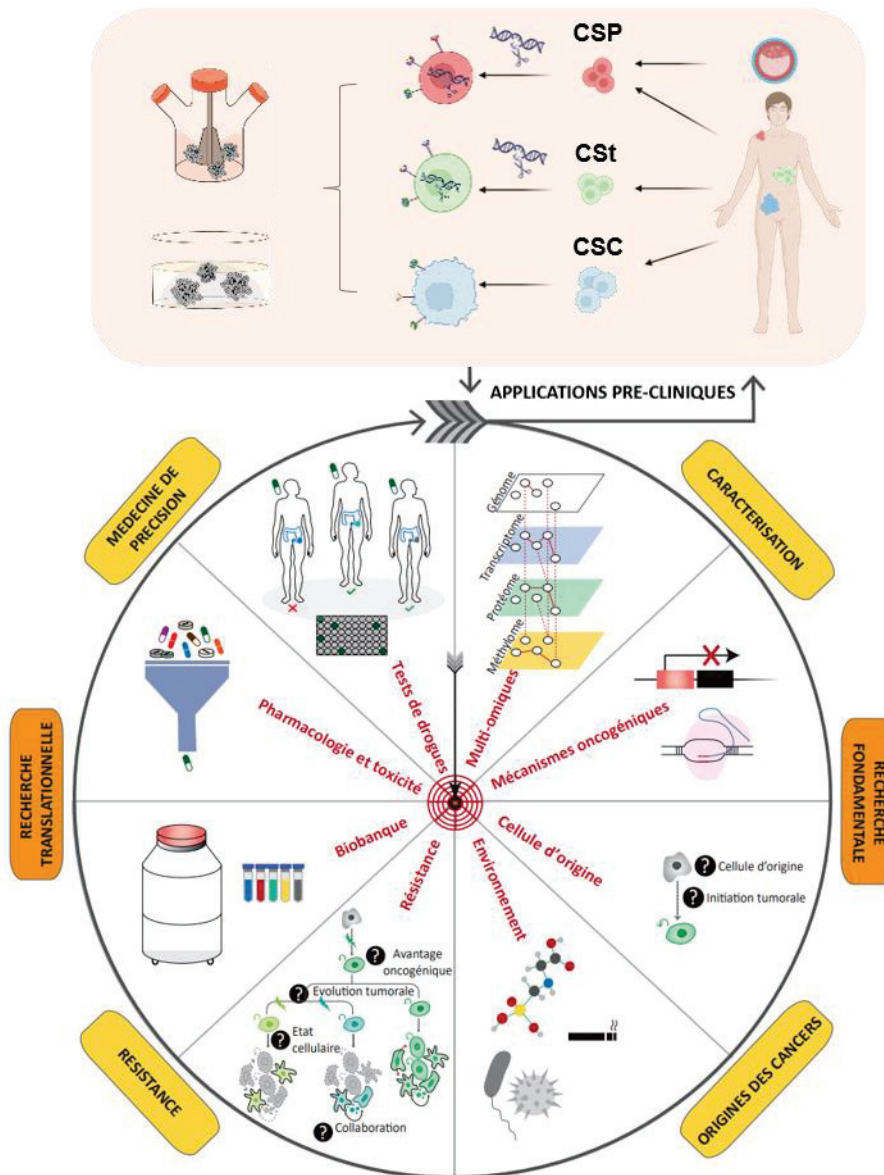


Figure 21 : Applicabilité des modèles de tumeurs en recherche fondamentale et translationnelle. Adapté de Barbet et Broutier 2021.

Même si les tumeurs présentent de nombreux avantages, ils ont bien évidemment des limites. Notamment, même si ces modèles conservent l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale, ils ne conservent que le compartiment tumoral et sont pour la plupart du temps dénués de la composante cellulaire du micro-environnement tumoral (stromal, vasculaire et immunitaire). La génération de tumeurs vascularisées présentant une composante immunitaire et stromale sont les défis de demain. Cependant, Neal et collègues ont récemment mis au point un protocole qui permet de générer des tumeurs en maintenant le contingent lymphocytaire ainsi que ses Inhibiteurs de point de contrôle. Brièvement, les tumeurs sont établies *in vitro* avec une interface liquide-air qui favorise l'activation et l'expansion des lymphocytes T et donc promeut la mort des cellules tumorales (Neal et al., 2018).

*Les **tumoroïdes** sont des modèles innovants et robustes qui récapitulent les profils histologiques et moléculaires, et **donc l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale**. Ils offrent ainsi des possibilités uniques d'étude *in vitro* de mécanismes très longtemps analysables seulement *in vivo* et représentent donc des modèles intéressants pour la panoplie du chercheur, puisqu'à **l'interface des modèles 2D et des modèles *in vivo* classiquement utilisés en laboratoire**. Mais comme souvent en cancérologie pédiatrique, on observe **un délai de transfert technologique** et force est de constater qu'il existe **malheureusement très peu de modèles de tumoroïdes pédiatriques aujourd'hui**.*

OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

Les RMS sont des tumeurs malignes des tissus mous, avec des caractéristiques de cellules musculaires squelettiques. Ces tumeurs peuvent être très agressives en fonction de leur localisation, de leur statut mutationnel et de la rapidité de prise en charge du patient. Depuis plus de 20 ans, le taux de survie à 5 ans n'évolue plus. Chez certains patients, la thérapie prescrite se révélera inefficace d'emblée. On parlera alors de résistance « primaire » au traitement. D'autres patients vont, en revanche, en tirer un bénéfice thérapeutique immédiat. Il n'est pas rare cependant que la maladie réapparaisse après quelques semaines, mois ou années de traitement. Cela signifie que le médicament n'est plus efficace pour contrer la maladie. On parlera alors de résistance « secondaire » au traitement. Pour ces patients il n'existe aujourd'hui pas de secondes lignes de traitements efficaces.

Les cancers sont des pathologies remarquablement hétérogènes. Selon l'OMS, il existe à ce jour 4 sous-types de RMS différents comprenant des profils cliniques, histologique et moléculaire différents, reflétant une notion d'hétérogénéité inter-patients. De plus, une tumeur n'est pas un amas uniforme de cellules cancéreuses identiques mais se compose en réalité de plusieurs types de cellules en constante évolution : on parle d'hétérogénéité intra-tumorale (génétique, spatiale, fonctionnelle et temporelle). Cette hétérogénéité a de lourdes conséquences en termes d'efficacité de traitement. Pour être efficace, un traitement devrait en effet pouvoir cibler spécifiquement toutes les cellules tumorales du patient. Dans ce contexte, comprendre l'hétérogénéité tumorale représente un vrai défi pour contrer les résistances et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées et personnalisées pour lutter contre les RMS.

Il existe plusieurs modèles d'étude des RMS ayant permis internationalement des avancées majeures sur leurs classifications, l'étude de leurs mécanismes oncogéniques ou encore le test de nouvelles drogues. Malheureusement, ces modèles reflètent peu ou pas la complexité de l'hétérogénéité inter- et intra- tumorale des patients ce qui limite leur utilisation pour comprendre et dépasser les mécanismes de résistance observés chez les patients atteints de RMS. Depuis une quinzaine d'années, les tumoroïdes représentent des modèles puissants et novateurs en cancérologie. En effet, leur capacité à mimer la complexité et la diversité des cellules tumorales dont ils sont dérivés, permet des travaux de recherche fondamentales et translationnelle sans précédents. Mais à ce jour, il n'existe pas de modèles de tumoroïdes de RMS pédiatriques.

Dans ce contexte, les objectifs de ma thèse ont été de générer, caractériser et utiliser des modèles de tumoroïdes de RMS pédiatriques préservant l'hétérogénéité inter- et intra- tumorale pour étudier et contourner les mécanismes de résistances aux traitements dans les RMS.

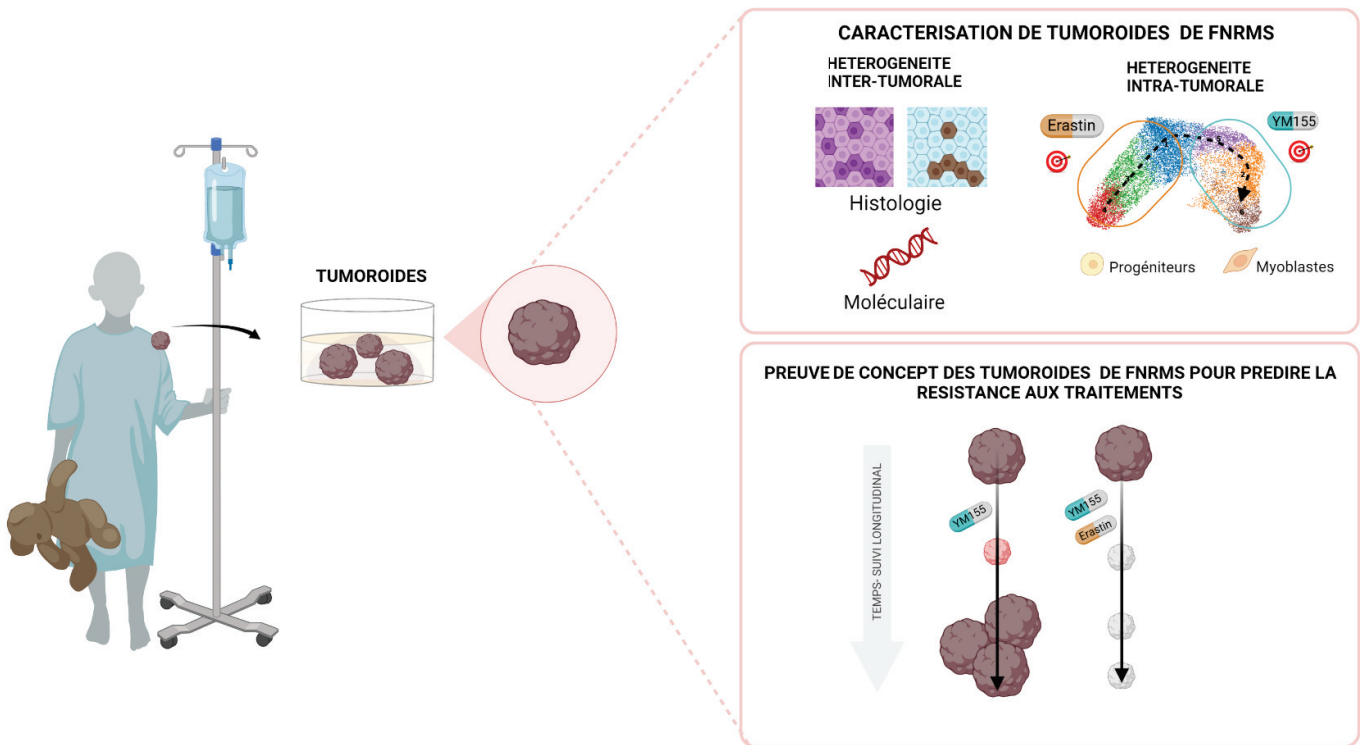
RESULTATS

RESULTATS

Résumé des résultats obtenus & publications associées

Résumé de publication n°1

Dans ce travail, nous avons établi un protocole robuste de dérivation de tumoroïdes de FNRMS à la rechute. Ces modèles préservent les caractéristiques histologiques et moléculaires de la tumeur du patient dont ils dérivent. De plus, le contingent souche, au cœur de l'hétérogénéité intra-tumorale, est préservé dans ce système ce qui permet une expansion en 3D sur plusieurs mois. Ces modèles sont donc performants pour évaluer l'efficacité de drogues et anticiper/étudier les mécanismes de résistance éventuels grâce à un suivi longitudinal des cultures. En réévaluant les opportunités thérapeutiques de ciblage de l'apoptose, nous avons en effet pu apporter la preuve de concept du potentiels précliniques des tumoroïdes établis.



1 **Modeling the next-generation of fusion-negative rhabdomyosarcoma 3D-organoids to**
2 **predict effective drug combinations: a proof-of-concept on cell death inducers.**

3 Clara Savary^{1*}, Paul Huchedé^{1*}, Léa Luciana^{1*}, Arthur Tourbez^{1*}, Clémence Deligne¹, Cécile Picard², Thomas Diot¹, Claire
4 Coquet¹, Nina Meynard¹, Marion Le Grand³, Laurie Tonon⁴, Nicolas Gadot⁵, Cyril Degletagne⁶, Sophie Léon⁷, Valéry
5 Attignon⁶, Alexandra Bomane¹, Isabelle Rochet^{2,8}, Kevin Müller³, Virginie Mournetas⁹, Luciana Oliveira⁹, Christophe
6 Bergeron⁸, Paul Rinaudo⁹, Aurélie Dutour¹, Martine Cordier-Bussat¹, Sarah Watson¹⁰, Daniel Orbach¹⁰, Olivier Delattre¹⁰,
7 Frédérique Dijoud², Nadège Corradini^{1,8,11}, Delphine Maucort-Boulch^{12,13}, Eddy Pasquier³, Jean-Yves Blay^{1,11}, Marie
8 Castets^{1,11‡}, Laura Broutier^{1,11‡}.

9
10 1 Childhood Cancer & Cell Death team (C3 team), LabEx DEVweCAN, Institut Convergence Plascan, Centre Léon Bérard, Centre de
11 Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, 69008 Lyon, France.
12 2 Multisite Institute of Pathology, Groupement Hospitalier Est du CHU de Lyon, Hôpital Femme-Mère-Enfant, 69677 Bron, France.
13 3 Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Université Aix-Marseille, Institut Paoli-Calmettes, Centre de Lutte Contre le
14 Cancer de la région PACA, INSERM 1068, CNRS 7258, 13009 Marseille, France.
15 4 Synergie Lyon Cancer, Gilles Thomas' Bioinformatics Platform, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France.
16 5 Anatomopathology Research Platform, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Université Claude
17 Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, 69008 Lyon, France.
18 6 Platform of Cancer Genomics, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France
19 7 EX-VIVO Platform, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon (CRCL), Université de Lyon, Université Claude
20 Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, 69008 Lyon, France
21 8 Department of Pediatric Oncology, Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France.
22 9 ADLIN Science, Evry-Courcouronnes, France.
23 10 SIREDO Oncology Center (Care, Innovation and Research for Children and AYA with Cancer), Institut Curie, PSL Research University,
24 Paris, France.
25 11 Department of Translational Research in Pediatric Oncology PROSPECT, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France.
26 12 Biostatistics and Bioinformatics Department, Pôle Santé Publique, Hospices Civils de Lyon, 69003 Lyon, France.
27 13 Biostatistics and Health team, Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS 5558, 69100
28 Villeurbanne, France.

29

30 * co-first authors

31 ‡ co-last authors, co-corresponding authors: Marie Castets, Laura Broutier.

32 **Correspondence:** marie.castets@lyon.unicancer.fr ; laura.broutier@lyon.unicancer.fr

33

34 **ABSTRACT**

35 Rhabdomyosarcoma (RMS) is the main form of pediatric soft-tissue sarcoma. Its cure rate has not improved in the last 20 years
36 notably following relapse, and the lack of reliable preclinical models has so far hampered the design of new therapies. This is
37 particularly true for highly heterogeneous fusion-negative RMS (FNRMS). Although methods have been proposed to establish
38 FNRMS organoids, their efficiency remains limited to date, both in terms of derivation rate and ability to accurately mimic the
39 original tumor. Here, we present the development of a next-generation 3D-organoid model derived from relapsed FNRMS.
40 This model preserves the molecular features of the patients' tumors and is expandable for several months in 3D, reinforcing its
41 interest to drug combination screening with longitudinal efficacy monitoring. As a proof-of-concept, we demonstrated its
42 preclinical relevance by reevaluating the therapeutic opportunities of targeting apoptosis in FNRMS from a streamlined
43 approach based on transcriptomic data exploitation.

44

45 **KEYWORDS:** Rhabdomyosarcoma, tumor-derived organoids, intra-tumoral heterogeneity, cell death.

46

47 **INTRODUCTION**

48 Rhabdomyosarcoma (RMS) (1) gather a group of heterogeneous cancers representing notably 5% of all pediatric solid tumors.
49 They share similarities to embryonic muscle tissue (1), and two main subclasses have been defined based on histological
50 features in the pediatric population, namely the embryonal (ERMS; 70% of all RMS) and the alveolar subclasses (ARMS; 20%
51 of all RMS). Molecular advances resulted in the identification of pathognomonic PAX3/7-FOXO1 chromosomal translocations
52 as being associated with 85% of ARMS. ERMS and ARMS lacking this translocation, *i.e.*, fusion-negative RMS (FNRMS),
53 are an even more heterogeneous and complex subgroup, still defined by default (1). Their 5-year survival rate ranges from 60-
54 80% for patients with localized tumors but drops to 20% for those who relapsed or with metastases at diagnosis, with only a
55 slight improvement in prognosis over the last 20 years (1). Innovative therapeutic strategies are thus required notably for these
56 patients with poor prognosis.

57 To meet this challenge, major efforts have been made to design *in vitro* models mimicking RMS tumors in their diversity and
58 complexity to (i) better understand RMS biology and (ii) facilitate high-throughput drug screenings (2-4). Protocols have
59 notably been proposed to establish tumor-derived organoids (*i.e.* tumoroids) (3-4). However, approaches to develop FNRMS
60 *in vitro* models, although promising, have until yet been hampered by i) derivation efficiency rate below 20% from patients'
61 samples, ii) lack of preservation of original tumors' molecular specificities beyond genetics, and iii) difficulties to expand them
62 in 3D (2-4). These pitfalls complicate both the modeling of inter-tumoral heterogeneity and the long-term evaluation of new
63 therapeutic strategies. Here, we present the establishment of an original relapse FNRMS-derived organoid model, which has
64 overcome all these limitations, and allows the highly efficient derivation of 3D-cultures directly from patients' tumors in a
65 unique optimized culture medium. These tumoroids recapitulate precisely histological and molecular characteristics of
66 aggressive FNRMS tumors, and they accurately preserve their stem-cell hierarchy and intra-tumoral heterogeneity even after
67 several passages and cryopreservation as 3D cultures. By combining bioinformatics analyses of bulk and single-cell
68 transcriptomic data, we demonstrate their usefulness to design and evaluate new drug combinations, from a streamlined proof-
69 of-concept approach based on targeting apoptosis.

70

71

72

73 **RESULTS**

74 **Design and characterization of an original FNRMS-derived organoid model that finely preserve tumor-of-origin's**
75 **features.**

76 By extensively deciphering active signaling cascades that could support tumor cell growth based on transcriptomic datasets
77 (Figure S1), we designed a M3 culture medium and established a protocol to rapidly generate and expand over a long term (>
78 6 months) relapse FNRMS-derived organoids (designated as RMS_O). RMS_O were successfully established directly in 3D
79 from patient or patient-derived xenograft tumor specimens (100% efficiency, 5/5 samples; Figure 1A and Table S1). We also
80 improved significantly the derivation of primary 2D-FNRMS models directly from patients' samples at diagnosis by using a
81 supplemented M3 medium (M5), with a 100% growth (n=7/7) versus respectively 17% in classically used DMEM-FBS 10%
82 (n=1/6 samples), or 16% growth in the recently described BM1* medium (n=4/25) (3). Tumorigenicity of RMS_O was
83 demonstrated by their ability to give rise to tumors when orthotopically (*tibialis anterior*) xenografted in immunocompromised
84 mice (RMS_XG, Figure 1B). Contrary to the methods available until now (3-4), RMS_O were derived successfully from tumors
85 located in diverse regions, with varying histological etiologies and at different ages, without requiring necessarily a prior
86 grafting step in PDX models (Table S1). Moreover, RMS_O precisely recapitulate the histological features of their tumor-of-
87 origin (Figure 1B), which is also a major improvement to obtain tumors' phenocopies. For example, RMS1_O preserves the
88 histology of its primary tumor (RMS1_T), with cells of variable sizes, some with small nuclei and often reduced cytoplasm
89 and some rhabdomyoblast cells, whereas RMS2_O, like RMS2_T, displays a more undifferentiated state (Figure 1B). RMS_O
90 also preserve the expression pattern of Desmin and Myogenin diagnostic markers, and the proliferation rates of their tumor-of-
91 origin (Figure 1B).

92 Previously established RMS-derived organoids only partially reproduced the transcriptional characteristics of their original
93 tumors, allowing only to cluster them according to their fusion status (3). Transcriptomic profiling and PCA analysis unveil
94 that RMS_O models are clearly grouped with their respective tumor-of-origin, mostly through the first dimension (Dim1) that
95 largely reflects inter-patient heterogeneity (Figure 1C). Pearson's correlation heatmap confirms that RMS_O but also their
96 equivalent 2D models cultured in M3 medium (M3_2D) cluster with their corresponding tumors in an unsupervised analysis
97 even after several passages (Figure 1D), contrary to 2D and 3D models respectively cultured in DMEM-FBS 10% (DMEM_2D)
98 or an incomplete organoid medium (M2_3D) (Figures 1C-D). However, functional gene set enrichment highlights that cultures
99 propagated in 2D are characterized by unspecific processes, including those related to cell adhesion regulation, whereas

100 RMS_O display the expected developmental and muscular identity (Figure 1E). Hierarchical clustering analysis on RMS
101 markers confirms the high level of similarities between RMS_O and their corresponding tumor samples, even after
102 cryopreservation, while unveiling notable differences with 2D cultures, even grown in M3 (M3_2D) (Figure 1F). For example,
103 the expression patterns of cancer (*GPC3* and *MYCN*) and muscle (*PAX7*, *MYOD1*, *TTN*, *MYL1*) markers are comparable in
104 RMS1_O and its tumor-of-origin, while they are downregulated in M3_2D cultures (Figure 1F). These markers are barely
105 expressed in RMS2_T and its matched RMS2_O, which reciprocally both present a strong expression of *MEOX2*, a specific
106 marker of early paraxial mesoderm (5). Furthermore, DNaseq analysis validates the preservation of the tumor-of-origin's
107 variant allelic fraction (VAF) by RMS_O, indicating that they retain major clones and subclonal populations even after
108 cryopreservation, unlike DMEM_2D cultures (Figures 1G and S2A). Of note, DMEM_2D cultures acquires *in vitro*, before
109 any cryopreservation, two genetic alterations predicted by automatic tools (PolyPhen-2 and SIFT) to be deleterious and recently
110 described as oncogenic (6). Finally, methylome analysis indicates that only RMS_O models allow to discriminate patients like
111 the original tumors (Figure 1H), whereas *in vitro* 2D-propagation leads to a loss of inter-patient heterogeneity regardless of the
112 medium (Figure 1H, bottom panel).

113 Then, these FNRMS-derived organoids are the first models i) established and propagated in 3D directly from patients' samples
114 with high efficiency and ii) precisely preserving the genetic, epigenetic and gene expression profiles' characteristics of their
115 original tumor, which is a prerequisite to mimic inter-patient heterogeneity in the context of personalized medicine approaches.

116

117 **FNRMS-derived organoids preserve functional intra-tumor heterogeneity.**

118 Intra-tumoral heterogeneity is widely considered as a key driver of resistance to treatment. Preservation of the recently
119 described RMS tumor hierarchy (4,7) is then a pre-requisite in a pre-clinical perspective. To define the relevance of our
120 RMS_O, we performed droplet-based single-cell RNA sequencing (scRNA-seq). Using an unsupervised Leiden algorithm, we
121 identified 6 clusters on UMAP, each expressing a specific subset of biomarker genes (Figures 2A and S1B-C, Table S2).
122 Trajectory inference analyses unveiled the expected myogenic-like differentiation sequence (Figures 2B-C and S1D), with
123 features of muscle satellite cells in clusters 3-4 whereas clusters 5-2-6 resemble myoblasts at different cell cycle stages and
124 were subsequently grouped into a single myoblast-like proliferative cluster (Figures 2C-D and S1D). Gene set enrichment
125 analyses confirmed that clusters 3-4 encompass quiescent satellite-like cells enriched in a hypoxic gene signature (Figures 2D-

126 E), whereas cycling myoblasts-like (clusters 5-2-6) are reciprocally enriched in genes involved in quiescence exit, and in the
127 previously reported pediatric cancer signature (8) (Figures 2D-E). As expected from the expression of key muscle marker genes
128 described in the literature (9-11), clusters 4-3 express *CRYAB*, *GLUL* and *MTX1*, three genes robustly defining satellite cells in
129 human muscle tissue scRNA-seq analyses (9, 11) and the mesenchymal marker *CD44*, recently described to be expressed by
130 RMS satellite-like cells (Figure 2F) (7, 12). Cells in cluster 1 specifically express *PAX7*, suggesting a commitment towards
131 myogenic differentiation and satellite cell activation (Figure 2F) (13). This differentiation ends at clusters 5-2-6, which express
132 *EZH2*, a gene specifically induced in activated satellite cells during myogenesis (13), and early myoblastic differentiation
133 markers, such as *MSTN* and *TPM4* (14) (Figure 2F). Importantly, those myoblast-like tumor cells fail to express late markers
134 of muscular differentiation (Table S2). Thus, proliferating myoblasts-like at the end of the myogenic continuum described in
135 this RMS_O model seem to be ‘halted’ in an early stage of differentiation, confirming recent studies on RMS tumor hierarchy
136 (4, 7). We then wondered whether precise preservation of the tumor hierarchy allows to model drug response and relapse. As
137 a proof-of-concept, we showed that RMS1_O reproduces the vincristine resistance profile observed in Patient 1 (Figures 2G-
138 I), with a resistant subpopulation remaining viable even under high doses of treatment. Importantly, the ability to expand
139 RMS_O over time in 3D allows to mimic the regrowth of tumor cells post-treatment washout (Figures H-I).

140 Thus, the RMS_O model preserves the cell states previously described in patients’ tumors, allowing to model the impact of
141 intra-tumor heterogeneity on drugs’ response.

142

143 **FNRMS-derived organoids are innovative tools to design new drug combinations: proof-of-concept on apoptosis.**

144 Therapies targeting apoptotic pathways are the prototypical example of promising strategies, which have so far fallen short of
145 expectations in patients (15). We reasoned that by combining a rationalized approach based on the targeting of appropriate
146 apoptotic blocking points and the use of FNRMS tumoroid models that faithfully reproduce their tumor of origin, we could
147 optimize the design of apoptotic inducers therapeutic combinations.

148 Separated clusters for FNRMS and FPRMS were identified on UMAP in two independent cohorts, solely based on the
149 expression of an 86-gene apoptotic signature (Figures 3A and S3A, Table S3). Interestingly, causal inference approaches by
150 Ingenuity Pathway Analysis (16) indicate that cell death transcriptional regulatory networks are significantly activated in
151 FNRMS compared to FPRMS in cohorts 1 ($p < 0.0001$, z-score = 1.94; Figure 3B) and 2 ($p < 0.0001$, z-score = 1.41; Figure

152 S3B). Using a cross-validation strategy, we generated an apoptotic gene metascore based on a two-genes signature using *BNIP3*
153 ($p < 0.05$ in 186/250 iterations) and *FASLG* ($p < 0.05$ in 170/250 iterations) (Figure S3C), which efficiently discriminates
154 metascore-high (BNIP3/FASL high) FNRMS patients as those with a significantly poorer outcome compared to metascore-
155 low patients (Figures 3C and S3D). Considering the clinical relevance of the apoptotic cascade's status, we sought to identify
156 apoptotic effectors that block its execution in FNRMS. We unveiled that 47% of pro-apoptotic and 54% of anti-apoptotic genes
157 are respectively expressed at significantly higher and lower levels in tumors than in their normal skeletal muscle's counterparts
158 (Figure 3D and Table S4). Interestingly, pro-apoptotic effectors overexpressed in tumors are mostly upstream in the apoptotic
159 cascade (Figure 3E). Conversely, *BIRC5*, which encodes the downstream IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) Survivin is
160 significantly over-expressed in FNRMS ($\log_2(\text{FC}) = 2.9$; $p < 0.0001$) in two independent cohorts (Figures 3D-E and S3E). To
161 define whether FNRMS may be dependent on *BIRC5* expression for survival, we performed a medium-scale drug screening
162 focusing on therapeutic compounds targeting apoptosis on 2D-FNRMS cell lines (Figure 3F). As expected, and already shown
163 by others (2,3,17), FNRMS cells are highly susceptible to the Survivin-inhibitor YM155, with 10 nM of this compound being
164 sufficient to drive massive cell death in all three tested 2D FNRMS cell lines (Figure 3F). In contrast, FNRMS cells are resistant
165 to other IAP, BCL-2 and DNA repair inhibitors, confirming the central role of Survivin in blocking apoptosis execution (Figure
166 3F).

167 In RMS_O, which accurately maintain the original tumor pattern of apoptotic gene expression (Figure S3F), we observed that
168 *BIRC5* is specifically expressed by the *MKI67*-positive proliferative myoblasts population (Figures 3G-H). Consistently,
169 although YM155 induced a massive wave of cell death and a major destruction of tumoroid structures (Figures 3I and S3G),
170 75% of tumoroids treated had grown back from cells that had not been eliminated, within one-month post-washout (Figures 3J
171 and S3H). To eliminate those cells, we therefore looked for another target gene more specifically expressed in the *BIRC5*-
172 negative quiescent satellite cell-like population. We identified the Voltage-Dependent Anion-selective Channel protein-2
173 encoding gene (*VDAC2*), which is also involved in cell death regulation (18,19), as a putative candidate (Figure 3K). A
174 therapeutic combination of YM155 and Erastin, a known inhibitor of VDAC2 activity (19), is sufficient to induce a massive
175 destruction of tumoroid structures (Figure 3L), at doses largely ineffective in monotherapy (Figure S3I). Most importantly,
176 while both monotherapies are largely insufficient to block RMS1_O regrowth, their combination is highly effective even after
177 several weeks (Figures 3L-M and S3J). Importantly, renewal properties of RMS1_O treated with YM155 are preserved, as
178 shown by their ability to be split over time (Figure 3L-N).

179 Because they accurately reproduce tumor cell states while maintaining their self-renewal and 3D expansion properties, these
180 last-generation FNRMS-derived organoids are crucial tools to define effective therapeutic strategies in longitudinal preclinical
181 approaches.

182

183 **DISCUSSION**

184 RMS remain a clinical challenge, due to the insufficient effectiveness of current treatments (1). One of the major obstacles to
185 improving their management is the availability of preclinical tools that accurately and precisely reproduce the characteristics
186 of their tumor-of-origin, in their heterogeneous and dynamic component. Organoid models derived from patient tumors (*i.e.*
187 tumoroids) have been demonstrated to efficiently bridge the gap between *in vitro* and xenograft models to predict the actual
188 human response in the field of adult epithelial cancers (20). However, so far, the derivation of FNRMS *in vitro* cultures has
189 only been possible with rather low efficiency, or from PDX models (2-4). Moreover, beyond genetics, an important challenge
190 remained to faithfully reproduce the epigenetic/transcriptional profile of the original FNRMS tumors and their heterogeneous
191 cell states. Finally, the design of new therapeutic combinations, targeting all tumor populations, relies on the possibility of
192 cultivating and expanding tumoroids over the long term in 3D, to preserve as much as possible the characteristics of their
193 original tumors.

194 Here, we show for the first time that it is feasible to derive with high efficiency tumoroids from aggressive FNRMS, which
195 reproduce the original tumor features including its genetic, epigenetic and transcriptional profiles, and can be expanded in 3D
196 over a long period of time, thereby meeting the tumor-derived organoid definition (20). Preservation of the 3D structure is a
197 key issue to reproduce cell-cell contacts, as well as physical constraints existing in malignancies, and thus to precisely reproduce
198 tumor behavior. Indeed, although the 2D-lines that we and others (2,3) established recapitulate partially tumor characteristics,
199 they also present significant caveats as exemplified here by the artefactual enrichment in cell adhesion signatures or the loss of
200 the original DNA methylation pattern. Moreover, our protocol meets the challenge to allow the systematic derivation of all
201 relapse FNRMS-derived organoids included so far, which is a prerequisite in a personalized medicine perspective considering
202 both the heterogeneity and scarcity of these tumors. Last, the direct derivation of *in vitro* FNRMS organoids from patients'
203 tumors is crucial in preclinical settings, to avoid both time loss and additional costs/complexity resulting from requirement for
204 prior establishment of PDX models (2). The creation of biocollection of relapse FNRMS-derived organoids is highly relevant

205 considering that i) this subgroup is the most prevalent in children and adolescents, ii) a collection of such models, which we
206 initiated here, is crucial to provide proxies of the high level of complexity resulting from the inter-patient heterogeneity in the
207 FNRMS group and that iii) survival rate of patients at relapse is about 20%, highlighting the need for models to establish new
208 efficient therapeutic approaches.

209 Beyond simple assessment of drug vulnerability, we also established the proof-of-concept of the efficiency of these FNRMS-
210 derived organoid models in optimized drug screening, by showing that they provide leads to design and/or re-explore the
211 therapeutic potential of drug combinations, while explaining their limits and the potential origin of resistance observed in
212 patients. Targeting *BIRC5* has already been proposed as a putative therapeutic approach in several cancers including RMS (2,
213 3, 17), but no combination including a Survivin inhibitor has shown clinical efficacy. The use of our FNRMS-derived organoid
214 models sheds new light on these contradictory data. Indeed, *BIRC5* expression seems to be restricted to the myoblast
215 proliferative clusters - consistent with the dual role of Survivin in both apoptosis inhibition and cell cycle promotion (21),
216 thereby explaining the transient effect of YM155 on this model. Because they finely reproduce intra-tumor heterogeneity and
217 are expandable over long term period in 3D, which was not the case with the tumor-derived models proposed so far, these
218 FNRMS-derived organoids then offer a sizeable opportunity to reexplore the specific vulnerabilities of each tumor cell states,
219 to target them therapeutically using relevant drug combinations, and to model long-term therapeutic response. In other words,
220 the use of these FNRMS-derived organoid models could reconcile the promising data obtained *in vitro* and the failures observed
221 in the clinic, to rapidly provide new effective therapeutic opportunities to prevent and anticipate resistance and relapse. The
222 next challenge will be to establish a bio-collection of tumoroid models sufficient to mimic inter-patient heterogeneity and
223 validate the relevance of new therapeutic approaches on a large fraction of patients, and to extend the design of 3D FNRMS-
224 derived organoids at diagnosis.

225

226 **ACKNOWLEDGMENTS**

227 We thank the patients and their families who consent to participate in this study. We also thank all facilities from the CRCL,
228 clinical teams from IHOPe, HCL-HFME and Institut Curie as well as the BRCs of CLB, HCL (Tissu-Tumorotheque Est) and
229 Institut Curie for their support and contributions. We are grateful to Séverine Tabone-Eglinger, Corinne Perrin, Lesly
230 Chambault, Deborah Sitbon, Gaelle Pierron, Sophie El Zein, Loïc Sebileau and Anne-Sophie Bonne for their help with the
231 management of regulatory procedures and tissues collection. We also thank Dr Xavier Morelli and Carine Derviaux of the

232 HiTS platform of the CRCM for their help with the medium-throughput drug screening, and Dr Akram Ghantous from IARC
233 for his help with methylome analysis. We thank Brigitte Manship for editorial assistance. We thank parents' charities which
234 support this work ("Enfants, Cancers, Santé", "Imagine for Margo", "L'Etoile de Martin", "Le sourire de Lucie", "Aidons
235 Marina", "Un Horizon d'Espoir", "Nos P'tites Etoiles", "César Gibaud, une enfance sans cancer"). This research was supported
236 by the Foundation ARCECI innovation award (USA) awarded to L.B., the ANR JCJC program, the DevWeCan2 LabEx, the
237 Convergence Institute Plascan, the Ligue départementale Saône et Loire, Ain, and Haute-Savoie, and the Ligue Nationale
238 Contre le Cancer. C.S. and A.T. received financial support respectively from the Fondation de France, the Ligue Nationale
239 Contre le Cancer and Fondation ARC.

240

241 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

242 C.S, P.H. L.L., A.T., J-Y.B., M.C. and L.B. conceived and designed the experiments and analyses. M.C. and L.B. analysed the
243 data with contributions from C.S, P.H. L.L., A.T., C.D., J-Y.B. and T.D. Bioinformatic analyses were performed by C.S. and
244 T.D., with the help of L.T., A.B., P.R, C.D., N.M., V.M., L.O., P.R., M.C. and L.B.. Tumor samples processing and
245 characterization was performed by L.L., C.D., and L.B., with contributions from O.D., D.O., S.W., I.R., N.M., C.C, C.P., F.D,
246 C.B. and N.C. Metascore design and statistical analysis were performed by C.S., M.C., L.B. and D.M.B.. M.L.G., K.M., and
247 E.P. performed drug screening on 2D cell lines, while P.H. and A.T. did drug experiments on tumoroids. M.C.B and A.D.
248 provided detailed technical advice. Sequencing was performed on the CRCL platform with the help of C.D. and V.A.
249 Histological and immunostaining were performed with the help of the anatomopathological platform of CRCL with the help
250 of S.L. and N.G.. M.C. and L.B. wrote the manuscript with contributions from C.S, P.H. L.L., A.T., C.D. and J-Y.B. M.C. and
251 L.B. supervised the work. All authors read and approved the manuscript.

252

253 **COMPETING INTEREST STATEMENT**

254 Authors declare that they have no competing interests.

255

256

257 **FIGURE LEGENDS**

258 **Figure 1: Design and characterization of an original FNRMS-derived organoid model that finely preserve tumor-of-**
259 **origin's features.**

260 **A.** Pipeline of organoid (RMS_O) derivation from fresh FNRMS tumors. Samples were obtained from patients undergoing
261 biopsy/surgery (Table S1). Six RMS_O have been established and expanded using the protocol described in STAR Methods
262 section. RMS1_O and RMS2_O derived respectively from Patients 1 and 2 are shown. From day 3 to 15 post-seeding, RMS_O
263 expand to 1 000 μm (RMS1_O) and 1 500 μm (RMS2_O) diameter. White scale bar: 1 cm. Black scale bar: 200 μm . **B.**
264 Representative HPS and IHC characterization of RMS_O, using clinical markers routinely used for RMS diagnosis. RMS_O
265 were matched blind by anatomopathologists to their tumor-of-origin. RMS1-T, Tumor from Patient 1; RMS2-T, Tumor from
266 Patient 2. Scale bar: 50 μm . **C.** PCA of RNA-seq data from tumors and models plotted in 2D, using their projections onto the
267 first two principal components (Dim1 and Dim2). Each data point represents one sample. Beside RMS_O, each sample is
268 designed according to i) the medium in which it was derived, ii) its 2D or 3D structure, and iii) its passage at time of collection,
269 and then labeled as follows: Culture Medium_Dimension_Passage. M3: optimized tumoroid medium; M2: incomplete medium.
270 Patient 1-derived models and tumor (RMS1): pink dots; Patient 2-derived models and tumor (RMS2): blue dots. **D.** Pearson's
271 correlation heatmap based on global transcriptomic expression profile showing the clustering of RMS-O with their paired
272 tissue-of-origin. Each sample is designed as above (see B). **E.** Functional enrichment of DE genes between 2D-cell lines and
273 3D-RMS_O from Patient 1. Left scatterplots represent the top 6 enriched Gene Ontology (GO) pathways in 2D-models, right
274 scatter plots corresponding, reciprocally, to the top 6 enriched GO pathways in 3D-RMS_O. Dots are colored according to their
275 adjusted statistical probabilities with a blue (lower significance) to yellow (higher significance) gradient and sized by the count
276 number of genes matching the biological process. **F.** Hierarchical clustering analysis based on the centered-normalized
277 expression values of RMS tumor and differentiation markers highlights the high level of similarities between RMS_O and their
278 corresponding tumoral samples. Top-left column indicates whether the indicated genes are markers of stem
279 (progenitors/satellite cells), committed muscle (muscle differentiation), or cancer cells. Each sample is designed as above (see
280 B-D). **G-H.** Preservation of tumor mutational (**G**) and methylation (**H**) profiles in RMS_O. **G.** Heatmap of pairwise Pearson
281 correlation coefficients between all samples. The correlation coefficients were calculated on the variant allele frequencies and
282 the hierarchical clustering was based on the Euclidean distance. **H.** PCA plot of normalized methylation values of tissue samples

283 (top panel) and *in vitro* samples (2D or 3D) cultured in DMEM, M3 or M5 (bottom panel) for RMS1, RMS2, RMS7 and RMS9
284 patients.

285 **Figure 2: FNRMS-derived organoids preserve functional intra-tumor heterogeneity.**

286 **A-B.** scRNA-seq UMAP of RMS1_O showing cluster identities (**A**), and unsupervised trajectory inference analysis using
287 scVelo (**B**). **C.** Module scores of quiescent satellite cells (upper panel) and myoblasts (bottom panel) expression programs
288 displayed on scRNA-seq UMAP of RMS1_O. **D.** Module scores of cycling progenitors, G1_S (top) and G2_M cell cycle
289 (down) phases. **E.** Functional enrichment between quiescent satellite-like cells (clusters 4-3) and myoblast-proliferative cells
290 (clusters 5-2-6) (see STAR Methods). Dots are colored according to their adjusted statistical probabilities with a yellow (lower
291 significance) to blue (higher significance) gradient and sized by the count number of genes matching the biological process. **F.**
292 Dot plot representing gene expressions of specific myogenic differentiation markers between cluster groups. Dots are sized
293 according to the percentage of cells in each cluster group that express the gene (transcript level > 0) and color-coded by average
294 gene expression levels across cells. **G.** Vincristine dose-responses curves performed on RMS1_O. Viability is expressed as a
295 percentage of the value in untreated cells (CellTiter-Glo®). Means +/- std are represented (n=3). **H.** Growth curve of RMS1_O
296 after treatment with vincristine for 4 days, before washout and follow-up of growth. Each point corresponds to mean +/- std of
297 at least 3 RMS1-O areas. **I.** Representative brightfield images at t=0 and 4 days of treated or control RMS1_O. 1 nM; scale
298 bar: 200 μ m.

299

300 **Figure 3: FNRMS-derived organoids are innovative tools to design new drug combinations: proof-of-concept on**
301 **apoptosis.**

302 **A.** UMAP of FNRMS and FPRMS samples (cohort 1) based on the expression of apoptotic effectors (see Table S3). **B.**
303 Activation state of apoptotic cascades using IPA in FNRMS versus FPRMS samples (cohort 1). Significant difference
304 corresponds to z-score > 0 and p < 0.0001. **C.** Survival analyses on the apoptotic metascore in the training (cohort 1) and test
305 (cohort 3) FNRMS datasets. Kaplan-Meier curves were generated using its dichotomized form defined by a cross-validated
306 optimal cutpoint procedures in a cohort-dependent manner. Differences of overall survival (cohort 1) and event-free survival
307 (cohort 3) probabilities between both groups were tested using log-rank tests and associated statistical probabilities are
308 displayed on the graph. Number of patients at risk are indicated in the tables below the curves. Time-dependent receiver
309 operating characteristic (ROC) curves and hazard ratios were generated using continuous apoptotic metascore. **D.** Heatmap of

310 apoptotic genes expression levels, significantly DE (FDR < 0.05) between FNRMS and normal muscle samples (cohort 4,
311 Table S4). Samples in columns are clustered using Ward's method on the inverse Spearman's correlation coefficient matrix. **E.**
312 Mapping of main pro-apoptotic (rectangle) and anti-apoptotic (circle) effectors significantly differentially expressed (FDR <
313 0.05; UP = FC > 1.5; DN [Down] = FC < 1.5) between FNRMS and normal muscle samples. Genes with altered expression
314 compared to normal tissue are colored in red or green, when alterations are potentially associated with apoptotic blockage or
315 induction, respectively. Drug-target genes are indicated with an orange label. **F.** Drug screening of FNRMS cell lines
316 representing their sensitivity (pIC50) to a panel of 20 drugs, including IAP, BCL-2, and DNA repair inhibitors, as well as
317 chemotherapy agents, with a blue (low sensitivity) to yellow (high sensitivity) color-coded gradient. **G.** *MKI67* (upper panel)
318 and *BIRC5* (bottom panel) expressions in RMS1_O scRNA-seq UMAP. **H.** Immunofluorescence showing heterogeneous
319 expression of *BIRC5* (in red) among tumor cells on a tumoroid section (RMS1_O). Overlap between *BIRC5*-encoded protein,
320 Survivin and Ki67 (in green) in proliferative cells is shown in enlarged boxes (bottom panel). Nuclei are stained in blue. White
321 scale-Bar: 50 μ m. Orange scale-Bar: 10 μ m. **I-J.** *BIRC-5* inhibitor YM155 shows transient efficiency on tumoroids. **I.**
322 Representative images of RMS1_O treated or not with 25 nM of YM155 for two days. Scale-Bar: 200 μ m. **J.** RMS1_O
323 regrowth rate within 30 days after treatment washout. **K.** VDAC2 expression in RMS1_O visualized on scRNA-seq UMAP.
324 **L-N.** Efficiency of Erastin/YM155 combination on RMS1_O. RMS1_O were treated or not with YM155, Erastin or a
325 combination of both for two days. Treatments were then stopped, and regrowth of structures was evaluated within 80 days in
326 each case. **L.** Representative brightfield images of RMS1_O in the different conditions tested. When regrowth of RMS1_O
327 was observed, they were split twice to ensure that their renewal properties were preserved (red lines). **M.** RMS1_O regrowth
328 rate within 80 days after treatment washout, showing improved efficacy of the combination Erastin/YM155. **N.** Growth curve
329 of RMS1_O after treatment washout in the different conditions tested. Each point corresponds to mean +/-std of at least 3
330 RMS1_O areas. Vertical falls of growth curve lines to 0 correspond to split of tumoroids.

331

332 **STAR METHODS**

333 **Gene expression analysis of available muscle and RMS datasets**

334 Three microarray datasets were collected from public databases. E-TABM-1202 (cohort 1) (Missiaglia et al., DOI:
335 10.1200/JCO.2011.38.5591) raw microarray data (.CEL files) with 101 RMS samples are accessible at the ArrayExpress
336 platform (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) and were normalized using the Robust Multiarray Average (RMA) algorithm

337 (oligo R library v.1.58.0). Schäfer and Welle (cohort 4, Schafer-Welle-56-MAS5.0-u133a) log₂-transformed data comprising
338 26 normal muscles and 30 RMS samples were downloaded from the R2 genomic platform (<http://r2.amc.nl>) using the gene
339 reporter selection mode, *i.e.* HugoOnce algorithm that selects a single probeset to represent a gene. GSE28511 (cohort 5)
340 quantile normalized data (Li et al., DOI: 10.1038/labinvest.2012.10) were downloaded from the GEO database
341 (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) and were then log₂-transformed. After quality control, we removed the GSM706247 normal
342 sample (tumor adjacent skeletal muscle cell) subject to high levels of tumor-in-normal contamination leading to a dataset of 5
343 normal muscles and 18 RMS samples. Last, Javed Khan and colleagues kindly shared Khan collection's log₂-transformed data
344 (cohort 3) with 86 RMS samples (Shern et al., DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0639). Gene reporter selection was performed
345 by selecting the probeset with the highest average expression levels across samples, except for the Schäfer and Welle dataset
346 with default probeset assignment.

347 St. Jude RNA-seq data (cohort 2) of 60 RMS samples have been retrieved from St. Jude Cloud (<https://www.stjude.cloud>) and
348 generated as described (McLeod et al., DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1230). Briefly, read mapping was done using STAR
349 (v.2.7.9a) on the hg38 human genome and gene-level counts were generated using HTSeq-count based on the Gencode v31
350 gene annotations. We focused on transcripts with consistent annotations, *i.e.* protein-coding genes, and filtered those with less
351 than 10 reads in overall samples. Gene expression data were normalized using a variance-stabilizing transformation procedure
352 with `vst` function (DESeq2 R library v.1.34.0). To remove unwanted variability driven by technical and non-biological factors,
353 we used the `removeBatchEffect` function implemented in the `limma` R library (v.3.50.3) and specified the "fusion status" as the
354 variable to consider in the linear model.

355 **Human specimens**

356 Leftovers from RMS samples were obtained through biopsies/resections performed at the Pediatric Hematology and Oncology
357 Institute (iHOPE, Lyon) or Hôpital Femme Mère Enfant (HFME, Lyon) or Institut Curie (Paris). In brief, tumor pieces were
358 put in a sterile saline solution (0.9%), while confirmed to be RMS by anatomopathologists. For each RMS sample, tissues were
359 split into four parts and processed for histology, RNA and DNA isolation, or dissociated and processed for RMS models
360 derivation. Samples were used in the context of patient diagnosis/clinical care. Indeed, non-used parts of the samples might be
361 used for research if the patient is not opposed to it (information notice transmitted to each patient). This study was approved
362 by the ethical review board of the BRC of the Centre Léon Bérard (n°BB-0033-00050, N° 2020-02). This BRC quality is
363 certified according to AFNOR NFS96900 (N° 2009/35884.2) and ISO 9001 (Certification N° 2013/56348.2). Biological

364 material collection and retention activity are declared to the Ministry of Research (DC-2008-99 and AC-2019-3426). The study
365 had all necessary regulatory approvals and informed consents are available for all patients.

366 **Derivation and culture of tumor-derived organoids and 2D lines**

367 RMS tissues (~5–125 mm³) were minced into small pieces, digested in a solution containing collagenase D (0.125 mg/mL
368 Roche, cat. no. 1108866001) diluted in HBSS (Gibco, cat. no. 14025050) and washed using Advanced DMEM/F-12 medium
369 (Gibco, cat. no. 12634010) supplemented with Hepes (1X, Gibco, cat. no. 15630106), GlutaMAX™ (1X, Gibco, cat. no.
370 35050038) and Penicillin-Streptomycin (1X, Gibco, cat. no. 15140122). After centrifugation, cultures were established in 96-
371 well ULA plates (Corning, cat. no. 7007) or in 6-well plates (Corning, cat. no. 353046) either in DMEM or in a low-serum
372 optimized M3 medium (Promocell), notably supplemented with EGF (10 ng/ml) and bFGF (1ng/ml). Culture medium was
373 changed twice a week, and RMS_O were split every 2 weeks on average. All cultures were tested every month for mycoplasma
374 using the MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit (Lonza, cat. no. LT07-318), in accordance with the manufacturer's
375 instructions. To prepare frozen vials, all organoid cultures were dissociated and resuspended in Recovery™ Cell Culture
376 Freezing medium (Gibco, cat. no. 12648010).

377 **Xenograft experiments**

378 6-week-old male NSG-NOD SCID mice were obtained from Charles River animal facility. The mice were housed in sterilized
379 filter-topped cages and maintained in the P-PAC pathogen-free animal facility (D 69 388 0202). For orthotopic grafts, 300 000
380 from RMS1_O and 500 000 from RMS2_O cells were prepared in 50% culture medium-50% Matrigel Low Growth Factor
381 (Corning, cat. no. 356231) and were injected orthotopically into the *tibialis anterior* muscle of mice. Visible tumors developed
382 in approximately 2-3 months (RMS1_O) and 3-4 weeks (RMS2_O). Mice were culled when the tumor reached the limit end-
383 point (600 mm³). All experiments were performed in accordance with relevant guidelines validated by the local Animal Ethic
384 Evaluation Committee (C2EA-15) and authorized by the French Ministry of Education and Research (Authorization
385 APAFIS#28836).

386 **Histological analyses**

387 RMS_O were fixed and processed as described before (22). In brief, immunohistochemistry (IHC) was performed on an
388 automated immunostainer (Ventana discoveryXT, Roche) using rabbit Omni map DAB kit. Organoids' slides were stained
389 with HPS (Hematoxylin Phloxine Saffron), or the following antibodies: anti-Desmin (1/50, Dako, cat. no. M0760), anti-
390 Myogenin (1/100, Dako, cat. no. M3559), and anti-Ki67 (1/100, Dako, cat. no. M7240). Then, slides were incubated in relevant

391 antibody-HRP conjugate for 1 hour at room temperature (RT) and finally revealed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) for 5
392 min, counterstained Gill's-hematoxylin. Following IHC, slides were mounted using Pertex (Histolab, cat. no. 00801-EX). Co-
393 immunofluorescence (IF) was performed on Bond RX automated immunostainer (Leica biosystems) using OPAL detection
394 kits (ref NEL871001KT, AKOYA bioscience). Primary antibodies specific to Survivin (1/400, Cell Signaling, cat. no. 2808S)
395 and Ki67 (1/100, Dako, cat. no. M7240) were applied 30 min at RT. Sequential immunofluorescence was performed using
396 OPAL 520 (Survivin, green), OPAL 690 (Ki-67, red), and cells were counterstained with DAPI. Slides were then mounted in
397 Prolong™ Gold Antifad Reagent (Invitrogen, Ref# P36930). Sections were scanned with panoramic scan II (3D Histech,
398 Hungary) at 40× for IHC and using the Vectra POLARIS device (Akoya bioscience) for multiplexed IF.

399 **Molecular profiling of FNRMS-derived organoids**

400 RNA and Genomic DNA (gDNA) from both RMS tissues and models were extracted using the Allprep DNA/RNA/miRNA
401 universal kit (Qiagen, cat. no. 80224) following manufacturer's instructions.

402 **RNAseq.** For RNA-seq library construction, 100 to 1 000 ng of total RNAs were used. Libraries were prepared with Illumina
403 Stranded mRNA Prep (Illumina, cat. no. 20040534) following recommendations. Quality was further assessed using the
404 TapeStation 4200 automated electrophoresis system (Agilent) with High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent). All libraries
405 were sequenced (2×75 bp) using NovaSeq 6000 (Illumina) according to the standard Illumina protocol.

406 Raw FASTQ files were then processed using the following steps. Quality control was performed using FASTQC (v.0.11.9),
407 followed by trimming of adapter sequences with Cutadapt (v.3.4) using -a CTGTCTCTTATACACATCT and -A
408 CTGTCTCTTATACACATCT parameters. Reads were mapped using STAR (v.2.7.9) to the human reference genome
409 assembly GRCh38.p13 with --seedSearchStartLmax 38 --outFilterMatchNminOverLread 0.66 --outReadsUnmapped Fastx --
410 outSAMmultNmax -1 --outMultimapperOrder Random --outFilterScoreMinOverLread 0.66 --quantMode TranscriptomeSAM
411 --outSAMstrandField intronMotif --twopassMode Basic --limitSjdbInsertNsj 1324910 parameters. Gene expression data was
412 generated with HTseq-count (v.0.13.5) using --order pos --stranded reverse parameter and symbols were annotated with their
413 respective Ensembl gene IDs using the package org.Hs.eg.db v3.14.0 based on Gencode v37 (Ensembl v103).

414 To assess the concordance of tumors with FNRMS-derived organoids, raw HTseq counts for all tissues and derived-models
415 were loaded using DESeq2 R library with the "design" parameter combining sample conditions (tissue/culture, 2D/3D culture).
416 Genes with low counts, *i.e.* less than 10 reads across samples, were then filtered. Gene expressions were normalized using the
417 vst function of DESeq2 R library with parameter "blind=FALSE" and only protein coding genes were kept for further analysis.

418 DESeq-normalized data were extracted using the DESeq function (DESeq2 R library). Principal Component Analysis (PCA)
419 and Hierarchical Clustering on Principal Components (HCPC) were performed using FactoMineR (v.2.4) and factoextra
420 (v1.0.7) R libraries. Heatmaps were generated using ComplexHeatmap R library (v2.10.0) with Euclidean distance as the
421 clustering method and color palettes of RcolorBrewer R library (v.1.1-3). All analyses were performed in a R statistical
422 environment (v.4.1.2) using DESeq2 (v1.34.0) library.

423 **DNaseq.** For DNA-seq library construction, 100 to 500 ng of gDNA were used. In brief, quality control of reads was performed
424 using FastQC. Unique Molecular Identifiers (UMIs) were extracted and deduplicated using UMI-tools. Reads were mapped to
425 the GRCh38 human genome using bwa-mem2. Optical duplicates were further removed using Picard MarkDuplicates.
426 Mosdepth was used to generate coverage quality control. Then, GATK Best-Practices workflow “Somatic short variant
427 discovery (SNVs + Indels)” ([https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360035894731-Somatic-short-variant-discovery-](https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360035894731-Somatic-short-variant-discovery-SNVs-Indels-)
428 [SNVs-Indels-](https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360035894731-Somatic-short-variant-discovery-SNVs-Indels-)) was used to call somatic mutations. Variants were annotated using Ensembl Variant Effect Predictor (VEP).
429 Heatmaps were made using the Bioconductor package ComplexHeatmap.

430 **Methylation analysis.** A total of 25 samples was analyzed and generated from RMS1, RMS2, RMS7 and RMS9 patients,
431 including 7 tumors and 18 matched *in vitro* models cultured in 2D or 3D conditions with DMEM, M3 and M5 media, in
432 collaboration with the team of Z. Herceg (IARC, Lyon). 100 to 500ng of gDNA was hybridized to Illumina Infinium
433 HumanMethylationEPIC BeadChip (850K) arrays. Methylation data were analyzed using minfi (R library v.1.44.0).
434 Normalization was performed for all samples using functional normalization (FunNorm) with default parameters. Filtering was
435 performed to remove (1) poor performing probes, *i.e.* detection p-value above 0.01 in one or more samples, (2) probes located
436 on sex chromosomes, (3) probes known to have common SNPs at the CpG site using dropLociWithSnps function; and (4)
437 cross-reactive probes published by Chen et al. (2013) and Pidsley et al. (2016). Normalized methylation M-values were
438 extracted to perform principal component analysis (PCA) using factoextra (R library v.10.7).

439 **Single-cell RNA sequencing analysis of FNRMS-derived organoids**

440 For single-cell suspension preparation, FNRMS-derived organoids were dissociated using TrypLE Express Enzyme
441 (ThermoFisher Scientific, cat. no. 12605010) preheated to 37 °C for 3 min. Cells were then filtered through a 30- μ m strainer
442 (Miltenyi Biotec, cat. no. 130 098 458), centrifuged at 500g for 5 min, resuspended in complete culture medium and sorted
443 using a FACSAria (BD Biosciences). Cells were centrifuged again at 500g for 8 min and resuspended in PBS (Gibco, cat. no.

444 14190-094) with 0.04% BSA (Sigma-Aldrich, cat. no. A7030) for a final cell concentration of 1 000 cells/ μ L. Approximately
445 20 μ L of isolated cells were loaded on a 10X Genomic chip and run on the Chromium Controller system (10X Genomics) to
446 target 10 000 cells per sample.

447 Gene expression data were generated with the Chromium Single Cell 5' v3.1 assay (10X Genomics) and sequenced on the
448 NovaSeq 6000 platform (S1 flow cell, Illumina). To generate gene-barcode count matrices, raw sequencing reads were
449 processed using mkfastq and count (Cell Ranger v.3.1.0, 10x Genomics). The raw base call (BCL) files were demultiplexed
450 into FASTQ files and aligned to the hg38 human genome as reference. Overall, 23 993 cells (RMS2_O_P13, n=11 627;
451 RMS2_O_P14, n=12 366) passed the quality control criteria. Each single cell dataset was imported using Read10X function
452 and converted into a Seurat object with CreateSeuratObject function with at least min.features = 200 and min.cells = 3. To
453 retain only high-quality cells, we applied a joint filtration based on unique molecular identifier (UMI), number of detected
454 genes and number of mitochondrial counts criteria (Luecken & Theis, 2019). For each sample, independently, we retained cells
455 within a three median absolute deviation (MAD) around the population median for these metrics, combined with absolute
456 quality thresholds. We considered low-quality cells as cells with (1) low (nGene < 200 genes) and high (nGene > 3MAD)
457 number of detected genes; (2) high mitochondrial gene content (mitoRatio > 3MAD); and (3) cells with relatively high library
458 sizes (nUMI > 4 500). We predicted doublets/multiplets, *i.e.* multiple cells captured within the same droplet or reaction volume,
459 using the scDblFinder R library (v.1.10.0) but kept this variable as indicative. The single-cell datasets were then merged and
460 normalized using methods adapted from Scran pipeline (scran R library v.1.24.0) comprising quickCluster,
461 computeSumFactors with min.mean = 0.1 and logNormCounts steps. The highly variable genes (HVGs) were detected using
462 three algorithms including scran, Seurat and a rank custom strategy. The scran method comprises: (1) a modelGeneVar function
463 that models the variance of the log-expression profiles for each gene; (2) a metadata function to fit the mean-variance trend;
464 and (3) a getTopHVGs function to extract the top features. The Seurat V3 algorithm was implemented in the
465 highly_variable_genes function (scanpy python library v.1.8.2) and consists of ranking genes according to a normalized
466 variance procedure. The custom strategy (1) ranks genes according to their expression levels for each cell; (2) measures the
467 standard deviation of rank for each gene across overall cells; and (3) sort genes based on their ranked expression levels; and
468 (4) select the most variable ones. For each strategy, we selected the top 2 000 most variable genes and retained a list of 1 158
469 genes that were detected in at least two of the three methods. Variable features included the top 484 of these most variable
470 genes and 245 genes known to be biologically relevant in the process of myogenic differentiation (12,14,15) and were used for

471 principal component analysis (PCA) using RunPCA function. We kept the first 9 principal components (PCs) for analysis based
472 on the ElbowPlot method that allows a visualization of the standard deviation of each PC. The most contributing dimensions
473 were then chosen based on two metrics: (1) the percent of variation associated with each PC (cumulative percent of variation
474 > 90% and percent of variation < 5%); and (2) the percent change in variation between consecutive PCs (< 0.1%). Clusters
475 were identified with the FindClusters function using a resolution set to 0.3 and the Leiden algorithm. Briefly, this strategy
476 comprises local moving of nodes, refinement of the partition and aggregation of the network based on the refined partition, as
477 previously described (Traag et al., 2019). Cluster identities of the cells were then mapped on a UMAP using the RunUMAP
478 function. Specific marker genes for clusters were identified using the FindAllMarkers function with only.pos = TRUE, min.pct
479 = 0.25 and test.use = "MAST". Trajectory inference analyses was performed using slingshot R library (v.2.4.0) with start.clus
480 = 4 and stretch = 0 for a supervised strategy and scVelo python library (v.0.2.4) for an unsupervised one based on RNA velocity
481 data generated by loom python library (v.3.0.6). For each cluster, we also identified both positive and negative cluster marker
482 genes using FindAllMarkers function with min.pct = 0.25 and test.use = "MAST". We then ranked these genes based on their
483 fold change ratio and performed functional enrichment analysis using HALLMARK (H), Gene Ontology (subcategory:
484 Biological Processes), curated (C2) and cell type (C8) gene signatures downloaded from MSigDB ([http://www.gsea-](http://www.gsea-msigdb.org/)
485 [msigdb.org/](http://www.gsea-msigdb.org/)), Human Protein Atlas (HPA) (<https://www.proteinatlas.org/>) and literature-based gene sets. Of note, custom gene
486 sets are lists of genes resulting from the intersection of literature-based gene sets (Myoblasts intersection: PMID: 31053169
487 and PMID: 32011235; MuSC intersection: PMID: 32396864 and PMID: 32234209 and PMID: 31937892). Overall, 14 818
488 gene sets were tested for Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using fgsea R library (v.1.22.0). Statistical probabilities were
489 adjusted based on the number of tested biological processes using the FDR method. Analyses were performed in a R statistical
490 environment (v.4.1.3) using Seurat R library (v.4.1.1) and Python environment (v.3.9.10).

491 **Apoptotic genes expression profiling and pathway activation scores**

492 We selected manually curated genes, known to encode proteins involved in apoptosis and other forms of cell death mechanisms,
493 from the Deathbase platform (<http://deathbase.org/>, downloaded on March 31, 2022). Only genes characterized in the *Homo*
494 *sapiens* organism were selected. Based on this list of 86 genes (Table S3), we performed differential expression analyses using
495 limma R library (v.3.50.3) for microarray data and DESeq2 R library (v.1.34.0) using Shrunken log2 fold changes (LFC) for
496 RNA-seq data. We tested gene expression differences between (1) FNRMS versus FPRMS samples in the cohort 1 (E-TABM-
497 1202), cohort 2 (St. Jude) and cohort 3 (Khan); and (2) normal muscles versus FNRMS samples in the cohort 3 (Schäfer and

498 Welle) and cohort 4 (GSE28511). Statistical probabilities were adjusted using the False Discovery Rate (FDR) method. Only
499 apoptotic genes with significant differences between the two conditions ($FDR < 0.05$) were then selected for visualization.
500 Visualization plots were generated with the ComplexHeatmap R library (v.2.10.0) using ward. D2 clustering on the inverse
501 Spearman's correlation coefficient matrix to assess the distance between samples and genes. Single gene expression comparison
502 between normal and tumor samples was performed using ggboxplot (ggpubr R library v.0.4.0) for visualization and rstatix
503 (v.0.7.0) for statistical analysis using Wilcoxon signed-rank test. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) was performed with
504 QIAGEN IPA (v.01-20-04, <https://digitalinsights.qiagen.com/IPA>) to predict downstream effects on biological functions based
505 on the expression log fold change ratio of apoptotic genes with significant differences between conditions ($FDR < 0.05$), *i.e.*
506 normal versus tumoral or fusion-negative versus -positive samples.

507 **Establishment of a prognostic apoptotic metascore in patients with FNRMS**

508 Only FNRMS patients with known survival time and status information were selected for analysis (cohorts 1 and 3). The cohort
509 1 (E-TABM-1202) was used as the training set and the cohort 3 (Khan) as the independent test set. For each apoptotic gene,
510 univariate Cox proportional hazards models were performed to test the prognostic value of each gene. To limit optimism bias,
511 the selection strategy was based on a leave-10-out cross-validation procedure with 250 iterations in the training set. Genes were
512 ranked based on their statistical significance ($p < 0.05$) across iterations and those significantly associated with the overall
513 survival probability of patients with FNRMS in at least 150 (60%) iterations were included in the multivariate Cox proportional
514 hazards model. Proportional hazard hypothesis was checked using Schoenfeld residuals using cox.zph function (survival R
515 library). To explore collinearity between predictor genes, associations were assessed with Pearson correlation coefficients using
516 cor function (stats R library v.4.1.3) with method = "pearson". For each sample, the apoptotic metascore was calculated as the
517 sum of the predictor genes expression levels weighted by the regression coefficients of the training model, generated on the
518 FNRMS samples of the cohort 1 (E-TABM-1202). For each cohort, an independent optimal risk cut point was identified to
519 define two groups, high and low apoptotic metascore, among FNRMS. For each of the 250 iterations, a cut point of the
520 metascore was identified using the surv_cutpoint function (survminer R library). This algorithm relies on the maxstat function
521 (maxstat R library v.0.7-25) that performs a test of independence between a quantitative predictor X (here, the apoptotic
522 metascore) and a censored response Y (here, the survival status) using maximally selected rank statistics. This defines which
523 cutpoint μ in X determines two groups of observations regarding the response Y and measures the difference between both
524 groups as the absolute value of an appropriate standardized two-sample linear rank statistic of the responses. We retained as

525 final threshold the median of overall cutpoints (n = 250). The two groups defined by low and high apoptotic metascore have
526 been studied in more detail from a discriminatory point of view. Kaplan-Meier survival curves were drawn using the ggsurvplot
527 function (survminer R library). Survival curves in high and low metascore groups were compared using log-rank tests in the
528 training and test sets. Dynamic receiver operating characteristic (ROC) curves were built using timeROC R library (v.0.4). All
529 statistical analyses were performed in the R statistical environment (v.4.1.3) using survival (v.3.3-1, Therneau 2022),
530 survivalROC (v.1.0.3, Heagerty 2013) and survminer (v.0.4.9, Kassambara 2021) libraries.

531 **Analysis of the impact of drugs on FNRMS-derived organoids**

532 For IC50 determination, tumoroids were dissociated and plated at 5 000 cells/well in 96-well ULA plates (Corning, cat. no.
533 4515). RMS_O were allowed to form for 3 days, and then treated with serial dilutions of YM155 (Selleckchem, cat. no. S1130),
534 Erastin (Selleckchem, cat. no. S7242) or vincristine (Teva, collected at the pharmacy of Centre Léon Bérard). Impact of
535 treatments on intracellular ATP content was measured using the CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega, cat. no.
536 G9681) after 2 (Erastin/YM155) or 4 days (vincristine). Relative luminescence units (RLU) of each well were normalized to
537 the mean RLU from the DMSO negative control wells as 100% viability. Gambogic acid (10 µM, Cayman Chemical, cat. no.
538 14761) was used as a positive control. All acquisitions of luminescence were performed on a Spark® microplate reader (Tecan)
539 with a 400 ms exposition and auto-attenuation. Three technical replicates per condition were performed for each experiment.
540 IC50 curves were drawn using Prism 7.04 (GraphPad).

541 For washout experiments, tumoroids were seeded at 5 000 cells/well in 96-well ULA plates (Corning, cat. no. 7007). After 3
542 days, RMS_O were treated either with DMSO as negative control, 0.25 µM Erastin, 25 nM YM155, or a combination of both
543 compounds. Two days after, RMS_O were collected, washed twice in fresh medium and put back in new wells with complete
544 culture medium. Culture medium was renewed once a week. When reaching the growth plateau (around 4 to 6x10⁵ µm² in
545 area), FNRMS-derived organoids were split and reseeded at 5 000 cells/well.

546 For IF staining of dead and viable cells, the LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit (ThermoFisher Scientific, cat. no.
547 L3224) was used directly on treated RMS_O following manufacturer's instructions. RMS_O imaging was performed using the
548 EVOS™ M7000 Imaging System (Invitrogen).

549 **Drug screening on 2D cell lines**

550 Briefly, 2 000 living cells from RDAb1 and 4 000 from RD or Rh36 FNRMS cell lines were seeded per well in 384-well plates
551 (Corning, cat. no. 3830) and incubated in the presence of a selection of 20 drugs. Cells were grown in DMEM medium

552 supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin, 1% Glutamax and 1% non-essential amino acids.
553 Drugs were distributed with the Echo 550 liquid dispenser (Labcyte) at 6 different concentrations covering 3 logs (*i.e.*, 1 nM
554 to 1 μ M; 10 nM to 10 μ M; 100 nM to 100 μ M) in constant DMSO. Cell viability was measured using CellTiter-Glo® 2.0 Cell
555 Viability Assay (Promega, cat. no. G9243) after 72 hours of drug incubation and luminescence was read using a Pherastar®
556 plate reader (BMG Labtech). Data were normalized to negative control wells (DMSO only). IC50, defined as half maximal
557 inhibitory concentration values, were deduced from dose-response curves obtained using Prism 9.3.1 (GraphPad).

558

559 **DATA AND CODE AVAILABILITY**

560 Three patients datasets were collected from public databases (E-TABM-1202, Missiaglia et al., DOI:
561 10.1200/JCO.2011.38.5591, <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/> ; Schafer-Welle-56-MAS5.0-u133a, <http://r2.amc.nl> ;
562 GSE28511, Li et al., DOI: 10.1038/labinvest.2012.10, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). Javed Khan and colleagues kindly shared
563 Khan collection's log2-transformed data (Shern et al., DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0639). St. Jude RNA-seq data (cohort
564 2) have been retrieved from St. Jude Cloud (<https://www.stjude.cloud>, McLeod et al., DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1230).
565 Requests for material, tumoroid/cell lines sequencing data and codes should be made to the corresponding author.

566

567 **SUPPLEMENTAL TABLES**

568 Table S1. Description of patients' clinical characteristics from which *in vitro* models have been derived.

569 Table S2. Cluster biomarkers of the scRNA-Seq analysis of a FNRMS-derived organoid.

570 Table S3. Apoptotic genes list from the Deathbase database (<http://deathbase.org/>).

571 Table S4. Differential gene expression analysis of apoptotic genes in cohorts 1 to 5.

572

573 **REFERENCES**

574 1. Skapek, S. X. et al. Rhabdomyosarcoma. Nat. Rev. Dis. Primer 5, 1 (2019).

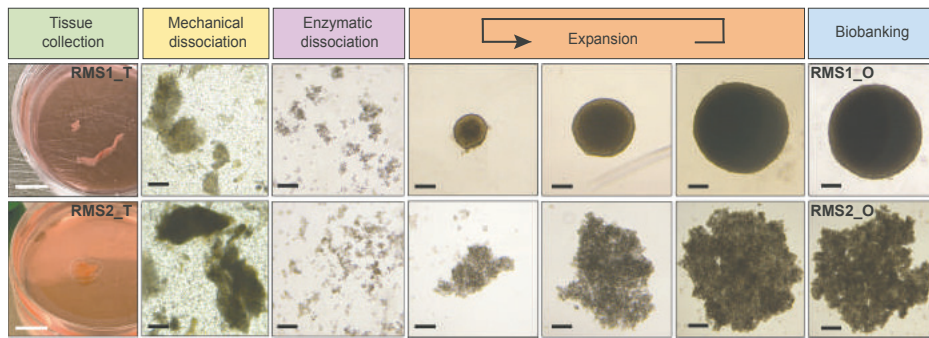
575 2. Manzella, G. et al. Phenotypic profiling with a living biobank of primary rhabdomyosarcoma unravels disease
576 heterogeneity and AKT sensitivity. Nat Commun. 11(1):4629 (2020).

577 3. Meister, M. T. et al. Mesenchymal tumor organoid models recapitulate rhabdomyosarcoma subtypes. EMBO Mol.
578 Med. 14(10):e16001 (2022).

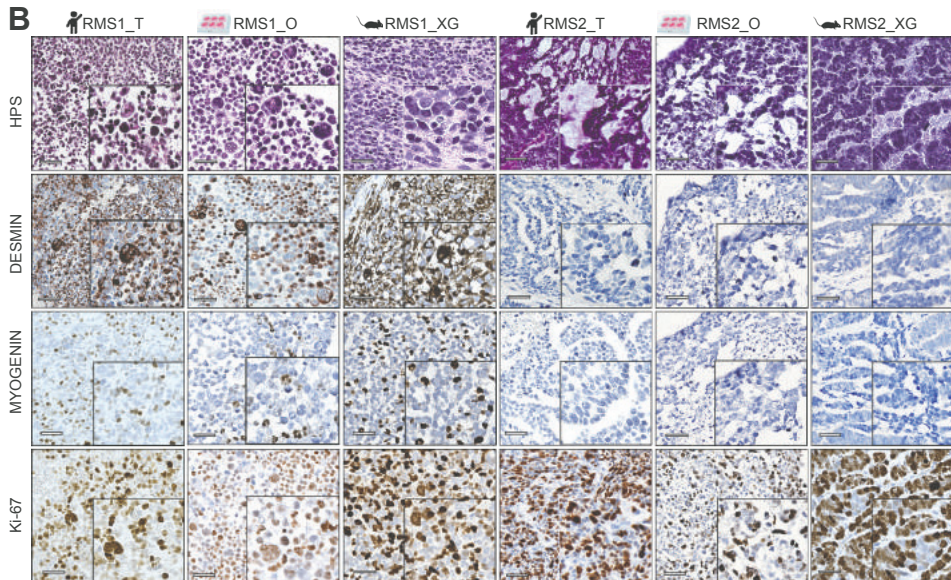
- 579 4. Patel, A. G. et al. The myogenesis program drives clonal selection and drug resistance in rhabdomyosarcoma. *Dev.*
580 *Cell* 57, 1226-1240.e8 (2022).
- 581 5. Sugii, H. et al. The Dlx5-FGF10 signaling cascade controls cranial neural crest and myoblast interaction during
582 oropharyngeal patterning and development. *Development* 144, 4037–4045 (2017).
- 583 6. Rekhi, B. et al. MYOD1 (L122R) mutations are associated with spindle cell and sclerosing rhabdomyosarcomas with
584 aggressive clinical outcomes. 29(12):1532-1540. *Mod Pathol.* (2016).
- 585 7. Danielli, SG. et al. Single-cell profiling of alveolar rhabdomyosarcoma reveals RAS pathway inhibitors as cell-fate
586 hijackers with therapeutic relevance. *Science Advances* 9(6) (2023).
- 587 8. Whiteford, C. C. et al. Credentialing preclinical pediatric xenograft models using gene expression and tissue
588 microarray analysis. *Cancer Res.* 67, 32–40 (2007).
- 589 9. Xi, H. et al. A Human Skeletal Muscle Atlas Identifies the Trajectories of Stem and Progenitor Cells across
590 Development and from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 27, 158-176.e10 (2020).
- 591 10. De Micheli, A. J. et al. Single-Cell Analysis of the Muscle Stem Cell Hierarchy Identifies Heterotypic Communication
592 Signals Involved in Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Rep.* 30, 3583-3595.e5 (2020).
- 593 11. Barruet, E. et al. Functionally heterogeneous human satellite cells identified by single cell RNA sequencing. *eLife* 9,
594 e51576 (2020).
- 595 12. Wei, Y. et al. Single-cell analysis and functional characterization uncover the stem cell hierarchies and developmental
596 origins of rhabdomyosarcoma. *Nat. Cancer* 3, 961-975 (2022).
- 597 13. Almada, A. E. & Wagers, A. J. Molecular circuitry of stem cell fate in skeletal muscle regeneration, ageing and
598 disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 267–279 (2016).
- 599 14. Terry, E. E. et al. Transcriptional profiling reveals extraordinary diversity among skeletal muscle tissues. *eLife* 7,
600 e34613 (2018).
- 601 15. Singh, P. & Lim, B. Targeting Apoptosis in Cancer. *Curr. Oncol. Rep.* 24, 273–284 (2022).
- 602 16. Krämer, A., Green, J., Pollard, J. & Tugendreich, S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis.
603 *Bioinformatics* 30, 523–530 (2014).
- 604 17. Ueno, T., Uehara, S., Nakahata, K. & Okuyama, H. Survivin selective inhibitor YM155 promotes cisplatin-induced
605 apoptosis in embryonal rhabdomyosarcoma. *Int. J. Oncol.* 48, 1847–1854 (2016).

- 606 18. Roy, S. S., Ehrlich, A. M., Craigen, W. J. & Hajnóczky, G. VDAC2 is required for truncated BID-induced
607 mitochondrial apoptosis by recruiting BAK to the mitochondria. *EMBO Rep.* 10, 1341–1347 (2009).
- 608 19. Yang, Y. et al. Nedd4 ubiquitylates VDAC2/3 to suppress erastin-induced ferroptosis in melanoma. *Nat. Commun.*
609 11, 433 (2020).
- 610 20. Tuveson, D. & Clevers, H. Cancer modeling meets human organoid technology. *Science* 364, 952–955 (2019).
- 611 21. Wheatley, S. P. & Altieri, D. C. Survivin at a glance. *J. Cell Sci.* 132, jcs223826 (2019).
- 612 22. Gonzalez, A. L. et al. Staining and High-Resolution Imaging of Three-Dimensional Organoid and Spheroid Models.
613 *J. Vis. Exp. JoVE* (2021).

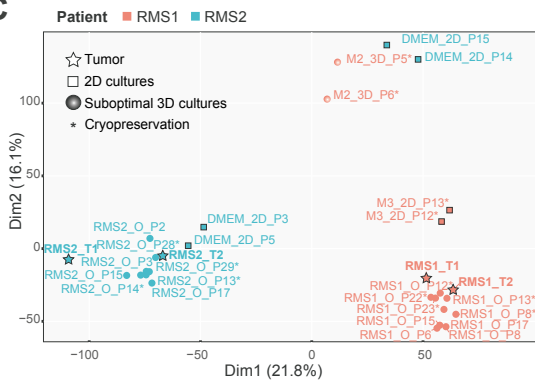
A



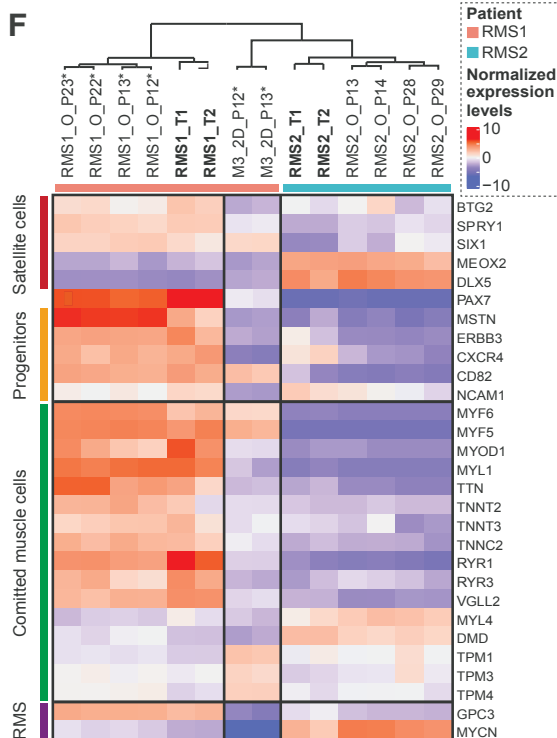
B



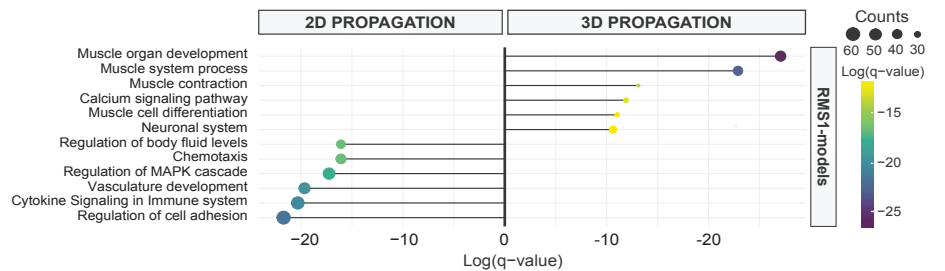
C



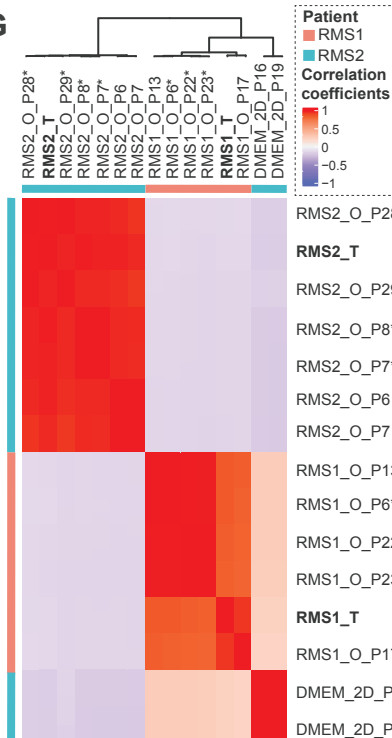
F



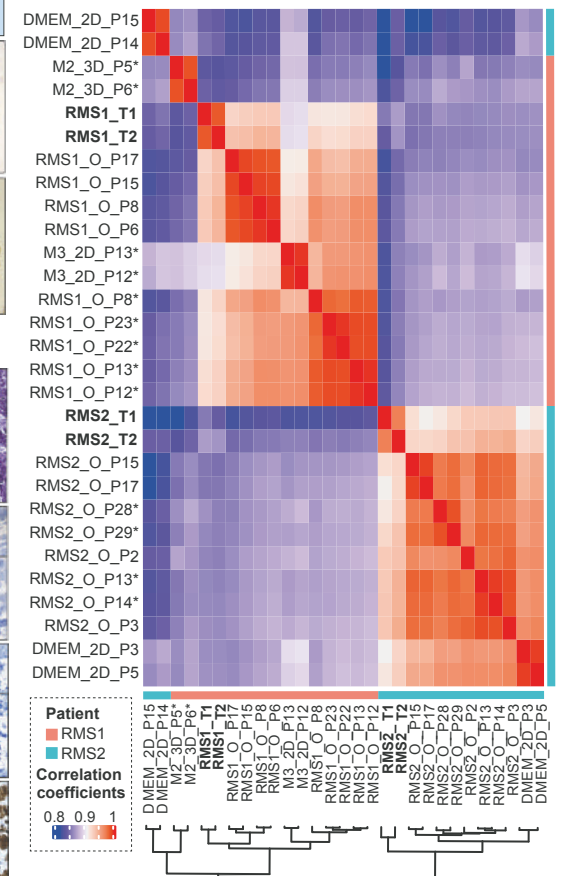
E



G



D



H

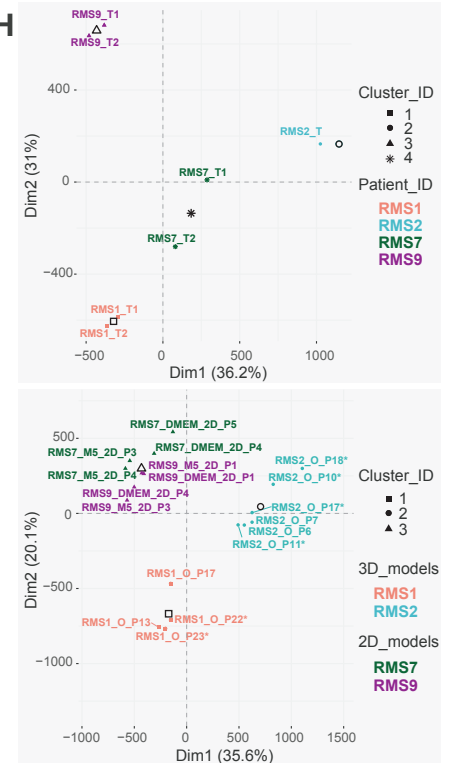


Figure 2

[Click here to access/download;Figure;renamed_789c5.pdf](#)

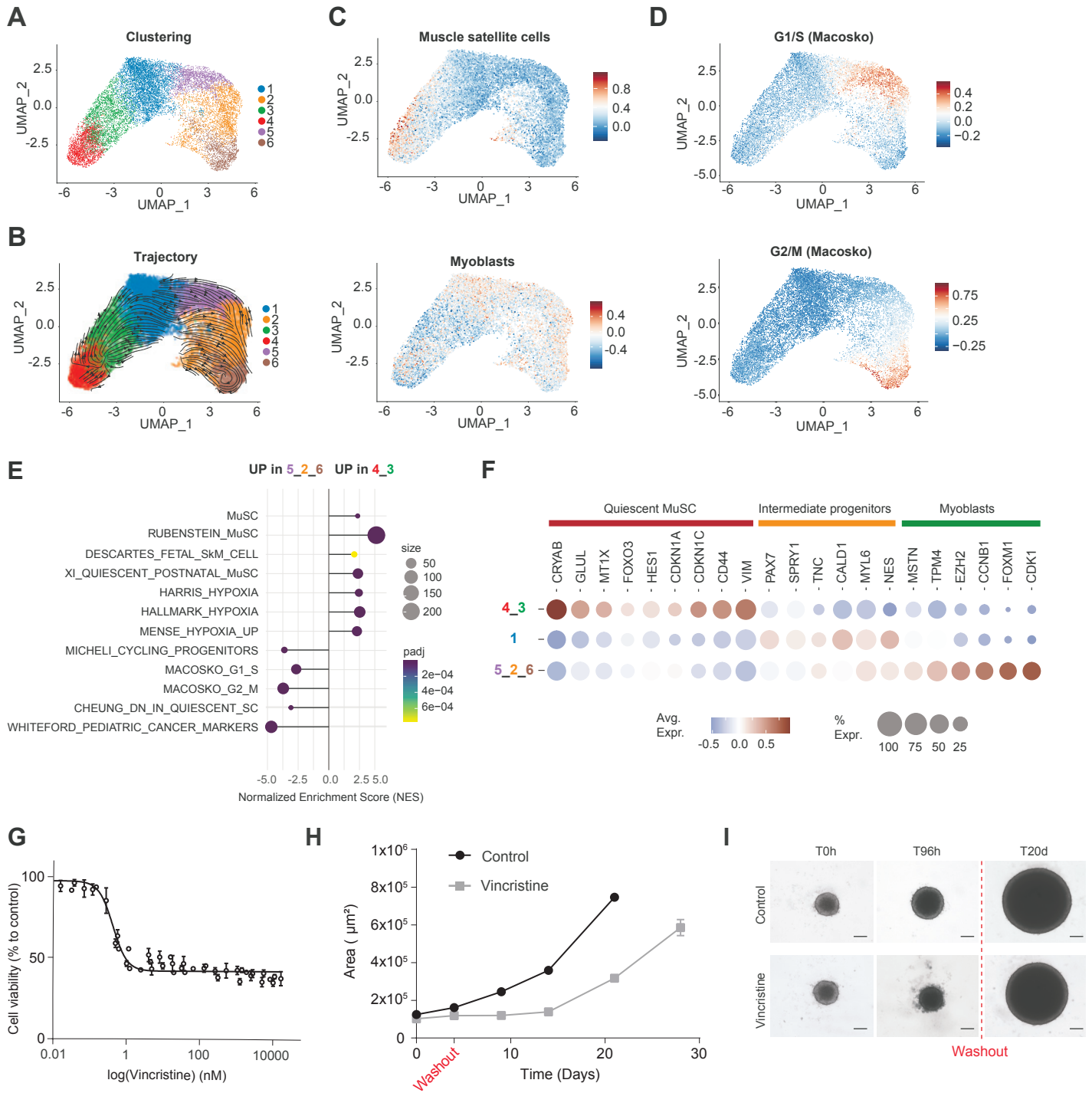
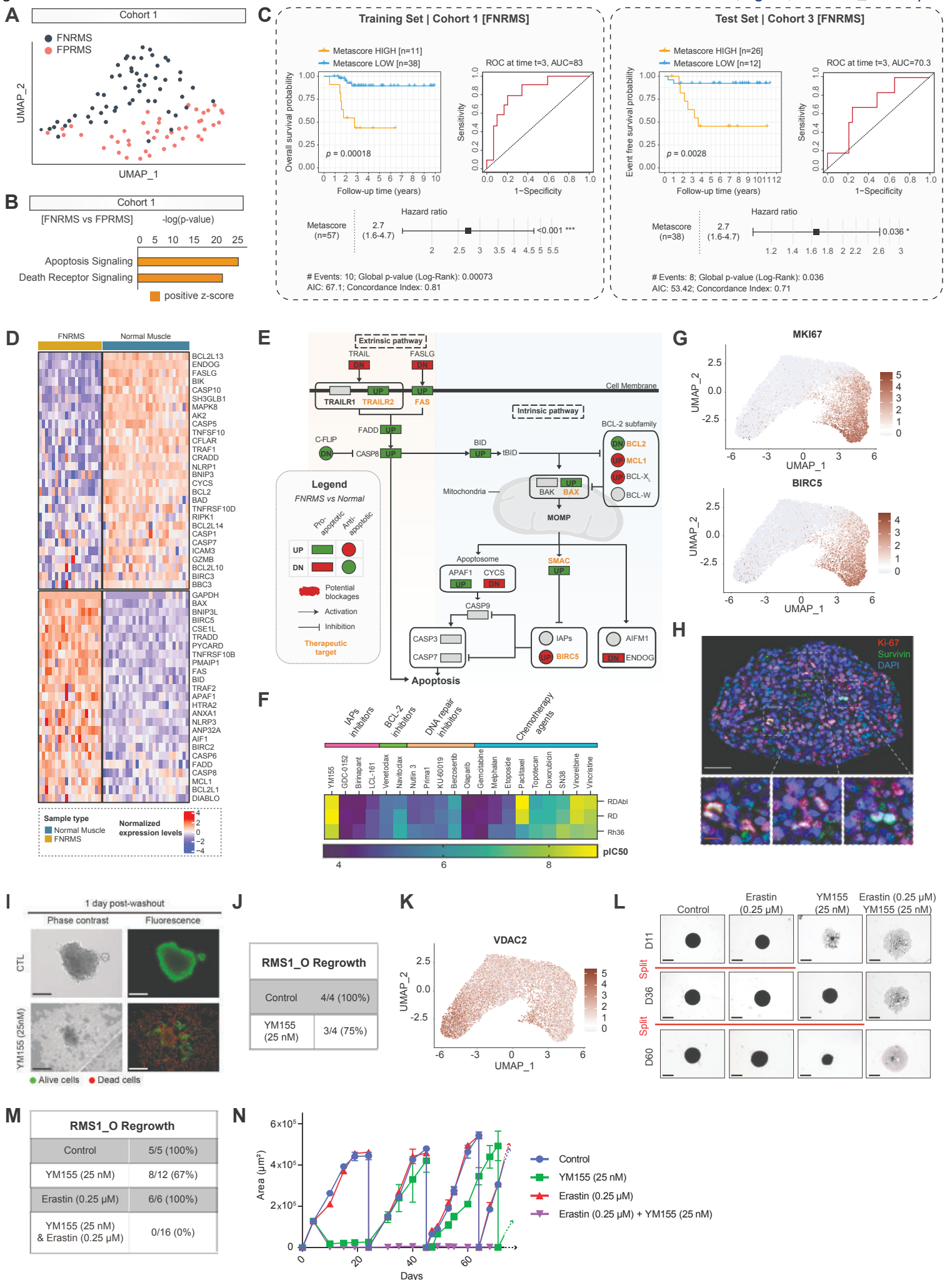


Figure 3



Supplemental information

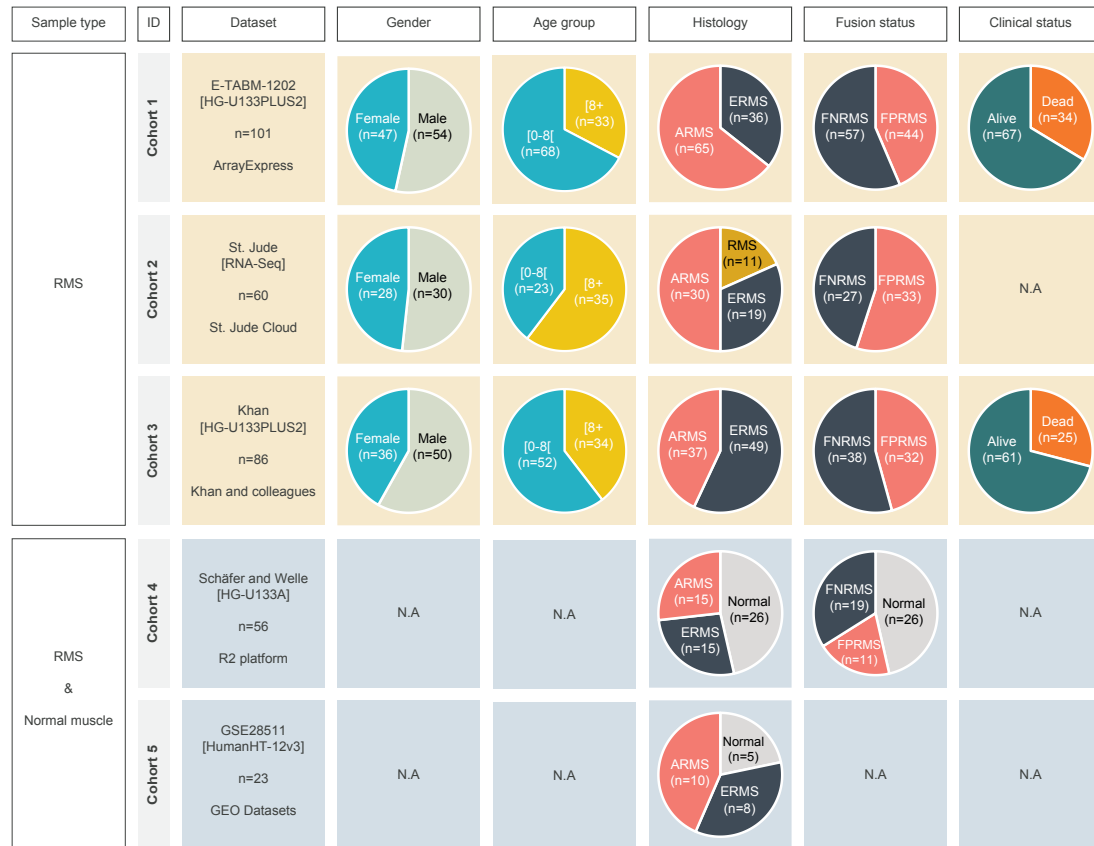


Figure S1. Clinical description of the five cohorts used for transcriptomic analyses. Sample proportions depending on the clinical categories are represented: gender, age group (in years), histology, fusion status, clinical status in the 5 following datasets, *i.e.* E-TABM-1202 (cohort 1; Missiaglia *et al.*, PMID: 22454413), St. Jude (cohort 2; McLeod *et al.*, PMID: 33408242), Khan (cohort 3; Shern *et al.*, PMID: 24436047), Schafer and Welle (cohort 4; Schafer-Welle-56-MAS5.0-u133a) and GSE28511 (cohort 5; Li *et al.*, PMID: 22330340). ARMS: alveolar rhabdomyosarcoma; ERMS: embryonal rhabdomyosarcoma; FDR: False Discovery Rate; FNRMS: Fusion-Negative Rhabdomyosarcoma; FPRMS: Fusion-Positive Rhabdomyosarcoma; RMS, Rhabdomyosarcoma.

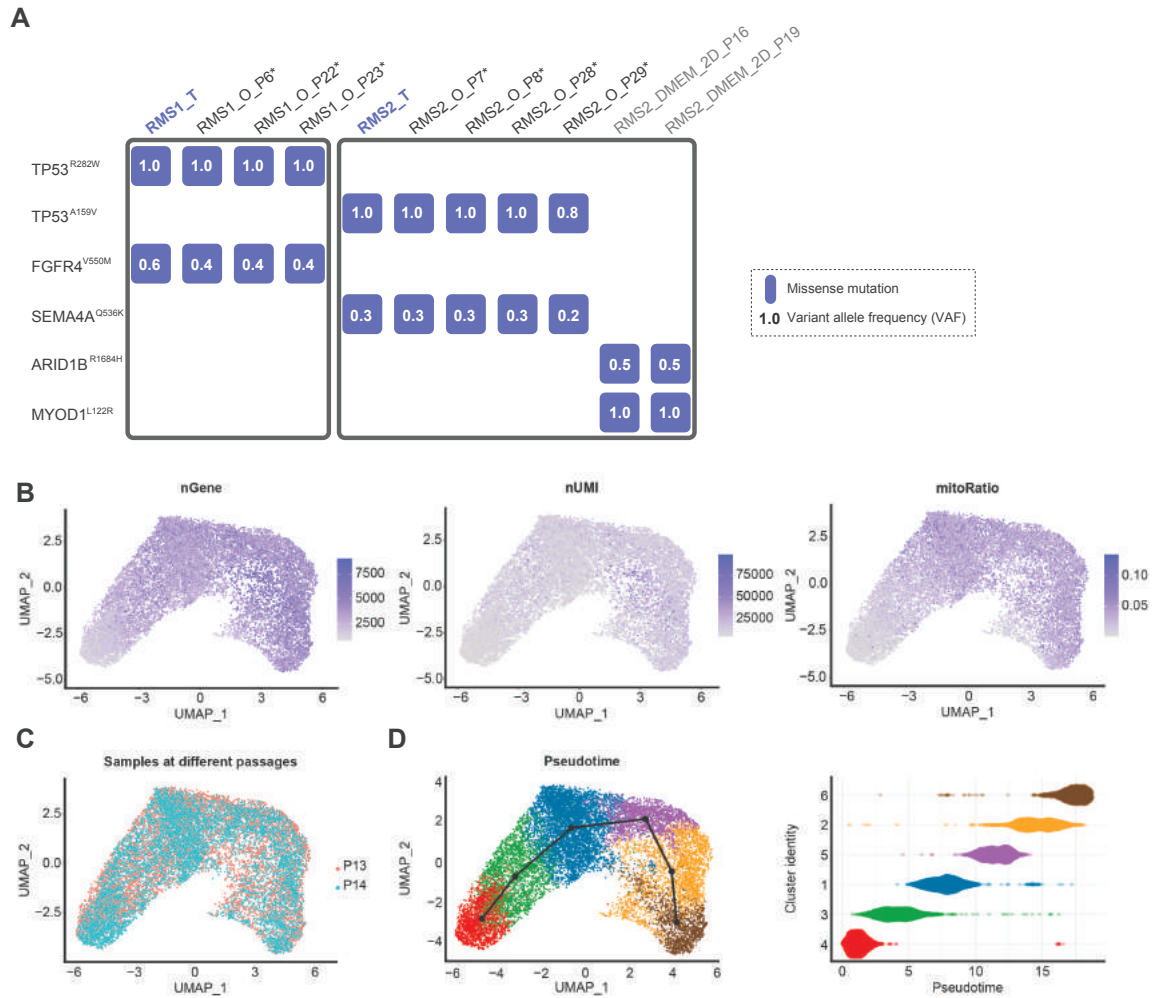


Figure S2. Characterization of FNRMS-derived organoids.

A. Preservation of tumor mutational profile in RMS_O. DNA sequencing on gDNA of RMS1 and 2 tumors (RMS_T) and their corresponding tumoroids, respectively RMS1_O and RMS2_O. RMS_O culture passages (P) are indicated. Models derived in DMEM as 2D cell lines are referred to as RMS_DM1EM_2D. **B-D.** UMAP visualization of unified scRNA-seq data of FNRMS-organoid derived from Patient 1 (RMS1_O) samples. **(B)** Quality control metrics (nGene, number of detected genes; nUMI, number of transcripts; and mitoRatio, percentage of mitochondrial transcripts). **(C)** Biological replicates (RMS1_O samples at P13 and P14 passages). **(D)** Unsupervised trajectory inference analysis using slingshot.

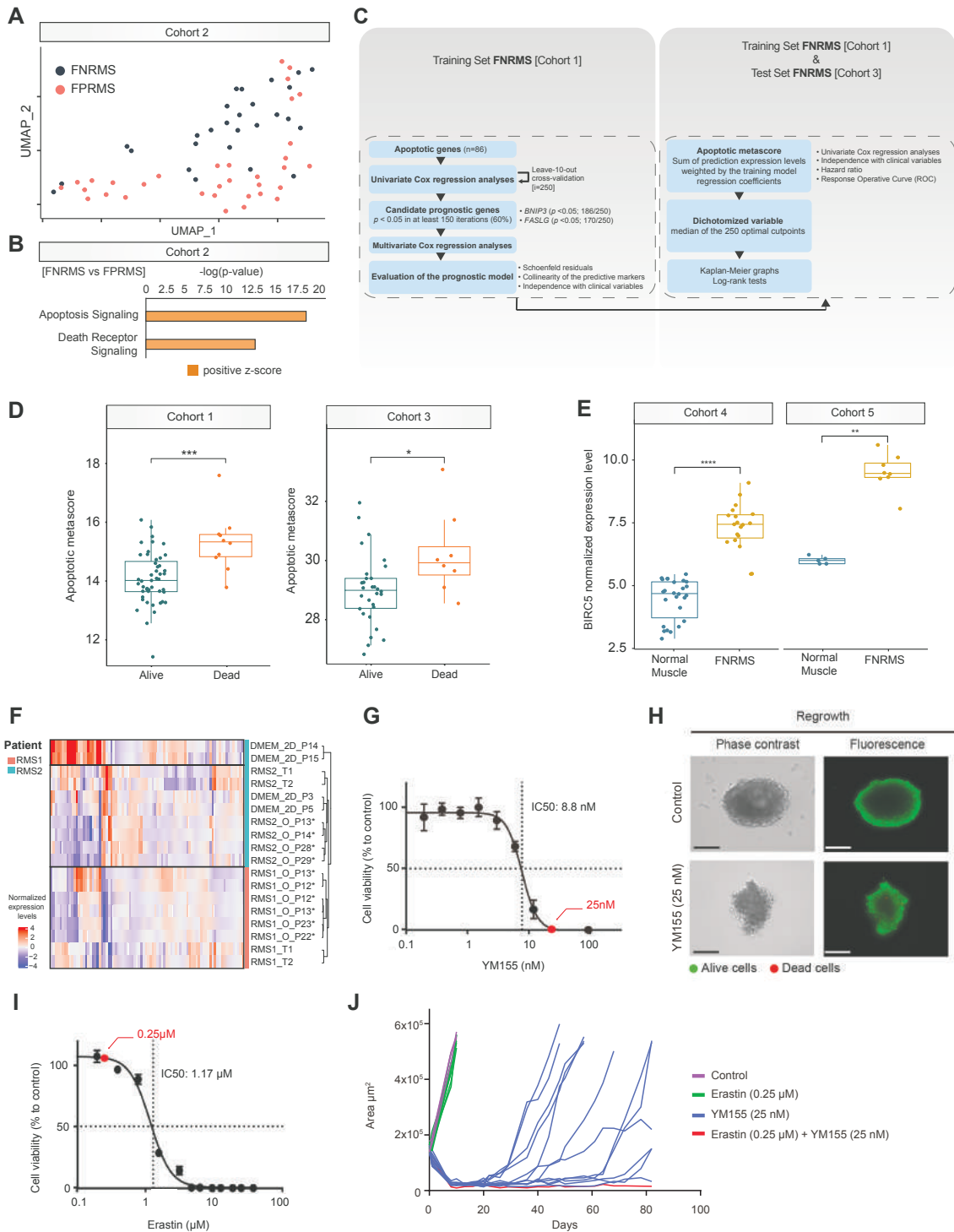
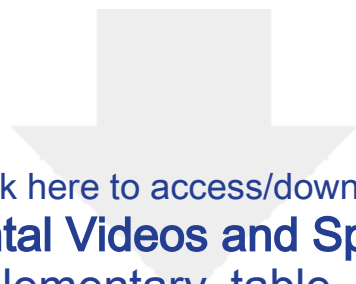


Figure S3. Improving drug combinations' evaluation using FNRMS-derived organoids: proof-of-concept on apoptosis.

A. UMAP of FNRMS and FPRMS samples (cohort 2) based on the expression of apoptotic effectors (Table S3). **B.** Activation state of apoptotic cascades using Ingenuity Pathway Analysis Software in FNRMS versus FPRMS (cohort 2). Significant difference corresponds to z-score > 0 and $p < 0.0001$. **C.** Workflow for construction and evaluation of an apoptotic gene signature and metascoring in a training set (cohort 1) and an independent test set (cohort 3). **D.** Apoptotic metascoring value between alive and dead patients with FNRMS in the cohorts 1 and 3. Differences between groups were tested using Wilcoxon signed-rank test and associated statistical probability are displayed on top (* $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$). **E.** Expression levels of *BIRC5* between normal muscles and FNRMS samples (cohorts 4 and 5). Differences between groups were tested using Wilcoxon signed-rank test with associated statistical probability displayed on top (** $p \leq 0.01$; **** $p \leq 0.0001$). **F.** Hierarchical cluster analysis

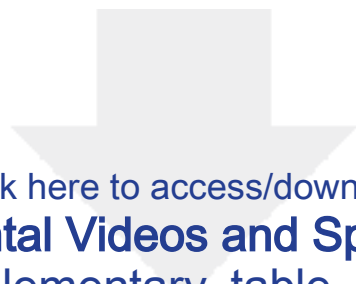
based on the centered-normalized expression value of apoptotic genes highlights the high level of similarities between tumoroids (RMS_O) and their corresponding tumor samples. Besides RMS_O, each sample is designed as follows, according to i) the medium in which it was derived, ii) its 2D or 3D structure, and iii) its passage at time of collection: Culture Medium_Dimension_Passage. M3: optimized tumoroid medium; M2: incomplete medium. **G.** IC50 curve representing RMS1_O sensitivity to YM155. Viability is expressed as a percentage of the untreated condition (CellTiter-Glo) in function of $\log_2(\text{drug concentration})$. Red dot indicates the concentration that was used in further experiments. **H.** Immunofluorescence staining of dead (red) and viable (green) cells in RMS1_O treated or not with YM155. Scale Bar: 200 μm . **I.** IC50 curve representing RMS1_O sensitivity to Erastin. Viability is expressed as a percentage to the untreated condition (CellTiter-Glo) in function of $\log_2(\text{drug concentration})$. Red dot indicates the concentration that was used in further experiments. **J.** Regrowth over time of RMS1_O after treatment washout in the different conditions tested. Each curve corresponds to one tumoroid.



[Click here to access/download](#)

Supplemental Videos and Spreadsheets
Supplementary_table_1.xlsx

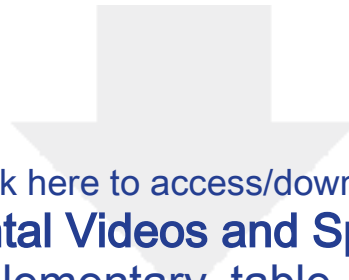




[Click here to access/download](#)

Supplemental Videos and Spreadsheets
Supplementary_table_2.xlsx

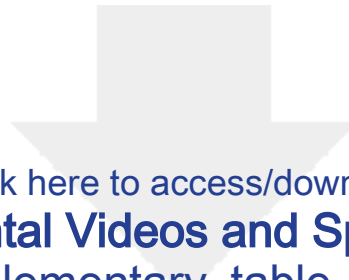




[Click here to access/download](#)

Supplemental Videos and Spreadsheets
Supplementary_table_3.xlsx





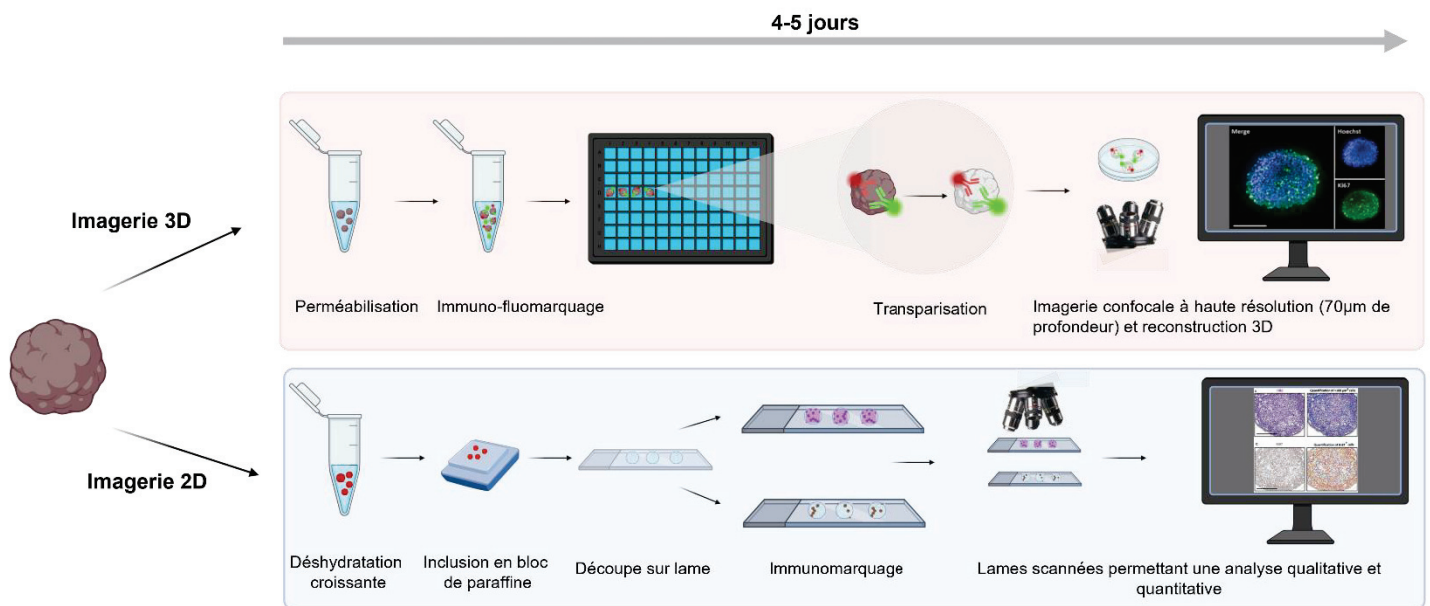
[Click here to access/download](#)

Supplemental Videos and Spreadsheets
Supplementary_table_4.xlsx



Résumé de publication n°2

Les modèles de culture cellulaires *in vitro* en 3D, tels que les organoïdes, tumoroïdes et les sphéroïdes, représentent des outils puissants pour de nombreuses applications, tels que le développement et la modélisation des maladies, l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques ou encore la médecine régénérative. Afin d'exploiter pleinement ces modèles, il est indispensable de les étudier au niveau cellulaire et subcellulaire. Cependant, la caractérisation de tels modèles *in vitro* peut parfois s'avérer techniquement difficile et nécessite alors une expertise spécifique. Cet article définit des protocoles détaillés, robustes et complémentaires permettant la caractérisation de structures cellulaires tridimensionnelles *in vitro* allant de 100µm à quelques millimètres. Ces protocoles sont applicables à une grande diversité de structures 3D quelles que soient leurs conditions de culture. De la collecte des modèles 3D à l'analyse d'images, ces protocoles peuvent être réalisés sous 4 à 5 jours. Brièvement, les structures 3D sont collectées, fixées et peuvent ensuite être incluses en paraffine à des fins d'analyses en 2D immunohistochimiques, soit directement immuno-marquées et imagées en permettant une reconstruction 3D par microscopie confocale.



Staining and High-Resolution Imaging of Three-Dimensional Organoid and Spheroid Models

Alejandro Lopez Gonzalez^{*1}, Léa Luciana^{*1}, Clémentine Le Nevé², Julie Valantin², Laura Francols², Nicolas Gadot², Christophe Vanbelle³, Laurianne Davignon⁴, Laura Broutier¹

¹ Childhood Cancer & Cell Death (C3), Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon (CRCL), Lyon 69373 ² Plateforme Anatomopathologie Recherche, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon (CRCL) ³ Plateforme d'Imagerie cellulaire, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon (CRCL) ⁴ PerkinElmer S.A.S.

* These authors contributed equally

Corresponding Author

Laura Broutier

laura.BROUTIER@lyon.unicancer.fr

Citation

Gonzalez, A.L., Luciana, L., Le Nevé, C., Valantin, J., Francols, L., Gadot, N., Vanbelle, C., Davignon, L., Broutier, L. Staining and High-Resolution Imaging of Three-Dimensional Organoid and Spheroid Models. *J. Vis. Exp.* (169), e62280, doi:10.3791/62280 (2021).

Date Published

March 27, 2021

DOI

10.3791/62280

URL

jove.com/video/62280

Abstract

In vitro three-dimensional (3D) cell culture models, such as organoids and spheroids, are valuable tools for many applications including development and disease modeling, drug discovery, and regenerative medicine. To fully exploit these models, it is crucial to study them at cellular and subcellular levels. However, characterizing such in vitro 3D cell culture models can be technically challenging and requires specific expertise to perform effective analyses. Here, this paper provides detailed, robust, and complementary protocols to perform staining and subcellular resolution imaging of fixed in vitro 3D cell culture models ranging from 100 μm to several millimeters. These protocols are applicable to a wide variety of organoids and spheroids that differ in their cell-of-origin, morphology, and culture conditions. From 3D structure harvesting to image analysis, these protocols can be completed within 4-5 days. Briefly, 3D structures are collected, fixed, and can then be processed either through paraffin-embedding and histological/immunohistochemical staining, or directly immunolabeled and prepared for optical clearing and 3D reconstruction (200 μm depth) by confocal microscopy.

Introduction

Over the past decades, advances in stem cell biology and in vitro 3D culture technologies have heralded a revolution in biology and medicine. Higher complexity cell models in 3D have become very popular as they allow cells to grow and interact with a surrounding extracellular framework,

closely recapitulating aspects of living tissues including their architecture, cell organization and interactions, or even diffusion characteristics. As such, 3D cell culture models can provide unique insights into the behavior of cells in developing or diseased tissues in vitro. Organoids and spheroids are both

multicellular 3D structures, ranging from several micrometers to millimeters, and are the most prominent in vitro 3D structures. Both may be cultured within a supporting scaffold including (i) hydrogels derived from animals (basement membrane extract, collagen), plants (alginate/agarose), or synthesized from chemicals, or (ii) inert matrices containing pores to promote cell proliferation and growth.

Organoids and spheroids can also develop without the presence of a supporting scaffold by relying on cells to self-assemble into clusters. This relies on different techniques such as the use of non-adhesive materials to inhibit cell attachment, surface tension and gravitational force (e.g., hanging drop techniques), or constant circular rotation of vessels (e.g., spinner culture). In all cases, these techniques facilitate cell-cell and cell-matrix interactions to overcome the limitations of traditional monolayer cell culture¹. The terms "organoids" and "spheroids" have been used interchangeably in the past, but there are key differences between these two 3D cell culture models. Organoids are in vitro 3D cellular clusters derived from pluripotent stem cells or tissue-specific stem cells, in which cells spontaneously self-organize into progenitors and differentiated cell types and which recapitulate at least some functions of the organ of interest². Spheroids comprise a broader range of multicellular 3D structures formed under non-adherent conditions and can arise from a large diversity of cell types such as immortalized cell lines or primary cells³. Hence, inherent to their intrinsic stem cell origins, organoids have a higher propensity for self-assembly, viability, and stability than spheroids.

Nevertheless, in essence, these two models are 3D structures composed of multiple cells, and the techniques developed to study them are thus very similar. For example, powerful imaging approaches at the single-cell resolution level are necessary for probing the cellular complexity of both organoids and spheroids. Here, by summarizing this group's expertise and that of leaders in the field of organoids⁴, this paper describes detailed procedures to perform two-dimensional (2D) and 3D whole-mount staining, imaging, and analyses of the cellular and subcellular composition and spatial organization of organoids and spheroids ranging from 100 μm to several millimeters. Indeed, this procedure presents two different and complementary types of staining and imaging acquisition to analyze a large variety of sizes and types of in vitro 3D cell culture models. The use of one (3D whole-mount analysis) or the other (2D section analysis) will depend on the model studied and the answers sought. 3D whole-mount analysis by confocal microscopy can, for instance, be applied to visualize cells in 3D culture up to 200 μm in depth, irrespective of the overall size of the 3D structure, whereas the analysis of 2D sections provides insights into samples of any size, albeit at the 2D level. This procedure has been successfully applied across a variety of organoids^{4,5} and spheroids derived from human and murine cells, originating from different embryonic germ layers. The overview of the procedure is shown in **Figure 1**. The major stages, the relationships between them, decisive steps, and the expected timing are indicated.

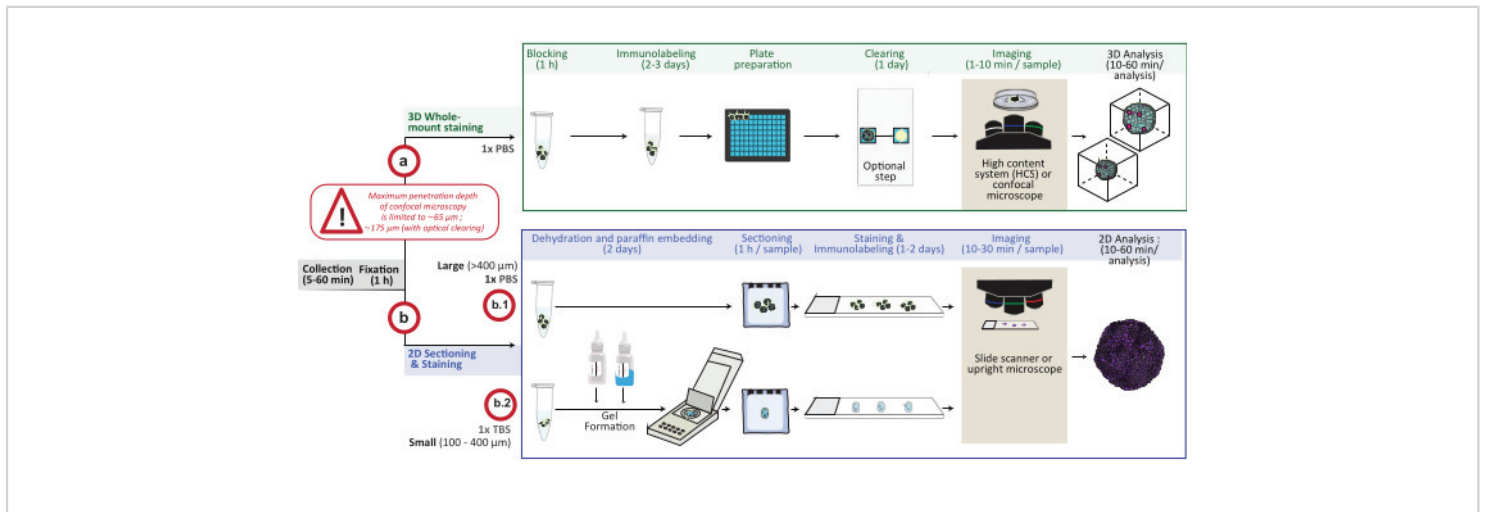


Figure 1: Schematic overview of the procedure. In vitro 3D cell culture models are collected and fixed, then either prepared for 3D whole mount staining (**option a**) or embedded in paraffin for 2D sectioning and staining (**option b**). For 3D whole-mount staining experiments, fixed 3D structures are immunolabeled following the fixation step. An optional optical-clearing step can be performed to improve imaging quality and depth of optical microscopy by reducing light scattering during image processing. Images are captured on an inverted confocal microscope or a confocal high content system and analyzed using the appropriate software. For paraffin embedding, 3D structures are directly processed (**option b.1 for large structures $\geq 400 \mu\text{m}$**) or included in a gel (**b.2; small structures $\leq 400 \mu\text{m}$**) for dehydration and paraffin embedding. Paraffin blocks are then cut and stained (histological or immunochemical staining). Images of 2D sections are obtained on a digital slide scanner or an upright microscope and analyzed on an image analysis platform using fast digital quantitative analysis. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Protocol

NOTE: A loss of $\leq 25\%$ of the initial number of 3D structures should be expected during the steps involving reagent changes and washing in the following procedure. Plan to use a final number of at least ten 3D structures, with a size ranging from 100 to 500 μm , per tested condition to perform qualitative and quantitative image analyses. If necessary, for larger structures, cut the ends of 1 mL pipette tips to avoid breaking the structures. For all steps, if 3D structure sedimentation is too long, cells can be gently spun at $50 \times g$ for 5 min at room temperature (RT). Depending on the issue

investigated, advantages/disadvantages of such a spinning step should be considered, as centrifugation can compromise the shape of the 3D structures. Avoid spinning at $>100 \times g$.

1. Collection and fixation of 3D cell culture models

NOTE: Be careful not to aspirate the 3D structures, which will be only loosely attached to the tube wall.

1. Harvesting of 3D cell culture models embedded in a matrix

NOTE: This section describes the recovery of 3D structures grown in drops of a basement membrane

extract from murine Engelbreth-Holm-Swarm sarcoma (BME), but may be adapted to other matrices. See the discussion for crucial points regarding ECM.

1. Remove the culture medium from the wells without disrupting the 3D matrix. Precoat the inside and outside of a 1 mL pipette tip with protein (called **precoated 1 mL tip** hereafter) by dipping the full length of the tip in 0.1% bovine serum albumin (BSA) in phosphate-buffered saline (PBS) (called **PBS-BSA 0.1% solution** hereafter) and pipetting 1 mL of this solution up and down twice.

NOTE: This precoating will prevent the cells from sticking to the tip and minimize any loss.

2. Precoat the inside of a centrifuge (15 mL) tube with protein (called **precoated centrifuge tube** hereafter) by repeatedly filling with PBS-BSA 0.1% solution and emptying the tube.

NOTE: This will prevent the cells from sticking to the tube and minimize any loss.

3. Using the precoated 1 mL tip, carefully resuspend the 3D structures of the well using 1 mL of ice-cold 1x PBS, and gently transfer the suspension containing the 3D structures to the precoated centrifuge tube.
4. Gently add 13 mL of ice-cold 1x PBS, and allow the 3D structures to sediment on ice for at least 10 min.

NOTE: If required, spin for 5 min at $50 \times g$ at 4°C . Avoid spinning $>100 \times g$, as this will compromise the shape of the 3D structures.
5. Remove the supernatant. Using a precoated 1 mL tip, gently resuspend the 3D structures in 1 mL of ice-cold 1x PBS. Repeat steps 1.1.4 to 1.1.5 to obtain a homogenous pellet without any 3D matrix residue.

NOTE: Efficient matrix removal is influenced by the type of matrix, the number, and size of 3D structures and requires optimization for different culture conditions. For 3D structures grown in BME, recovery from the matrix removal typically takes 45-60 min.

6. Using a precoated 1 mL tip, transfer the 1 mL 1x PBS suspension containing the 3D structures to a precoated 1.5 mL centrifuge tube, and proceed with section 1.3.

2. Harvesting floating 3D cell culture models

1. Using a precoated 1 mL tip, carefully collect and transfer the 3D structures to a precoated 1.5 mL centrifuge tube. Allow the 3D structures to sediment, or spin for 5 min at $50 \times g$ at RT.

2. Remove the supernatant. Using a precoated 1 mL tip, resuspend the 3D structures in 1 mL of 1x PBS. Proceed with section 1.3.

3. Fixation of 3D cell culture models

1. Allow the 3D structures to sediment. Carefully remove the supernatant; under a fume hood, gently resuspend the 3D structures in 1 mL of formalin using a precoated 1 mL tip.

NOTE: Formalin contains formaldehyde, which is hazardous. Manipulate the chemical in a chemical hood. Wear rubber gloves and safety eye goggles.

2. Incubate the 3D structures for 30 min at RT.

NOTE: A 30 min fixation step with formalin is required for immunostaining of a wide range of 3D structures (varying in size, shape, and origin). However, in general, longer fixation times (>3 h) are better suited to preserve the fluorescence of reporter proteins.

3. Allow the 3D structures to sediment, or spin for 5 min at $50 \times g$ at RT. Gently remove the formalin, and replace it with 1 mL of 1x PBS. Repeat this washing step in 1x PBS twice. Store the samples at 4 °C, and proceed with section 2 or section 3.

NOTE: The protocol can be paused here, and the cells can be maintained at 4 °C for long-term storage (>1 year).

2. 3D whole mount staining, imaging, and analysis of 3D cell culture models

NOTE: As the organoids are loosely attached to the tube wall, handle them gently as all following reagent changes can cause sample loss. Before starting, ensure the availability of the correct controls for staining. Positive and negative controls can be cells, in which the protein of interest is known to be either overexpressed or absent, respectively. Incubate samples without the primary antibody to determine if the observed signal is due to non-specific binding of the secondary antibody. As some cells tend to display high levels of autofluorescence, use controls devoid of secondary antibody to determine if the observed fluorescence is coming from background autofluorescence. Immunolabeling and fluorescent reporter visualization can be combined.

1. 3D whole mount staining

1. Prepare the permeabilization-blocking (PB) solution by supplementing 1x PBS with 0.1%-1% of a non-ionic surfactant (see the **Table of Materials**), 1% dimethylsulfoxide, 1% BSA, and 1% donkey serum (or from the animal in which the secondary antibodies were raised).

NOTE: Carefully optimize the concentration of the non-ionic surfactant depending on the localization of the target: membrane (0-0.5%), cytoplasm (0.5-1%),

and nucleus (1%). This solution can be stored at 4 °C for up to 1 month. BSA usually works well for the blocking step, but in case of high background noise, perform an empirical test to obtain the best possible results for a given combination of antibodies.

2. Transfer the organoids from the 1.5 mL centrifuge tube to a 0.5 mL tube using a precoated 1 mL tip. Let the organoids sediment, gently remove the 1x PBS, and replace it with 0.5 mL of PB solution. Incubate the organoids with gentle horizontal agitation (30-50 rpm) for 1 h at RT.
3. Let the organoids sediment, gently remove the PB solution, and wash twice in 1 mL PBS-BSA 0.1% for 3 min.

NOTE: Waiting for 3 min allows the structures to sediment at the bottom of the tube.

4. Gently remove the PBS-BSA 0.1%, and add 250 μ L of primary antibody diluted at the appropriate concentration in PB:1x PBS (1:10) solution. To prepare 10 mL of PB:1x PBS (1:10) solution, dilute 1 mL of PB solution in 9 mL of 1x PBS. Incubate for 2-3 days with gentle horizontal agitation (30-50 rpm) at 4 °C.

NOTE: An appropriate antibody incubation time is crucial for a suitable antibody penetration as 3D structures can sometimes reach large sizes.

5. Let the organoids sediment, and gently remove the primary antibody solution. Wash 5x in PBS-BSA 0.1% for 3 min per wash and then 2x in 1 mL PBS-BSA 0.1% for 15 min per wash with gentle horizontal agitation.
6. Add 250 μ L of secondary antibody diluted at 1:250 in PB:1x PBS (1:10) solution. Incubate for 24 h at 4 °C

with gentle horizontal agitation (30-50 rpm). For this step, protect the samples from light.

7. Add 250 μ L of Hoechst 33342 (20 μ M stock solution) diluted at 1:1000 in PB:1x PBS (1:10) solution, and incubate for another 2 h at 4 °C with gentle horizontal agitation (30-50 rpm).
8. Let the organoids sediment, and gently remove the solution containing secondary antibody + Hoechst 33342. Wash the organoids 5x in 1 mL of 1x PBS for 3 min per wash and then 2x in 1 mL of 1x PBS for 15 min per wash with gentle horizontal agitation (30-50 rpm).

NOTE: It is crucial to extensively wash the samples to avoid background noise or loss of signal.

9. Store the samples in PBS at 4 °C until image acquisition. Proceed with section 2.2.

NOTE: The protocol can be paused here, and the samples can be stored at 4 °C for several months, protected from light.

2. Sample preparation for confocal imaging

1. Using a pre-coated 1 mL tip, carefully transfer the organoids into 50 μ L of the 1x PBS per well in a 96-well black polystyrene microplate. Proceed with step 2.2.3 or section 2.3.

NOTE: At this stage, the sample can be protected from light and stored at 4 °C for many weeks.

2. Clearing

NOTE: The clearing step is optional and can be used to either immunolabel organoids or to detect endogenous fluorescence. Clearing can cause 3D structure shrinkage, but does not change the general morphology except for spherical monolayered organoids with large lumens⁴. For these

cystic organoids, skip the clearing step, and perform deep-tissue imaging⁶.

1. Prepare 2.5 M glycerol-fructose clearing solution containing 50% v/v glycerol, 11% v/v of distilled water, and 45% w/v fructose by mixing on a magnetic stirrer at least overnight until the solution is completely solubilized and homogenous. Store at 4 °C in the dark for up to 1 month.
2. Remove as much 1x PBS as possible without touching the organoids. Add 200 μ L of the clearing solution using a 1 mL pipette tip after removing the end, and resuspend gently to prevent the formation of bubbles. Incubate at RT for at least 12 h, and proceed with section 3.

NOTE: As the clearing solution is viscous, small volumes are difficult to handle. To facilitate handling, make sure the solution is at RT, and pipette slowly. For optimal clearing, allow the sample to sediment in the clearing solution for at least 24 h before imaging. If 3D structures are floating at the time of acquisition, perform an optional spin for 10 min at $<100 \times g$ at RT, or allow more time (one to several days) to let them sediment. The protocol can be paused at this step before proceeding to imaging if it is protected from light and stored at 4 °C (for weeks) or -20 °C (for months).

3. Image acquisition and analysis

NOTE: Image sectioning technology will be required to image 3D structures.

1. Use confocal microscopes, and favor immersion objectives with higher numerical aperture (NA)

compared to air. Choose magnification objectives (10x, 20x, 40x) according to the size of 3D structures, image reconstruction (stitching), and solutions used for the analysis.

- When selecting the acquisition mode, take into consideration the depth of focus of the objective used to define the step for Z stacking; allow for optimal 3D rendering.

NOTE: Image analysis solutions vary, and the analysis will need to be adjusted to the software used. For instance, this analysis protocol was established on a high-content analysis software (see **Table of Materials** and **Supplementary Figure 1** for details) and provides data on object segmentation, calculation of properties, and cell population selection within a 3D reconstructed object.

3. 2D sectioning, staining, imaging, and analysis of 3D cell culture models

NOTE: 3D cell culture models vary in size. Proceed with section 3.1 or 3.2 for efficient paraffin embedding (**Figure 2**). Allow sufficient time for 3D structure sedimentation before any washes and reagent changes. Be careful not to aspirate the organoids that will be floating at the bottom of the tube. For paraffin embedding, refer to **Figure 2** for guidance.

- Paraffin embedding of large ($\varnothing \geq 400 \mu\text{m}$) 3D cell culture models
 - On the day before embedding, prewarm two 150 mL flasks filled with paraffin (paraffin baths), a small metal embedding mold per sample, and fine forceps to 65 °C.

- Using a precoated 1 mL tip, carefully transfer the organoids in 1x PBS to a flat-bottom glass tube with a polytetrafluoroethylene-lined bottle cap. Let the organoids sediment, carefully remove the 1x PBS, and replace it with 70% ethanol. Incubate for at least 30 min.
- Let the organoids sediment, and carefully remove the 70% ethanol. Replace it with 1 mL of ready-to-use eosin Y solution. Flick the tube, and stain for at least 30 min. Carefully remove the eosin solution, and dehydrate the organoids in three successive washes with 1 mL of 100% ethanol for ~30 min each.

NOTE: Ethanol, a flammable and volatile liquid, causes severe eye and respiratory tract irritation. Manipulate it in a fume hood, and wear protective eye goggles.
- Carefully remove the 100% ethanol, and under a chemical hood, clear the organoids in 3 successive washes with 1 mL of xylene for ~30 min each.

NOTE: Xylene is a toxic, liquid flammable whose vapors may cause irritation. Manipulate it in a fume hood. Avoid direct contact with skin, and wear rubber gloves and protective eye goggles.
- Under a chemical hood, prepare a white microtwin tissue cassette by placing a piece of biopsy pad (previously soaked in xylene) inside one of the compartments of the cassette. Carefully transfer the 3D structures using a precoated 2 mL plastic Pasteur pipette to the biopsy pad. Cover them with another biopsy pad soaked in xylene to prevent the organoids from moving, and close the cassette.
- If several samples are processed, place the cassette in a xylene bath to await further processing. Once

all samples are transferred into cassettes, place the cassettes in a prewarmed paraffin bath for 30 min at 65 °C. Transfer the cassettes to a fresh prewarmed paraffin bath overnight.

7. After paraffin impregnation, take a prewarmed embedding mold, and add the heated paraffin to it. Place the biopsy pad containing the 3D structures into the mold, and gently agitate it until all of the organoids drop to the bottom of the mold. Very carefully place the 3D structures at the center of the mold using prewarmed fine forceps. Proceed with section 3.3.

NOTE: Be careful not to disrupt the 3D structures with the forceps; push, but do not pinch them.

2. Paraffin embedding of small ($\varnothing \leq 400 \mu\text{m}$) 3D cell culture models

1. On the day before embedding, prewarm two 150 mL flasks filled with paraffin (paraffin baths), a small metal embedding mold per sample, and fine forceps to 65 °C.
2. Carefully remove the 1x PBS from the organoid suspension. Gently perform 3 washes in 1 mL of 1x Tris-buffered saline (TBS). Remove as much 1x TBS as possible without touching the organoids.

NOTE: Be careful not to aspirate the sample. If necessary, perform a 5 min spin at 50 x g at RT. Remaining traces of phosphate will interfere with the following steps, notably preventing gel polymerization. Therefore, do not use PBS solutions during any processing step. For this step, a commercial kit, containing cassettes, Reagent #1 (clear fluid), and Reagent #2 (colored fluid), was used to facilitate the paraffin-embedded procedure

without potentially losing tiny fragments (see **Table of Materials**). Follow kit instructions. The cassettes are preassembled with backing papers and board inserts already in place.

3. Add 2 drops of Reagent #2 into the tube, and mix gently by tapping the tube. Add 2 drops of Reagent #1, and mix again by tapping to make the gel solidify. Using the fine forceps, remove the gel from the tube, and place it in the well of the cassette.
 4. Under the fume hood, dehydrate the sample by placing the cassette in successive baths as follows (use the 150 mL flasks, and use fresh ethanol or xylene for each bath): ethanol 70%, 30 min; ethanol 96%, 30 min; ethanol 100%, three washes, 30 min each; xylene, three washes, 30 min each.
 5. Place the cassettes in a prewarmed paraffin bath for 30 min at 65 °C, and transfer them to a fresh prewarmed paraffin bath overnight. After paraffin impregnation, take a prewarmed embedding mold, and add heated paraffin into it. Open the cassette, carefully dislodge the gel with fine forceps, and place the gel containing the 3D structures onto the center of the embedding mold. Proceed with section 3.3.
- ## 3. Common steps for paraffin embedding
1. Gently transfer the mold to a cold area to let the paraffin solidify in a thin layer, which will maintain the 3D structures in the appropriate position. Add a tissue cassette on top of the mold, and add hot paraffin to cover this plastic cassette. Remove the mold once it is completely solidified, and proceed with section 3.4.

NOTE: Paraffin blocks can be stored at room temperature for years.

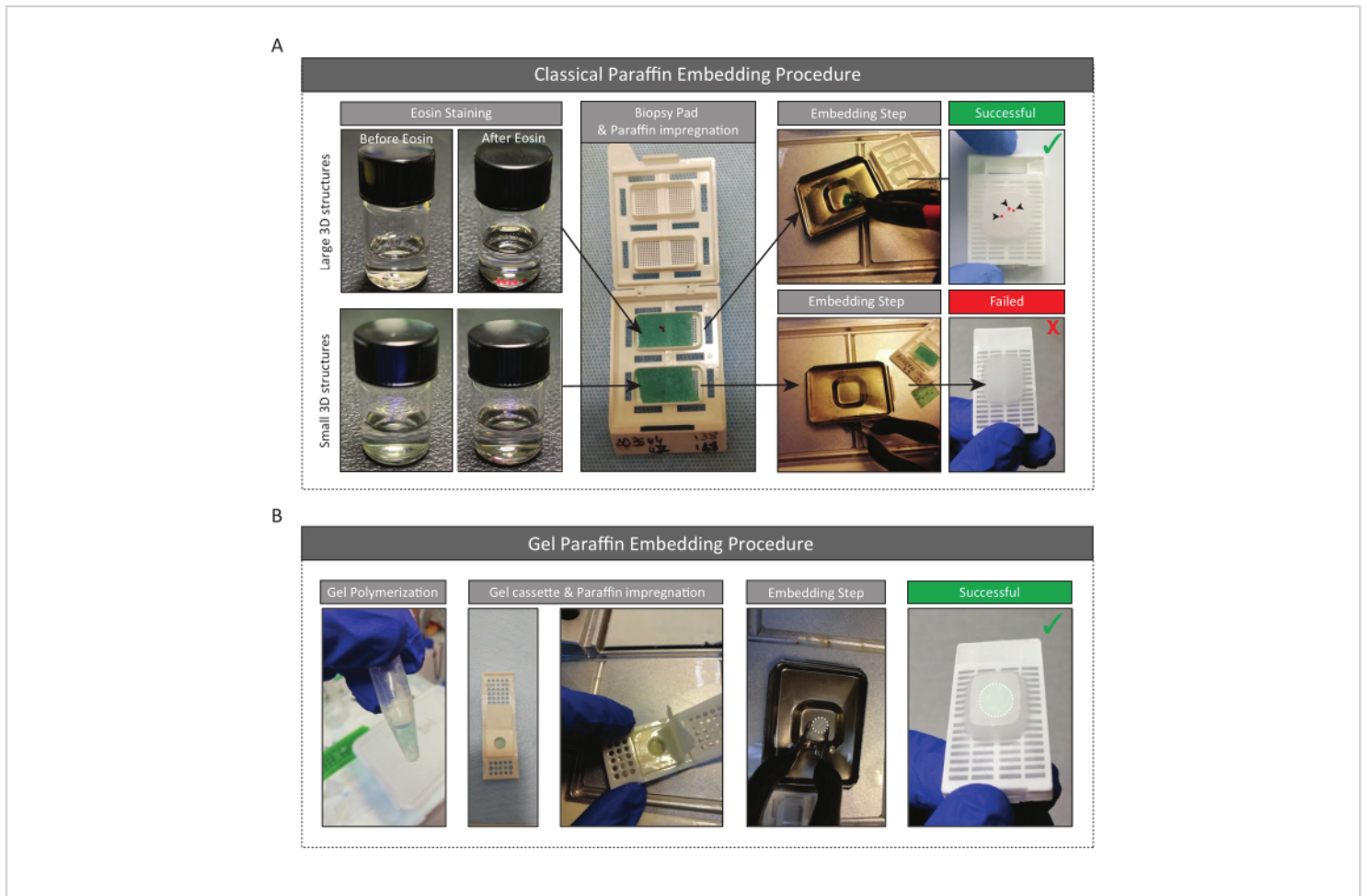


Figure 2: Overview of the procedure for paraffin embedding of large and small in vitro 3D cell culture models.

(A) Standard procedure for paraffin embedding. After fixation and dehydration, 3D structures are stained with eosin to facilitate their visualization (top and bottom left). 3D structures are carefully placed on the biopsy pad (blue) in the cassette using a 2 mL Pasteur pipet (middle). After paraffin impregnation, the 3D structures are gently dropped into the liquid paraffin using forceps and gently agitated in the biopsy pad. Small 3D structures are lost during this step as they cannot be released from the pad (bottom right: failed embedding). Only large 3D structures will be embedded (top right: successful embedding). Arrowheads point to 3D cultures. (B) Alternative to the standard paraffin embedding protocol. After having fixed small 3D structures, a commercial kit is used to maintain cells in a gel and facilitate their transfer to the mold after paraffin impregnation (right: successful embedding). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

4. Block sectioning and staining

1. Cut 4 μm sections using a standard microtome, and perform standard histological and

immunohistochemical techniques. Proceed with section 3.5.

NOTE: Specific slides (see **Table of Materials**) were used for a better adhesion of sections. The slides

can be stored at room temperature or at 4 °C for years.

5. Image acquisition and analysis

1. Perform imaging using a digital slide scanner or upright microscope, and analyze data using a platform for fast digital quantitative analysis that reports morphological and multiplexed expression data on a cell-by-cell basis across entire 3D structure sections (see **Supplementary Figure 2** for details).

NOTE: The 20x objective is used routinely by this group.

Representative Results

This protocol provides an overview of the critical steps for 2D and 3D whole-mount staining, as well as imaging and quantitative analyses of 3D cell culture models (**Figure 3** and **Figure 4**). It is applicable to a wide range of 3D cell culture models—from spheroids to organoids from different host species or tissues—and enables the acquisition of accurate and quantitative information on architecture, cell organization, and interactions at cellular and subcellular levels (**Figure**

3 and **Figure 4**). Laboratories may need to optimize 2D histological and immunohistochemical techniques and antibody concentrations according to their own needs.

Both methods yield valuable biological information. 3D whole-mount staining and confocal microscopy provide visual information on cellular composition and spatial position with a field of depth of up to 200 μm (**Figure 3B**). However, 2D sectioning is convenient for larger 3D structures to reveal detailed cellular morphological traits in the entire section of 3D structures that can be otherwise challenging to observe in situ due to light scattering that compromises resolution in larger samples. Moreover, both techniques can provide quantitative data. Indeed, the resolution obtained allows the application of cellular and subcellular segmentation algorithms for the quantification of the number of cells and the detection of the presence of various cell markers in different cellular subtypes (**Figure 3F** and **Figure 4**). In summary, the imaging techniques described here are reproducible, simple, and complementary and represent valuable tools for studying cellular heterogeneity.

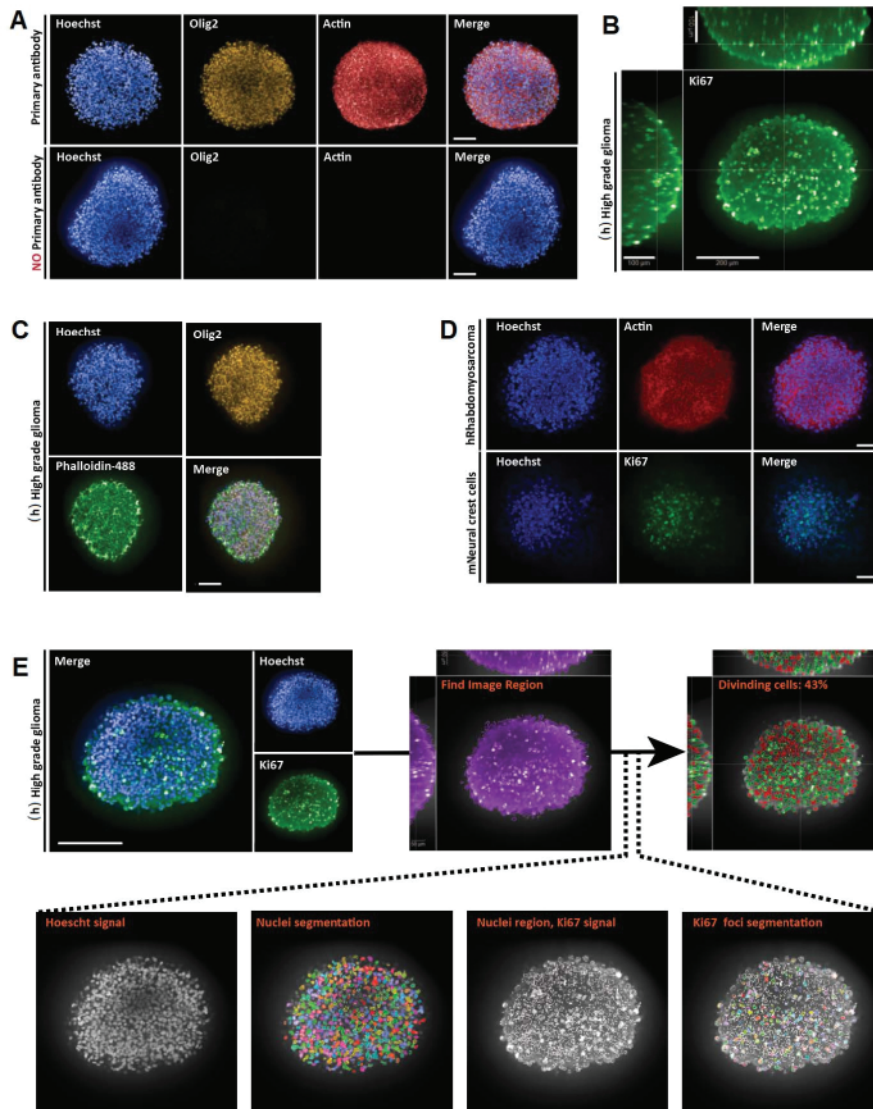


Figure 3: Representative results for 3D whole mount, imaging, and analyses of 3D and 2D optical sections.

(A) Confocal images of human (h) high-grade glioma spheroid cultured for a week and labeled with Hoechst (blue), Olig2 (yellow), and Actin (red) (20x water objective). For all acquired images, microscope settings were established using a positive control (top), and then the negative control was imaged using identical settings to control the lack of fluorescence in the absence of primary antibody (bottom). (B) Orthogonal 3D whole-mount representation of Ki67 staining performed in (h) high-grade glioma spheroid cultured for a week (glycerol-fructose clearing; 20x water objective, confocal). (C) Confocal images of (h) high-grade glioma spheroid cultured for a week and labeled with Hoechst (blue), Olig2 (yellow), and Phalloidine-488 (green) (glycerol-fructose clearing; 20x water objective). (D) Confocal images of human (h) rhabdomyosarcoma (top) and mouse (m) neural crest cell (bottom) spheroids cultured for a week and labeled with Hoechst (blue), Actin (red), and Ki67 (green), respectively (glycerol-fructose clearing; 20x dry objective). (E) Confocal images of (h)

high-grade glioma spheroid cultured for a week and labeled with Hoechst (blue) and Ki67 (green) (glycerol-fructose clearing; 40x water objective) (top left). Segmented images on the Hoechst channel and Ki67-positive (+) nuclear regions on the green channel were generated using high-content analysis software (see **Supplementary Figure 1** and **Table of materials**) (bottom). Output given is the percentage of Ki67⁺ nuclei per segmented 3D structure (top right). Scale bar = 100 μm . [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

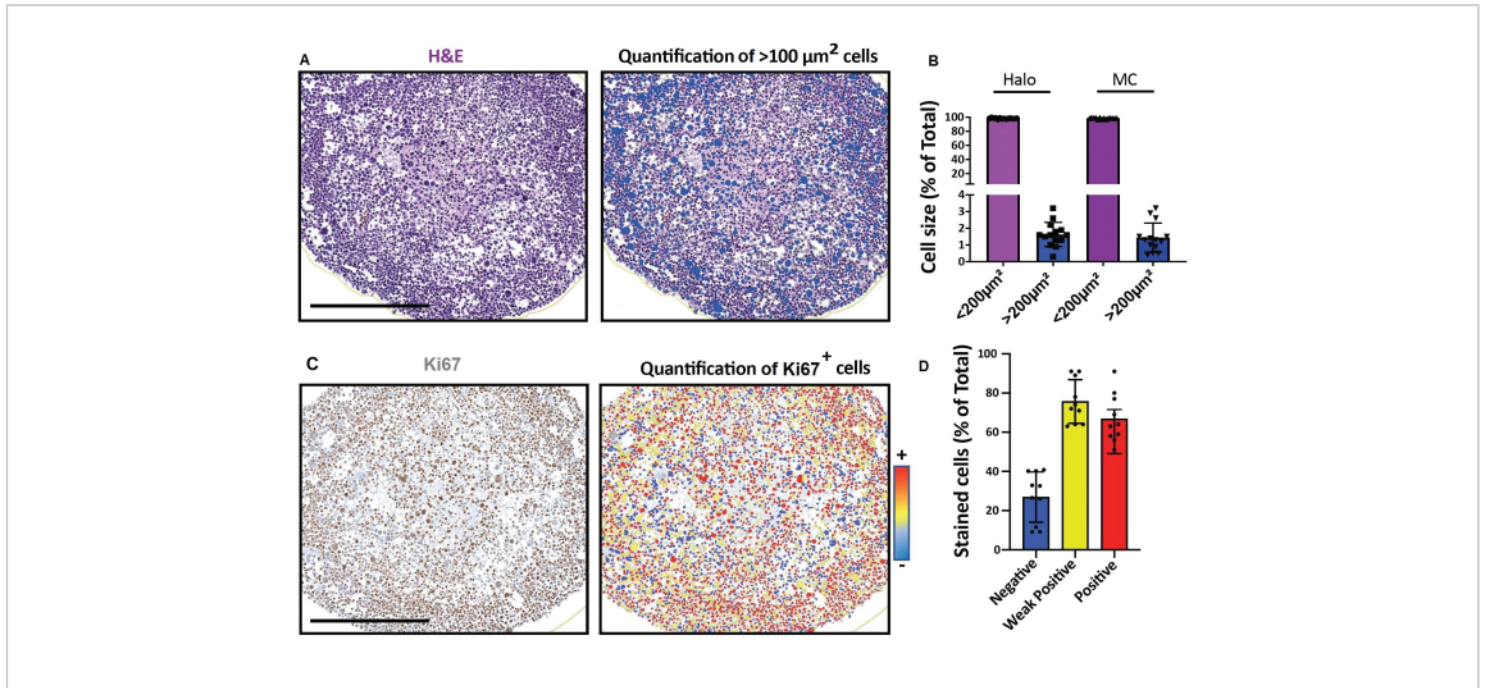


Figure 4: Representative results for imaging and analyses of 2D optical sections. (A, D) 2D section images of a 3D cell model (human rhabdomyosarcoma spheroids cultured for a month) obtained with a digital slide scanner and analyzed on a platform for fast digital quantitative analysis. (A) H&E staining and detection of cells according to their size. Scale bar = 500 μm . (B) Histogram shows percentage of cells $< 100 \mu\text{m}^2$ and $> 100 \mu\text{m}^2$ detected using software for fast digital quantitative analysis (left: Halo) or manual counting (right: MC). (C) Ki67 staining and detection of cells according to the intensity of their 3,3'-diaminobenzidine (DAB) signal. Negative (blue), weakly positive (yellow), positive (red). Scale bar = 500 μm . (D) Histogram shows percentage of Ki67-negative, weakly positive, and positive cells. Abbreviations: H&E = hematoxylin and eosin; MC = manual counting. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Supplementary Figure 1: Overview of the steps in the imaging analysis software. Analyses are based on the association of building blocks. Each building block corresponding to a function-segmentation, calculation, association, output definition-and offers multiple algorithms and variable selections to match the biological sample

being imaged. The software provides multiple RMS (Ready Made Solution) analysis protocols that can easily be used and modified. Integrated image analysis protocols can be saved, applied to different datasets, and shared between users. Briefly, the analysis protocol implies sequential object segmentation: spheroid, nuclei and finally, Ki67 pockets

(A488). Then, the mean intensity of the Ki67 pockets is calculated to further discriminate the positive events. Finally, nuclei encompassing Ki67 positive pockets are positively selected. [Please click here to download this File.](#)

Supplementary Figure 2: Overview of the procedure steps of the quantitative analysis software.

Step 1. Upload the files using the **Studies** tab. Files will be opened in the **Image Actions** section. Step 2. Open the **Annotations** tab, then click on **Layer Actions** to design a new layer all around the structure using the **circle** tool of the toolbar. For non-circular structures, the **pen** tool can be used instead. Step 3. The toolbar can be used to design annotations and visualize the quantification with the **✓** tool. Step 4. Open the **Analysis** tab, and select the best conditions for the analysis of the sample (several trials may be necessary here). Step 4.1. Use the **Stain Selection** section to set up the staining condition. In the event of several stains, these can be added and renamed, and the **virtual** color can be modified. The localization detection can be specified-nuclear or cytoplasm staining. Step 4.2. Use the **Cell Detection** section to set up the cell detection. This section will be the most important for the analysis. The **Nuclear Contrast Threshold** section will enable detection of all nuclei. Attention must be paid in case there are multiple population sizes, the software can detect several cells instead of a unique big one. **Nuclear Size** and **Nuclear segmentation aggressiveness** sections can be used to quantify cell size population ranges. Step 5. Description on how to run sample analysis. Follow steps shown in the figure. **Annotation Layer** section will run the setting only on this slide. The quantification can be visualized using the **✓** tool. Repeat steps 4.1-5 until suitable quantification is achieved. Steps 6-6.1. These steps enable you to draw a figure using the software. Step 7. Quantification graphics obtained via software can be saved. Step 8. Data can be exported. [Please click here to download this File.](#)

Discussion

Cell culture is an indispensable tool to uncover fundamental biological mechanisms involved in tissue and organ development, function, regeneration and disruption, and disease. Although monolayered 2D cell culture has predominated, recent research has shifted towards cultures generating 3D structures more reflective of *in vivo* cellular responses, owing notably to additional spatial organization and cell-cell contacts that influence gene expression and cellular behavior and could thus provide more predictive data⁷. Nevertheless, many challenges remain, including the need for user-friendly staining and imaging techniques for detailed microscopic visualization and evaluation of complex 3D structures at the cellular and subcellular levels. In that context, detailed, robust, and complementary protocols have been provided to perform staining and cellular and subcellular resolution imaging of fixed *in vitro* 3D cell culture models ranging from 100 μm to several millimeters in size.

This procedure presents two different strategies to deal with a large variety of sizes and types of *in vitro* 3D cell culture models. The choice of one (3D whole-mount analysis) or the other (2D sectioning analysis) will depend on the model used and issue investigated. 3D whole-mount analysis by confocal microscopy enables the visualization of cells with a field of depth of up to 200 μm , irrespective of the overall size of the 3D structure, whereas 2D sectioning is applicable to samples of any size, but visualization remains 2D dimensional. Below are some suggestions for troubleshooting and technical considerations.

Loss of 3D structures during the workflow is the most common drawback. They can remain adherent to the tips and tubes, which is why precoating tips and tubes with PBS-BSA 0.1% solution is key. Moreover, it is crucial to let the 3D

structures sediment between reagent changes and to perform all pipetting very carefully. As mentioned in the procedure, for all steps, if 3D structure sedimentation is too long, cells can be gently spun at $50 \times g$ for 5 min at RT. Depending on the aim of the study, the advantages/disadvantages of such a spinning step should be considered as centrifugation can compromise the shape of the 3D structures. Moreover, care should be taken to preserve this morphology during the fixation step because cystic organoids tend to collapse. Fixing structures under 400 μm in size should prevent structural changes.

For optimal immunolabeling, recovery of organoids from their 3D matrices is a crucial step. The 3D matrix can impede adequate antibody penetration or lead to high background staining because of non-specific binding to the matrix. ECM removal may alter the morphology of the outer segments of organoids (notably in case of small cellular protrusions extending from studied 3D structures) and partially hamper analyses. For such 3D structures, the matrix can be retained throughout the procedure; however, culture conditions should be carefully adapted to grow cells in a minimum amount of matrix to prevent insufficient penetration of solutions and antibodies and to avoid successive washing steps aimed at reducing excessive background noise^{6,8}.

The optical clearing step described in this protocol in the 3D whole mount staining section is pertinent for the imaging of 3D structures up to 150-200 μm in depth instead of 50-80 μm without clearing. Compared to other clearing methodologies that often requiring several weeks and using toxic clearing agents, a previously published fast and safe clearing step was used in this protocol^{4,9}. In addition, this clearing step is reversible, and new antibodies can be added to the initial staining with no loss of resolution or brightness⁴. Nevertheless, depending on the 3D cell

culture model studied, a depth of 150-200 μm might not be sufficient to image the 3D structure in an informative way, and this clearing protocol can cause changes in the general morphology of spherical, monolayered organoids with large lumens⁴. Users should carefully design their experiment, and if necessary, optimize the timing of the permeabilization/blocking step (to allow penetration of antibodies and solution), the clearing step (to penetrate deeper than 200 μm , specimens should be totally cleared), and image acquisition. The two most prevalent technologies available in core facilities would be light sheet and confocal microscopy. Users will need to carefully choose a technology based on the size of their 3D structures and their biological question¹⁰. However, compared to confocal microscopy, light sheet microscopy resolution obtained for such deep structures remains suboptimal for obtaining subcellular resolution.

Here, a detailed and robust process has been reported that is dedicated to paraffin embedding of single samples. Interestingly, Gabriel et al. recently developed a protocol embedding 3D cell cultures in paraffin with an increased throughput. They used a polydimethylsiloxane (PDMS) mold to confine 96 3D structures in a microarray pattern in one block, providing novel perspectives for studies on 3D tumor models encompassing more groups, time points, treatment conditions, and replicates¹¹. However, this method requires extensive skills and machinery, notably for the fabrication of the premold used to create PDMS molds.

In summary, this paper describes two different, complementary, and adaptable approaches enabling the acquisition of accurate and quantitative information on architectural and cellular composition of 3D cellular models. Both parameters are crucial for studying biological processes

such as intratumoral cellular heterogeneity and its role in resistance to treatments.

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgments

This work was supported by the St Baldrick's Robert J. Arceci Innovation Award #604303.

References

1. Ryu, N. E., Lee, S. H., Park, H. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. *Cells*. **8** (12), 1-13 (2019).
2. Bartfeld, S., Clevers, H. Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *Journal of Molecular Medicine*. **95** (7), 729-738 (2017).
3. Cui, X., Hartanto, Y., Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *Journal of the Royal Society, Interface*. **14** (127) (2017).
4. Dekkers, J. F. et al. High-resolution 3D imaging of fixed and cleared organoids. *Nature Protocols*. **14**, 1756-1771 (2019).
5. Broutier, L. et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nature Protocols*. **11** (9), 1724-1743 (2016).
6. Rezanejad, H., Lock, J. H., Sullivan, B. A., Bonner-Weir, S. Generation of pancreatic ductal organoids and whole-mount immunostaining of intact organoids. *Current Protocols in Cell Biology*. **83** (1), ee82 (2019).

7. Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., Yang, L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technologies*. **12** (4), 207-218 (2014).
8. McCray, T., Richards, Z., Marsili, J., Prins, G. S., Nonn, L. Handling and assessment of human primary prostate organoid culture. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. (143), 10.3791/59051 (2019).
9. Ueda, H. R. et al. Tissue clearing and its applications in neuroscience. *Nature Reviews: Neuroscience*. **21** (2), 61-79 (2020).
10. Lazzari, G. et al. Light sheet fluorescence microscopy versus confocal microscopy: in quest of a suitable tool to assess drug and nanomedicine penetration into multicellular tumor spheroids. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **142**, 195-203 (2019).
11. Gabriel, J., Brennan, D., Elisseeff, J. H., Beachley, V. Microarray embedding/sectioning for parallel analysis of 3D cell spheroids. *Scientific Reports*. **9**, 16287 (2019).

CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'élaboration d'un protocole inédit de génération de tumoroïdes de RMS à partir d'échantillons pédiatriques et adultes de FNRMS à la rechute. J'ai également participé à la mise en place des outils nécessaires à leur caractérisation. Ces tumoroïdes sont capables de mimer l'hétérogénéité inter- et intra- tumorale des patients dont ils sont dérivés. Ils représentent donc des modèles robustes et pertinents pour l'étude des mécanismes oncogéniques mis en place au cours de la progression tumorale et pour l'étude du rôle de l'hétérogénéité et de la plasticité des cellules tumorales dans la résistance aux traitements.

Je suis convaincue que ces tumoroïdes de RMS, établis à partir de micro-biopsie résiduelles, sont à l'interface entre la recherche fondamentale et la recherche clinique, et ont le potentiel d'ouvrir de nouveaux horizons thérapeutiques pour les patients atteints de RMS.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans cette partie, je discuterai les forces et les faiblesses des tumoroïdes établis au cours de ma thèse et présenterai brièvement les résultats préliminaires que j'ai pu obtenir dans une perspective d'améliorations de ces modèles. Dans un premier temps, je comparerai les tumoroïdes aux modèles RMS pré-existants tout en discutant la nécessité de définir *stricto sensu* ce qu'est un tumoroïde. Par la suite, je m'attarderai sur l'efficacité de dérivation de mon protocole et de la nécessité de structurer des réseaux de collectes d'échantillons performants pour espérer constituer une bio-banque représentative de la grande hétérogénéité des RMS dans le futur. Enfin, je discuterai de la nécessité de complexifier le modèle réductionniste que j'ai pu établir au cours de ma thèse, en rajoutant notamment des acteurs du micro-environnement tumoral qui jouent un rôle clef dans la progression tumorale et la résistance aux traitements.

1. Les tumoroïdes : des modèles novateurs à l'interface entre les modèles *in vitro* et *in vivo* pré-existants

Comme tous modèles, les tumoroïdes de RMS présentent des avantages mais également des limites. La force majeure est de pouvoir mimer fidèlement, et sur plusieurs passages, l'hétérogénéité inter- et intra- tumorale des patients, ce qui n'est pas le cas des modèles de RMS *in vitro* en 2D. Ils sont ainsi des modèles de choix pour l'étude des voies de signalisation oncogéniques et des mécanismes de résistance aux traitements, d'autant qu'ils peuvent être génétiquement modifiés par électroporation

ou transduction lentivirale comme a pu le montrer ma collègue, Virginie Barbet (données non montrées). Cependant, ils restent des modèles difficiles à mettre en place sans une expertise dédiée et ils nécessitent un budget plus important que les systèmes de culture en 2D classiquement utilisés pour l'étude des RMS et ce notamment en raison des facteurs de croissance et des matrices utilisées pour leur expansion. De plus, comme la plupart des modèles *in vitro*, ils ne permettent pas de contextualiser un micro-environnement tumoral contrairement aux modèles *in vivo*. Les tumorôides de RMS se situent donc exactement à l'interface entre les cultures 2D conventionnelles et les modèles animaux, mais ils offrent une opportunité unique de traiter un système de complexité modérée tout en capturant la complexité des tumeurs humaines (**Figure 22**).

	Complexité du modèle					
	Lignées cellulaires	Sphéroïdes	Tumorôides	XDC	XDP	OGM
FAISABILITE						
Dérivation à partir de micro-biopsies	Difficile	Partiellement adapté	Très bon	N/A	Difficile	N/A
Manipulabilité	Très bon	Bon	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Partiellement adapté
Modifications génétiques	Très bon	Bon	Bon	Non adapté	Non adapté	Bon
Coût relatif	Très bon	Bon	Bon	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Partiellement adapté
REPRESENTATIVITE DES CRITERES TUMORAUX « HALLMARKS »						
Maintien de l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Très bon	Partiellement adapté	Très bon	Partiellement adapté
Maintien des caractéristiques génétiques et phénotypiques	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Très bon	Partiellement adapté	Très bon	Bon
REPRESENTATIVITE DE LA BIOLOGIE HUMAINE						
Modélisation de la pathologie humaine	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Très bon	Partiellement adapté	Très bon	Partiellement adapté
Contingent immunitaire et vasculaire	Non adapté	Partiellement adapté (ie. Co-culture)	Partiellement adapté (ie. Co-culture)	Bon pour vascularisation	Bon pour vascularisation	Très bon
REPRESENTATIVITE DE LA BIOLOGIE HUMAINE						
Bio-banque	Très bon	Partiellement adapté	Très bon	Partiellement adapté	Bon	Partiellement adapté
Criblage de drogues à haut débit	Très bon	Bon	Bon	Partiellement adapté	Non adapté	Partiellement adapté
Outils pré-cliniques	Partiellement adapté	Partiellement adapté	Très bon	Partiellement adapté	Très bon	Partiellement adapté

Figure 22 : Avantages et limites des modèles d'organoïdes/tumorôides vis à vis des modèles existants. Les modèles de tumorôides sont des modèles puissants et robustes permettant d'être à l'interface entre les modèles *in vitro* et *in vivo* déjà existants. Adapté de Barbet et Broutier 2021.

Cependant, il est peu probable que les tumorôides de RMS que j'ai développé au cours de ma thèse remplacent totalement un jour les expériences sur les animaux. En effet l'absence de stroma, de vaisseaux sanguins et de cellules immunitaires est une limitation intrinsèque de ces tumorôides qui empêche une application universelle. Les molécules thérapeutiques candidates testées *in vitro* les plus prometteuses devront donc toujours être vérifiées de manière optimale dans des expériences de xénogreffes par exemple. Cela étant dit, les tumorôides de RMS sont xénogreffables et devraient donc faciliter ces expériences en permettant, grâce à leur capacité d'expansion, d'assurer un débit plus important que les études XDP sur souris (Pauli et al., 2017). Aussi, des études comparant la sensibilité aux médicaments entre des paires de tumorôides et modèles XDP de souris ont été réalisées dans des modèles de cancers colorectaux (Pauli et al., 2017), (Schütte et al., 2017) et ont montré des différences

de sensibilité dans les deux modèles, probablement dues à des schémas de pression sélective et des inconvénients distincts (Bleijs *et al.*, 2019).

Ainsi, les études combinant les forces de plusieurs modèles pré-cliniques apparaissent aujourd'hui encore comme le meilleur moyen d'étudier une pathologie et de fournir des métriques cliniquement pertinentes pour les approches de médecine de précision et/ou personnalisée.

2. Nécessité de définition et consensus : ne pas confondre tumoroïdes et « tumoroïdes »

Ces dernières années de nombreux efforts ont été déployés pour concevoir des modèles *in vitro* en 3D récapitulant au mieux les RMS dans leur diversité et leur complexité afin i) de mieux comprendre la biologie du RMS et ii) de faciliter les criblages de médicaments à haut débit. Des protocoles ont notamment été proposés pour établir des tumoroïdes (Meister *et al.*, 2022), (Patel *et al.*, 2022). Cependant, les approches visant à développer des modèles *in vitro* de FNRMS, bien que prometteuses, ont jusqu'à présent été entravées par i) un taux d'efficacité de dérivation inférieur à 20 % à partir d'échantillons de patients, ii) le manque de préservation des spécificités moléculaires des tumeurs d'origine au-delà de la génétique, et iii) des difficultés à les amplifier en 3D (Meister *et al.*, 2022), (Patel *et al.*, 2022). En effet, bien que Meister *et al.*, aient récemment proposé un protocole pour obtenir des tumoroïdes de RMS, leur méthode repose sur l'obtention de lignées cellulaires 2D à partir de biopsies de patients, qui sont ensuite cultivées en point final en sphéroïdes 3D pour les analyses fonctionnelles. Bien que cela leur permette d'établir une collection intéressante de modèles pour imiter le spectre génétique des altérations dans le RMS, nos tumoroïdes, directement dérivés en tant qu'entités 3D, répondent précisément aux exigences d'un modèle tumoroïde en reproduisant strictement la signature transcriptomique de leur tumeur d'origine, ce qui est crucial pour comprendre leur biologie. En outre, notre protocole a une efficacité de dérivation beaucoup plus élevée (100 % contre 16 %), ce qui est un prérequis lorsqu'il s'agit de tumeurs aussi rares et hétérogènes (Meister *et al.*, 2022). Enfin, contrairement à Patel *et al.*, qui ont élégamment dérivé des modèles de RMS 3D *in vitro* à partir de tumeurs issues de XDP pour évaluer l'efficacité des médicaments, nous avons démontré que nos modèles 3D peuvent être amplifiés et stables dans le temps, ce qui permet l'établissement d'une bio-collection robuste utilisable pour la recherche fondamentale et clinique (Patel *et al.*, 2022).

Ces observations me laissent penser que les experts dans le domaine des tumoroïdes devraient établir un consensus sur leur définition et les critères essentiels qu'ils doivent respecter afin de faciliter la communication scientifique, comme cela a été fait récemment pour les organoïdes hépatiques, pancréatiques et biliaires (Marsee *et al.*, 2021).

3. Vers une bio-banque de FNRMS à la rechute ?

Bien que notre protocole de génération de tumoroïdes soit robuste avec 100% de réussite à ce jour pour les FNRMS à la rechute, il n'a pu être appliqué qu'à 4 échantillons. Alors que cette mini-cohorte présente des profils cliniques très différents (**Tableau 3**), il est encore beaucoup trop tôt pour être sûr que mon protocole sera applicable à l'ensemble des FNRMS à la rechute, et mes résultats devront donc être confirmés par mes collègues au laboratoire. Il sera également intéressant de le tester sur des FPRMS à la rechute.

N° échantillon	Localisation	Âge (années)	Sexe	Type histologique	Statut de fusion	Statut	Culture 3D M3
RMS1	Tête et cou - conduit auditif	8	M	Embryonnaire	Négatif	Rechute	OPTIMAL
RMS2	Tronc - poumon	7	M	Embryonnaire	Négatif	Rechute/métastatique	OPTIMAL
RMS13	Extrémité - glutéal	43	M	Pléomorphe	Négatif	Rechute/métastatique	OPTIMAL
PDXA	Tronc - abdomen	5	M	Embryonnaire	Négatif	Rechute	OPTIMAL

Tableau 3 : Cohorte de patients utilisée pour dériver des tumoroïdes de FNRMS la rechute en milieu M3. 100% de nos échantillons ont pu être dérivés dans notre milieu M3. Le profil clinique de chaque patient est détaillé dans le tableau.

Ce faible effectif est notamment dû à la rareté mais également à la difficulté d'accès aux échantillons de patients pédiatriques. D'une part car les enfants ne sont pas toujours biopsiés avant traitement(s). D'autre part, quand elles sont faites, les biopsies sont prioritairement dédiées au diagnostic et sont de très petites tailles car souvent réalisées à l'aiguille, appelées micro-biopsies, afin de préserver l'intégrité de l'organisme de l'enfant en cours de développement.

Les enjeux du laboratoire sont donc de structurer et coordonner des réseaux de collectes d'échantillon de RMS à l'échelle nationale et/ou internationale pour inclure davantage de patients dans notre étude. Fort à propos, de plus en plus d'institutions s'engagent dans la collection et le partage de matériels/données pour l'oncologie, notamment pédiatrique. On peut citer le Childhood Solid Tumor Network (CSTN) du St Jude Hospital (U.S.), un portail de données en ligne permettant aux chercheurs en oncopédiatrie d'explorer diverses caractéristiques biologiques de leurs modèles de XDP et qui fournit gratuitement des modèles *in vivo et in vitro* pour étudier les cancers pédiatriques. De plus, le consortium international « Human Cancer Models Initiative » qui vise à générer une bio-banque de modèles de tumoroïdes incluant les caractéristiques -omiques et cliniques, devrait également participer à faire la différence dans les années à venir ([Human Cancer Models Initiative \(HCMI\) | ATCC, n.d.](#)).

4. Efficacité de dérivation des RMS au diagnostic et tumoroïdes : un nouveau défi *in vitro* ?

Le protocole que j'ai développé au cours de ma thèse n'est malheureusement pas applicable à des biopsies de FNRMS ni FPRMS au diagnostic (non-traitées) : j'ai en effet observé 100% d'échec pour

ces échantillons (**Tableau 4**). Les cellules tumorales survivent quelques temps dans mes conditions de cultures mais ne prolifèrent pas et entrent très vite en quiescence et ou sénescence. Plusieurs choses peuvent expliquer ce défaut de croissance. Tout d’abord, nos conditions de culture actuelles ne récapitulent certainement pas suffisamment les besoins biochimiques et ou physiques des cellules tumorales au diagnostic. D’autant que la présence de vacuole de stress à l’histologie laisse penser que les cellules tumorales pourraient subir très précocement des phénomènes massifs d’autophagie et/ ou de macropinocytose (exploration en cours). De plus, les tumeurs primaires pourraient présenter un profil de différenciation plus proche de celui des cellules musculaires squelettiques que les tumeurs à la rechute. Ainsi, par analogie avec le comportement des myoblastes sains *in vitro*, des mécanismes de fusions cellulaires dus au contact cellules/cellules imposés par mon système de culture en 3D pourraient être à l’origine de l’arrêt de croissance que j’observe dans les RMS au diagnostic. En ce sens, j’ai pu observer que l’utilisation d’un inhibiteur de p38, une protéine impliquée dans la différenciation myoblastique, améliore transitoirement la croissance tumorale *in vitro*.

Les lignées cellulaires de RMS existantes dans les bio-banques sont principalement des rechutes cultivées dans un milieu universel (*Hinson et al., 2013*). Au cours de ma thèse, j’ai également participé au développement d’un protocole de dérivation de lignées cellulaires 2D de FPRMS et FNRMS au diagnostic, directement à partir de tumeur de patient (**Tableau 4**). Ce protocole repose sur l’utilisation du milieu basal des tumoroides (M3) optimisé pour les échantillons au diagnostic (M5). Il permet d’obtenir 100% de croissance tumorale (n=7/7 dont 4 FNRMS et 3 FPRMS) versus 28% en milieu classique DMEM-SVF10% (n=2/7 dont 1 FNRMS et 1 FPRMS) et environ 30% (n=7/25 dont 4 FNRMS et 3 FPRMS) dans le milieu récemment décrit par Meister *et al.*, (*Meister et al., 2022*). Ce milieu reste toutefois insuffisant pour l’expansion en 3D des cellules tumorales de RMS au diagnostic.

Localisation	Âge (années)	Sexe	Type histologique	Statut de fusion	Statut	Culture 3D M3	Culture en 2D DMEM	Culture en 2D M5
Extrémité - glutéal	1	M	Embryonnaire	Negatif	Primaire	NON-OPTIMAL	OPTIMAL	OPTIMAL
Génito-urinaire - paratesticulaire	7	M	Embryonnaire	Negatif	Primaire	NON-OPTIMAL	NON-OPTIMAL	OPTIMAL
Extrémité - pied	5	F	Embryonnaire	Negatif	Primaire	NON-OPTIMAL	NON-OPTIMAL	OPTIMAL
Tête et cou - parapharyngé	4	F	Embryonnaire	Negatif	Primaire	NON-OPTIMAL	NON-OPTIMAL	OPTIMAL
Tronc - abdomen	17	M	Alvéolaire	Positif	Primaire	NON-OPTIMAL	NON-OPTIMAL	OPTIMAL
Tronc - abdomen pelvis	1,9	M	Alvéolaire	Positif	Primaire	NON-OPTIMAL	NON-OPTIMAL	OPTIMAL
Tronc - abdomen	20	F	Alvéolaire	Positif	Primaire	NON-OPTIMAL	OPTIMAL	OPTIMAL

Tableau 4 : Récapitulatif des profils cliniques et moléculaires des lignées primaires de RMS au diagnostic, établies en milieu M5. 100% de nos lignées au diagnostic FP et FNRMS ont été générées utilisant le milieu basal M3, supplémenté, appelé M5.

5. Au-delà des limites du modèle organoïde : réductionniste vers organotypique

a. Tumoroides et micro-environnement tumoral

Bien que nos modèles présentent de nombreux avantages, ils restent des modèles réductionnistes avec une totale absence de microenvironnement tumoral (MET), stromal et

immunitaire. Les tumeurs et leur MET forment un écosystème où chaque acteur interagit avec les cellules tumorales *via* des signaux physiques ou chimiques. Par exemple, les cellules tumorales peuvent sécréter une cytokine de type « Transforming Growth Factor β » (TGF β) permettant la transdifférenciation de fibroblastes en myofibroblastes et ainsi promouvoir l'invasion tumorale (*De Wever & Mareel, 2003*). De plus, certaines tumeurs peuvent remanier les protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène de type I ou les ténascines, pour former une barrière de protection contre le système immunitaire pro-inflammatoire et les drogues favorisant ainsi la résistance aux traitements et la progression tumorale (*Venning et al., 2015*), (*Kesh et al., 2020*). Les macrophages, capables de plasticité, peuvent quant à eux adapter leur phénotype selon les signaux tumoraux environnants pour également promouvoir la progression tumorale (*De Wever & Mareel, 2003*). Dans les RMS, de nombreuses études ont montré une forte valence des macrophages, notamment M2, qui pourraient être impliqués dans la progression tumorale (*Apps et al., 2013*), (*McEachron & Helman, 2021*), (*Thakur et al., 2022*), (*Demartino et al., 2022*). Dans ce contexte, au cours de ma dernière année de thèse, j'ai participé à la mise en place d'un système de co-culture entre des tumoroïdes de FNRMS à la rechute et des macrophages humains sains dans le but de complexifier le modèle et de contextualiser un contingent immunitaire. Ces modèles de co-culture pourraient permettre d'étudier l'impact du système immunitaire dans la réponse aux traitements des RMS.

b. Vers une co-culture de tumoroïdes et de macrophages

Les macrophages, issus de la différenciation terminale des monocytes, peuvent être générés *in vitro* à partir de sang frais, à l'aide de protocoles de différenciation faciles et rapides déjà publiés (*Vogel et al., 2014*), (*Heideveld et al., 2020*). En se basant sur ces articles scientifiques, j'ai réalisé pour la première fois des co-cultures de tumoroïdes de FNRMS pédiatriques avec des macrophages issus d'une différenciation *in vitro* de PBMC humain sains (**Figure 23**).

Discussion et perspectives

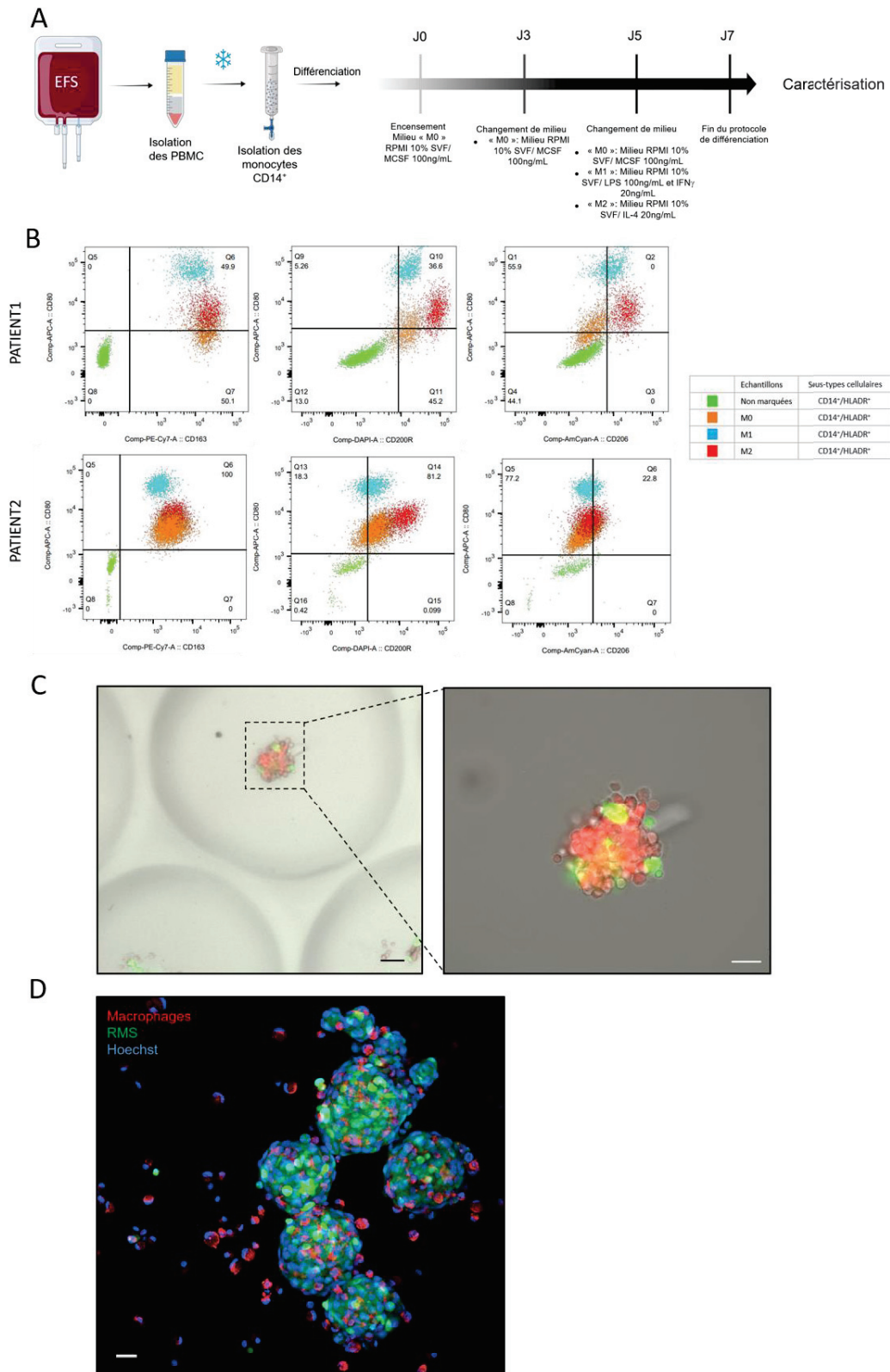


Figure 23 : Mise en place d'un protocole de génération de macrophages humains sains et résultats préliminaires d'une co-culture avec des tumeurs de FNRMS pédiatriques et des macrophages. A) Protocole d'isolation et de différenciation de macrophages humains sains à partir de sang frais. B) Caractérisation des macrophages par méthode de cytométrie en flux. Certains macrophages expriment des marqueurs qui ne leur sont pas propres, reflétant leur grande plasticité. C) Co-culture en 3D entre des macrophages sains (rouge) et des FNRMS pédiatriques (vert). T=6h, (ratio 3 :1), échelle noire 200µm, échelle blanche 150µm. D) Imagerie à haute résolution des modèles de co-culture, permettant d'acquérir des images allant jusqu'à 70µm d'épaisseur. T=30h, (ratio3 :1). Noyau (bleu), RMS (vert), macrophages (rouge). Echelle 50µm.

Après avoir différencié et caractérisé des macrophages de sujets sains (n=2) (**Figure 23 A-B**), on retrouve la même tendance d'expression de marqueurs de macrophages, validant ainsi la reproductibilité de notre protocole. Toutefois on peut noter certaines discordances avec la littérature. Par exemple, les M1 sont CD80⁺/CD163⁺ ou CD80⁺/CD200⁺ dans mes résultats alors qu'ils sont décrits dans la littérature comme étant CD80⁺/CD163⁻ ou CD80⁺/CD200⁻ (**Figure 23 B**). Ceci suggère que notre protocole de différenciation est peut-être à optimiser, et cela souligne également je pense, la grande plasticité des macrophages.

J'ai optimisé cette co-culture à l'aide de marqueurs membranaires afin de pouvoir suivre les comportements cellulaires (croissance, prolifération, mort, phagocytose) en imagerie confocale sur une période allant jusqu'à 96h (**Figure 23 C**).

Ces modèles serviront au laboratoire pour différents projets de recherche. Tout d'abord, puisque les RMS à la rechute sont très souvent infiltrés par des macrophages M2, ils serviront de modèle d'étude du dialogue entre les macrophages M2 et les cellules tumorales dans l'idée de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. De plus, ils serviront d'outils pré-cliniques pour tester l'intérêt de certaines immunothérapies telle qu'un anticorps anti-CD47 qui pourrait restaurer l'activité phagocytaire des macrophages et ainsi aider à réduire la croissance tumorale.

6. : Vers des systèmes plus dynamiques

a. Tumoroides et biofluidiques

Le développement de modèles biofluidiques représentent une nouvelle méthode de modélisation permettant d'ajouter une plus-value dynamique mimant au plus proche les conditions *in vivo* de la tumeur (*Park et al., 2019*). La complexification des tumoroides *via* les biofluidiques permettrait de placer chaque protagoniste impliqué dans les RMS (RMS, macrophages, cellules endothéliales, fibroblastes) et de suivre leurs intercommunications de façon contrôlée. Aussi, des gradients de molécules (facteurs de croissance, cytokines ou drogues) pourraient être injectées à des temps donnés mimant une distribution plus physiologique. De ce fait, l'utilisation d'un système dynamique permet ainsi de voir les implications individuelles ou collectives des composantes du MET dans la progression tumorale.

b. Tumoroides et modèles syngéniques

Les souris SCID « Severe combined immunodeficiency » permettent des xéno greffes mais peuvent aussi conserver une composante immunitaire de type macrophages, ce qui pourrait représenter un grand intérêt dans l'étude du rôle des macrophages dans les RMS (*Mills, 2019*), (*Kather et al., 2019*). Nos tumoroides ont la particularité d'être xéno greffables dans des souris NSG (NOD scid gamma) ce qui a permis de valider leurs caractères tumorigéniques (données non montrées). De ce

fait, il serait intéressant de les xéno greffer chez des souris SCID permettant ainsi de contextualiser des composantes immunitaire et vasculaire, pour étudier leur dynamisme à savoir entres autres : l'impact du système immunitaire sur la progression tumorale, le processus de métastatisation et/ou la réponse aux traitements à différents temps donnés.

Les modèles syngéniques représentent des allogreffes de cellules ou de tissus provenant d'un animal de la même espèce (Lopez, 2013). De ce fait, ces modèles confèrent une dynamique immunitaire compétente, vasculaire et stromale complète, particulièrement intéressante pour comprendre les relations complexes entre cancer et MET (Lopez, 2013). Dans ce contexte-là, il serait particulièrement intéressant de développer des tumoroïdes de RMS murins (voir modèles existants détaillés dans l'introduction) pour ensuite réaliser des allogreffes sur des souris isogéniques. Ces modèles pourraient permettre i) de recontextualiser la complexité en 3D dans un environnement dynamique et physiologique *in vivo*, ii) d'étudier aussi bien l'impact du système immunitaire inné - *partiel ou complet* -, qu'adaptatif ; ainsi que iii) le processus métastatique dans un modèle vascularisé. Enfin, ces modèles permettraient de procéder à une comparaison inter-âge de la progression tumorale et de la réponse aux traitements *via* notamment des greffes réalisées à des âges différents, correspondant à ceux des enfants, AJA ou adultes respectivement.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de mon doctorat a donc permis de générer et de caractériser des tumoroïdes de différents sous-types de FNRMS pédiatriques et adultes à l'état rechute et métastatiques. Ces modèles récapitulent l'hétérogénéité inter et intra tumorale du patient d'origine, et peuvent être amplifiés afin d'étudier le rôle de l'hétérogénéité tumorale dans la résistance aux traitements, notamment grâce à un suivi longitudinal.

*Cependant, les tumoroïdes que j'ai établis restent des modèles réductionnistes, sans aucun compartiment du micro-environnement tumoral. Afin d'améliorer ces modèles, j'ai initié au cours de ma dernière année de thèse, des co-cultures de tumoroïdes de FNRMS pédiatriques avec des macrophages issus de PBMC de patients sains. Ces co-cultures permettront de contextualiser *in vitro* le contingent immunitaire le plus fréquemment rencontré dans les biopsies de RMS, et seront utiles pour ouvrir le champ des possibles d'études pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à traiter les rhabdomyosarcomes.*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agaram, N. P. (2021). *Evolving classification of rhabdomyosarcoma*. <https://doi.org/10.1111/his.14449>
- Agaram, N. P. (2022). Evolving classification of rhabdomyosarcoma. *Histopathology*, *80*(1), 98–108. <https://doi.org/10.1111/his.14449>
- Agaram, N. P., Chen, C. L., Zhang, L., Laquaglia, M. P., Wexler, L., & Antonescu, C. R. (2014). Recurrent MYOD1 mutations in pediatric and adult sclerosing and spindle cell rhabdomyosarcomas: Evidence for a common pathogenesis. *Genes Chromosomes and Cancer*, *53*(9), 779–787. <https://doi.org/10.1002/gcc.22187>
- Agaram, N. P., LaQuaglia, M. P., Alaggio, R., Zhang, L., Fujisawa, Y., Ladanyi, M., Wexler, L. H., & Antonescu, C. R. (2019). MYOD1-mutant spindle cell and sclerosing rhabdomyosarcoma: an aggressive subtype irrespective of age. A reappraisal for molecular classification and risk stratification. *Modern Pathology*, *32*(1), 27–36. <https://doi.org/10.1038/s41379-018-0120-9>
- Aktipis, C. A., & Nesse, R. M. (2013). Evolutionary foundations for cancer biology. *Evolutionary Applications*, *6*(1), 144. <https://doi.org/10.1111/EVA.12034>
- Alaggio et al. (2017). A Molecular Study of Pediatric Spindle and Sclerosing Rhabdomyosarcoma: Identification of Novel and Recurrent VGLL2-Related Fusions in Infantile Cases. *Physiology & Behavior*, *176*(3), 139–148. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000538.A>
- Apps, J. R., Hasan, F., Campus, O., Behjati, S., Jacques, T. S., J. Sebire, N., & Anderson, J. (2013). The immune environment of paediatric solid malignancies: Evidence from an immunohistochemical study of clinical cases. *Fetal and Pediatric Pathology*, *32*(4), 298–307. <https://doi.org/10.3109/15513815.2012.754527>
- Ballabio, C., Anderle, M., Giancesello, M., Lago, C., Miele, E., Cardano, M., Aiello, G., Piazza, S., Caron, D., Gianno, F., Ciolfi, A., Pedace, L., Mastronuzzi, A., Tartaglia, M., Locatelli, F., Ferretti, E., Giangaspero, F., & Tiberi, L. (2020). Modeling medulloblastoma in vivo and with human cerebellar organoids. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13989-3>
- Bangi, E., Ang, C., Smibert, P., Uzilov, A. V., Teague, A. G., Antipin, Y., Chen, R., Hecht, C., Gruszczynski, N., Yon, W. J., Malyshev, D., Laspina, D., Selkridge, I., Rainey, H., Moe, A. S., Lau, C. Y., Taik, P., Wilck, E., Bhardwaj, A., ... Cagan, R. L. (2019). A personalized platform identifies trametinib plus zoledronate for a patient with KRAS-mutant metastatic colorectal cancer. *Science Advances*, *5*(5),

Références bibliographiques

- 1–12. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav6528>
- Bannier-Hélaouët, M., Post, Y., Korving, J., Trani Bustos, M., Gehart, H., Begthel, H., Bar-Ephraim, Y. E., van der Vaart, J., Kalmann, R., Imhoff, S. M., & Clevers, H. (2021). Exploring the human lacrimal gland using organoids and single-cell sequencing. *Cell Stem Cell*, *28*(7), 1221-1232.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.02.024>
- Barbet, V., & Broutier, L. (2021). Future Match Making: When Pediatric Oncology Meets Organoid Technology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*(July). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.674219>
- Barr, F. G., Galili, N., Holick, J., Biegel, J. A., Rovera, G., & Emanuel, B. S. (1993). Rearrangement of the PAX3 paired box gene in the paediatric solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nature Genetics*, *3*(2), 113–117. <https://doi.org/10.1038/ng0293-113>
- Bennicelli, J. L., Edwards, R. H., & Barr, F. G. (1996). Mechanism for transcriptional gain of function resulting from chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(11), 5455–5459. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5455>
- Bernstein, M., Kovar, H., Paulussen, M., Randall, R. L., Schuck, A., Teot, L. A., & Juergens, H. (2006). Ewing's Sarcoma Family of Tumors: Current Management. *The Oncologist*, *11*(5), 503–519. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-5-503>
- Beverly Raney, R., Maurer, H. M., Anderson, J. R., Andrassy, R. J., Donaldson, S. S., Qualman, S. J., Wharam, M. D., Wiener, E. S., & Crist, W. M. (2001). The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group (IRSG): Major lessons from the IRS-I through IRS-IV studies as background for the current IRS-V treatment protocols. *Sarcoma*, *5*(1), 9–15. <https://doi.org/10.1080/13577140120048890>
- Bleijis, M., Wetering, M., Clevers, H., & Drost, J. (2019). Xenograft and organoid model systems in cancer research. *The EMBO Journal*, *38*(15), 1–11. <https://doi.org/10.15252/emboj.2019101654>
- Bose, S., Clevers, H., & Shen, X. (2021). Promises and challenges of organoid-guided precision medicine. *Med*, *2*(9), 1011–1026. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2021.08.005>
- Bourdeaut, F., Pouponnot, C., & Ayrault, O. (2012). Les médulloblastomes et leurs cellules d'origine. *Médecine/Sciences*, *28*(10), 805–809. <https://doi.org/10.1051/medsci/20122810003>
- Broutier, L., Mastrogiovanni, G., Verstegen, M. M. A., Francies, H. E., Gavarró, L. M., Bradshaw, C. R., Allen, G. E., Arnes-Benito, R., Sidorova, O., Gaspersz, M. P., Georgakopoulos, N., Koo, B. K., Dietmann, S., Davies, S. E., Praseedom, R. K., Lieshout, R., IJzermans, J. N. M., Wigmore, S. J.,

Références bibliographiques

- Saeb-Parsy, K., ... Huch, M. (2017). Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nature Medicine*, 23(12), 1424–1435. <https://doi.org/10.1038/nm.4438>
- Brown, C. B., Engleka, K. A., Wenning, J., Min, M. L., & Epstein, J. A. (2005). Identification of a hypaxial somite enhancer element regulating Pax3 expression in migrating myoblasts and characterization of hypaxial muscle Cre transgenic mice. *Genesis*, 41(4), 202–209. <https://doi.org/10.1002/GENE.20116>
- Burningham, Z., Hashibe, M., Spector, L., & Schiffman, J. D. (2012). *The Epidemiology of Sarcoma*. <http://www.clinicalsarcomaresearch.com/content/2/1/14>
- Butel, T., Karanian, M., Pierron, G., Orbach, D., Ranchere, D., Cozic, N., Galmiche, L., Coulomb, A., Corradini, N., Lacour, B., Proust, S., Guerin, F., Boutroux, H., Rome, A., Mansuy, L., Vérité, C., Defachelles, A. S., Tirode, F., & Minard-Colin, V. (2020). Integrative clinical and biopathology analyses to understand the clinical heterogeneity of infantile rhabdomyosarcoma: A report from the French MMT committee. *Cancer Medicine*, 9(8), 2698–2709. <https://doi.org/10.1002/cam4.2713>
- Cadas. (2017). *THESE P RISE EN CHARGE D ' UN PATIENT ATT EINT DE Remerciements et avant-propos*. 1–62.
- Calandrini, C., van Hooff, S. R., Paassen, I., Ayyildiz, D., Derakhshan, S., Dolman, M. E. M., Langenberg, K. P. S., van de Ven, M., de Heus, C., Liv, N., Kool, M., de Krijger, R. R., Tytgat, G. A. M., van den Heuvel-Eibrink, M. M., Molenaar, J. J., & Drost, J. (2021). Organoid-based drug screening reveals neddylation as therapeutic target for malignant rhabdoid tumors. *Cell Reports*, 36(8), 109568. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109568>
- Cancer Biology Program | St. Jude Research*. (n.d.). Retrieved April 18, 2023, from <https://www.stjude.org/research/comprehensive-cancer-center/programs/cancer-genetics-biochemistry-and-cell-biology.html>
- Capasso, M., Montella, A., Tirelli, M., Maiorino, T., Cantalupo, S., & Iolascon, A. (2020). Genetic Predisposition to Solid Pediatric Cancers. *Frontiers in Oncology*, 10(October), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.590033>
- Caracciolo, J. T., Henderson-Jackson, E., & Binitie, O. (2019). Synovial sarcoma of bone: Sarcoma typically of soft tissues presenting as a primary bone tumor. *Radiology Case Reports*, 14(2), 204–207. <https://doi.org/10.1016/j.radcr.2018.10.026>

Références bibliographiques

- Carrel, A., & Burrows, M. T. (1911). CULTIVATION IN VITRO OF MALIGNANT TUMORS. *The Journal of Experimental Medicine*, 13(5), 571. <https://doi.org/10.1084/JEM.13.5.571>
- Carter, M., & Shieh, J. (2015). Cell Culture Techniques. *Guide to Research Techniques in Neuroscience*, 295–310. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800511-8.00014-9>
- Charles, N., Ozawa, T., Squatrito, M., Bleau, A. M., Brennan, C. W., Hambardzumyan, D., & Holland, E. C. (2010). Perivascular Nitric Oxide Activates Notch Signaling and Promotes Stem-like Character in PDGF-Induced Glioma Cells. *Cell Stem Cell*, 6(2), 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.01.001>
- Charpentier, E., & Doudna, J. A. (2013). Rewriting a genome. THA REAL OG. *Nature Biotechnology*, 495, 50–51. <https://www.nature.com/articles/495050a>
- Chichra, A., & Mahajan, A. (2012). Recent advances in childhood cancer: Fifty years of progress. *Apollo Medicine*, 9(2), 140–145. <https://doi.org/10.1016/J.APME.2012.05.009>
- Chow, K. H., Shin, D. M., Jenkins, M. H., Miller, E. E., Shih, D. J., Choi, S., Low, B. E., Philip, V., Rybinski, B., Bronson, R. T., Taylor, M. D., & Yun, K. (2014). Epigenetic states of cells of origin and tumor evolution drive tumor-initiating cell phenotype and tumor heterogeneity. *Cancer Research*, 74(17), 4864–4874. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3293>
- Chrisinger, J. S. A., Wehrli, B., Dickson, B. C., Fasih, S., Hirbe, A. C., Shultz, D. B., Zadeh, G., Gupta, A. A., & Demicco, E. G. (2020). Epithelioid and spindle cell rhabdomyosarcoma with FUS-TFCP2 or EWSR1-TFCP2 fusion: report of two cases. *Virchows Archiv*, 477(5), 725–732. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02870-0>
- Cieśla, M., Dulak, J., & Józkwicz, A. (2014). MicroRNAs and epigenetic mechanisms of rhabdomyosarcoma development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 53, 482–492. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2014.05.003>
- Clay, M. R., Patel, A., Tran, Q., Hedges, D. J., Chang, T. C., Stewart, E., Charville, G., Cline, C., Dyer, M. A., & Orr, B. A. (2021). Methylation profiling reveals novel molecular classes of rhabdomyosarcoma. *Scientific Reports*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01649-w>
- Clevers, H. (2016). Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*, 165(7), 1586–1597. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.05.082>
- Cobb. (1972). METASTATIC SPREAD OF HUMAN TUMOUR IMPLANTED INTO THYMECTOMIZED , ANTITHYMOCYTE SERUM TREATED HAMSTERS are combined , the survival of human rodents has been poor . It has always carcinoma of the breast was implanted together with ATS . In the second

Références bibliographiques

group. 183–189.

- Costa, E. C., Moreira, A. F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V. M., Carvalho, M. P., & Correia, I. J. (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances*, *34*(8), 1427–1441. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2016.11.002>
- Dancsok, A. R., Gao, D., Lee, A. F., Steigen, S. E., Blay, J. Y., Thomas, D. M., Maki, R. G., Nielsen, T. O., & Demicco, E. G. (2020). Tumor-associated macrophages and macrophage-related immune checkpoint expression in sarcomas. *Oncolmmunology*, *9*(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1747340>
- Danielli, S. G., Porpiglia, E., De Micheli, A. J., Navarro, N., Zellinger, M. J., Bechtold, I., Kisele, S., Volken, L., Marques, J. G., Kasper, S., Bode, P. K., Henssen, A. G., Gürgen, D., Delattre, O., Surdez, D., Roma, J., Bühlmann, P., Blau, H. M., Wachtel, M., & Schäfer, B. W. (2023). Single-cell profiling of alveolar rhabdomyosarcoma reveals RAS pathway inhibitors as cell-fate hijackers with therapeutic relevance. *Science Advances*, *9*(6), 1–21. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade9238>
- Dashti, N. K., Wehrs, R. N., Thomas, B. C., Nair, A., Davila, J., Buckner, J. C., Martinez, A. P., Sukov, W. R., Halling, K. C., Howe, B. M., & Folpe, A. L. (2018). Spindle cell rhabdomyosarcoma of bone with FUS–TFCP2 fusion: confirmation of a very recently described rhabdomyosarcoma subtype. *Histopathology*, *73*(3), 514–520. <https://doi.org/10.1111/HIS.13649>
- Davicioni, E., Anderson, M. J., Finckenstein, F. G., Lynch, J. C., Qualman, S. J., Shimada, H., Schofield, D. E., Buckley, J. D., Meyer, W. H., Sorensen, P. H. B., & Triche, T. J. (2009). Molecular Classification of Rhabdomyosarcoma—Genotypic and Phenotypic Determinants of Diagnosis: A Report from the Children’s Oncology Group. *The American Journal of Pathology*, *174*(2), 550–564. <https://doi.org/10.2353/AJPATH.2009.080631>
- Davis, R. J., & Barr, F. G. (1997). Fusion genes resulting from alternative chromosomal translocations are overexpressed by gene-specific mechanisms in alveolar rhabdomyosarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(15), 8047–8051. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.15.8047>
- De Wever, O., & Mareel, M. (2003). Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *Journal of Pathology*, *200*(4), 429–447. <https://doi.org/10.1002/path.1398>
- Dehner, C. A., Armstrong, A. E., Yohe, M., Shern, J. F., & Hirbe, A. C. (2020). Fusion-Positive Rhabdomyosarcoma. *Definitions*. <https://doi.org/10.32388/u0rmlt>
- Demartino, J., Meister, M. T., Visser, L., Brok, M., Koerkamp, M. J. A. G., Hiemcke-Jiwa, L. S., De Souza,

Références bibliographiques

- T., Merks, J. H. M., Holstege, F. C. P., Margaritis, T., & Drost, J. (2022). *Single-cell transcriptomics reveals immune suppression and cell states predictive of patient outcomes in rhabdomyosarcoma*. <https://doi.org/10.1101/2022.07.15.497944>
- Dick, J. E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*, *112*(13), 4793–4807. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-077941>
- Dong, M., Wu, J., Wu, R., Wang, D., Liu, R., Luo, H., Wang, Y., Chen, J., Ou, Y., Zhang, Q., & Wang, X. (2023). Efficacy and safety of proton beam therapy for rhabdomyosarcoma: a systematic review and meta-analysis. *Radiation Oncology*, *18*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13014-023-02223-6>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1258096>
- Drost, J., Van Jaarsveld, R. H., Ponsioen, B., Zimmerlin, C., Van Boxtel, R., Buijs, A., Sachs, N., Overmeer, R. M., Offerhaus, G. J., Begthel, H., Korving, J., Van De Wetering, M., Schwank, G., Logtenberg, M., Cuppen, E., Snippert, H. J., Medema, J. P., Kops, G. J. P. L., & Clevers, H. (2015). Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature*, *521*(7550), 43–47. <https://doi.org/10.1038/nature14415>
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. In *Assay and Drug Development Technologies*. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>
- Enfants sans cancer*. (n.d.). Retrieved February 28, 2023, from <https://www.enfantsanscancer.fr/le-cancer-des-enfants/>
- Erdmann, F., Frederiksen, L. E., Bonaventure, A., Mader, L., Hasle, H., Robison, L. L., & Winther, J. F. (2021). Childhood cancer: Survival, treatment modalities, late effects and improvements over time. *Cancer Epidemiology*, *71*(PB), 101733. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2020.101733>
- Fan, R., Parham, D. M., & Wang, L. L. (2022). An Integrative Morphologic and Molecular Approach for Diagnosis and Subclassification of Rhabdomyosarcoma. *Arch Pathol Lab Med*, *146*, 953–959. <https://doi.org/10.5858/arpa.2021-0183-RA>
- Ferrari, A., Dirksen, U., & Bielack, S. (2016). Sarcomas of Soft Tissue and Bone. *Progress in Tumor Research*, *43*, 128–141. <https://doi.org/10.1159/000447083>
- Fults, D. W. (2005). Modeling medulloblastoma with genetically engineered mice. *Neurosurgical Focus*, *19*(5), 1–8. <https://doi.org/10.3171/foc.2005.19.5.8>

Références bibliographiques

- Furlong, M. A., & Fanburg-Smith, J. C. (2001). Pleomorphic rhabdomyosarcoma in children: Four cases in the pediatric age group. *Annals of Diagnostic Pathology*, 5(4), 199–206. <https://doi.org/10.1053/ADPA.2001.26970>
- Gaál, Z. (2023). Targeted Epigenetic Interventions in Cancer with an Emphasis on Pediatric Malignancies. *Biomolecules*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/biom13010061>
- Galindo, R. L., Allport, J. A., & Olson, E. N. (2006). A Drosophila model of the rhabdomyosarcoma initiator PAX7-FKHR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(36), 13439–13444. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605926103>
- Gao, Y. Y., Ling, Z. Y., Zhu, Y. R., Shi, C., Wang, Y., Zhang, X. Y., Zhang, Z. Q., Jiang, Q., Chen, M. Bin, Yang, S., & Cao, C. (2021). The histone acetyltransferase HBO1 functions as a novel oncogenic gene in osteosarcoma. *Theranostics*, 11(10), 4599–4615. <https://doi.org/10.7150/thno.55655>
- García-Domínguez, D. J., Hajji, N., Sánchez-Molina, S., Figuerola-Bou, E., de Pablos, R. M., Espinosa-Oliva, A. M., Andrés-León, E., Terrón-Camero, L. C., Flores-Campos, R., Pascual-Pasto, G., Robles, M. J., Machado, I., Llombart-Bosch, A., Magagnoli, G., Scotlandi, K., Carcaboso, Á. M., Mora, J., de Álava, E., & Hontecillas-Prieto, L. (2021). Selective inhibition of HDAC6 regulates expression of the oncogenic driver EWSR1-FLI1 through the EWSR1 promoter in Ewing sarcoma. *Oncogene*, 40(39), 5843–5853. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01974-4>
- Gasparini, P., Fortunato, O., De Cecco, L., Casanova, M., Iannó, M. F., Carengo, A., Centonze, G., Milione, M., Collini, P., Boeri, M., Dugo, M., Gargiuli, C., Mensah, M., Segale, M., Bergamaschi, L., Chiaravalli, S., Sensi, M. L., Massimino, M., Sozzi, G., & Ferrari, A. (2019). Age-related alterations in immune contexture are associated with aggressiveness in Rhabdomyosarcoma. *Cancers*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/cancers11091380>
- Gateff, E., & Schneiderman, H. A. (1969). Neoplasms in mutant and cultured wild-tupe tissues of Drosophila. *National Cancer Institute Monograph*, 31, 365–397. <https://europepmc.org/article/med/5374686>
- Gateff, E., & Schneiderman, H. A. (1974). Developmental capacities of benign and malignant neoplasms of Drosophila. *Wilhelm Roux Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen*, 176(1), 23–65. <https://doi.org/10.1007/BF00577830>
- Gazendam, A. M., Popovic, S., Munir, S., Parasu, N., Wilson, D., & Ghert, M. (2021). Synovial sarcoma: A clinical review. *Current Oncology*, 28(3), 1909–1920. <https://doi.org/10.3390/curroncol28030177>

Références bibliographiques

- Gey G. (1952). Cancer research. *Cancer Research*, 124(3135), 844. <https://doi.org/10.1038/124844a0>
- Ghiringhelli, F. (2013). Surveillance immune antitumorale et échappement. *Correspondances En Onco-Théranostic, II*, 6–10.
- Gryder, B. E., Yohe, M. E., Chou, H. C., Zhang, X., Marques, J., Wachtel, M., Schaefer, B., Sen, N., Song, Y., Gualtieri, A., Pomella, S., Rota, R., Cleveland, A., Wen, X., Sindiri, S., Wei, J. S., Barr, F. G., Das, S., Andresson, T., ... Khan, J. (2017). PAX3-FOXO1 Establishes Myogenic Super Enhancers and Confers BET Bromodomain Vulnerability. *Cancer Discovery*, 7(8), 884–899. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1297>
- Gupta, S. K., & Shukla, P. (2016). Gene editing for cell engineering: trends and applications. <Http://Dx.Do.Org/10.1080/07388551.2016.1214557>, 37(5), 672–684. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1214557>
- Haldar, M., Karan, G., Tvrdik, P., & Capecchi, M. R. (2008). Two cell lineages, myf5 and myf5-independent, participate in mouse skeletal myogenesis. *Developmental Cell*, 14(3), 437–445. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2008.01.002>
- Haldi, M., Ton, C., Seng, W. L., & McGrath, P. (2006). Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis*, 9(3), 139–151. <https://doi.org/10.1007/s10456-006-9040-2>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harrison, R. G. (1906). Observations on the living developing nerve fiber. <Https://Doi.Org/10.3181/00379727-4-98>, 4(1), 140–143. <https://doi.org/10.3181/00379727-4-98>
- Hass, R., von der Ohe, J., & Ungefroren, H. (2020). Impact of the tumor microenvironment on tumor heterogeneity and consequences for cancer cell plasticity and stemness. *Cancers*, 12(12), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cancers12123716>
- He, X., & Xu, C. (2020). Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Research*, 30(8),

Références bibliographiques

660–669. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0343-4>

Health, A. (2017). *STS u mladih review*. 41–55.

Hecker, R. M., Amstutz, R. A., Wachtel, M., Walter, D., Niggli, F. K., & Schäfer, B. W. (2010). p21 Downregulation is an important component of PAX3/FKHR oncogenicity and its reactivation by HDAC inhibitors enhances combination treatment. *Oncogene* 29:27, 29(27), 3942–3952. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.145>

Heideveld, E., Horcas-Lopez, M., Lopez-Yrigoyen, M., Forrester, L. M., Cassetta, L., & Pollard, J. W. (2020). Methods for macrophage differentiation and in vitro generation of human tumor associated-like macrophages. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 632). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.10.005>

Helson, L., Das, S., & Hajdu, S. (1975). Human neuroblastoma in nude mice. *Cancer Research*.

Herrmann, D., Seitz, G., Fuchs, J., & Armeanu-Ebinger, S. (2012). Susceptibility of rhabdomyosarcoma cells to macrophage-mediated cytotoxicity. *Oncotmunology*, 1(3), 279–286. <https://doi.org/10.4161/onci.18612>

Hettmer, S., Linardic, C. M., Kelsey, A., Rudzinski, E. R., Vokuhl, C., Selfe, J., Ruhen, O., Shern, J. F., Khan, J., Kovach, A. R., Lupo, P. J., Gatz, S. A., Schäfer, B. W., Volchenboum, S., Minard-Colin, V., Koscielniak, E., Hawkins, D. S., Bisogno, G., Sparber-Sauer, M., ... Shipley, J. (2022). Molecular testing of rhabdomyosarcoma in clinical trials to improve risk stratification and outcome: A consensus view from European paediatric Soft tissue sarcoma Study Group, Children’s Oncology Group and Cooperative Weichteilsarkom-Studiengruppe. *European Journal of Cancer*, 172, 367–386. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2022.05.036>

Hill, S. J., Decker, B., Roberts, E. A., Horowitz, N. S., Muto, M. G., Worley, M. J., Feltmate, C. M., Nucci, M. R., Swisher, E. M., Nguyen, H., Yang, C., Morizane, R., Kochupurakkal, B. S., Do, K. T., Konstantinopoulos, P. A., Liu, J. F., Bonventre, J. V., Matulonis, U. A., Shapiro, G. I., ... D’Andrea, A. D. (2018). Prediction of DNA repair inhibitor response in short-term patient-derived ovarian cancer organoids. *Cancer Discovery*, 8(11), 1404–1421. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0474>

Hinson, A. R. P., Jones, R., Crose, L. E. S., Belyea, B. C., Barr, F. G., Linardic, C. M., & Lessnick, S. (2013). *Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00183>

Horn & Enterline. (1957). *Study and Classification of 39 Cases*. 181–199.

Références bibliographiques

- Human Cancer Models Initiative (HCMI) | ATCC.* (n.d.). Retrieved April 21, 2023, from <https://www.atcc.org/cell-products/collections-and-projects/human-cancer-models-initiative#t=productTab&numberOfResults=24>
- Ignatius, M. S., Hayes, M., & Langenau, D. M. (2016). In Vivo Imaging of Cancer in Zebrafish. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 916, 219–237. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30654-4_10
- Institut Curie - Centre de recherche et traitement du cancer en France.* (n.d.). Retrieved March 6, 2023, from <https://curie.fr/>
- Institut National Du Cancer.* (n.d.). Retrieved April 19, 2023, from <https://www.e-cancer.fr/>
- Italiano, A., Bessedé, A., Pulido, M., Bompas, E., Chevreau, C., Penel, N., Bertucci, F., Toulmonde, M., Bellera, C., Guegan, J. P., Rey, C., Bougoüin, A., Cantarel, C., Kind, M., Spalato, M., Loarer, F., Blay, J. Y., & Fridman, W. H. (2022). *Pembrolizumab in soft-tissue sarcomas with tertiary lymphoid structures: a phase 2 PEMBROSARC trial cohort.* 28(June). <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01821-3>
- ITCC: Innovative therapies for children with cancer.* (n.d.). Retrieved April 18, 2023, from <https://www.itcc-consortium.org/>
- Jenney, M. (2005). *EPSSG RMS 2005: a protocol for non metastatic rhabdomyosarcoma.* May, 1–203.
- Jo, V. Y., & Fletcher, C. D. M. (2014). WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology*, 46(2), 95–104. <https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000050>
- Jones, D. T. W., Banito, A., Grünewald, T. G. P., Haber, M., Jäger, N., Kool, M., Milde, T., Molenaar, J. J., Nabbi, A., Pugh, T. J., Schleiermacher, G., Smith, M. A., Westermann, F., & Pfister, S. M. (2019). Molecular characteristics and therapeutic vulnerabilities across paediatric solid tumours. *Nature Reviews Cancer*, 19(8), 420–438. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0169-x>
- Jordan, B. (2021). The legacy of Henrietta Lacks. *Medecine/Sciences*, 37(12), 1189–1193. <https://doi.org/10.1051/medsci/2021181>
- Kabir, T. F., Chauhan, A., Anthony, L., & Hildebrandt, G. C. (2018). Immune checkpoint inhibitors in pediatric solid tumors: Status in 2018. *Ochsner Journal*, 18(4), 370–376. <https://doi.org/10.31486/toj.18.0055>
- Kallen, M. E., & Hornick, J. L. (2022). From the ashes of “Ewing-like” sarcoma: A contemporary update of the classification, immunohistochemistry, and molecular genetics of round cell sarcomas.

Références bibliographiques

- Seminars in Diagnostic Pathology*, 39(1), 29–37. <https://doi.org/10.1053/J.SEMDP.2021.10.002>
- Kashi, V. P., Hatley, M. E., & Galindo, R. L. (2015). Probing for a deeper understanding of rhabdomyosarcoma: Insights from complementary model systems. *Nature Reviews Cancer*, 15(7), 426–439. <https://doi.org/10.1038/nrc3961>
- Kather, J. N., Hörner, C., Weis, C. A., Aung, T., Vokuhl, C., Weiss, C., Scheer, M., Marx, A., & Simon-Keller, K. (2019). CD163+ immune cell infiltrates and presence of CD54+ microvessels are prognostic markers for patients with embryonal rhabdomyosarcoma. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45551-y>
- Keller, C., & Capecchi, M. R. (2005). New Genetic Tactics to Model Alveolar Rhabdomyosarcoma in the Mouse. *Cancer Research*, 65(17), 7530–7532. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0477>
- Kendall, G. C., Watson, S., Xu, L., Lavigne, C. A., Murchison, W., Rakheja, D., Skapek, S. X., Tirode, F., Delattre, O., & Amatruda, J. F. (2018). PAX3-FOXO1 transgenic zebrafish models identify HES3 as a mediator of rhabdomyosarcoma tumorigenesis. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.33800>
- Kesh, K., Gupta, V. K., Durden, B., Garrido, V., Mateo-Victoriano, B., Lavania, S. P., & Banerjee, S. (2020). Therapy resistance, cancer stem cells and ECM in cancer: The matrix reloaded. *Cancers*, 12(10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/cancers12103067>
- Khokhlova, E. V., Fesenko, Z. S., Sopova, J. V., & Leonova, E. I. (2020). *Mammalian Embryonic Development*.
- Kim, G. H., Ryan, J. J., Marsboom, G., & Archer, S. L. (2011). Epigenetic mechanisms of pulmonary hypertension. *Pulmonary Circulation*, 1(3), 347–356. <https://doi.org/10.4103/2045-8932.87300>
- Kim, S., Choung, S., Sun, R. X., Ung, N., Hashemi, N., Fong, E. J., Lau, R., Spiller, E., Gasho, J., Foo, J., & Mumenthaler, S. M. (2020). Comparison of Cell and Organoid-Level Analysis of Patient-Derived 3D Organoids to Evaluate Tumor Cell Growth Dynamics and Drug Response. *SLAS Discovery*, 25(7), 744–754. <https://doi.org/10.1177/2472555220915827>
- Kloc, M., Ghobrial, R. M., Wosik, J., Lewicka, A., Lewicki, S., & Kubiak, J. Z. (2019). Macrophage functions in wound healing. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(1), 99–109. <https://doi.org/10.1002/term.2772>
- Kreso, A., & Dick, J. E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*, 14(3), 275–291. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2014.02.006>
- Kruse, J., Von Bernstorff, W., Evert, K., Albers, N., Hadlich, S., Hagemann, S., Günther, C., Van Rooijen,

Références bibliographiques

- N., Heidecke, C. D., & Partecke, L. I. (2013). Macrophages promote tumour growth and liver metastasis in an orthotopic syngeneic mouse model of colon cancer. *International Journal of Colorectal Disease*, 28(10), 1337–1349. <https://doi.org/10.1007/s00384-013-1703-z>
- Lacour, B., Guyot-Goubin, A., Désandes, E., & Clavel, J. (2011). Cancer in children and adolescents: What are we talking about? *Oncologie*, 13(4), 125–135. <https://doi.org/10.1007/s10269-011-1998-8>
- Lam, C. G., Howard, S. C., Bouffet, E., & Pritchard-Jones, K. (2019). Science and health for all children with cancer. *Science*, 363(6432), 1182–1186. <https://doi.org/10.1126/science.aaw4892>
- Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 345(6194). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1247125>
- Landier, W., Skinner, R., Wallace, W. H., Hjorth, L., Mulder, R. L., Wong, F. L., Yasui, Y., Bhakta, N., Constine, L. S., Bhatia, S., Kremer, L. C., & Hudson, M. M. (2018). Surveillance for late effects in childhood cancer survivors. *Journal of Clinical Oncology*, 36(21), 2216–2222. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.77.0180>
- Langenau, D. M., Keefe, M. D., Storer, N. Y., Guyon, J. R., Kutok, J. L., Le, X., Goessling, W., Neubergh, D. S., Kunkel, L. M., & Zon, L. I. (2007). Effects of RAS on the genesis of embryonal rhabdomyosarcoma. *Genes & Development*, 21(11), 1382–1395. <https://doi.org/10.1101/GAD.1545007>
- Laubscher, D., Gryder, B. E., Sunkel, B. D., Andresson, T., Wachtel, M., Das, S., Roschitzki, B., Wolski, W., Wu, X. S., Chou, H. C., Song, Y. K., Wang, C., Wei, J. S., Wang, M., Wen, X., Ngo, Q. A., Marques, J. G., Vakoc, C. R., Schäfer, B. W., ... Khan, J. (2021). BAF complexes drive proliferation and block myogenic differentiation in fusion-positive rhabdomyosarcoma. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27176-w>
- Lawrence, M., Daujat, S., & Schneider, R. (2016). Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends in Genetics*, 32(1), 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.007>
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N. M., Pastorino, S., Purow, B. W., Christopher, N., Zhang, W., Park, J. K., & Fine, H. A. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 9(5), 391–403. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2006.03.030>
- Lindeboom, R. G., Voorthuijsen, L., Oost, K. C., Rodríguez-Colman, M. J., Luna-Velez, M. V, Furlan, C.,

Références bibliographiques

- Baraille, F., Jansen, P. W., Ribeiro, A., Burgering, B. M., Snippert, H. J., & Vermeulen, M. (2018). Integrative multi-omics analysis of intestinal organoid differentiation. *Molecular Systems Biology*, *14*(6), 1–16. <https://doi.org/10.15252/msb.20188227>
- Logtenberg, M. E. W., Scheeren, F. A., & Schumacher, T. N. (2020). The CD47-SIRP α Immune Checkpoint. *Immunity*, *52*(5), 742–752. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.011>
- Lopez. (2013). *Open Archive Toulouse Archive Ouverte (OATAO)*. 2013(September). http://hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/92/65/14/PDF/Delbe_9783.pdf
- Mack, S. C., Witt, H., Piro, R. M., Gu, L., Zuyderduyn, S., Stütz, A. M., Wang, X., Gallo, M., Garzia, L., Zayne, K., Zhang, X., Ramaswamy, V., Jäger, N., Jones, D. T. W., Sill, M., Pugh, T. J., Ryzhova, M., Wani, K. M., Shih, D. J. H., ... Taylor, M. D. (2014). Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy. *Nature*, *506*(7489), 445–450. <https://doi.org/10.1038/nature13108>
- Mahajan, P., Leavey, P. J., & Galindo, R. L. (2014). PAX genes in childhood oncogenesis: developmental biology gone awry? *Oncogene* 2015 34:21, *34*(21), 2681–2689. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.209>
- Marsee, A., Roos, F. J. M., Verstegen, M. M. A., Roos, F., Verstegen, M., Clevers, H., Vallier, L., Takebe, T., Huch, M., Peng, W. C., Forbes, S., Lemaigre, F., de Koning, E., Gehart, H., van der Laan, L., Spee, B., Boj, S., Baptista, P., Schneeberger, K., ... van der Laan, L. J. W. (2021). Building consensus on definition and nomenclature of hepatic, pancreatic, and biliary organoids. *Cell Stem Cell*, *28*(5), 816–832. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.04.005>
- Marshall, A. D., & Grosveld, G. C. (2012). Alveolar rhabdomyosarcoma - The molecular drivers of PAX3/7-FOXO1-induced tumorigenesis. *Skeletal Muscle*, *2*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-2-25>
- Matlung, H. L., Szilagy, K., Barclay, N. A., & van den Berg, T. K. (2017). The CD47-SIRP α signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer. *Immunological Reviews*, *276*(1), 145–164. <https://doi.org/10.1111/imr.12527>
- McEachron, T. A., & Helman, L. J. (2021). Recent Advances in Pediatric Cancer Research. *Cancer Research*, *81*(23), 5783–5799. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-1191>
- Mckinnon, T., Venier, R., Dickson, B. C., Kabaroff, L., Alkema, M., Chen, L., Shern, J. F., Yohe, M. E., Khan, J., & Gladdy, R. A. (2015). *Kras activation in p53-deficient myoblasts results in high-grade sarcoma formation with impaired myogenic differentiation*. *6*(16).

Références bibliographiques

- Mckinnon, T., Venier, R., Yohe, M., Sindiri, S., Berkley, •, Gryder, E., Jack, •, Shern, F., Kabaroff, • Leah, Dickson, B., Schleicher, K., Chouinard-Pelletier, G., Menezes, S., Gupta, A., Zhang, • Xiaohu, Guha, R., Ferrer, M., Craig, •, Thomas, J., ... Javed Khan, •. (2018). Functional screening of FGFR4-driven tumorigenesis identifies PI3K/ mTOR inhibition as a therapeutic strategy in rhabdomyosarcoma. *Oncogene*, 37, 2630–2644. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0122-y>
- Mehta, J. (2009). Graft-versus-Leukemia Reactions in Clinical Bone Marrow Transplantation. *https://Doi.Org/10.3109/10428199309148199*, 10(6), 427–432. <https://doi.org/10.3109/10428199309148199>
- Meister, M. T., Groot Koerkamp, M. J. A., de Souza, T., Breunis, W. B., Frazer-Mendelewska, E., Brok, M., DeMartino, J., Manders, F., Calandrini, C., Kerstens, H. H. D., Janse, A., Dolman, M. E. M., Eising, S., Langenberg, K. P. S., van Tuil, M., Knops, R. R. G., van Scheltinga, S. T., Hiemcke-Jiwa, L. S., Flucke, U., ... Holstege, F. C. P. (2022). Mesenchymal tumor organoid models recapitulate rhabdomyosarcoma subtypes. *EMBO Molecular Medicine*, 14(10). <https://doi.org/10.15252/EMMM.202216001>
- Melo, F. D. S. E., Vermeulen, L., Fessler, E., & Medema, J. P. (2013). Cancer heterogeneity - A multifaceted view. *EMBO Reports*, 14(8), 686–695. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.92>
- Millán-Zambrano, G., Burton, A., Bannister, A. J., & Schneider, R. (2022). Histone post-translational modifications — cause and consequence of genome function. *Nature Reviews Genetics*, 23(9), 563–580. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00468-7>
- Mills, C. D. (2019). *M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm 1* [\[2\]](#).
- Monje, M. (2018). Open questions: Why are babies rarely born with cancer? *BMC Biology*, 16(1), 4–5. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0601-9>
- Murphy, J. B. (1914). Factors of resistance to heteroplastic tissue-grafting: Studies in tissue specificity. III. *Journal of Experimental Medicine*, 19(5), 513–522. <https://doi.org/10.1084/jem.19.5.513>
- Neal, J. T., Li, X., Zhu, J., Giangarra, V., Grzeskowiak, C. L., Ju, J., Liu, I. H., Chiou, S. H., Salahudeen, A. A., Smith, A. R., Deutsch, B. C., Liao, L., Zemek, A. J., Zhao, F., Karlsson, K., Schultz, L. M., Metzner, T. J., Nadauld, L. D., Tseng, Y. Y., ... Kuo, C. J. (2018). Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell*, 175(7), 1972–1988.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.021>
- Nishijo, K., Hosoyama, T., Bjornson, C. R. R., Schaffer, B. S., Prajapati, S. I., Bahadur, A. N., Hansen, M. S., Blandford, M. C., McCleish, A. T., Rubin, B. P., Epstein, J. A., Rando, T. A., Capecchi, M. R., & Keller, C. (2009). Biomarker system for studying muscle, stem cells, and cancer in vivo. *The FASEB*

Références bibliographiques

- Journal*, 23(8), 2681. <https://doi.org/10.1096/FJ.08-128116>
- Norrie, J. L., Nityanandam, A., Lai, K., Chen, X., Wilson, M., Stewart, E., Griffiths, L., Jin, H., Wu, G., Orr, B., Tran, Q., Allen, S., Reilly, C., Zhou, X., Zhang, J., Newman, K., Johnson, D., Brennan, R., & Dyer, M. A. (2021). Retinoblastoma from human stem cell-derived retinal organoids. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24781-7>
- Notta, F., Mullighan, C. G., Wang, J. C. Y., Poepl, A., Doulatov, S., Phillips, L. A., Ma, J., Minden, M. D., Downing, J. R., & Dick, J. E. (2011). Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature*, 469(7330), 362–367. <https://doi.org/10.1038/nature09733>
- Nuciforo, S., Fofana, I., Matter, M. S., Blumer, T., Calabrese, D., Boldanova, T., Piscuoglio, S., Wieland, S., Ringnalda, F., Schwank, G., Terracciano, L. M., Ng, C. K. Y., & Heim, M. H. (2018). Organoid Models of Human Liver Cancers Derived from Tumor Needle Biopsies. *Cell Reports*, 24(5), 1363–1376. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.001>
- Orgerie, M. B., Duchange, N., Pélicier, N., Chapet, S., Dorval, É., Rosset, P., Lemarié, É., Hervé, C., & Moutel, G. (2010). La réunion de concertation pluridisciplinaire : quelle place dans la décision médicale en cancérologie ? *Bulletin Du Cancer*, 97(2), 255–264. <https://doi.org/10.1684/BDC.2009.0957>
- Ovchinnikov, D. A. (2020). Genetically-modified cell lines: categorisation and considerations for characterisation. *Stem Cell Research*, 49, 102103. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102103>
- Parham, D. M. (2001). Pathologic classification of rhabdomyosarcomas and correlations with molecular studies. *Modern Pathology*, 14(5), 506–514. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880339>
- Parham, D. M., & Ellison, D. A. (2006). Rhabdomyosarcomas in adults and children: An update. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 130(10), 1454–1465. <https://doi.org/10.5858/2006-130-1454-riaaca>
- Park, S. E., Georgescu, A., & Huh, D. (2019). Organoids-on-a-chip. *Science*, 364(6444), 960–965. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAW7894>
- Patel, A. G., Chen, X., Huang, X., Clay, M. R., Komorova, N., Krasin, M. J., Pappo, A., Tillman, H., Orr, B. A., McEvoy, J., Gordon, B., Blankenship, K., Reilly, C., Zhou, X., Norrie, J. L., Karlstrom, A., Yu, J., Wodarz, D., Stewart, E., & Dyer, M. A. (2022). The myogenesis program drives clonal selection and drug resistance in rhabdomyosarcoma. *Developmental Cell*, 57(10), 1226-1240.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.04.003>
- Pauli, C., Hopkins, B. D., Prandi, D., Shaw, R., Fedrizzi, T., Sboner, A., Sailer, V., Augello, M., Puca, L.,

Références bibliographiques

- Rosati, R., McNary, T. J., Churakova, Y., Cheung, C., Triscott, J., Pisapia, D., Rao, R., Mosquera, J. M., Robinson, B., Faltas, B. M., ... Rubin, M. A. (2017). Personalized in vitro and in vivo cancer models to guide precision medicine. *Cancer Discovery*, 7(5), 462–477. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1154>
- Petragnano, F., Pietrantonì, I., Camero, S., Codenotti, S., Milazzo, L., Vulcano, F., Macloce, G., Giordani, I., Tini, P., Cheleschi, S., Gravina, G. L., Festuccia, C., Rossetti, A., Delle Monache, S., Ordinelli, A., Ciccarelli, C., Mauro, A., Barbara, B., Antinozzi, C., ... Marampon, F. (2020). Clinically relevant radioresistant rhabdomyosarcoma cell lines: Functional, molecular and immune-related characterization. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00683-6>
- Pham, T. Q., Robinson, K., Xu, L., Pavlova, M. N., Skapek, S. X., & Chen, E. Y. (2020). HDAC6 promotes growth, migration/invasion, and self-renewal of rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 2020 40:3, 40(3), 578–591. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01550-2>
- Post, Y., Puschhof, J., Beumer, J., Kerckamp, H. M., de Bakker, M. A. G., Slagboom, J., de Barbanson, B., Wevers, N. R., Spijkers, X. M., Olivier, T., Kazandjian, T. D., Ainsworth, S., Iglesias, C. L., van de Wetering, W. J., Heinz, M. C., van Ineveld, R. L., van Kleef, R. G. D. M., Begthel, H., Korving, J., ... Clevers, H. (2020). Snake Venom Gland Organoids. *Cell*, 180(2), 233-247.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.038>
- Puca, L., Bareja, R., Prandi, D., Shaw, R., Benelli, M., Karthaus, W. R., Hess, J., Sigouros, M., Donoghue, A., Kossai, M., Gao, D., Cyrta, J., Sailer, V., Vosoughi, A., Pauli, C., Churakova, Y., Cheung, C., Deonaraine, L. D., McNary, T. J., ... Beltran, H. (2018). Patient derived organoids to model rare prostate cancer phenotypes. *Nature Communications*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04495-z>
- Pulvertaft, R. J. V. (1964). CYTOLOGY OF BURKITT'S TUMOUR (AFRICAN LYMPHOMA). *The Lancet*, 283(7327), 238–240. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(64\)92345-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(64)92345-1)
- Ramadan, F., Fahs, A., Ghayad, S. E., & Saab, R. (2020). Signaling pathways in Rhabdomyosarcoma invasion and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39(1), 287–301. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09860-3>
- Ranftl, R. E., & Calvo, F. (2017). Chapter 15 an Organotypic Culture System. 1612, 199–212. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7021-6>
- Riopelle & Theriault. (1955). Alveolar rhabdomyosarcoma; a distinctive tumor type. *American Journal*

Références bibliographiques

- of Clinical Pathology*, 29(4), 356–366. <https://doi.org/10.1093/ajcp/29.4.356>
- Ryu, N. E., Lee, S. H., & Park, H. (2019). Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/CELLS8121620>
- Sampson, V. B., Kamara, D. F., & Kolb, E. A. (2013). Xenograft and genetically engineered mouse model systems of osteosarcoma and Ewing's sarcoma: Tumor models for cancer drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 8(10), 1181–1189. <https://doi.org/10.1517/17460441.2013.817988>
- Sante Publique France*, 2015. (n.d.).
- Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G. J., Van Es, J. H., Van Den Brink, S., Van Houdt, W. J., Pronk, A., Van Gorp, J., Siersema, P. D., & Clevers, H. (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, 141(5), 1762–1772. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2011.07.050>
- Savary. (2022). Complex Elucidation of Cells-of-Origin in Pediatric Soft Tissue Sarcoma: From Concepts to Real Life, Hide-and-Seek through Epigenetic and Transcriptional Reprogramming. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/ijms23116310>
- Schütte, M., Risch, T., Abdavi-Azar, N., Boehnke, K., Schumacher, D., Keil, M., Yildirim, R., Jandrasits, C., Borodina, T., Amstislavskiy, V., Worth, C. L., Schweiger, C., Liebs, S., Lange, M., Warnatz, H. J., Butcher, L. M., Barrett, J. E., Sultan, M., Wierling, C., ... Yaspo, M. L. (2017). Molecular dissection of colorectal cancer in pre-clinical models identifies biomarkers predicting sensitivity to EGFR inhibitors. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14262>
- Seino, T., Kawasaki, S., Shimokawa, M., Tamagawa, H., Toshimitsu, K., Fujii, M., Ohta, Y., Matano, M., Nanki, K., Kawasaki, K., Takahashi, S., Sugimoto, S., Iwasaki, E., Takagi, J., Itoi, T., Kitago, M., Kitagawa, Y., Kanai, T., & Sato, T. (2018). Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. *Cell Stem Cell*, 22(3), 454-467.e6. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2017.12.009>
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S. A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6425–6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
- Sharp, R., RECIO1, J. A., JHAPPAN1, C., OTSUKA1, T., LIU1, S., YU1, YANLINLIU1, W., ANVER2, M., NAVID3, F., HELMAN3, L. J., & RMERLINO, O. A. D. & G. (2002). Synergism between *INK4a* / *ARF* inactivation and aberrant *HGF* / *SF* signaling in rhabdomyosarcomagenesis. 8(11), 6–11.

Références bibliographiques

<https://doi.org/10.1038/nm>

- Shi, Z.-D., Pang, K., Wu, Z.-X., Dong, Y., Hao, L., Qin, J.-X., Wang, W., Chen, Z.-S., & Han, C.-H. (2023). Tumor cell plasticity in targeted therapy-induced resistance: mechanisms and new strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023 8:1, 8(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01383-x>
- Shimokawa, M., Ohta, Y., Nishikori, S., Matano, M., Takano, A., Fujii, M., Date, S., Sugimoto, S., Kanai, T., & Sato, T. (2017). Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells. *Nature*, 545(7653), 187–192. <https://doi.org/10.1038/nature22081>
- Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M. G., Rimoldi, M., Biswas, S. K., Allavena, P., & Mantovani, A. (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Seminars in Cancer Biology*, 18(5), 349–355. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.004>
- Silen, M. (1996). Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. *Newton*, 31(3), 456. [https://doi.org/10.1016/s0022-3468\(96\)90815-5](https://doi.org/10.1016/s0022-3468(96)90815-5)
- Simard, F. A., Richert, I., Vandermoeten, A., Decouvelaere, A. V., Michot, J. P., Caux, C., Blay, J. Y., & Dutour, A. (2017). Description of the immune microenvironment of chondrosarcoma and contribution to progression. *Oncolimmunology*, 6(2), 1–10. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1265716>
- Skapek, S. X., Ferrari, A., Gupta, A. A., Lupo, P. J., Butler, E., Shipley, J., Barr, F. G., & Hawkins, D. S. (2019). Rhabdomyosarcoma. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/S41572-018-0051-2>
- Solary, É. (2014). Une approche réductionniste du cancer. *Medecine/Sciences*, 30(6–7), 683–687. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143006021>
- Spunt, S. L., Skapek, S. X., & Coffin, C. M. (2008). Pediatric Nonrhabdomyosarcoma Soft Tissue Sarcomas. *The Oncologist*, 13(6), 668–678. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2007-0182>
- Steliarova-Foucher, E., Colombet, M., Ries, L. A. G., Moreno, F., Dolya, A., Bray, F., Hesselting, P., Shin, H. Y., Stiller, C. A., Bouzbid, S., Hamdi-Cherif, M., Hablas, A., Chirpaz, E., Buziba, N., Chesumbai, G. C., Manraj, S. S., Reynders, D., Wabinga, H. R., Chokunonga, E., ... Masuyer, E. (2017). International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. *The Lancet. Oncology*, 18(6), 719–731. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30186-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30186-9)
- Steliarova-Foucher, E., Stiller, C., Lacour, B., & Kaatsch, P. (2005). International classification of childhood cancer, third edition. *Cancer*, 103(7), 1457–1467.

Références bibliographiques

<https://doi.org/10.1002/CNCR.20910>

- Stevens, B. M., Jones, C. L., Pollyea, D. A., Culp-Hill, R., D'Alessandro, A., Winters, A., Krug, A., Abbott, D., Goosman, M., Pei, S., Ye, H., Gillen, A. E., Becker, M. W., Savona, M. R., Smith, C., & Jordan, C. T. (2020). Fatty acid metabolism underlies venetoclax resistance in acute myeloid leukemia stem cells. *Nature Cancer*, *1*(12), 1176. <https://doi.org/10.1038/S43018-020-00126-Z>
- Stewart, E., Federico, S. M., Chen, X., Shelat, A. A., Bradley, C., Gordon, B., Karlstrom, A., Twarog, N. R., Clay, M. R., Bahrami, A., Freeman, B. B., Xu, B., Zhou, X., Wu, J., Honnell, V., Ocarz, M., Blankenship, K., Dapper, J., Mardis, E. R., ... Dyer, M. A. (2017). Orthotopic patient-derived xenografts of paediatric solid tumours. *Nature*, *549*(7670), 96–100. <https://doi.org/10.1038/nature23647>
- Stout. (1946). Rhabdomyosarcoma of the skeletal muscles. *Annals of Surgery*, *123*, 447–472. <https://doi.org/10.1097/00000658-194603000-00011>
- Strahm, B., & Malkin, D. (2006). Hereditary cancer predisposition in children: Genetic basis and clinical implications. *International Journal of Cancer*, *119*(9), 2001–2006. <https://doi.org/10.1002/ijc.21962>
- Sundberg, K. K., Lampic, C., Björk, O., Arvidson, J., & Wettergren, L. (2009). Positive and negative consequences of childhood cancer influencing the lives of young adults. *European Journal of Oncology Nursing*, *13*(3), 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.ejon.2008.05.009>
- Terezakis, S., & Ladra, M. (2018). Pediatric rhabdomyosarcoma. *Pediatric Oncology*, *9783319435442*, 21–43. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43545-9_3
- Thakur, M. Das, Franz, C. J., Brennan, L., Brouwer-Visser, J., Tam, R., Korski, K., Koeppen, H., Ziai, J., Babitzki, G., Ranchere-Vince, D., Vasiljevic, A., Dijoud, F., Marec-Bérard, P., Rochet, I., Cannarile, M. A., & Marabelle, A. (2022). Immune contexture of paediatric cancers. *European Journal of Cancer*, *170*, 179–193. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2022.03.012>
- Thankamony, A. P., Saxena, K., Murali, R., Jolly, M. K., & Nair, R. (2020). Cancer Stem Cell Plasticity – A Deadly Deal. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *7*, 79. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2020.00079/EPUB>
- Toolan, H. W. (1953). Growth of Human Tumors in Cortisone-treated Laboratory Animals: The Possibility of Obtaining Permanently Transplantable Human Tumors. *Cancer Research*, *13*, 389–394.
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global cancer incidence and mortality rates

Références bibliographiques

- and trends - An update. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 25(1), 16–27. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>
- Tsokos, M., Webber, B. L., Parham, D. M., Wesley, R. A., Miser, A., Miser, J. S., Etcubanas, E., Kinsella, T., Grayson, J., Glatstein, E., Pizzo, P. A., & Triche, T. J. (1992). Rhabdomyosarcoma. A new classification scheme related to prognosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 116(8), 847–855. <https://europepmc.org/article/med/1497467>
- Turhan, A. G., Hwang, J. W., Chaker, D., Tasteyre, A., Latsis, T., Griscelli, F., Desterke, C., & Bennaceur-Griscelli, A. (2021). iPSC-Derived Organoids as Therapeutic Models in Regenerative Medicine and Oncology. *Frontiers in Medicine*, 8(October), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.728543>
- Tuveson, D., & Clevers, H. (2019). Cancer modeling meets human organoid technology. *Science (New York, N.Y.)*, 364(6444), 952–955. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAW6985>
- University of Birmingham. (2021). *FaR-RMS*.
- Ursano, R. J. (2012). “Science calls her HeLa.” *Psychiatry*, 75(2), 101–102. <https://doi.org/10.1521/PSYC.2012.75.2.101>
- Vakkila, J., Jaffe, R., Michelow, M., & Lotze, M. T. (2006). Pediatric cancers are infiltrated predominantly by macrophages and contain a paucity of dendritic cells: A major nosologic difference with adult tumors. *Clinical Cancer Research*, 12(7 1), 2049–2054. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1824>
- Venning, F. A., Wullkopf, L., & Erler, J. T. (2015). Targeting ECM disrupts cancer progression. *Frontiers in Oncology*, 5(OCT), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00224>
- Vogel, D. Y. S., Glim, J. E., Stavenuiter, A. W. D., Breur, M., Heijnen, P., Amor, S., Dijkstra, C. D., & Beelen, R. H. J. (2014). Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology*, 219(9), 695–703. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.05.002>
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6127), 1546. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1235122>
- Waddington, C. H. (2012). The epigenotype. 1942. *International Journal of Epidemiology*, 41(1), 10–13. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr184>
- Walter, D., Satheesha, S., Albrecht, P., Bornhauser, B. C., & 'alessandro, D. (2011). CD133 Positive Embryonal Rhabdomyosarcoma Stem-Like Cell Population Is Enriched in Rhabdospheres. *PLoS*

Références bibliographiques

- ONE*, 6(5), 19506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019506>
- Watson, S., Perrin, V., Guillemot, D., Reynaud, S., Coindre, J. M., Karanian, M., Guinebretière, J. M., Freneaux, P., Le Loarer, F., Bouvet, M., Galmiche-Rolland, L., Larousserie, F., Longchamp, E., Ranchere-Vince, D., Pierron, G., Delattre, O., & Tirode, F. (2018). Transcriptomic definition of molecular subgroups of small round cell sarcomas. *The Journal of Pathology*, 245(1), 29–40. <https://doi.org/10.1002/PATH.5053>
- Wei, Y., Qin, Q., Yan, C., Hayes, M. N., Garcia, S. P., Xi, H., Do, D., Jin, A. H., Eng, T. C., McCarthy, K. M., Adhikari, A., Onozato, M. L., Spentzos, D., Neilsen, G. P., Iafrate, A. J., Wexler, L. H., Pyle, A. D., Suvà, M. L., Dela Cruz, F., ... Langenau, D. M. (2022). Single-cell analysis and functional characterization uncover the stem cell hierarchies and developmental origins of rhabdomyosarcoma. *Nature Cancer*, 3(8), 961–975. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00414-w>
- Weiss, W. A., Aldape, K., Mohapatra, G., Feuerstein, B. G., & Bishop, J. M. (1997). Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO Journal*, 16(11), 2985–2995. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.11.2985>
- Whittle, S. B., Hicks, M. J., Roy, A., Vasudevan, S. A., Reddy, K., & Venkatramani, R. (2019). Congenital spindle cell rhabdomyosarcoma. *Pediatric Blood & Cancer*, 66(11), e27935. <https://doi.org/10.1002/PBC.27935>
- WHO. (2019). Handling and assessment of human primary prostate organoid culture. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(143). <https://doi.org/10.3791/59051>
- Williams, R. F., Fernandez-Pineda, I., & Gosain, A. (2016). Pediatric Sarcomas. *Surgical Clinics of North America*, 96(5), 1107–1125. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2016.05.012>
- Williamson, D., Missiaglia, E., De Reyniès, A., Pierron, G., Thuille, B., Palenzuela, G., Thway, K., Orbach, D., Laé, M., Fréneaux, P., Pritchard-Jones, K., Oberlin, O., Shipley, J., & Delattre, O. (2010). Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(13), 2151–2158. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.3814>
- Windle, J. J., Albert, D. M., O'Brien, J. M., Marcus, D. M., Disteché, C. M., Bernards, R., & Mellon, P. L. (1990). Retinoblastoma in transgenic mice. *Nature*, 343(6259), 665–669. <https://doi.org/10.1038/343665a0>
- World Health Organization. (2020). Framework: WHO Global Initiative for Childhood Cancer. In *CureAll*

Références bibliographiques

framework: WHO global initiative for childhood cancer: increasing access, advancing quality, saving lives. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/347370>

Wuputra, K., Ku, C. C., Kato, K., Wu, D. C., Saito, S., & Yokoyama, K. K. (2021). Translational models of 3-D organoids and cancer stem cells in gastric cancer research. *Stem Cell Research and Therapy*, *12*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02521-4>

Yechieli, R. L., Mandeville, H. C., Hiniker, S. M., Bernier-Chastagner, V., McGovern, S., Scarzello, G., Wolden, S., Cameron, A., Breneman, J., Fajardo, R. D., & Donaldson, S. S. (2021). Rhabdomyosarcoma. *Pediatric Blood and Cancer*, *68*(S2), 1–8. <https://doi.org/10.1002/pbc.28254>

Zarzosa, P., Navarro, N., Giralto, I., Molist, C., Almazán-Moga, A., Vidal, I., Soriano, A., Segura, M. F., Hladun, R., Villanueva, A., Gallego, S., & Roma, J. (2017). Patient-derived xenografts for childhood solid tumors: a valuable tool to test new drugs and personalize treatments. *Clinical and Translational Oncology*, *19*(1), 44–50. <https://doi.org/10.1007/s12094-016-1557-2>

Zhang, L., Lu, Q., & Chang, C. (2020). Epigenetics in Health and Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1253*, 3–55. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3449-2_1

Zhang, M., Vandana, J. J., Lacko, L., & Chen, S. (2020). Modeling cancer progression using human pluripotent stem cell-derived cells and organoids. *Stem Cell Research*, *49*, 102063. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102063>

ANNEXES

ANNEXES

Publications:

- Clara Savary¹, Paul Huchedé¹, **Léa Luciana**¹, Arthur Tourbez¹, Clémence Deligne, Cécile Picard, Thomas Diot, Claire Coquet, Nina Meynard, MarionLe Grand, Laurie Tonon, Nicolas Gadot, Cyril Degletagne, Sophie Léon, Valéry Attignon, Alexandra Bomane, Isabelle Rochet, Kevin Müller, Virginie Mournetas, Christophe Bergeron, Paul Rinaudo, Aurélie Dutour, Martine Cordier Bussat, Frédérique Dijoud, Nadège Corradini, Delphine Maucort Boulch, Eddy Pasquier, Jean-Yves Blay, Marie Castets, Laura Broutier.
« Fusion-negative Rhabdomyosarcoma 3D-organoids as an innovative model to predict resistance to cell death inducers » En révisions, 2022
- Alejandro Lopez Gonzalez¹, **Léa Luciana**¹, Clémentine Le Nevé, Julie Valantin, Laura Francols, Nicolas Gadot, Christophe Vanbelle, Laurianne Davignon, Laura Broutier.
« Staining and High-Resolution Imaging of Three-Dimensional Organoid and Spheroid Models », JoVe, 2021.
- Delilah Hendriks, Jos F. Brouwers, Karien Hamer, Maarten H. Geurts, **Léa Luciana**, Simone Massalini , Carmen López-Iglesias , Peter J. Peters, Maria J. Rodríguez-Colman, Susana Chuva de Sousa Lopes, Benedetta Artegiani & Hans Clevers.
« Engineered human hepatocyte organoids enable CRISPR-based target discovery and drug screening for steatosis » Nature Biotechnology, 2023

Posters :

- Présentation de e-poster sur l'article "*Fusion-negative Rhabdomyosarcoma 3D-organoids as an innovative model to predict resistance to cell death inducers*", 2^{ème} prix, organisé par le LYRICAN, Lyon, 2022

Encadrement :

- Claire Coquet, Master 2 Cancer Innovation Thérapeutiques en Cancérologie, Février-Août 2021

Présentations orales :

- Présentation du projet de thèse pour Youth4Kids, Mai 2021
- Vulgarisation scientifique pour les réseaux sociaux, organisé par la ligue contre le cancer, Août 2022

Séminaires et colloques auxquels j'ai assisté:

- Colloque Youth4Kids, à destination des jeunes chercheurs, Mai 2021, Lyon
- Colloque Youth4Kids, à destination des jeunes chercheurs, Mai 2022, Lyon
- Séminaire React4Kids, « Comprendre pour soigner », Septembre 2022, Strasbourg
- Colloque Youth4Kids, à destination des jeunes chercheurs, Mai 2023, Lyon

Formations transversales :

- Ethique de la recherche
- Intégrité scientifique
- Management des équipes
- Rédiger un article scientifique

Engineered human hepatocyte organoids enable CRISPR-based target discovery and drug screening for steatosis

Received: 1 April 2022

Accepted: 19 January 2023

Published online: 23 February 2023

 Check for updates

Delilah Hendriks^{1,2}✉, Jos F. Brouwers^{3,4}, Karien Hamer^{1,2}, Maarten H. Geurts^{1,2}, Léa Luciana^{1,2}, Simone Massalini⁵, Carmen López-Iglesias⁶, Peter J. Peters⁶, Maria J. Rodríguez-Colman⁴, Susana Chuva de Sousa Lopes⁷, Benedetta Artergiani^{1,5,10}✉ & Hans Clevers^{1,2,5,8,9,10}✉

The lack of registered drugs for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is partly due to the paucity of human-relevant models for target discovery and compound screening. Here we use human fetal hepatocyte organoids to model the first stage of NAFLD, steatosis, representing three different triggers: free fatty acid loading, interindividual genetic variability (PNPLA3 I148M) and monogenic lipid disorders (*APOB* and *MTTP* mutations). Screening of drug candidates revealed compounds effective at resolving steatosis. Mechanistic evaluation of effective drugs uncovered repression of de novo lipogenesis as the convergent molecular pathway. We present FatTracer, a CRISPR screening platform to identify steatosis modulators and putative targets using *APOB*^{-/-} and *MTTP*^{-/-} organoids. From a screen targeting 35 genes implicated in lipid metabolism and/or NAFLD risk, FADS2 (fatty acid desaturase 2) emerged as an important determinant of hepatic steatosis. Enhancement of FADS2 expression increases polyunsaturated fatty acid abundance which, in turn, reduces de novo lipogenesis. These organoid models facilitate study of steatosis etiology and drug targets.

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a major cause of chronic liver disease worldwide, with >25% of the global population affected¹. NAFLD is a progressive disease. Starting with the accumulation of fat within the liver, hepatic steatosis, it can develop into nonalcoholic steatohepatitis (NASH), eventually resulting in liver failure or cancer. NAFLD risk is associated with different factors including nutritional overload, genetic predisposition and genetic lipid disorders, as well

as environmental factors². In particular, dietary habits such as high caloric intake and high carbohydrate/fat consumption are key risks³. Indeed, NAFLD is epidemiologically associated with obesity, type 2 diabetes and metabolic syndrome features⁴. Interindividual differences in susceptibility can be partly explained by genetic variation. Genome-wide association studies have revealed multiple NAFLD risk loci⁵, with a single-nucleotide polymorphism (SNP) in the *PNPLA3* gene

¹Hubrecht Institute, Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, Utrecht, The Netherlands. ²Oncode Institute, Utrecht, The Netherlands. ³Research Group Analysis Techniques in the Life Sciences, School of Life Sciences and Technology, Avans University of Applied Sciences, Breda, The Netherlands. ⁴Molecular Cancer Research, Center for Molecular Medicine, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands. ⁵The Princess Maxima Center for Pediatric Oncology, Utrecht, The Netherlands. ⁶The Maastricht Multimodal Molecular Imaging Institute, Maastricht University, Maastricht, The Netherlands. ⁷Department of Anatomy and Embryology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands. ⁸University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands. ⁹Present address: Pharma, Research and Early Development of F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland. ¹⁰These authors contributed equally: Benedetta Artergiani, Hans Clevers ✉ e-mail: d.hendriks@hubrecht.eu; b.a.artegiani@prinsesmaximacentrum.nl; h.clevers@hubrecht.eu

as one of the strongest links⁶. Monogenic disorders of lipid metabolism can also predispose to NAFLD^{7,8}, with sometimes already severe phenotypes in pediatric patients⁹. These include familial hypobetalipoproteinemia (incidence 1:500–1:1,000)¹⁰, predominantly caused by *APOB* mutations, and abetalipoproteinemia (incidence <1:100,000)¹¹, caused by *MTTP* mutations.

Despite its high and rising prevalence¹², effective drug therapies for any stage of NAFLD are lacking. Recent drug failures in clinical trials, such as obeticholic acid for NASH therapy¹³, underscore the current complexity in combatting NAFLD. Most emphasis has been placed on tackling the more advanced and clinical NASH stage^{14,15}, while targeting disease at an early stage could become of future importance. Accordingly, efforts are being taken to identify biomarkers of early NAFLD¹⁶. Therapies effective for steatosis are therefore of considerable interest in regard to minimization of liver damage and disease progression.

NAFLD biology and putative drug therapies have predominantly been studied in rodents using genetic, chemically induced or diet-driven models¹⁷. However, inherent interspecies differences, amongst others in their metabolism, complicate translation of these findings to humans. Animal models also do not represent scalable systems for rapid and high-throughput target discovery. More recently, relevant *in vitro* human models of NAFLD relying on primary cells or pluripotent stem cell-derived cells have emerged^{18–22}, but their applicability to systematic drug screenings remains unproven. In addition, a drawback of these models is their lack of expansion capacity and the difficulty in genetic engineering, which hampers genetic screens for target discovery. Human fetal hepatocyte organoids represent a culture system that recapitulates key features of mature *in vivo* hepatocytes²³, including lipid metabolism profiles (Supplementary Fig. 1a,b). Their long-term expansion capacity has enabled us to genetically engineer these organoids using various CRISPR approaches^{24–26}.

Here, we explored these features to model the first stage of NAFLD. We modeled a variety of different steatosis triggers and studied their interplay: (1) free fatty acid (FFA) loading to approximate a Western diet, (2) interindividual genetic risk through modeling the top risk variant, *PNPLA3* I148M and (3) monogenic lipid disorders through creation of *APOB* or *MTTP* knockout (KO) organoids. We performed drug screening and identified compounds effective at resolving steatosis across these different models, while highlighting that *PNPLA3* I148M impairs drug response. Through drug treatment-based clustering analysis of whole transcriptomes, we identified common classes of drug action and noted putative adverse drug effects. This approach revealed repression of *de novo* lipogenesis (DNL) as the common mechanism of action of the effective steatosis-reducing compounds. Finally, we leveraged the *APOB*- and *MTTP*-mutant organoids to establish a CRISPR-based screening platform to identify steatosis modulators/targets and to evaluate NAFLD risk genes. This platform, termed FatTracer, identified *FADS2* as a critical steatosis modulator. While *FADS2* loss aggravated steatosis phenotypes, its overexpression resulted in steatosis reduction.

Results

FFA-induced steatosis organoids

Different and multiple causes underlie the development of hepatic steatosis. We set out to develop models that could capture both exogenous and genetic triggers of human hepatic steatosis using human fetal hepatocyte organoids (Fig. 1a). Of note, characterization of the genotypes of the four different organoid lines used throughout this study revealed all donors to not be carriers of three well-established coding NAFLD risk SNPs (*PNPLA3* I148M, TM6SF2 E167K and GCKR P446L), with the exception of one donor being a heterozygous carrier of GCKR P446L (Supplementary Fig. 1c and Supplementary Table 1). The hallmark feature of steatosis is triglyceride (TAG) accumulation. Potential sources contributing to the hepatic fatty acid pool for TAG synthesis include (1) dietary fatty acids taken up in the form of chylomicron remnants from the small intestine; (2) the plasma FFA pool comprising

those derived from lipolysis of adipose tissue as well as those from spillover of lipoprotein lipase-generated FFAs from chylomicrons; and (3) hepatic DNL using carbohydrate sources²⁷. Serum FFAs are the main contributor to the hepatic fatty acid pool and are elevated in NAFLD patients, strongly linked to dietary and lifestyle habits^{27,28}. We thus defined a FFA-induced steatosis model by challenging wild-type (WT) organoids with a concentrated mixture of oleic acid and palmitic acid (1:1 ratio), two of the most abundant FFAs in the plasma pool²⁹. While at low concentrations organoids were able to process externally provided FFAs, at higher concentrations hepatocytes progressively accumulated lipids, as visualized by Nile Red staining (Fig. 1b and Supplementary Fig. 2a). Quantification of the steatosis level (defined as the area of lipid droplet coverage within an organoid) revealed a progressive induction of steatosis, reaching >40% at the highest FFA challenge (Fig. 1c). Concomitant with the progressive development of steatosis, the organoids displayed impaired proliferation capacity as confirmed by a sharp reduction in Ki-67⁺ cells (Supplementary Fig. 2a,b), which may be explained by the lipotoxic effects of certain fatty acids, especially saturated ones such as palmitic acid present in the FFA mixture³⁰. FFA exposure reproducibly induced similar levels of steatosis in organoids from different donors (Supplementary Fig. 2c).

Personalized *PNPLA3* organoids

We next focused on modeling genetic predisposition to NAFLD. The rs738409 variant in the *PNPLA3* gene encoding the I148M variant is the strongest genetic risk factor to date⁶. Mouse studies have provided important indications into its role, such as alterations in TAG metabolism following overexpression of the human I148M variant³¹. A recent study repopulating mouse livers with human hepatocytes, either from WT (I148I/I148I) or homozygous I148M donors, found that the I148M variant exacerbated steatohepatitis³². We turned to diverse CRISPR approaches to generate a complete panel of isogenic human *PNPLA3* variant organoids. We used prime editing³³ to introduce the I148M variant in organoids from donors with a I148I/I148I genotype to generate both heterozygous (*PNPLA3*^{WT/I148M}) and homozygous (*PNPLA3*^{I148M/I148M}) variant organoids, while similarly transfected but unedited organoids (*PNPLA3*^{WT}) were used as internal controls, thereby covering all possible genotypes (Supplementary Fig. 3a). Within this isogenic setting, hepatocytes from two different donors were efficiently prime edited (Fig. 1d,e and Supplementary Fig. 3b). We also generated *PNPLA3* KO (*PNPLA3*^{-/-}) organoids using conventional CRISPR–Cas9 (ref. 24) for comparative analysis (Fig. 1d,e and Supplementary Fig. 3a), and confirmed the loss of *PNPLA3* protein as assessed by antibody staining (Supplementary Fig. 3c).

The *PNPLA3* genotype directly influenced lipid levels within hepatocytes. As expected, *PNPLA3*^{WT} organoids do not accumulate lipids in homeostasis (that is, under standard culture conditions). Instead, all three engineered *PNPLA3* genotypes spontaneously yielded lipid phenotypes (Fig. 1d and Supplementary Fig. 3d). *PNPLA3*^{-/-} organoids most extensively accumulated lipids (around 8% steatosis), followed by homozygous I148M organoids (around 5%) and heterozygous I148M organoids (around 2%) (Fig. 1f). Lipid phenotypes were consistent across all generated clonal lines for the different *PNPLA3* genotypes (Fig. 1f and Supplementary Fig. 3e). The accumulation of *PNPLA3* protein on lipid droplets has been proposed as a mechanism underlying the increased steatosis risk in I148M carriers³⁴. In *PNPLA3*^{I148M/I148M} organoids, we found that many of the small lipid droplets colocalized with increased intensity of *PNPLA3* protein signal (Fig. 1g and Supplementary Fig. 3f).

We next interrogated the interplay between *PNPLA3* genotypes and FFA-induced steatosis. Both *PNPLA3*^{WT/I148M} and *PNPLA3*^{I148M/I148M} organoids displayed increased sensitivity to a mild FFA challenge (320 μ M), developing more severe steatosis, as compared with their *PNPLA3*^{WT} counterparts (Fig. 1h). Similar evidence on homozygous *PNPLA3* I148M was recently observed in two-dimensional pluripotent

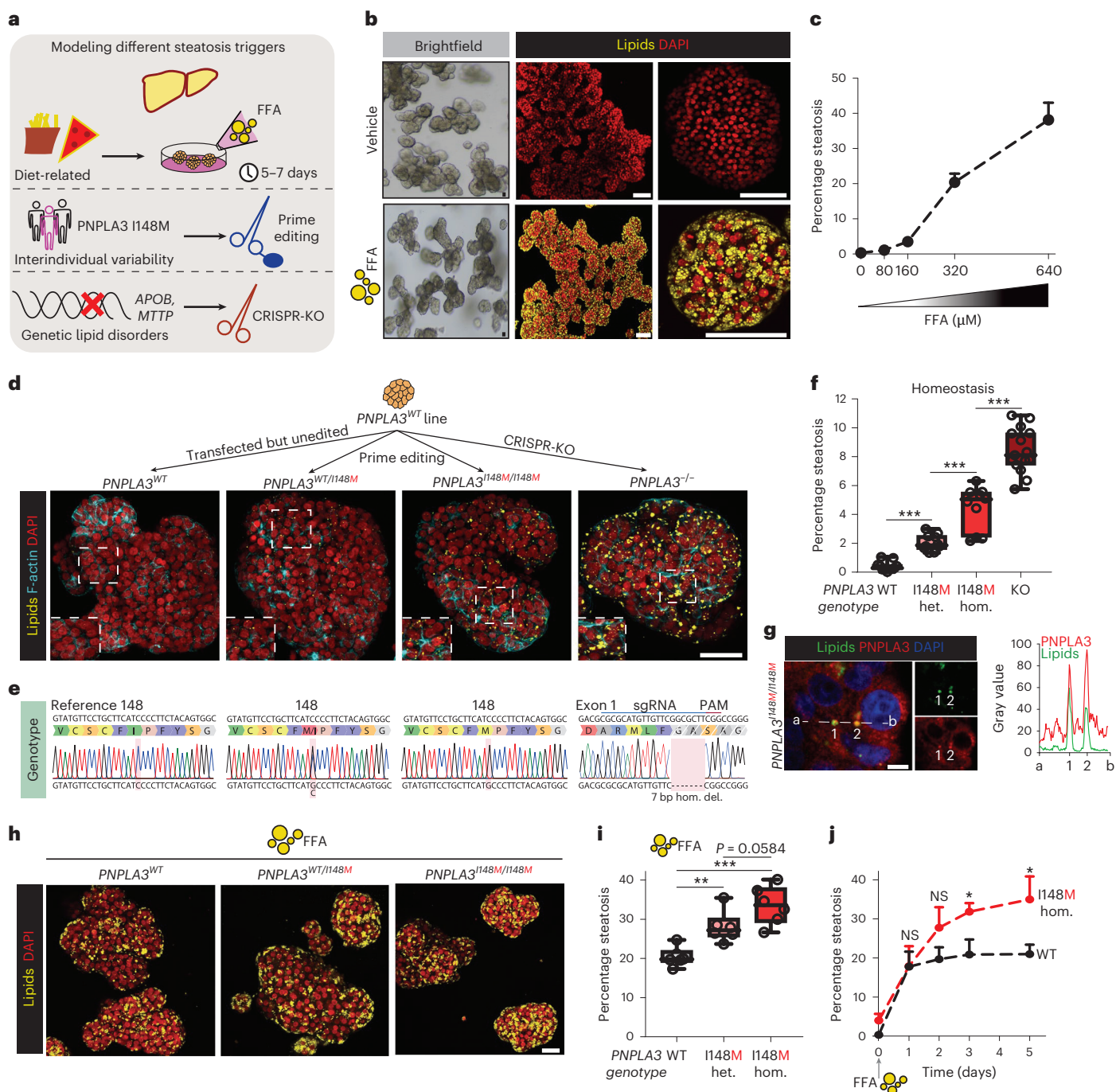


Fig. 1 | Precision gene editing in human fetal hepatocyte organoids evaluates genetic predisposition to steatosis. **a**, Strategy used to generate a panel of human hepatic steatosis organoid models. **b**, Brightfield images and Nile Red lipid staining of vehicle-treated and FFA-exposed (640 μM) WT organoids. **c**, Quantification of the percentage of steatosis after exposure to increasing FFA concentrations in WT organoids (mean \pm s.d.). $n = 6$ independent replicates from two donors. **d**, Nile Red lipid staining overlaid with phalloidin of PNPLA3 variant organoids generated from the same donor. **e**, Sanger trace sequences of the PNPLA3 genotypes of PNPLA3 variant organoids. **f**, Quantification of the percentage of spontaneous steatosis in PNPLA3 variant organoids. $n = 11$ independent replicates for PNPLA3^{WT} and PNPLA3^{WT/I148M}, $n = 10$ independent replicates for PNPLA3^{I148M/I148M}, $n = 15$ independent replicates for PNPLA3^{KO} from either two (WT, WT/I148M, I148M/I148M) or three (KO) clonal lines from two donors. Two-tailed nested t -test: KO versus WT and I148M/I148M versus WT, *** $P < 0.0001$; I148M/I148M versus WT/I148M, *** $P = 0.0001$. **g**, Left, immunofluorescence staining for PNPLA3 and lipid droplet visualization with

BioTracker 488 Green Lipid Droplet Dye in PNPLA3^{I148M/I148M} organoids. Right, quantification of the fluorescence signal from a to b through lipid droplets (1 and 2). **h**, Nile Red lipid staining of FFA-exposed (320 μM) PNPLA3 variant organoids. **i**, Quantification of the percentage of steatosis following FFA exposure in PNPLA3 variant organoids. $n = 6$ independent replicates from two clonal lines from two donors per genotype. Two-tailed nested t -test: WT/I148M versus WT, ** $P = 0.0026$; I148M/I148M versus WT, *** $P = 0.0002$; I148M/I148M versus WT/I148M, $P = 0.0584$. **j**, Quantification of the percentage of steatosis over time after FFA exposure (320 μM) in PNPLA3^{WT} and PNPLA3^{I148M/I148M} organoids generated from the same donor (mean \pm s.d.). $n = 3$ independent replicates per genotype. Two-tailed t -test: day 3, * $P = 0.0128$; day 5, * $P = 0.0191$; NS, not significant. **f, i**, The box indicates the 25–75th percentiles, the center line indicates the median and the whiskers indicate minimum and maximum values. **b, d, g, h**, Representative of $n = 10$, 6, 3 and 6 independent experiments, respectively. Scale bars, 100 μm (**b**), 50 μm (**d**), 5 μm (**g**) and 25 μm (**h**). PAM, protospacer adjacent motif; hom., homozygous; het., heterozygous; del., deletion.

stem cell-derived hepatocytes²². Quantification of steatosis levels following FFA challenge confirmed these observations and indicated a trend of more severe steatosis in the I148M variant in homozygosity as compared with that in heterozygosity (Fig. 1i). We then evaluated the time-dependent effects of steatosis induction in homozygous I148M organoids in relation to their WT counterparts, to understand the dynamics of the aggravated steatosis phenotype. While after 1 day of FFA exposure both PNPLA3 variant organoids presented with a similar steatosis degree, fat levels were consistently elevated in *PNPLA3*^{I148M/I148M} organoids from day 2 onwards (Fig. 1j). This may indicate that the I148M variant impairs the capacity of hepatocytes to secrete/hydrolyze lipids or, alternatively, that the balance between de novo synthesis and lipid disposal is perturbed. Changes in the capacity of lipid particle assembly and export have been reported in I148M carriers^{35,36}, and mouse studies likewise have hinted at an impairment in TAG hydrolysis³¹.

Altogether, these comparative studies on the different *PNPLA3* genotypes engineered at the endogenous locus suggest that the I148M variant phenocopied—but to a lesser extent—the effect of *PNPLA3* loss. KO of the *Pnpla3* gene in mice does not induce steatosis³⁷ and therefore depletion of *PNPLA3* has been suggested as a putative clinical approach^{34,38}. Our findings challenge this idea, because complete loss of *PNPLA3* protein in human hepatocytes induces steatosis (Fig. 1d–f), highlighting important interspecies differences.

Genetic steatosis organoids

We next aimed to model two monogenic lipid disorders that predispose to NAFLD: familial hypobetalipoproteinemia and abetalipoproteinemia^{7,8}. These diseases most commonly result from monoallelic or, more rarely, biallelic, loss of *APOB* and *MTTP*, respectively. Their gene products, ApoB and MTP, are critically involved in the packaging of TAG into very-low-density lipoprotein (VLDL) particles. The resulting impaired VLDL secretion in turn confers susceptibility to steatosis. We first addressed the VLDL secretory capacity of WT organoids. To this end, we cultured organoids for 3 days without changing the culture medium, collected the supernatant and performed lipidomics on neutral lipids (Fig. 2a). Principle component analysis (PCA) revealed distinct clustering of the lipid profiles of blank medium (which contained very few lipid species (Supplementary Fig. 4a)) versus the medium in which WT organoids were maintained (Fig. 2b). Indeed, TAG content in the medium was enriched by approximately 25-fold (Fig. 2c and Supplementary Fig. 4a,b), confirming that WT organoids actively secrete VLDL particles.

We then proceeded to CRISPR-engineer WT organoids to generate *APOB*- and *MTTP*-mutants (Supplementary Fig. 5a). When hepatocytes were targeted with either *APOB*-single-guide RNA (sgRNA)/Cas9 or *MTTP*-sgRNA/Cas9, we immediately noticed distinct outgrowth of darker organoids (Supplementary Fig. 5b). We derived clonal lines from these organoids, which presented with many lipid droplets visible under brightfield microscopy (Fig. 2d). Lipid accumulation in these lines occurred spontaneously under homeostatic conditions, without any exogenous stimulus. Genotyping and immunofluorescence staining revealed the presence of homozygous *APOB* or *MTTP* mutations and concomitant loss of protein expression, respectively (Supplementary Fig. 5c–f). Of note, heterozygous *APOB*^{+/−} organoids accumulated only few lipid droplets (Supplementary Fig. 5g). Nile Red staining confirmed extensive lipid accumulation within *APOB*^{−/−} and *MTTP*^{−/−} organoids (Fig. 2d), reaching a steatosis level of around 30% for both mutants (Fig. 2e). Transmission electron microscopy further visualized the abundant presence of lipid droplets of various size throughout the cytoplasm, as well as in the nucleus, of *APOB*^{−/−} organoids (Supplementary Fig. 5h). In addition, while in WT organoids VLDL particles were readily detectable in typical vesicles around the Golgi apparatus (Supplementary Fig. 5h), these were completely absent in *APOB*^{−/−} organoids, further validating the consequences of *APOB* KO in the organoids. We confirmed these lipid phenotypes by generating *APOB*- and

MTTP-mutants from multiple donors (Supplementary Fig. 6a,b). Despite their extensive steatosis, hepatocyte proliferation capacity was unaffected (Supplementary Fig. 6c), contrasting with the FFA-induced steatosis model. This suggested that different underlying sources of lipid accumulation induce distinct cell responses. In line, it has been recognized that not all lipid species are equally toxic³⁹.

We reasoned that DNL should be the source of lipid accumulation in *APOB*^{−/−} and *MTTP*^{−/−} organoids, because the culture medium itself contains minimal lipid sources and only small amounts of essential fatty acids (that is, those that cells cannot synthesize). Culturing these mutants in the complete absence of the potential confounding lipid sources (for example, RSPO1-conditioned medium) accordingly did not alter the steatosis phenotypes (Supplementary Fig. 4c). To directly probe the origin of the accumulated lipids and to assess changes in lipid profiles, we subjected both *APOB*^{−/−} and WT organoids to lipidomic analyses, this time interrogating both the intracellular lipid profiles (organoid pellets) and secreted lipid profiles (supernatants) (Fig. 2a). Notably, PCA revealed distinct clustering where the intracellular lipid profiles of *APOB*^{−/−} organoids closely clustered with the supernatants of WT organoids, confirming defective lipid export in ApoB mutants (Fig. 2f and Supplementary Fig. 4a). Quantification of the lipid content corroborated the extensive lipid accumulation within *APOB*^{−/−} organoids (about 14-fold compared with WT), with the predominant change being extensive TAG accumulation, while conversely secreted lipids (especially TAG) in the supernatant were nearly absent (Fig. 2g and Supplementary Fig. 4d–g). To address the contribution of DNL to the observed lipid profiles, we performed a time-resolved [¹³C]-glucose isotope-tracing experiment (Fig. 2h). We calculated the incorporation of labeled glucose into the synthesis of five of the most abundant fatty acids (C14:0, C16:0, C16:1, C18:0 and C18:1) which, together, constitute >90% of the total intracellular fatty acid pool and >85% of the fatty acid pool that can be synthesized by DNL. We observed a time-dependent increase in [¹³C]-glucose-dependent DNL contribution, which linearly increased to approximately 60% on day 5, with a low extent of heterogeneity between the contribution of the individual fatty acids (Fig. 2i–j). The validity of this approach was confirmed by the absence of labeling of essential fatty acids that cannot be synthesized by human cells (for example, C20:4) (Fig. 2j and Supplementary Fig. 4h). A 100% incorporation would not be expected, because other sources contributing to the acetyl-CoA pool, such as amino acids and culture medium-provided pyruvate and glutamine, were not traced in this setting. Thus, glucose-driven DNL is the main contributor to the spontaneous steatosis phenotype of these lipid secretion-defective organoids (Fig. 2k). Both *APOB*^{−/−} and *MTTP*^{−/−} mutants constitute natural steatosis organoid models that can, like their WT counterparts^{23,24}, be long-term expanded in culture for at least 2 years with stable steatosis levels (Supplementary Fig. 6d).

Selected drug candidates reduce steatosis

Multiple putative NAFLD drugs are currently under evaluation in clinical trials^{40,41}, largely based on encouraging results from rodent studies. Addressing drug effects on different NAFLD stages and identifying the mechanism of action on a particular cell type is difficult to interpret from in vivo studies. We reasoned that our developed models could constitute screening platforms to identify drugs that directly act in hepatocytes to reduce steatosis, and could also address whether drug responses differ depending on the steatosis trigger (that is, FFA-driven versus DNL-driven). We selected 17 candidate NAFLD drugs from recent drug development programs and from new targets reported in the literature, focusing on those with putative hepatic effects^{40,41} (Supplementary Fig. 7a and Supplementary Table 2), and screened these drugs in the FFA-induced and genetic (*APOB*^{−/−} and *MTTP*^{−/−}) steatosis models. For the FFA model, WT organoids were first made steatotic with a fixed concentration of FFAs (500 μM) for 3 days before drug administration, to induce a degree of steatosis similar to that observed in *APOB*^{−/−} and

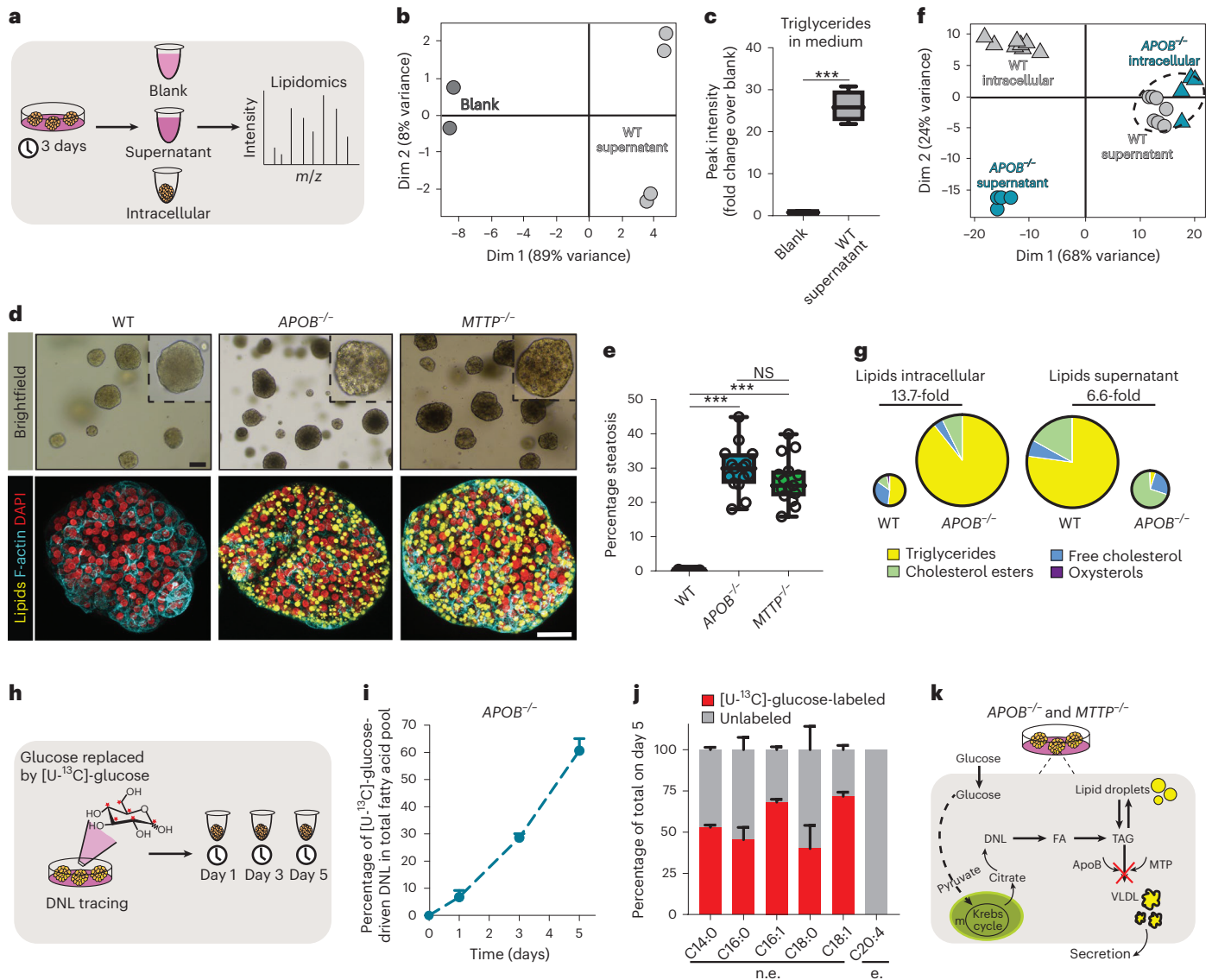


Fig. 2 | Organoid models of DNL-generated lipid accumulation by introduction of *APOB* or *MTTP* mutations. **a**, Workflow used to perform lipidomics on organoid cultures. **b**, PCA on neutral lipids found in the supernatant of WT organoids and in blank medium. $n = 4$ independent measurements in WT organoid cultures from two donors; $n = 2$ independent measurements for blank medium. **c**, Quantification of TAG content in the supernatant of WT organoids relative to blank medium. Sample sizes as in **b**. Two-tailed t -test: $***P = 0.0008$. **d**, Brightfield images and Nile Red lipid staining overlaid with phalloidin of WT, *APOB*^{-/-} and *MTTP*^{-/-} organoids. Representative of $n = 9$ independent experiments. **e**, Quantification of the percentage of spontaneous steatosis in WT, *APOB*^{-/-} and *MTTP*^{-/-} organoids. $n = 15$ independent replicates from three clonal lines per genotype from three donors. Two-tailed nested t -test: *APOB*^{-/-} versus WT, $***P < 0.0001$; *MTTP*^{-/-} versus WT, $***P = 0.0002$. **f**, PCA of neutral lipids found intracellularly and in the supernatant of *APOB*^{-/-} and WT organoids. $n = 4$ independent measurements in

APOB^{-/-} organoid cultures from two donors; $n = 8$ independent measurements in WT organoid cultures from the same two donors. **g**, Pie charts indicating the average distribution of different neutral lipid species in WT and *APOB*^{-/-} organoids. Pie size reflects average FC in total lipid amount. Sample sizes as in **f** (see also Supplementary Fig. 6c). **h**, Workflow used to perform DNL tracing using [¹³C]-glucose in *APOB*^{-/-} organoids. **i**, Quantification of the percentage of glucose-driven DNL contribution to the fatty acid pool in *APOB*^{-/-} organoids (mean \pm s.d.). $n = 2$ independent quantifications in *APOB*^{-/-} organoid cultures from two donors. **j**, Quantification of the percentage of glucose-driven DNL contribution for five nonessential (n.e.) fatty acids in *APOB*^{-/-} organoids 5 days post tracing (mean \pm s.d.). No labeling is observed for the essential (e.) fatty acid C20:4. Sample size as in **i**. **k**, Mechanism of lipid accumulation in *APOB*^{-/-} and *MTTP*^{-/-} organoids. **c, e**, The box indicates the 25–75th percentiles, the center line indicates the median and the whiskers indicate minimum and maximum values. **d**, Scale bars, 100 μ m (brightfield) and 25 μ m (fluorescence). Dim, dimension.

MTTP^{-/-} organoids (Supplementary Fig. 8a–c). We then exposed these models to the drugs (for the FFA-induced steatosis model, still in the presence of FFAs) for 7 days. Lipid accumulation was assessed through Nile Red staining, and we developed a lipid droplet scoring system to score drug effectiveness (Fig. 3a and Supplementary Fig. 7b).

A selected set of drugs markedly reduced the steatosis phenotypes of both *APOB*^{-/-} and *MTTP*^{-/-} organoids (Fig. 3b), most with a dose-dependent effect (Supplementary Fig. 7c). Effective drugs

included inhibitors of ACC, FAS and DGAT2, a FXR agonist, as well as recombinant hFGF19. Using live imaging of *APOB*^{-/-} organoids following treatment with ACCi we could trace drug effects in real time, which revealed an extensive reduction in lipid content within the first 72 h (Supplementary Fig. 7d and Supplementary Video 1). We then evaluated drug responses in the FFA-induced steatosis model, noting a very similar drug response pattern as compared with the genetic models (Supplementary Fig. 8d).

We quantitatively assessed drug responses across the different models using our lipid scoring system to rank drug effectiveness (Fig. 3c). This confirmed a strong correlation between the FFA and genetic models ($R^2 = 0.79$ and 0.83 for *APOB*^{-/-} and *MTTP*^{-/-}, respectively) (Fig. 3d). Many of the identified effective targets act in hepatic lipogenesis (Fig. 3c,d). The strongest effects were observed following inhibition of acetyl-CoA carboxylase (ACC), converting acetyl-CoA to malonyl-CoA, which reduced steatosis levels to near WT organoid level. Inhibition of diacylglycerol O-acyltransferase 2 (DGAT2), which catalyzes the final reaction of TAG synthesis, also strongly reduced steatosis in all models. Finally, inhibition of fatty acid synthase (FAS), which converts acetyl-CoA and malonyl-CoA to palmitate, was also effective in both systems but with stronger effects in the genetic steatosis models. Nevertheless, other lipogenic targets were ineffective, suggesting an unprecedented high target dependency within the lipogenesis pathway (Fig. 3c,d). In fact, inhibition of ATP citrate lyase (ACL), which acts at the intersection of carbohydrate and lipid metabolism by conversion of citrate to acetyl-CoA, was ineffective, as was inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1), which catalyzes the synthesis of monounsaturated fatty acids. Additionally, we noted only a very modest steatosis-reducing effect of DGAT1 inhibition in both genetic and FFA models, contrasting the effects of DGAT2i. DGAT1 primarily esterifies exogenous fatty acids while DGAT2 preferentially acts on DNL-derived fatty acids⁴², potentially underlying these differences. Combined DGAT1 and DGAT2 inhibition provided a synergistic effect that completely reverted the steatosis phenotypes of both genetic and FFA-induced steatosis models, already evident at nanomolar concentrations (Supplementary Fig. 9a–e).

Beyond beneficial effects on certain lipogenic enzymes, treatment with the FXR activator (FXRa) also induced a marked steatosis reduction with a similar extent in both genetic and FFA models (roughly 50%) (Fig. 3c,d). In mice, FXR activation imposes lipid-reducing effects in the liver, amongst others through reduced lipid absorption in the intestine⁴³. Nevertheless, direct effects of FXR activation in the liver have also not been ruled out⁴³. Our data demonstrate that FXRa poses direct steatosis-reducing effects in hepatocytes. Lastly, we observed a discrepancy between hFGF19 and hFGF21 treatment. Both have shown promising results for treatment of NASH, but whether their effects are mediated through direct or indirect actions on the liver is unresolved⁴⁴. We found that recombinant hFGF19 effectively reduced steatosis, under both genetic and FFA-induced steatosis (about 50%), while hFGF21 failed to do so (Fig. 3c,d). The remainder of the screened drugs did not display steatosis-reducing effects in either of the models. Notably, none of the selective/dual/pan-peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists influenced steatosis levels in a hepatocyte-directed fashion. Of note, PPAR agonists limit macrophage and stellate cell activation in the context of NASH in mice⁴⁵, suggesting beneficial effects at more advanced disease stages. We further found no evidence of steatosis reduction following thyroid receptor-beta agonism and sirTun 1 activation (Fig. 3c).

Fig. 3 | Capturing drug responses in different organoid models of human hepatic steatosis. **a**, Workflow used to perform NAFLD drug screening in the different steatosis organoid models. **b**, Nile Red lipid staining of *APOB*^{-/-} organoids after treatment with the different indicated drugs. Green-bordered boxes highlight steatosis-reducing effects. Representative of $n = 4$ independent experiments using two donors. **c**, Lipid score analyses of genetic steatosis (*APOB*^{-/-} and *MTTP*^{-/-} organoids) and FFA-induced steatosis (FFA-exposed WT organoids) following treatment with the different indicated drugs. Each square represents a concentration, with four increasing concentrations as per the white-to-black triangle; see Supplementary Table 2 for drug concentrations. Black squares indicate drug toxicity (Supplementary Fig. 7e); green boxes highlight effective drugs. An arbitrary color scale ranging from 0 (blue, representing the lipid level in WT organoids) to 1 (red, representing vehicle-treated steatosis organoids from each model) is used. Quantifications represent the average

PNPLA3 I148M influences drug response

We then interrogated whether genetic predisposition would influence drug treatment responses. We evaluated the five steatosis-reducing drugs (ACCi, FASi, DGAT2i, FXRa and hFGF19) in our *PNPLA3*^{WT} and *PNPLA3*^{I148M/I148M} organoids in a FFA-induced steatosis setting. As observed earlier (Fig. 1h–i), vehicle-treated I148M homozygous organoids displayed a worsened steatosis phenotype in response to the same FFA concentration as compared with their isogenic WT counterparts (Fig. 3e). Inhibition of ACC, FAS or DGAT2 posed obvious steatosis-reducing effects (Fig. 3e). Unexpectedly, we observed a diminished response towards both FXRa and hFGF19 treatment (approximately 15% steatosis reduction) which, in *PNPLA3*^{WT} organoids, reduced steatosis instead by roughly 50% (Fig. 3c–e). We calculated lipid scores and correlated them with those observed in *PNPLA3*^{WT} organoids ($R^2 = 0.54$). This highlighted the generally decreased effect of drug treatment in organoids carrying the I148M variant (Fig. 3f), with the most obvious differences following treatment with FXRa and hFGF19. Our proof-of-concept data implied that, at similar levels of fat challenge, drug effectivity could be compromised by genetic risk factors.

Drug screening using PLIN2 lipid reporter organoids

Perilipins coat lipid droplet particles, with PLIN2 being most abundantly expressed in the liver⁴⁶. We hypothesized that fluorescence labeling of lipid droplets by tagging the endogenous *PLIN2* locus might enable the development of an imaging-based steatosis drug-screening system. To this end, we used our nonhomologous end-joining-mediated gene knock-in strategy²⁵ (Supplementary Fig. 10a). *PLIN2* could be efficiently tagged with tdTomato or mNEON in both *APOB*^{-/-} and *MTTP*^{-/-} organoids (Supplementary Fig. 10b). The fluorescent signal derived from PLIN2 reporters was of typical lipid droplet morphology (Supplementary Fig. 10c). Counterstaining of the reporters with a lipid droplet dye confirmed faithful tagging of lipid droplets (Supplementary Fig. 10d), and tagging of PLIN2 did not alter steatosis phenotypes (Supplementary Fig. 10e). As a proof of principle, we treated the tagged organoids with ACCi which, as expected, reduced the endogenous PLIN2 fluorescent signal (Supplementary Fig. 10f). We next subjected the organoids to a set of five previously screened drugs (three positive, two negative) to assess the robustness of the system. Quantification of the fluorescent signal over a timeframe of 7 days visualized variable drug dynamics with time and demonstrated an identical classification of effective drugs (Supplementary Fig. 10g,h). Thus, PLIN2-reporter organoids act as real-time lipid reporter systems, providing the possibility of higher throughput and semiautomated analysis of drug effects on steatosis.

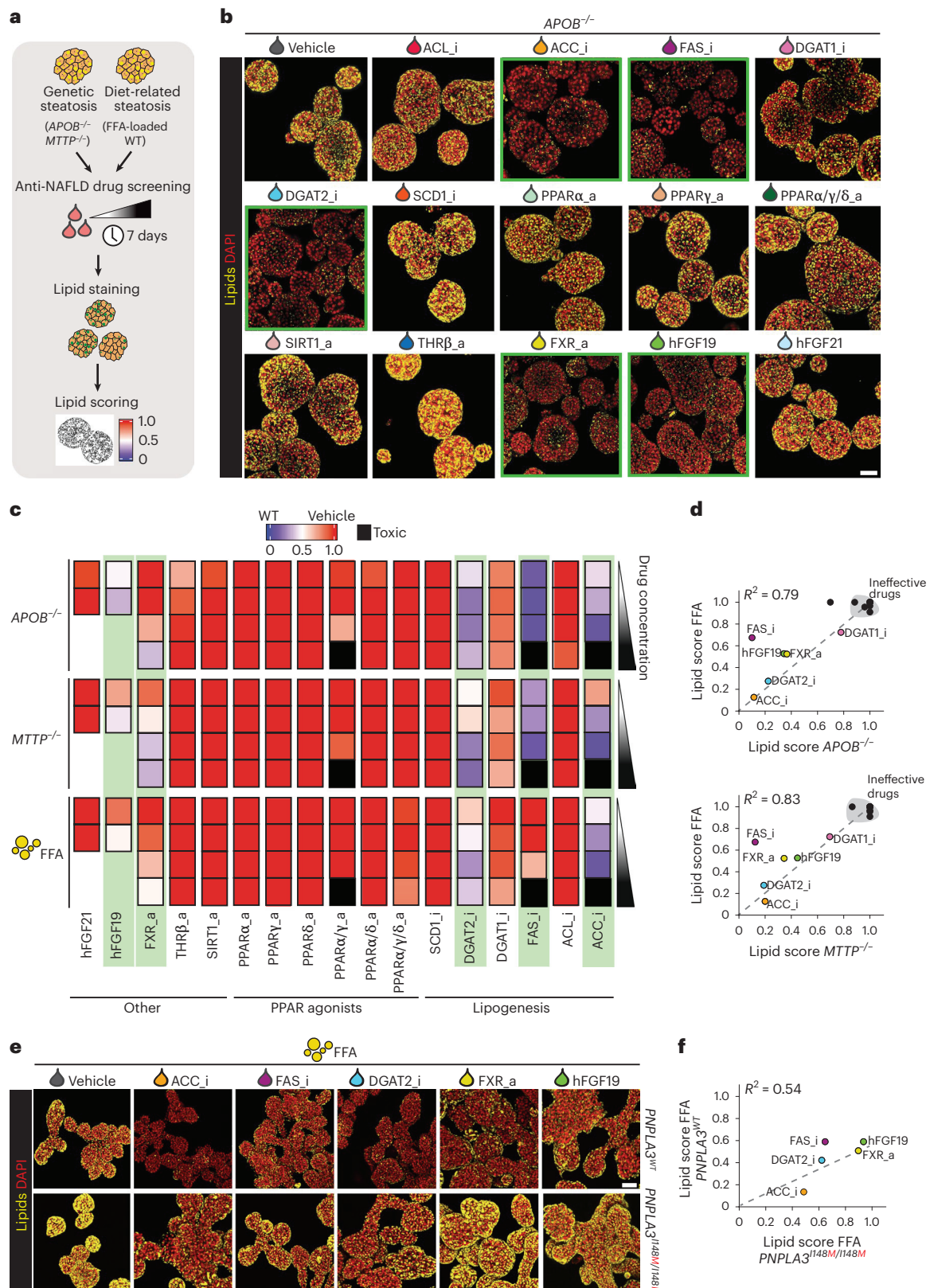
Distinct drug effects on global hepatocyte transcriptomes

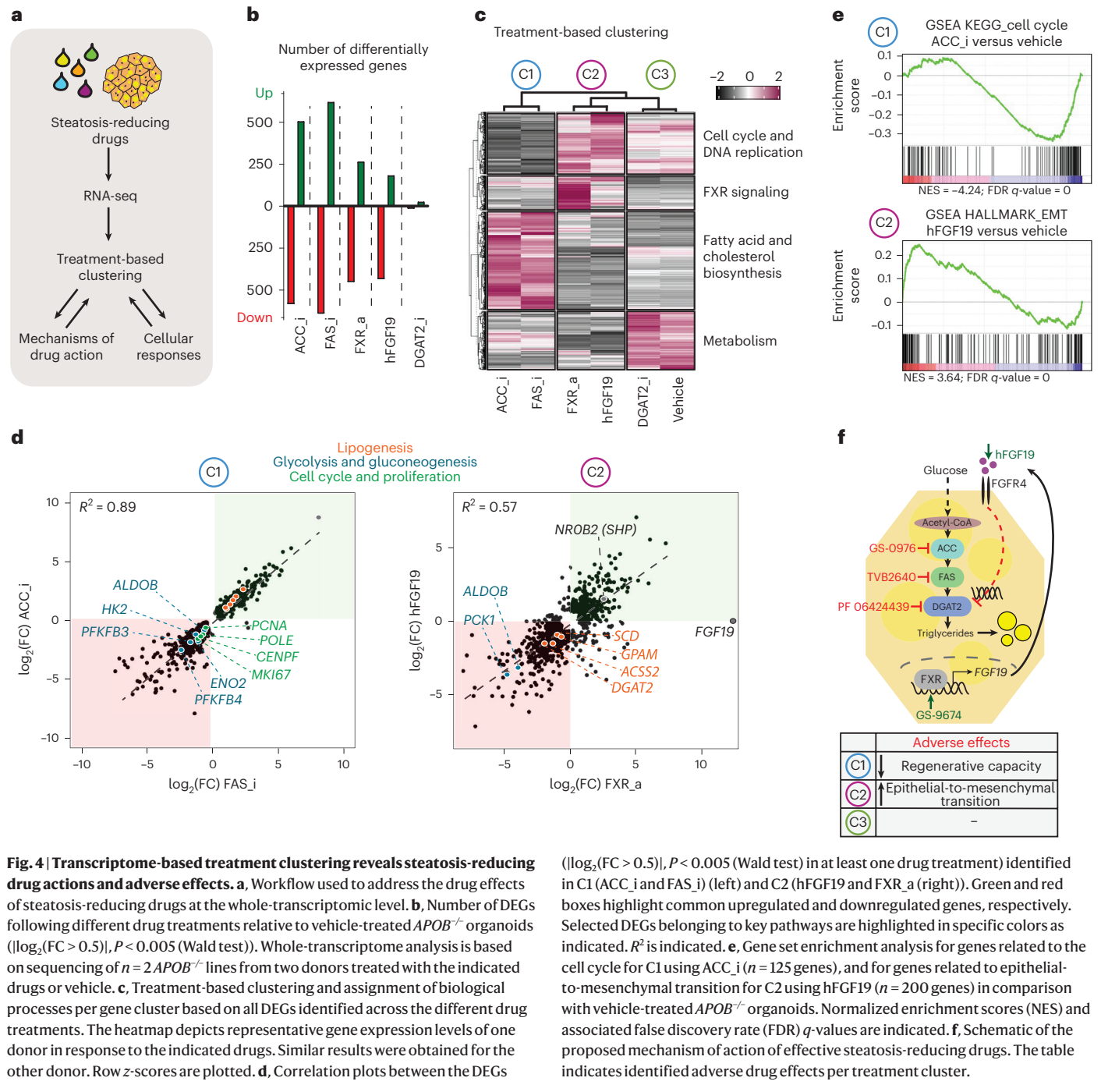
We next investigated drug responses and effects at the whole-transcriptome level to evaluate drug mechanisms, but also to assess overall cellular responses including, for example, adverse effects. We subjected *APOB*^{-/-} organoids treated with the effective drugs (DGAT2i, FASi, ACCi, FXRa, or hFGF19) or vehicle to bulk RNA-sequencing

lipid score from $n = 3$ organoid cultures/drug concentration. **d**, Correlation plots between lipid scores of *APOB*^{-/-} organoids (top) and *MTTP*^{-/-} organoids (bottom) versus those of FFA-exposed WT organoids following treatment with the different indicated drugs at the highest drug concentration, except for ACCi, FASi and PPAR α/γ a, for which the third-highest dose is depicted. The coefficient of determination (R^2) is indicated. **e**, Nile Red lipid staining of *PNPLA3*^{WT} and *PNPLA3*^{I148M/I148M} organoids (generated from the same donor) after treatment with selected drugs under FFA-induced steatosis. The most effective drug concentration (as used in **d**) was used. Representative of $n = 2$ independent experiments. **f**, Correlation plots between lipid scores of *PNPLA3*^{I148M/I148M} organoids versus those of *PNPLA3*^{WT} organoids following treatment with the selected drugs. Quantifications represent average lipid score from $n = 3$ organoid cultures/drug. R^2 is indicated. **b, e**, Scale bars, 100 μ m.

(RNA-seq) (Fig. 4a). Despite the fact that the net effect of all the different treatments was the same (that is, reduction of steatosis), differential gene expression analysis showed very different extents of transcriptomic rewiring. ACCi and FASi resulted in the highest number of differentially expressed genes (DEGs) (around 1,000 genes), followed by FXRa and hFGF19 (around 700 genes), while DGAT2i hardly

affected the transcriptome (Fig. 4b). We then performed unsupervised clustering analysis based on the DEGs. This revealed three distinct treatment-based clusters: C1 comprising ACCi and FASi, C2 comprising FXRa and hFGF19 while C3 was composed of DGAT2i that clustered with vehicle treatment (Fig. 4c). The DEGs could be grouped into four main classes related to specific biological processes, which highlighted that





the main changes within C1, C2 and C3 concerned metabolic pathways and the cell cycle.

Treatment-based clusters reveal drug action and side effects
 We zoomed into the transcriptomic changes per treatment cluster. C1 and C3 consisted of inhibitors directly targeting key enzymes of DNL. However, only in C1 did we observe marked transcriptomic changes. Within C1, ACC_i- and FAS_i-treated organoids highly correlated ($R^2 = 0.89$) (Fig. 4d). We observed downregulation of several key genes encoding proteins involved in glycolysis and gluconeogenesis (for example, *ALDOB*, *HK2*, *ENO2*, *PFKFB3/4*). Because inhibition of ACC or FAS proteins probably leads to a buildup of acetyl-CoA, this response likely constitutes a cellular coping mechanism by which pathways

driving acetyl-CoA production are in turn repressed. We additionally observed a counterintuitive induction of many genes encoding lipogenic proteins (*SREBF1*, *ACACA*, *FASN* and so on) in C1 (Supplementary Fig. 11a). A similar observation was reported in hepatocyte-specific *Acaca/Acacb* KO mice⁴⁷. This presumably represented an overcompensation effect due to the consequential lack of certain fatty acid species following blocked ACC or FAS activity. Possibly as a consequence of this, we also noted a strong repression of many genes encoding proteins involved in the cell cycle and DNA synthesis (for example, *MKI67*, *PCNA*, *BUB2*, *POLE*) (Fig. 4d,e and Supplementary Fig. 11b), indicating decreased hepatocyte proliferation and, in a broader context, impaired liver regeneration. These overall changes thus highlighted potential important adverse effects of these two drugs.

FXRa and hFGF19 constituted cluster C2, whose transcriptomic responses displayed substantial correlation ($R^2 = 0.57$) (Fig. 4d). *FGF19* is primarily known as an intestinal FXR target gene⁴⁸. Given the strong global transcriptomic similarities, we evaluated possible crosstalks between the two treatments. Crucially, FXRa treatment—but not hFGF19 treatment—strongly induced hepatocyte *FGF19* expression (Fig. 4d). We thus hypothesized that direct beneficial effects on steatosis of FXR activators in hepatocytes are primarily mediated through induction of hepatic FGF19 signaling. In agreement with FXR function, typical bile acid synthesis-related FXR transcriptional responses were detected following FXRa treatment (including repression of *CYP7A1* and induction of *NROB2* (encoding small heterodimer partner, SHP)), but notably also following hFGF19 treatment (Supplementary Fig. 12a), suggesting indeed that many of the downstream effects of FXRa are the consequence of active FGF19 signaling. Additionally, we noted only a few DEGs unique to either condition (Supplementary Fig. 12b). We next searched for hints in the transcriptomic changes to explain how activation of the FXR–FGF19 signaling axis in hepatocytes could ultimately reduce steatosis. The repression of key genes encoding proteins involved in (de novo) lipogenesis—including for example *DGAT2* and *GPAM*—caught our attention. In addition, we observed decreased expression of certain genes encoding proteins involved in glycolysis and gluconeogenesis (for example, *PCK1*, *ALDOB*), which ultimately would also decrease lipogenesis (Fig. 4d). Hints of adverse effects were however also noted for C2. We observed various DEGs suggestive of induction of epithelial-to-mesenchymal transition through TGF β -mediated extracellular matrix remodeling (Fig. 4e and Supplementary Fig. 12c), accompanied by reduced expression of specific hepatocyte and epithelial markers (Supplementary Fig. 12d). These findings could well explain the presence of *FGF19* gene amplifications in liver cancer⁴⁹.

Collectively, either direct (ACCi, FASi, DGAT2i) or indirect (FXRa, hFGF19) repression of DNL appeared to represent a unified and highly effective mechanism through which steatosis can be resolved, while cellular ‘side effects’ are largely treatment cluster dependent (Fig. 4f).

Development of FatTracer as a genetic steatosis recorder

We next questioned whether we could extend the use of our organoid models to identify steatosis mediators and putative targets. In that regard, *APOB*^{-/-} and *MTTP*^{-/-} organoids possess unique features as steatosis models, including (1) their high similarity in drug response to FFA-induced steatosis organoids; (2) their long-term expansion as ‘naturally’ steatotic hepatocytes, allowing further genomic modification; and (3) their considerable steatosis levels that allow easy identification of aggravating or alleviating effects following drug or gene perturbation. We therefore exploited these features to leverage our mutants as a human platform for CRISPR-based genetic screening of potential steatosis modulators and possible drug targets. We named this

platform FatTracer (Fig. 5a). Inspired by the very specific target dependency that emerged from the drug screening, we compiled a CRISPR–Cas9-based loss-of-function (LOF) library of lipid metabolism-related genes ($n = 35$ genes). This library included a broad variety of genes encoding, amongst others, lipid metabolism enzymes, transporters and indirect mediators, for evaluation in FatTracer (Supplementary Table 3). To validate the use of FatTracer for CRISPR-LOF screening, we included some effective targets identified in our drug screening (that is, *DGAT2*, *ACC* (*ACACA/B*) and *FAS* (*FASN*)), as well as *PNPLA3* as a proxy to interrogate NAFLD risk genes. We transfected single cells with plasmids encoding for Cas9 and the pertinent sgRNA, as well as plasmids for antibiotic resistance selection to enrich for transfected cells. Every gene was targeted independently. When the outgrowing clonal organoids had fully grown, we analyzed the phenotypes in comparison with a control condition in which organoids were transfected with a nontargeting sgRNA (Fig. 5a,b). This approach allowed us to evaluate the effects of gene KO in hepatic steatosis within a timeframe of only ± 20 days (Fig. 5a).

We first focused on the validation genes (Fig. 5c–m and Supplementary Fig. 13a). Transfection with Cas9–*DGAT2* sgRNA resulted in the appearance of lighter (less lipid-containing) organoids, while other organoids still presented the typical steatosis phenotype (Fig. 5e,f). We analyzed the genotypes of both these still-steatotic and fat-resolved outgrowing organoids. Across multiple independent experiments, and using both *APOB*^{-/-} and *MTTP*^{-/-} organoids as FatTracer models, we found 100% fidelity in genotype–phenotype correlation—that is, fat-resolved organoids always carried homozygous *DGAT2* mutations while steatosis-presenting organoids carried no or heterozygous *DGAT2* mutations (Fig. 5g). Nile Red staining and quantitative assessments corroborated the strong reduction in the steatosis level upon *DGAT2* KO, reverting to WT organoid levels (Fig. 5h,i). Of note, clonal FatTracer; *DGAT2*^{-/-} lines were viable and proliferative. Under conditions targeting either *FASN* (encoding FAS) or *ACACA* + *ACACB* (encoding ACC1/2), we consistently noted outgrowth of fat-free organoids that remained very small (Fig. 5e,j and Supplementary Fig. 13a). These organoids quickly ceased to grow, and therefore organoid lines could not be derived. These CRISPR experiments were in full agreement with our findings from the drug screening and treatment-based clustering analysis (Fig. 5d), which suggested inhibition of proliferation following ACC or FAS inhibition. This highlights FatTracer’s potential as a predictive platform for evaluation of gene effects on both steatosis levels and cellular phenotypes, such as proliferation.

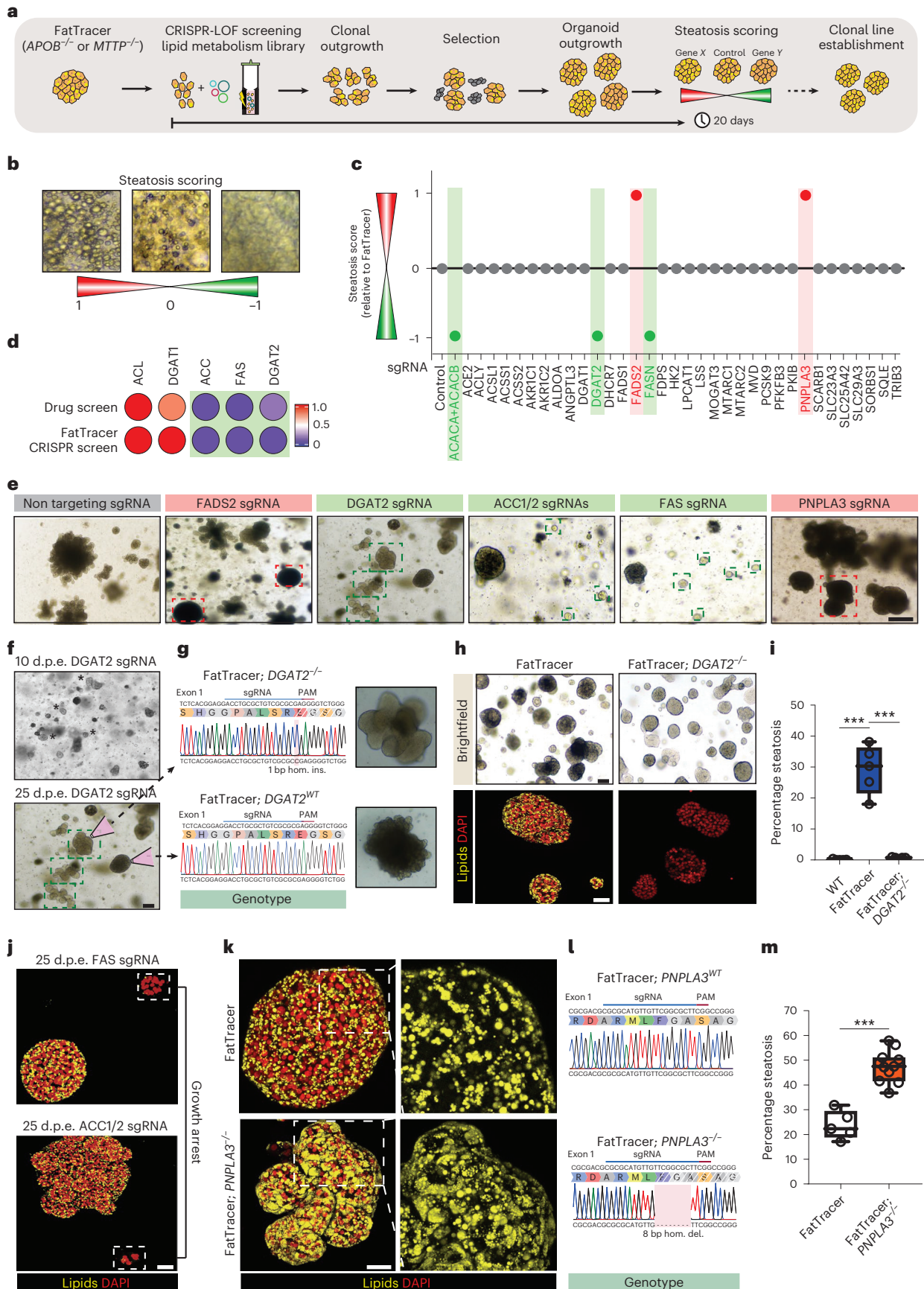
We then focused our attention on the other evaluated lipid metabolism-related genes (Fig. 5c). The majority of targeted genes did not induce phenotypic differences in FatTracer (Supplementary Fig. 13a). This included, for example, *DGATI*, again in agreement with our previous drug screenings, further highlighting high target specificity (Fig. 5c,d). We noted obvious phenotypic changes to FatTracer

Fig. 5 | Development of FatTracer as a CRISPR screening platform identifies steatosis mediators. a, Strategy used to perform CRISPR-LOF screening in FatTracer. **b**, Brightfield images exemplifying the steatosis scoring scale, where 0 (white) reflects the baseline steatosis level of FatTracer and 1 (red) and –1 (green) indicate increased and decreased steatosis, respectively. **c**, CRISPR-LOF screening results of 35 candidates evaluated in FatTracer using the steatosis scoring scale. **d**, Comparative analysis of results from FatTracer CRISPR-LOF screening and drug screening for the indicated gene targets. The lipid scoring system was used to quantify steatosis levels (Fig. 3c). Green boxes highlight steatosis-reducing effects. **e**, Brightfield images of outgrowing FatTracer organoids following CRISPR targeting of the indicated genes. Green boxes highlight lighter (fat-free) organoids, red boxes highlight darker (more fatty) organoids. **f**, Brightfield images of outgrowing FatTracer organoids following CRISPR targeting of *DGAT2* and 25 days post electroporation (d.p.e.). Asterisks indicate lighter (less lipid-containing) organoids. **g**, Sanger trace sequences of the picked organoid lines highlighted in **f**. **h**, Brightfield images and Nile Red lipid

staining of FatTracer and FatTracer; *DGAT2*^{-/-} organoids. **i**, Quantification of the percentage of steatosis in FatTracer, FatTracer; *DGAT2*^{-/-} and WT organoids (all from the same donor). $n = 5$ independent replicates per genotype. Two-tailed *t*-test, *** $P < 0.0001$. **j**, Nile Red lipid staining of outgrowing FatTracer organoids following CRISPR targeting of *FASN* or *ACACA* + *ACACB* 25 d.p.e. **k**, Nile Red lipid staining of FatTracer and FatTracer; *PNPLA3*^{-/-} organoid lines. **l**, Sanger trace sequences of *PNPLA3* genotypes of the organoid cultures shown in **k**. **m**, Quantification of the steatosis level in FatTracer and FatTracer; *PNPLA3*^{-/-} organoids. $n = 11$ independent replicates from three FatTracer; *PNPLA3*^{-/-} clonal lines; $n = 5$ independent replicates from the parental FatTracer line. Two-tailed *t*-test, *** $P < 0.0001$. **i, m**, The box indicates the 25–75th percentiles, the center line indicates the median and the whiskers indicate minimum and maximum values. **e, f, h, j, k**, Representative of $n = 3, 6, 6, 3$ and 4 independent experiments, respectively, using both *APOB*^{-/-} and *MTTP*^{-/-} organoids from two donors as FatTracer. Scale bars, 100 μm (**e, f**), 200 μm (brightfield) and 50 μm (fluorescence) (**h**), 50 μm (**j**) and 25 μm (**k**).

following KO of *PNPLA3* (Fig. 5c,e,k and Supplementary Fig. 13a). Clonal FatTracer; *PNPLA3*^{-/-} lines displayed a substantially worsened steatosis level, reaching around 50%, which is near double the steatosis level of

FatTracer (Fig. 5k-m). These findings aligned well with our findings on steatosis induction following *PNPLA3* KO in WT organoids (Fig. 1d-f), and suggested FatTracer's potential in evaluation of NAFLD risk genes.



FatTracer identifies FADS2 as a critical steatosis modulator

From this CRISPR screen, FADS2 (but not FADS1) emerged as a critical player in steatosis (Fig. 5c,e and Supplementary Fig. 13a). FADS2 is a delta-6 desaturase mediating the rate-limiting step in the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids (PUFAs). A causative role of FADS2 in NAFLD has not previously been implied, nor has FADS2 been investigated as a potential target. Clonal FatTracer; *FADS2*^{-/-} lines presented as much darker (more lipid-containing) organoids compared with FatTracer (Fig. 6a). We confirmed their genotypes (Fig. 6b), and immunofluorescence staining corroborated the loss of FADS2 protein (Supplementary Fig. 14a). To further evaluate the role of FADS2, we questioned whether *FADS2* KO would predispose WT human hepatocytes to steatosis. We therefore generated *FADS2*^{-/-} organoid lines, which indeed spontaneously accumulated lipids in basal culture conditions (roughly 5% steatosis) (Fig. 6c,d). We next used these lines to elucidate the interplay between the lack of FADS2 and a FFA-induced steatosis trigger. When challenged with a mild dose of FFAs (320 μM), *FADS2*^{-/-} organoids displayed a markedly aggravated steatosis phenotype compared with *FADS2*^{WT} organoids challenged with the same FFA dose (Fig. 6c,d), further strengthening the evidence of an important role for FADS2 in balancing lipid homeostasis.

FADS2 overexpression protects against steatosis

Prompted by these findings, we questioned whether overexpression of FADS2 would be beneficial for the steatosis phenotype in terms of (1) resolving existing steatosis and/or (2) being protective against its development. We employed a transposase-based integration of a CAG-FADS2 cassette to drive stable and constitutive overexpression of FADS2 (*FADS2*^{OE}) in transfected cells (Supplementary Fig. 14b). We first overexpressed FADS2 in FatTracer. Notably, we observed the appearance of lighter (less lipid-containing) outgrowing organoids (Supplementary Fig. 14c,d). These findings were also corroborated by fluorescent activated cell sorter analysis of the outgrowing organoids with a fluorescent lipid dye (Supplementary Fig. 14e). We derived multiple clonal FatTracer; *FADS2*^{OE} lines (ranging from around 20–25-fold overexpression (Supplementary Fig. 14f,g)) and found that FADS2 overexpression (further confirmed by antibody staining (Supplementary Fig. 14a)) led to almost complete resolution of steatosis (roughly 70% reduction) (Fig. 6e,h and Supplementary Fig. 14h), without altering the organoids' growth capacity and proliferation (Supplementary Fig. 14i). Of note, only a mild threshold level of FADS2 overexpression was needed to reduce steatosis (Supplementary Fig. 14j,k). We next generated *FADS2*^{OE} lines in WT organoids to evaluate whether FADS2 overexpression could confer protection against FFA-induced steatosis. We applied the same dosage of FFAs as used for previous drug screenings (500 μM) and found that FADS2 overexpression markedly reduced the extent of lipid accumulation (Fig. 6f,g). Therefore, modulation of the level of FADS2 expression directly determines the level of steatosis within hepatocytes (Fig. 6e,h), both in developing and pre-existing steatosis.

Mechanisms of FADS2 protection in steatosis

Given the role of FADS2 in fatty acid synthesis, we searched for mechanistic cues by performing lipidomics on FatTracer organoids in baseline (*FADS2*^{WT}) and following *FADS2*^{-/-} and *FADS2*^{OE}. We first analyzed total TAG content within these different FADS2 variant organoids, which photocopied the observed steatosis trend (Fig. 6i). Relative to FatTracer; *FADS2*^{WT}, FatTracer; *FADS2*^{-/-} organoids had an increase of around 200% in TAG content whereas *FADS2*^{OE} organoids had a marked reduction of >50% (Fig. 6i). The vast majority of TAG species were reduced following *FADS2*^{OE} and conversely increased with *FADS2*^{-/-} (Supplementary Fig. 15a,b). We then evaluated TAG characteristics (Supplementary Fig. 15a–f). In line with its desaturase activity, TAG unsaturation levels were notably changed. FatTracer; *FADS2*^{OE} organoids were enriched with TAG containing fatty acid chains with a higher degree of unsaturation, while conversely FatTracer; *FADS2*^{-/-} organoids displayed an increase in TAG with lower unsaturation levels (that is, containing at least one saturated fatty acid) (Fig. 6j).

TAG chain length analysis revealed a different trend. FatTracer; *FADS2*^{-/-} organoids displayed near-identical chain length profiles as compared with FatTracer; *FADS2*^{WT}, indicating that loss of FADS2 does not impair the overall generation of longer TAG species (Fig. 6k). The aggravated steatosis under loss of FADS2 is therefore solely associated with increased abundance in TAG species containing fatty acid chains with lower degrees of unsaturation. Instead, FatTracer; *FADS2*^{OE} organoids were enriched for longer-chain TAG species (54 C, 56 C, 58 C) at the expense of shorter TAG species (50 C, 52 C) (Fig. 6k). Shorter-chain TAG species represent those consisting of newly synthesized fatty acids⁵⁰. A shift towards incorporation of longer-chain 'old' PUFAs following FADS2 overexpression therefore suggested decreased endogenous fatty acid production. To further test this hypothesis, we calculated the DNL index (C16:0/C18:2)⁵¹ in TAG of the FADS2 variant FatTracer organoids. As compared with FatTracer; *FADS2*^{WT} organoids, the DNL index was sharply increased following FADS2 loss while it decreased in *FADS2*-overexpressing organoids (Fig. 6l). Thus, a FADS2-regulated PUFA–DNL axis may represent a functional mechanism to influence steatosis levels within the hepatocyte (Fig. 6m).

Discussion

In this study we developed human organoid models of hepatic steatosis. Organoid lines (unlike cell lines) can be directly generated from healthy WT cells from donors of different genetic backgrounds^{23,24}. The ability to reproduce findings within the same organoid line allows for high reproducibility. An important and exclusive feature (contrasting with other primary or pluripotent stem cell-derived hepatocyte systems) is their proliferative nature, enabling the generation of large organoid numbers in a relatively short timeframe. This allows application of robust and versatile genome-engineering protocols of WT hepatocytes^{24–26}. With precise gene editing, we show that the effects of gene mutations or SNPs (as exemplified for PNPLA3 I148M) on steatosis

Fig. 6 | FADS2 is a key modulator of steatosis levels in human hepatocytes.

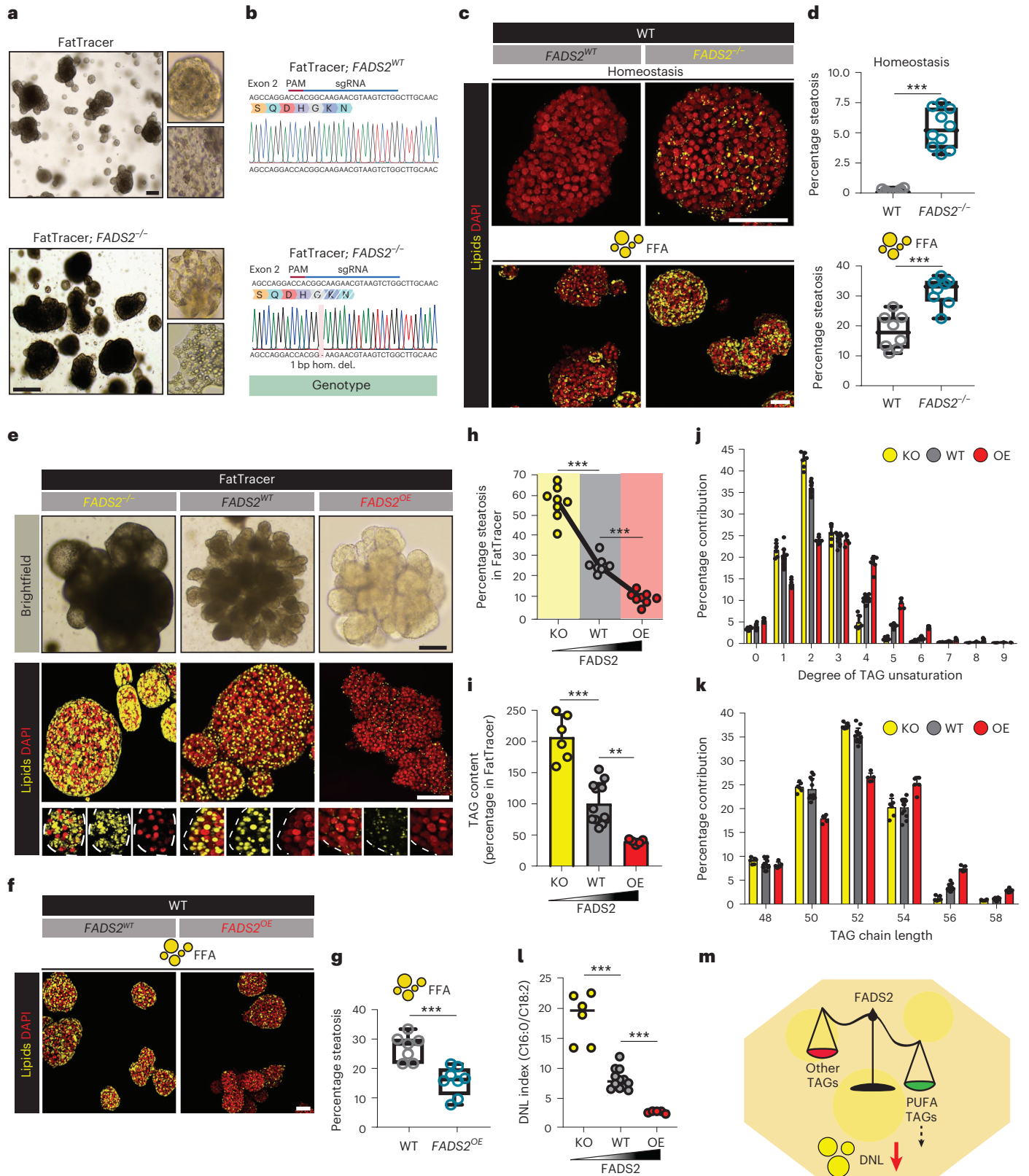
a, Brightfield images of FatTracer and FatTracer; *FADS2*^{-/-} organoids. **b**, Sanger trace sequences of *FADS2* genotypes of the organoid cultures shown in **a**. **c**, Nile Red lipid staining of *FADS2*^{WT} and *FADS2*^{-/-} organoids in homeostasis and following FFA exposure (320 μM). **d**, Quantification of the percentage of steatosis in homeostasis (top) and after FFA exposure (320 μM) (bottom) in *FADS2*^{WT} and *FADS2*^{-/-} organoids. *n* = 10 (homeostasis) and *n* = 8 (FFA) independent replicates from two clonal lines per genotype from two donors. Two-tailed nested *t*-test: homeostasis, ****P* < 0.0001; FFA, ****P* = 0.0001. **e**, Brightfield images and Nile Red lipid staining of FADS2 variant FatTracer organoids. **f**, Nile Red lipid staining of *FADS2*^{WT} and *FADS2*^{OE} organoids after FFA exposure (500 μM). **g**, Quantification of the percentage of steatosis after FFA exposure (500 μM) in *FADS2*^{WT} and *FADS2*^{OE} organoids. *n* = 7 independent replicates for *FADS2*^{WT}, *n* = 8 independent replicates for *FADS2*^{OE} from two clonal lines per genotype from two donors. Two-tailed nested *t*-test: ****P* = 0.0004. **h**, Quantification of the percentage of steatosis in FADS2 variant FatTracer

organoids. *n* = 8 independent replicates from two different clonal lines per genotype from two donors. Two-tailed nested *t*-test: ****P* < 0.0001. **i**, Quantification of TAG content in FatTracer following *FADS2*^{-/-} and *FADS2*^{OE} relative to *FADS2*^{WT} (mean ± s.d.). *n* = 6 independent measurements in three clonal lines from two donors for FatTracer; *FADS2*^{-/-} and FatTracer; *FADS2*^{OE}; *n* = 12 independent measurements in FatTracer; *FADS2*^{WT} from the same two donors. Two-tailed *t*-test: KO versus WT, ****P* < 0.0001; OE versus WT, ***P* = 0.0011. **j,k**, Relative distribution of degree of TAG unsaturation (**j**) and chain length (**k**) in FADS2 variant FatTracer organoids (mean ± s.d.). **l**, Quantification of DNL index (C16:0/C18:2 ratio) based on the fatty acid composition of the TAG in FADS2 variant FatTracer organoids. Two-tailed *t*-test, ****P* < 0.0001. **j–l**, Sample sizes as in **i**. **m**, Proposed role of FADS2 in regulation of hepatic steatosis. **d,g**, The box indicates the 25–75th percentiles, the center line indicates the median and the whiskers indicate minimum and maximum values. **a,c,e,f**, Representative of *n* = 4, 3, 4 and 3 independent experiments, respectively. Scale bars, 200 μm (**a**), 50 μm (**c,e,f**).

risk can be addressed with high phenotypic resolution. Altogether, these features allowed the development of scalable (personalized) organoid platforms paired with a drug–CRISPR toolkit for NAFLD target identification and testing. The developed organoid models capture different and clinically relevant biological mechanisms of steatosis: while the FFA model captures primarily steatosis driven by a surplus

of FFAs (approximating a Western diet), *APOB*^{-/-} and *MTTP*^{-/-} organoids develop steatosis through accumulation of lipids derived from DNL.

Through drug screening conjugated to in-depth mechanistic analysis, we discovered that repression of DNL (either directly or indirectly) is a common and highly effective mechanism to reduce steatosis, even under FFA-induced steatosis where DNL is not the primary trigger



(but instead exogenously provided palmitic acid and oleic acid). Other possible approaches, such as increasing fatty acid oxidation, do not appear to be as beneficial, as exemplified by the observed lack of effects of PPAR agonists. Clinical studies have indeed reported increased rates of DNL as a distinct feature of NAFLD patients⁵², making it a potential, clinically attractive mechanism to combat steatosis. The drug treatment-based clustering approach allowed classification of effective drugs based on specific molecular signatures. These signatures helped not only to decipher the common mechanisms of different drug actions (for example, that a FXR–FGF19 signaling axis effectively reduces DNL in hepatocytes), but also to predict possible adverse hepatocyte effects (for example, impaired liver regeneration capacity following treatment with ACC and FAS inhibitors). While organoid responses across the different steatosis models were generally conserved, our data hinted at the possibility that genetic risk may influence drug treatment outcomes. Carrying the PNPLA3 I148M variant attenuated organoid responses towards steatosis-reducing drugs. This was particularly evident for the FXR–FGF19 drug axis; a mechanistic explanation for this remains to be further investigated. Whether personalized medicine could be of value for NAFLD is currently unexplored⁵³, but our organoid data hint at such possibility.

In the hunt for drug targets, we exploited *APOB*- and *MTTP*-mutant organoids as a real-time genetic steatosis recorder (FatTracer) for CRISPR-LOF screening. This approach allows rapid functional investigation of candidate genes in a human context and in a high-throughput manner, requiring small starting material, with high reproducibility. Targets that emerged from the drug screening were also identified in this genetic screening. Moreover, LOF screening predicted the functional importance of PNPLA3. In addition to the genes screened in the current study, FatTracer in principle offers the possibility of performing (pooled) CRISPR screens at a genome-wide level. This could include evaluation of the role of many (often functionally unconfirmed) GWAS-associated NAFLD risk variants in the context of steatosis and under different culture conditions—for example, by evaluation of different carbohydrate sources and concentrations as well as insulin levels. The development of the PLIN2 lipid reporter lines allows the combination of steatosis organoid models with automated imaging systems for higher-throughput drug and CRISPR screenings.

This platform has some inherent limitations. Because FatTracer is a model in which VLDL secretion is defective, care should be taken when interpreting findings regarding the function of genes encoding proteins involved in lipid export. The same holds true for genes encoding proteins interacting at the level of organ crosstalk (for example, as is the case for PCSK9 screened here, which acts on circulating LDL particles). As a purely hepatocyte system, gene effects in other liver cell types or with roles in multicellular crosstalk cannot be studied in the current version of the organoid platform. FatTracer evaluates gene–steatosis relationships in a pre-existing steatosis state with the capacity to highlight both reducing and aggravating effects. To capture also the transition from a healthy to diseased state, evaluation with WT organoids can be performed in parallel.

The promise of FatTracer is underscored by our findings on *FADS2*. Mouse studies yielded controversial results on the role of *FADS2* in the context of fatty liver^{54–56}. Initially identified from our CRISPR-LOF screening by exacerbated steatosis, we found that increasing *FADS2* protein could effectively prevent and resolve steatosis. Mechanistically this was linked to a reduced total TAG content, with a concomitant favorable internal shift in TAG composition where *FADS2* activity determines PUFA abundancy. Saturated fats are more harmful and potent at promoting the development of fatty liver as compared with PUFAs⁵⁷. Livers of NAFLD patients display reduced PUFA content⁵⁸, while promotion of PUFA intake can reduce liver fat content in obese patients⁵⁹. How PUFAs may exert beneficial effects on steatosis is unclear; our lipidomic findings hint at repression of DNL. The *FADS* gene cluster is SNP rich, with various associations with lipid-related traits including plasma

lipid levels, glucose homeostasis, type 2 diabetes risk, dyslipidemia and metabolic syndrome^{60,61}. Of particular relevance, a recent study on novel NAFLD risk loci reported on a potential SNP in *FADS2* (ref. ⁶²). Our functional data position *FADS2* as an important steatosis mediator and putative target, and furthermore suggest that genetic variation in *FADS2* may confer susceptibility to steatosis.

In this study we have focused on steatosis, which at the hepatic level is primarily a hepatocyte disease. At more advanced clinical stages, such as NASH, the liver presents with inflammation and fibrosis through involvement of other liver cell types. Nonetheless, resolution of steatosis is often associated with downstream improvements of NASH⁶³, and being able to halt progression from steatosis to NASH is of key interest¹⁶. Implementation of cocultures with nonparenchymal cells (for example, Kupffer and stellate cells), similar to multicellular liver spheroids/organoids^{20,64}, may extend the application of our organoid models and CRISPR and drug-screening approaches to later stages of the NAFLD–NASH spectrum.

Online content

Any methods, additional references, Nature Portfolio reporting summaries, source data, extended data, supplementary information, acknowledgements, peer review information; details of author contributions and competing interests; and statements of data and code availability are available at <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01680-4>.

References

1. Younossi, Z. M. et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* **64**, 73–84 (2016).
2. Loomba, R., Friedman, S. L. & Shulman, G. I. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell* **184**, 2537–2564 (2021).
3. Stefan, N., Häring, H.-U. & Cusi, K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **7**, 313–324 (2019).
4. Younossi, Z. et al. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **69**, 2672–2682 (2019).
5. Eslam, M. & George, J. Genetic contributions to NAFLD: leveraging shared genetics to uncover systems biology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 40–52 (2020).
6. Romeo, S. et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* **40**, 1461–1465 (2008).
7. Kneeman, J. M., Misraji, J. & Corey, K. E. Secondary causes of nonalcoholic fatty liver disease. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **5**, 199–207 (2012).
8. Liebe, R. et al. Diagnosis and management of secondary causes of steatohepatitis. *J. Hepatol.* **74**, 1455–1471 (2021).
9. Welty, F. K. Hypobetalipoproteinemia and abetalipoproteinemia. *Curr. Opin. Lipidol.* **25**, 161–168 (2014).
10. Linton, M., Farese, R. & Young, S. Familial hypobetalipoproteinemia. *J. Lipid Res.* **34**, 521–541 (1993).
11. Zamel, R., Khan, R., Pollex, R. L. & Hegele, R. A. Abetalipoproteinemia: two case reports and literature review. *Orphanet J. Rare Dis.* **3**, 19 (2008).
12. Younossi, Z. M. Non-alcoholic fatty liver disease – a global public health perspective. *J. Hepatol.* **70**, 531–544 (2019).
13. Mullard, A. FDA rejects NASH drug. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 501 (2020).
14. Vuppalanchi, R., Noureddin, M., Alkhoury, N. & Sanyal, A. J. Therapeutic pipeline in nonalcoholic steatohepatitis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 373–392 (2021).
15. Dufour, J.-F. et al. Current therapies and new developments in NASH. *Gut* **71**, 2123–2134 (2022).

16. Masoodi, M. et al. Metabolomics and lipidomics in NAFLD: biomarkers and non-invasive diagnostic tests. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 835–856 (2021).
17. van Herck, M., Vonghia, L. & Francque, S. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease—a starter’s guide. *Nutrients* **9**, 1072 (2017).
18. Ramli, M. N. B. et al. Human pluripotent stem cell-derived organoids as models of liver disease. *Gastroenterology* **159**, 1471–1486 (2020).
19. Collin de l’Hortet, A. et al. Generation of human fatty livers using custom-engineered induced pluripotent stem cells with modifiable SIRT1 metabolism. *Cell Metab.* **30**, 385–401 (2019).
20. Ouchi, R. et al. Modeling steatohepatitis in humans with pluripotent stem cell-derived organoids. *Cell Metab.* **30**, 374–384 (2019).
21. Kozyra, M. et al. Human hepatic 3D spheroids as a model for steatosis and insulin resistance. *Sci. Rep.* **8**, 14297 (2018).
22. Tilson, S. G. et al. Modelling PNPLA3-associated non-alcoholic fatty liver disease using human induced pluripotent stem cells. *Hepatology* **74**, 2998–3017 (2021).
23. Hu, H. et al. Long-term expansion of functional mouse and human hepatocytes as 3D organoids. *Cell* **175**, 1591–1606 (2018).
24. Hendriks, D., Artegiani, B., Hu, H., Chuva de Sousa Lopes, S. & Clevers, H. Establishment of human fetal hepatocyte organoids and CRISPR–Cas9-based gene knockin and knockout in organoid cultures from human liver. *Nat. Protoc.* **16**, 182–217 (2021).
25. Artegiani, B. et al. Fast and efficient generation of knock-in human organoids using homology-independent CRISPR–Cas9 precision genome editing. *Nat. Cell Biol.* **22**, 321–331 (2020).
26. Hendriks, D., Clevers, H. & Artegiani, B. CRISPR-Cas tools and their application in genetic engineering of human stem cells and organoids. *Cell Stem Cell* **27**, 705–731 (2020).
27. Donnelly, K. L. et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* **115**, 1343–1351 (2005).
28. Zhang, J. et al. Association between serum free fatty acid levels and nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. *Sci. Rep.* **4**, 5832 (2014).
29. Quehenberger, O. et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J. Lipid Res.* **51**, 3299–3305 (2010).
30. Malhi, H. & Gores, G. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin. Liver Dis.* **28**, 360–369 (2008).
31. Li, J. Z. et al. Chronic overexpression of PNPLA3I148M in mouse liver causes hepatic steatosis. *J. Clin. Invest.* **122**, 4130–4144 (2012).
32. Kabbani, M. et al. Human hepatocyte PNPLA3-148M exacerbates rapid non-alcoholic fatty liver disease development in chimeric mice. *Cell Rep.* **40**, 111321 (2022).
33. Anzalone, A. V. et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* **576**, 149–157 (2019).
34. BasuRay, S., Wang, Y., Smagris, E., Cohen, J. C. & Hobbs, H. H. Accumulation of PNPLA3 on lipid droplets is the basis of associated hepatic steatosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **116**, 9521–9526 (2019).
35. Pirazzi, C. et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) I148M (rs738409) affects hepatic VLDL secretion in humans and in vitro. *J. Hepatol.* **57**, 1276–1282 (2012).
36. Luukkonen, P. K. et al. Human PNPLA3-I148M variant increases hepatic retention of polyunsaturated fatty acids. *JCI Insight* **4**, e127902 (2019).
37. Chen, W., Chang, B., Li, L. & Chan, L. Patatin-like phospholipase domain-containing 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease. *Hepatology* **52**, 1134–1142 (2010).
38. Lindén, D. et al. Pnpla3 silencing with antisense oligonucleotides ameliorates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in Pnpla3 I148M knock-in mice. *Mol. Metab.* **22**, 49–61 (2019).
39. Geng, Y., Faber, K. N., de Meijer, V. E., Blokzijl, H. & Moshage, H. How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease? *Hepatol. Int.* **15**, 21–35 (2021).
40. Neuschwander-Tetri, B. A. Therapeutic landscape for NAFLD in 2020. *Gastroenterology* **158**, 1984–1998 (2020).
41. Parlati, L., Régnier, M., Guillou, H. & Postic, C. New targets for NAFLD. *JHEP Rep.* **3**, 100346 (2021).
42. Qi, J. et al. The use of stable isotope-labeled glycerol and oleic acid to differentiate the hepatic functions of DGAT1 and -2. *J. Lipid Res.* **53**, 1106–1116 (2012).
43. Clifford, B. L. et al. FXR activation protects against NAFLD via bile-acid-dependent reductions in lipid absorption. *Cell Metab.* **33**, 1671–1684 (2021).
44. Henriksson, E. & Andersen, B. FGF19 and FGF21 for the treatment of NASH—two sides of the same coin? Differential and overlapping effects of FGF19 and FGF21 from mice to human. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **11**, 601349 (2020).
45. Lefere, S. et al. Differential effects of selective- and pan-PPAR agonists on experimental steatohepatitis and hepatic macrophages. *J. Hepatol.* **73**, 757–770 (2020).
46. Itabe, H., Yamaguchi, T., Nimura, S. & Sasabe, N. Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. *Lipids Health Dis.* **16**, 83 (2017).
47. Kim, C.-W. et al. Acetyl CoA carboxylase inhibition reduces hepatic steatosis but elevates plasma triglycerides in mice and humans: a bedside to bench Investigation. *Cell Metab.* **26**, 394–406 (2017).
48. Inagaki, T. et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* **2**, 217–225 (2005).
49. Sawey, E. T. et al. Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by oncogenomic screening. *Cancer Cell* **19**, 347–358 (2011).
50. Sanders, F. W. B. et al. Hepatic steatosis risk is partly driven by increased de novo lipogenesis following carbohydrate consumption. *Genome Biol.* **19**, 79 (2018).
51. Hudgins, L. C. et al. Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet. *J. Clin. Invest.* **97**, 2081–2091 (1996).
52. Lambert, J. E., Ramos-Roman, M. A., Browning, J. D. & Parks, E. J. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **146**, 726–735 (2014).
53. Lonardo, A., Arab, J. P. & Arrese, M. Perspectives on precision medicine approaches to NAFLD diagnosis and management. *Adv. Ther.* **38**, 2130–2158 (2021).
54. Hayashi, Y. et al. Ablation of fatty acid desaturase 2 (FADS2) exacerbates hepatic triacylglycerol and cholesterol accumulation in polyunsaturated fatty acid-depleted mice. *FEBS Lett.* **595**, 1920–1932 (2021).
55. López-Vicario, C. et al. Molecular interplay between $\Delta 5/\Delta 6$ desaturases and long-chain fatty acids in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* **63**, 344–355 (2014).
56. Stoffel, W. et al. Obesity resistance and deregulation of lipogenesis in $\Delta 6$ -fatty acid desaturase (FADS2) deficiency. *EMBO Rep.* **15**, 110–120 (2014).
57. Yki-Järvinen, H., Luukkonen, P. K., Hodson, L. & Moore, J. B. Dietary carbohydrates and fats in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 770–786 (2021).
58. Kotronen, A. et al. Hepatic stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. *Diabetes* **58**, 203–208 (2009).

59. Bjerme, H. et al. Effects of n-6 PUFAs compared with SFAs on liver fat, lipoproteins, and inflammation in abdominal obesity: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **95**, 1003–1012 (2012).
60. Kathiresan, S. et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat. Genet.* **41**, 56–65 (2009).
61. Aulchenko, Y. S. et al. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat. Genet.* **41**, 47–55 (2009).
62. Vujkovic, M. et al. A multiancestry genome-wide association study of unexplained chronic ALT elevation as a proxy for nonalcoholic fatty liver disease with histological and radiological validation. *Nat. Genet.* **54**, 761–771 (2022).
63. Esler, W. P. & Bence, K. K. Metabolic targets in nonalcoholic fatty liver disease. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 247–267 (2019).
64. Hurrell, T. et al. Human liver spheroids as a model to study aetiology and treatment of hepatic fibrosis. *Cells* **9**, 964 (2020).

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

Methods

Organoid culture

The use of human fetal livers for research was approved by the Dutch Ethical Medical Council (Leiden University Medical Center). Human fetal hepatocyte organoid lines were established and cultured in HEP medium as described by Hu et al.²³ and Hendriks et al.²⁴. In brief, hepatocytes were isolated by collagenase type IV (Sigma-Aldrich) digestion and enriched for by using low-speed centrifugation. Hepatocytes were washed with AdvDMEM+++ (AddMEM/F-12 medium supplemented with 1× GlutaMAX, 10 mM HEPES and 100 U ml⁻¹ penicillin/streptomycin solution (all Thermo Fisher)) and seeded in 100 µl of BME (Cultrex) suspension (2:1 BME:AdvDMEM+++ per well of a 12-well plate (three droplets per well (33 µl per droplet)). Organoids were maintained in HEP medium (AdvDMEM+++ supplemented with 15% RSPO1-conditioned medium (in-house production), 1× B-27 Supplement Minus Vitamin A (Thermo Fisher), 2.5 mM nicotinamide (Sigma-Aldrich), 1.25 mM *N*-acetyl-L-cysteine (Sigma-Aldrich), 50 ng ml⁻¹ hEGF, 50 ng ml⁻¹ hFGF7, 50 ng ml⁻¹ hFGF10, 50 ng ml⁻¹ hHGF, 20 ng ml⁻¹ hTGFα (all Peprotech), 10 nM gastrin (Sigma-Aldrich), 3 µM CHIR-99021 (Sigma-Aldrich), 1 µM A 83-01 (Tocris), 5 µM Y-27632 (AbMole) and 50 µg ml⁻¹ primocin (InvivoGen)). Organoids were typically passaged by mild mechanical shearing with a P1000 pipette every 7–10 days at a ratio of 1:2–1:4. During the first few days of organoid line establishment, HEP medium was supplemented with extra Y-27632 (final concentration, 10 µM) to minimize anoikis.

Medium withdrawal experiments

To probe the effect of selected medium components on the steatosis phenotype, HEP medium without RSPO1-conditioned medium and/or B-27 Supplement Minus Vitamin A was prepared. Alternatively, rather than using AdvDMEM+++ as a base medium, HEP medium was prepared using William's Medium E+++ (William's Medium E without phenol red (Thermo Fisher)) supplemented with 1× GlutaMAX, 10 mM HEPES and 100 U ml⁻¹ penicillin/streptomycin solution. Organoids were passaged and plated in new BME droplets, and subsequently cultured in these different culture media and collected for downstream analyses after 2 weeks of culture (including one splitting event).

Steatosis induction by exogenous FFA loading

Organoids were made steatotic by supplementing the culture medium with a concentrated mixture of exogenous FFAs (oleic acid and palmitic acid; both Sigma-Aldrich) in an equal ratio. FFAs were dissolved in 100% ethanol (200 mM stocks) and conjugated to bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) using 10% BSA-PBS to stock concentrations of 8 mM. Vehicle stocks were prepared in an identical manner using 100% ethanol. Before FFA loading, organoids were plated into smaller BME droplets (15 µl per droplet) to facilitate FFA penetration.

CRISPR gene KO

Organoids were CRISPR engineered using Cas9/nonhomologous end-joining-mediated gene disruption. Single-guide RNAs were designed using an online web-tool (www.atum.bio/eCommerce/cas9/input) and cloned into the pSPgRNA plasmid (Addgene, no. 47108) as described by Ran et al.⁶⁵. The sgRNA sequences of targeted genes are given in Supplementary Table 3. To provide Cas9, we used a plasmid expressing SpCas9 as well as mCherry for visualization of transfected cells (Addgene, no. 66940). To enrich for transfected cells we made use of an in-house, two-plasmid transposon system comprising a *piggyBac* transposase and a donor plasmid with inverted terminal repeats flanking a hygromycin resistance gene cassette. Human fetal hepatocyte organoids were transfected by electroporation, as described previously²⁴. Briefly, organoids were converted to single cells using Accutase (Thermo Fisher), washed twice with AdvDMEM+++ and resuspended in 130 µl of Opti-MEM (Thermo Fisher) containing the DNA mixture. Typically, one to two wells of a 12-well plate and a maximum 20 µg of

DNA were used per electroporation. Electroporation was performed in Nepa electroporation cuvettes (2-mm gap) with a NEPA21 electroporator (both Nepagene) using the settings described in Hendriks et al.²⁴. After 20-min recovery in HEP medium with additional Y-27632 (final concentration, 10 µM), single cells were recovered, washed with AdvDMEM+++ and plated in 100 µl of BME suspension into one well of a 12-well plate (three droplets per well). Cells were cultured in complete HEP medium with additional Y-27632 (final concentration, 10 µM) until small organoids appeared, after which these were shifted to regular HEP medium. When organoids were cotransfected with the hygromycin-*piggyBac* two-plasmid system, selection was started when organoids of small size had formed (typically after 7 days). Hygromycin B Gold (100 µg ml⁻¹, InvivoGen) was kept until selection was complete (roughly 7–12 days). Single surviving organoids were picked, converted to small fragments/single cells by Accutase, plated into a single BME droplet well of a 24-well plate and expanded into clonal lines. When no selection strategy was used, organoids were picked based on their fat phenotypes and grown into clonal lines as described above.

CRISPR prime editing

The PNPLA3 I148M mutation was introduced by PE3 prime editing³³. Prime editing guide RNAs and PE3 sgRNA were designed using peg-Finder⁶⁶. The pegRNAs were generated as described by Anzalone et al.³³ and the PE3 sgRNA was cloned as described above. Spacer and 3' extensions for pegRNAs and the PE3 sgRNA are given in Supplementary Table 3. In sum, the transfection mixture consisted of the specific pegRNA plasmid containing the sgRNA and desired edit, the common PE3 sgRNA plasmid to induce the second nick and the PE2 plasmid (Addgene, no. 132775), as well as the hygromycin-*piggyBac* two-plasmid system to facilitate selection. Outgrowing hygromycin-resistant clones were picked and genotyped, and clonal lines were established as described above.

FADS2 overexpression

To overexpress human FADS2 we generated a transposable construct for use in conjunction with the *piggyBac* transposase. Total RNA was extracted from human hepatocyte organoids and used as template for complementary DNA synthesis using the SuperScript IV kit (Thermo Fisher) and FADS2 was PCR amplified and gel purified. Using PBCAG-eGFP (Addgene, no. 40973) as a backbone, we replaced the eGFP sequence with FADS2 using In-Fusion cloning (Takara Bio) to generate the CAG-FADS2 plasmid. The CAG-FADS2-P2A-tdTomato plasmid was generated in a similar manner, using P2A-tdTomato as an additional cloning insert. FADS2 overexpression was confirmed by quantitative PCR with reverse transcription analysis using iQSYBRGreen mix (Bio-Rad) with the quantitative PCR primers FADS2_fw: 5' GACCACGGCAAGAAGCACTCAAAG 3' and FADS2_rev: 5' GAGGGTAGGAATCCAGCCATT 3'.

Genotyping of organoid lines

To characterize organoid lines for their NAFLD risk factor genotypes, DNA was extracted from each line using the Quick-DNA Microprep kit (Zymo). PCR reactions were performed to amplify the genomic region encompassing the genomic region of interest and PCR products were Sanger sequenced. To genotype the various mutant organoid lines, as soon as sufficient organoid material was present DNA was extracted and PCR reactions performed using primers encompassing the sgRNA/Cas9-targeted area. PCR products were subsequently Sanger sequenced and, when necessary, genotypes were deconvoluted using the ICE v.2 CRISPR tool and PCR products were further subcloned to discriminate between alleles whenever appropriate.

Drug screening

Compound stocks of all drugs were made in DMSO (Sigma-Aldrich), except for recombinant hFGF19 and hFGF21 which were reconstituted in AdvDMEM+++. Drugs were dissolved in HEP medium with a maximum

final concentration of 0.2% DMSO. Details on the drug panel, their targets and concentrations tested are described in Supplementary Table 2. *APOB*^{-/-} and *MTTP*^{-/-} organoids were exposed to drugs or vehicle in 24-well plates for 7 days with two medium changes. WT organoids (*PNPLA3*^{WT} or *PNPLA3*^{I148M/I148M}, engineered from the same donor) were first made steatotic by preincubation with 500 μ M FFA (oleic acid and palmitic acid, 1:1 ratio) for 3 days. Then, organoids were treated with the different drugs, still in the presence of 500 μ M FFA, for 7 days with two medium changes. All organoids were harvested for subsequent lipid staining and lipid scoring as described below. Drug effects were evaluated by assessment of lipid droplet fluorescence characteristics of all organoids within the whole well. Quantitative analyses were performed in representative organoid cultures ($n \geq 3$) per drug concentration per steatosis organoid model. Drug effects were validated in at least $n = 2$ independent experiments.

CRISPR screening

APOB^{-/-} or *MTTP*^{-/-} organoid lines (FatTracer), generated without previous hygromycin resistance, were used for CRISPR screening. Organoids were transfected with the sgRNA plasmid targeting the gene of interest, a Cas9-expressing plasmid and the hygromycin-*piggyBac* two-plasmid system in a manner identical to that described above. For each targeted gene, organoids from one well of a 12-well plate were used as starting material. The sgRNA sequences of the screened genes are given in Supplementary Table 3. Outgrowing hygromycin-resistant organoids were carefully inspected by brightfield microscopy and compared with control surviving organoids (mock-transfected organoids with Cas9 and a nonhuman sgRNA), using a binary classification of lighter (-1), similar (0) or darker (1). To ensure that the effects of the targeted genes were not evaluated during the energy-demanding phase of clonal outgrowth, we scored the phenotype of the organoids after they reached a steady-state phase—that is, when the organoids were of a size suitably large for establishment of a clonal line. Upon indication of different phenotypes between surviving organoids (that is, impacting on the steatosis phenotype), organoids were picked, grown into clonal lines and genotyped as described above. Alternatively, organoids were directly processed for lipid staining when clonal line establishment was not possible. CRISPR experiments were repeated at least in $n = 2$ independent experiments using both *APOB*^{-/-} and *MTTP*^{-/-} lines from two donors as FatTracer. Notable findings were followed up in $n \geq 3$ independent experiments using multiple clonal lines from two donors.

Lipid and immunofluorescence staining

Organoids were carefully harvested in cold AdvDMEM+++ and washed once with cold AdvDMEM+++. Sedimented organoids were fixed in 4% formaldehyde at room temperature (RT) for 30–60 min. For lipid staining, organoids were washed twice with PBS and incubated with Nile Red (0.5 μ g ml⁻¹) and DAPI (1 μ g ml⁻¹) (both Thermo Fisher) for 20 min at RT. Organoids were washed twice with PBS and transferred in 100 μ l of PBS to one well of a 96-well black SensoPlate (Greiner Bio-One) for imaging analysis. For immunofluorescence staining, fixed organoids were first washed twice with PBS and then simultaneously blocked and permeabilized using 5% BSA and 0.3% Triton-X in PBS at RT for 1 h. Organoids were washed once with 0.5% BSA-PBS and subsequently incubated with primary antibodies in 2.5% BSA-PBS overnight at 4 °C. The primary antibodies used were: mouse anti-ApoB (989529), no. MAB41241-SP, Novus Biologicals, dilution 1:50; rabbit anti-beta-catenin (H-102), no. sc-7199, Santa Cruz, dilution 1:200; rabbit anti-FADS2/Delta-6 Desaturase (aa79-108), no. LS-C165916, LSBio, dilution 1:50; rat anti-Ki-67 (SolA15), no. 14-5698-82, Thermo Fisher, dilution 1:1,000; rabbit anti-MTP, no. ab63467, Abcam, dilution 1:500; and sheep anti-PNPLA3/Adiponutrin, no. AF5208, R&D systems, dilution 1:100. After three washes with 0.5% BSA-PBS, organoids were incubated with appropriate Alexa Fluor secondary antibodies (all Thermo Fisher, at dilution 1:1,000) in 2.5% BSA-PBS for 2–4 h at RT. The secondary antibodies used were: Alexa

Fluor 488 anti-mouse, A11029; Alexa Fluor 488 anti-rabbit, no. A21206; Alexa Fluor 568 anti-sheep, no. A21099; Alexa Fluor 568 anti-rabbit; Alexa Fluor 647 anti-rat, no. A21247; and Alexa Fluor 647 anti-rabbit, no. A21245. Cell membranes were stained with Phalloidin-Atto 647 N (no. 65906, Sigma-Aldrich, dilution 1:2,000). Organoids were washed once with 0.5% BSA-PBS, after which they were incubated with DAPI (1 μ g ml⁻¹) in 0.5% BSA-PBS for 20 min at RT and washed once more with 0.5% BSA-PBS. Organoids were then transferred in 100 μ l 0.5% BSA-PBS to one well of a 96-well black SensoPlate.

Confocal imaging and lipid scoring

Stained organoids were imaged on a Leica Sp8 confocal using Leica LAS X software (v.1.1). Fluorescent images were processed using either Photoshop CS4 or Fiji (v.2.0.0) software. Lipid scores were calculated using Fiji. The lipid score is defined by integrating lipid droplet fluorescence and lipid droplet area coverage as follows: a fluorescence threshold derived from the lipid droplet signal is determined on Z-projected images to convert them into binary images. Note that we did not observe notable differences between measurements of steatosis levels following assessment in three versus two dimensions. The region of interest (organoid surface area) is defined based on fluorescence signal occupancy from counterstained DAPI⁺ nuclei. Then, particle measurement analysis is performed to define the fluorescence area covered within the defined region of interest. The lipid score represents a normalized score of the resulting data on a linear 0–1 scale, where the average calculated lipid droplet area coverage values from WT organoids are arbitrarily set to 0 while those from either vehicle-treated *APOB*^{-/-} or *MTTP*^{-/-} organoids or vehicle-treated FFA-exposed WT organoids are set to 1, allowing scoring of drug effectiveness within these boundaries. See also Supplementary Fig. 7b for a visual explanation. Lipid droplet area coverage (percentage steatosis) is determined in an identical manner to the lipid score but without the final normalization steps.

Transmission electron microscopy

Organoids were fixed with 1.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer at 4 °C for 24 h. Then, organoids were washed with 0.1 M cacodylate buffer and postfixed with 1% osmium tetroxide in the same buffer containing 1.5% potassium ferricyanide in the dark at 4 °C for 1 h. Samples were dehydrated in ethanol, infiltrated with Epon resin for 2 days, embedded in the same resin and polymerized at 60 °C for 48 h. Ultrathin sections were cut using a Leica Ultracut UCT ultramicrotome (Leica Microsystems) and mounted on Formvar-coated copper grids. Sections were stained with 2% uranyl acetate in 50% ethanol and lead citrate. Sections were observed under a Tecnai T12 Electron Microscope equipped with an Eagle 4k \times 4k CCD camera (Thermo Fisher). To specifically preserve and visualize lipid droplet morphology, organoids (fixed similarly to that described above) were instead high-pressure frozen using a Leica HPF. Freeze substitution was performed in a Leica AFS2 using 2% osmium tetroxide, 0.1% uranyl acetate and 5% water in acetone. The temperature was raised from -90 to 20 °C at a rate of 5 °C h⁻¹. After three washes with acetone, samples were infiltrated and embedded in Epon and polymerized as described above. Ultrathin sections were observed under a Tecnai T12 Electron Microscope.

Bulk RNA-seq

To address cellular responses to the different drug treatments by RNA-seq, we used two *APOB*^{-/-} lines from two donors. Organoids from one well of a 12-well plate were harvested and washed in cold AdvDMEM+++. Organoid pellets were lysed in 1 ml of TRIzol Reagent (Thermo Fisher) and subsequently snap-frozen in liquid nitrogen. RNA was extracted according to the manufacturer's protocol. RNA integrity was measured using the Agilent RNA 6000 Nano kit with the Agilent 2100 Bioanalyzer, and RNA concentrations were determined using the Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher). RNA integrity number values

of RNA samples were typically 9.5–10.0 and never <9.0. RNA libraries were prepared with the TruSeq Stranded messenger RNA polyA kit and paired-end (2 × 50 base pairs) sequenced on an Illumina NextSeq 2000. Reads were mapped to the human GRCh37 genome assembly. Differential gene expression analysis was performed using the DESeq2 package in RStudio (v.2022.02.2). Considered log₂ fold changes (FC) and significance (*P* values, Wald test) are indicated throughout the paper. Data visualization was performed using the packages ggplot2, ComplexHeatmap and EnhancedVolcano in RStudio, or manually plotted using GraphPad Prism (v.8.2.0). The coefficient of determination (*R*²) was determined either using the ggplot2 package in RStudio or in GraphPad Prism.

DNL assay

To address the contribution of DNL-generated lipids to the steatosis phenotypes of *APOB*^{-/-} organoids, we used isotope profiling with [U-¹³C]-glucose (Sigma-Aldrich)—that is, glucose in which all six ¹²C atoms are replaced by ¹³C. To this end, we used a base medium consisting of SILAC Advanced DMEM/F-12 Flex medium (no glucose, no phenol red, Thermo Fisher) supplemented with [U-¹³C]-glucose (17.5 mM, which is identical to the glucose concentration present in HEP medium) and with the addition of 700 μM L-arginine (Sigma-Aldrich), 500 μM L-lysine (Sigma-Aldrich), 1 × GlutaMAX, 10 mM HEPES and 100 U ml⁻¹ penicillin/streptomycin solution. To this medium we added all components present in HEP medium, with the exception of 15% RSPO1-CM (which we found not essential for hepatocyte growth, nor did its absence influence steatosis phenotypes; Supplementary Fig. 4c), to avoid the presence of unlabeled glucose from this medium in the culture medium. Organoids (both WT and *APOB*^{-/-}) were plated into fresh BME droplets and cultured in this medium for 1, 3 or 5 days. Organoids were harvested in cold SILAC medium, washed twice with the same medium and dry organoid pellets were snap-frozen in liquid nitrogen. Lipids were solubilized in water/methanol/chloroform (0.8/2.0/1.0, v/v/v) and, after removal of the protein precipitate, the extract was dried under nitrogen. Total cellular lipids were subsequently hydrolyzed in 0.3 M NaOH in 90% MeOH at 75 °C for 1 h. Unsaponifiable lipids were removed by washing twice with two volumes of hexane, followed by acidification of the hydrolysate. FFAs were then extracted by washing twice more with two volumes of hexane. The latter two hexane fractions were combined, dried under nitrogen and analyzed by liquid chromatography–mass spectrometry (see below). Fatty acids whose mass had shifted by a minimum of +4 Da from the monoisotopic (all ¹²C) mass were considered as having been synthesized de novo. Shifts of 2 and 3 Da were excluded, as this typically reflects chain elongation from pre-existing fatty acids.

Lipidomics

Organoids (all samples plated at the same density) were cultured for 3 days without changing the medium. Then, the medium (supernatant) from one well of a 12-well plate was collected, spun down to remove cell debris and snap-frozen in liquid nitrogen. Organoids from the same well were harvested in cold AdvDMEM⁺⁺⁺, washed twice with cold AdvDMEM⁺⁺⁺ and dry organoid pellets were snap-frozen in liquid nitrogen. Lipids from cell pellets and medium, as well as blank medium, were extracted with chloroform and methanol using stable-isotope-labeled SPLASH II LIPIDOMIX Mass Spec Standard (Avanti Polar Lipids) for quantification as required⁶⁷. Lipid extracts were kept frozen under a nitrogen atmosphere until analysis. Neutral lipid analysis was performed on an ACQUITY Premier BEH C18 column (130 Å, 1.7 μm, 2.1 × 100 mm², Waters Corporation). Elution was performed at 60 °C using a binary gradient from (A) methanol:water (50:50, v/v) to (B) methanol:isopropanol:ethyl acetate (80:12:8, v/v/v). Both solvents contained 25 mM ammonium formate. Gradient composition was (time, %B): (0, 60); (2.5, 100); (8, 100); (8.1, 60); (10, 60) and the flow rate was kept constant at 0.4 ml min⁻¹. The column effluent was introduced into a X500R QToF-type mass spectrometer (Sciex),

either via an atmospheric pressure chemical ionization source (APCI) or a heated electrospray ionization source (HESI), both operated in the positive-ion mode. Data from the APCI interfaced runs were used to determine oxysterols, sterols, sterol esters and total TAG content. Data from the subsequent HESI run were used to determine molecular species composition of TAG. Data analysis was performed using the XCMS package in R (v.4.2.0). The fatty acid composition of TAG was elucidated with MS-DIAL, using the default setting for identification confidence (80%)⁶⁸. PCA was performed using the nonlinear iterative partial least-squares (nipals) method with pareto scaling. FFAs were analyzed in negative HESI mode, in the range 150–500 amu with 0.1 s accumulation time. FFAs were eluted from the BEH C18 column mentioned above, using a 7-min gradient from 87.5 to 100% ACN/MeOH (6:4, v/v) in water containing 25 mM ammonium formate.

Statistical analysis

No statistical methods were used to predetermine sample size. The experiments were not randomized, and the investigators were not blinded to sample allocation during experiments and outcome assessment. Quantitative data are presented either as box-and-whisker plots—with the box spanning the interquartile range, the center line indicating the median value and the whiskers ranging from minimum to maximum values—or as bar plots where mean ± s.d. is depicted. Statistical analyses were performed in GraphPad Prism using two-tailed *t*-tests (with a nested design where appropriate), with the exception of data derived from bulk RNA-seq for which the Wald test used in DESeq2 analysis was applied. The coefficient of determination (*R*²), determined either with GraphPad Prism or RStudio (ggplot2 package), was calculated to determine correlation between the different steatosis models regarding drug responses (lipid scores) and correlation between transcriptional drug responses. Sample sizes (*n*), statistical tests, *P* values and considered statistical significance are indicated in the figure legends.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Portfolio Reporting Summary linked to this article.

Data availability

RNA-seq data are deposited in Gene Expression Omnibus under accession no. [GSE221705](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.25). The human genome GRCh37 can be accessed at https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.25.

References

65. Ran, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308 (2013).
66. Chow, R. D., Chen, J. S., Shen, J. & Chen, S. A web tool for the design of prime-editing guide RNAs. *Nat. Biomed. Eng.* **5**, 190–194 (2021).
67. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917 (1959).
68. Tsugawa, H. et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat. Methods* **12**, 523–526 (2015).

Acknowledgements

We thank S. van den Brink for RSPO1-conditioned medium production, G. van Son for mapping of RNA-seq data, E. Mocholi-Gimeno for providing reagents, E. Knaven for lipidomic analysis support and W. van de Wetering and K. Knoop for transmission electron microscopy support. This work was supported by an award from the Cancer Research UK Grand Challenge (no. C6307/A29058) and by the Mark Foundation for Cancer Research to the SPECIFICANCER team (H.C.). D.H. was supported by a postdoctoral fellowship from the Swedish Society of Medical Research (no. P19-0074) and is supported by a VENI grant from the Dutch Research Council (no. VI.Veni.212.134).

Author contributions

D.H., B.A. and H.C. conceived and supervised the study. D.H. and B.A. designed and conducted all experiments. J.F.B. performed and analyzed lipidomic experiments, with support from M.J.R.-C. K.H. participated in CRISPR screening and organoid culturing. M.H.G. and L.L. assisted with cell culture experiments. S.M. participated in vector construction. C.L.-I. and P.J.P. performed transmission electron microscopy. S.C.d.S.L. shared resources. D.H. and B.A. analyzed and interpreted all data and performed data visualization. D.H., B.A. and H.C. wrote the manuscript, with input from all authors.

Competing interests

H.C. is inventor of several patents related to organoid technology; his full disclosure is given at <https://www.uu.nl/staff/JCClevers/>. D.H., B.A. and H.C. are inventors on a filed patent application related to this work (PCT/NL2022/050641). Near the end of this study, H.C. became head of Pharma, Research and Early Development of

F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland. The other authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01680-4>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Delilah Hendriks, Benedetta Artegiani or Hans Clevers.

Peer review information *Nature Biotechnology* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Reporting Summary

Nature Research wishes to improve the reproducibility of the work that we publish. This form provides structure for consistency and transparency in reporting. For further information on Nature Research policies, see our [Editorial Policies](#) and the [Editorial Policy Checklist](#).

Statistics

For all statistical analyses, confirm that the following items are present in the figure legend, table legend, main text, or Methods section.

- | n/a | Confirmed |
|-------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> The exact sample size (n) for each experimental group/condition, given as a discrete number and unit of measurement |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> A statement on whether measurements were taken from distinct samples or whether the same sample was measured repeatedly |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> The statistical test(s) used AND whether they are one- or two-sided
<i>Only common tests should be described solely by name; describe more complex techniques in the Methods section.</i> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> A description of all covariates tested |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> A description of any assumptions or corrections, such as tests of normality and adjustment for multiple comparisons |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> A full description of the statistical parameters including central tendency (e.g. means) or other basic estimates (e.g. regression coefficient) AND variation (e.g. standard deviation) or associated estimates of uncertainty (e.g. confidence intervals) |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> For null hypothesis testing, the test statistic (e.g. F , t , r) with confidence intervals, effect sizes, degrees of freedom and P value noted
<i>Give P values as exact values whenever suitable.</i> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> For Bayesian analysis, information on the choice of priors and Markov chain Monte Carlo settings |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> For hierarchical and complex designs, identification of the appropriate level for tests and full reporting of outcomes |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> Estimates of effect sizes (e.g. Cohen's d , Pearson's r), indicating how they were calculated |

Our web collection on [statistics for biologists](#) contains articles on many of the points above.

Software and code

Policy information about [availability of computer code](#)

Data collection

Data analysis

For manuscripts utilizing custom algorithms or software that are central to the research but not yet described in published literature, software must be made available to editors and reviewers. We strongly encourage code deposition in a community repository (e.g. GitHub). See the Nature Research [guidelines for submitting code & software](#) for further information.

Data

Policy information about [availability of data](#)

All manuscripts must include a [data availability statement](#). This statement should provide the following information, where applicable:

- Accession codes, unique identifiers, or web links for publicly available datasets
- A list of figures that have associated raw data
- A description of any restrictions on data availability

Field-specific reporting

Please select the one below that is the best fit for your research. If you are not sure, read the appropriate sections before making your selection.

- Life sciences Behavioural & social sciences Ecological, evolutionary & environmental sciences

For a reference copy of the document with all sections, see [nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf](https://www.nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf)

Life sciences study design

All studies must disclose on these points even when the disclosure is negative.

Sample size	No sample size calculation was performed to predetermine sample sizes. The samples sizes used were in the same range of other studies in the field. Results were validated across organoid lines from at least 2 different donors.
Data exclusions	No datapoints were excluded.
Replication	Experiments were confirmed across multiple independent experiments, across multiple organoids, and across organoids from different donors. All attempts of replication were successful. Detailed information about replicate numbers are given in the figure legends.
Randomization	Not applicable. There are no experiments that require randomization and therefore no randomization was performed.
Blinding	The researchers were not blinded since no experiments needed blinding for analysis.

Reporting for specific materials, systems and methods

We require information from authors about some types of materials, experimental systems and methods used in many studies. Here, indicate whether each material, system or method listed is relevant to your study. If you are not sure if a list item applies to your research, read the appropriate section before selecting a response.

Materials & experimental systems

Methods

n/a	Involved in the study	n/a	Involved in the study
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Antibodies	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ChIP-seq
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Eukaryotic cell lines	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Flow cytometry
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Palaeontology and archaeology	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> MRI-based neuroimaging
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Animals and other organisms		
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Human research participants		
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Clinical data		
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Dual use research of concern		

Antibodies

Antibodies used	<p>Primary: mouse anti-ApoB (989529), MAB41241-SP, Novus Biologicals, dilution 1:50; rabbit anti-beta-catenin (H-102), sc-7199, Santa Cruz, dilution 1:200; rabbit anti-FADS2/Delta-6 Desaturase (aa79-108), LS-C165916, LSBio, dilution 1:50; rat anti-Ki-67 (SoIA15), 14-5698-82, Thermo Fisher; dilution 1:1000; rabbit anti-MTP, ab63467, Abcam, dilution 1:500; sheep anti-PNPLA3/Adiponutrin, AF5208, R&D systems, dilution 1:100.</p> <p>Secondary: Alexa Fluor 488 anti-mouse, A11029; Alexa Fluor 488 anti-rabbit, A21206; Alexa Fluor 568 anti-sheep, A21099; Alexa Fluor 568 anti-rabbit; Alexa Fluor 647 anti-rat, A21247; Alexa Fluor 647 anti-rabbit A21245. All secondary antibodies were purchased from Thermo Fisher, dilution 1:1000.</p> <p>Cell membranes were stained with Phalloidin-Atto 647N, 65906, Sigma-Aldrich, dilution 1:2000.</p>
Validation	<p>All antibodies were validated by the manufacturers and have been used across multiple publications.</p> <p>Anti-Ki-67 purified (SoIA15) #14-5698-82 (https://www.thermofisher.com/antibody/product/Ki-67-Antibody-clone-SoIA15-Monoclonal/14-5698-82). This Antibody was verified by Cell treatment to ensure that the antibody binds to the antigen stated. Citations: e.g. PMID: 34525348, PMID: 34100459</p> <p>Anti-APOB #MAB41241-SP (https://www.bio-technie.com/p/antibodies/human-apolipoprotein-b-apob-antibody-989529_mab41241). Apolipoprotein B/ApoB in Human HepG2 and MCF-7 Cell Lines. Apolipoprotein B/ApoB was detected in immersion fixed HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line (positive control) and MCF-7 human breast cancer cell line (negative control) using Mouse Anti-Human Apolipoprotein B/ApoB Monoclonal Antibody (Catalog # MAB41241) at 8 µg/mL for 3 hours at room temperature.</p> <p>Anti-MTTP #ab63467 (https://www.abcam.com/mttptmp-antibody-ab63467.html). This antibody gave a positive signal in Human Liver Tissue Lysate. Citations: e.g. PMID: 29074218, PMID: 28959527, PMID: 22648712.</p>

Phalloidin–Atto 647N #65906 (<https://www.sigmaldrich.com/NL/en/product/sigma/65906>). Citations: e.g. PMID: 32123335.

Anti-FADS2/delta-6 desaturase (aa79-108) (<https://www.lsbio.com/antibodies/delta-6-desaturase-antibody-fads2-antibody-aa79-108-flow-if-immunofluorescence-ihc-wb-western-ls-c165916/173263#reviews-section>). FADS2 antibody LS-C165916 is an unconjugated rabbit polyclonal antibody to human FADS2 (Delta-6 Desaturase) (aa79-108). Validated for Flow, IF, IHC and WB.

Anti-PNPLA3/adiponutrin #AF5208. (https://www.rndsystems.com/products/human-adiponutrin-pnpla3-antibody_af5208). Adiponutrin/ADPN was detected in immersion fixed human adipocytes using 10 µg/mL Sheep Anti-Human Adiponutrin/ADPN Antigen Affinity-purified Polyclonal Antibody (Catalog # AF5208) for 3 hours at room temperature. Citations: e.g. PMID34288010.

Eukaryotic cell lines

Policy information about [cell lines](#)

Cell line source(s)	All human hepatocyte organoid lines used in this study were derived from human fetal liver tissues from termination material from donors with informed consent under ethical permission (Leiden University Medical Center).
Authentication	None of the organoid lines were authenticated.
Mycoplasma contamination	All organoid lines were regularly assessed for mycoplasma contamination and scored negatively without exception.
Commonly misidentified lines (See ICLAC register)	N.A.

Human research participants

Policy information about [studies involving human research participants](#)

Population characteristics	Anonymized healthy human fetal livers from both males and females were included.
Recruitment	We included in the study any available anonymously donated healthy human fetal liver tissues upon informed consent. No pre-selection was performed, to avoid any bias.
Ethics oversight	Anonymized human fetal livers became available after pregnancy terminations and upon informed consent and under ethical permission from the Leiden University Medical Center.

Note that full information on the approval of the study protocol must also be provided in the manuscript.

FUSION-NEGATIVE RHABDOMYOSARCOMA 3D-ORGANOIDS AS AN INNOVATIVE MODEL TO PREDICT RESISTANCE TO CELL DEATH INDUCERS

Clara Savary, Paul Huchedé, Léa Luciana, Arthur Tourbez, Clémence Deligne, Cécile Picard, Thomas Diot, Claire Coquet, Nina Meynard, Marionne Grand, Laurie Tonon, Nicolas Gadoi, Cyril Degletagne, Sophie Rochet, Isabelle Rochet, Kevin Müller, Valéry Attignon, Alexandre Bomane, Isabelle Rochet, Virginie Moutetas, Christophe Bergeron, Paul Ri naudo, Aurélie Dutoir, Martine Cordier-Bussat, Frédérique Djoudj, Nadège Corradini, Delphine Maucort-Boulch, Eddy Pasquier, Jean-Yves Blay, Marie Castets, Laura Broutier,

Targeting apoptosis constitutes a promising therapeutic approach for rhabdomyosarcoma (RMS), as alterations in the expression of some apoptotic effectors have been linked to clinical outcome. Several studies have thus been conducted mostly *in vitro* on cell lines grown as monolayers and *in vivo* in xenograft experiments. However, clinical translation of these data is hampered by the expected emergence of resistance, as observed in clinical trials in other cancers. We propose here to develop a preclinical model bridging the gap between *in vitro*/xenograft models and the actual human response.

