

Master 1 Biologie Santé

UE « Méthodes d'investigation en recherche : modèles intégrés »

CM « Modèles animaux en cancérogenèse »



Mme DHENNIN-DUTHILLE Isabelle
isabelle.dhennin@u-picardie.fr



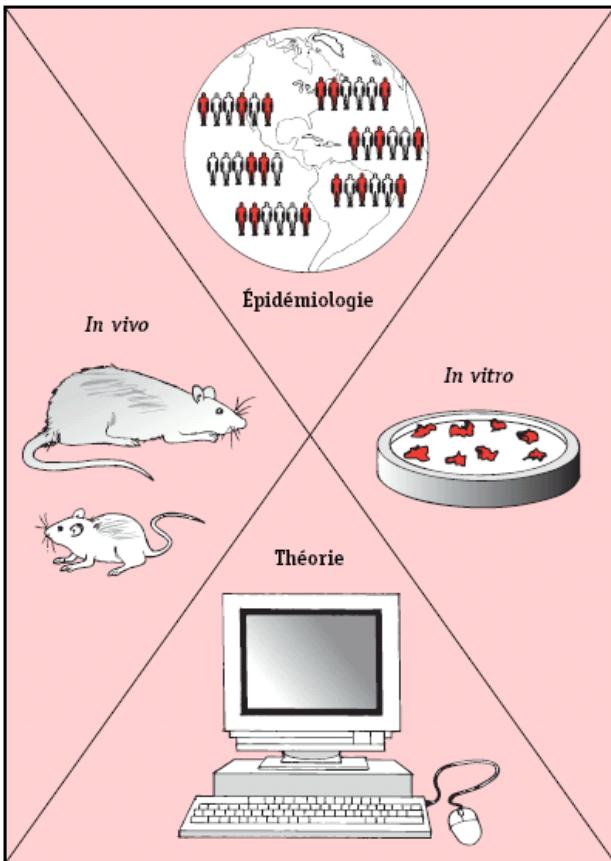
Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire EA4667

« Etudes expérimentales en cancérologie »



Etudes expérimentales

- Utilisation de volontaires humains et surveillance post-commercialisation
- Approches épidémiologiques
- Utilisation de systèmes *in vitro*
- Exploitation de données expérimentales déjà obtenues (recherches documentaires et examens systématiques)
- Emploi de modèles mathématiques et informatiques (*in silico*)
- Utilisation de modèles *in vivo*
Expérimentation animale



Etudes épidémiologiques

Différents types d'études

- les études expérimentales :

Le chercheur intervient sur le statut d'exposition des sujets :

facteurs d'exposition / moment d'exposition /personnes exposées

Limitées en raison des contraintes éthiques



Exemple : études randomisées cliniques (ERC)

ouvert : traitement connu de tous

simple aveugle : patient ne connaît pas la nature du traitement

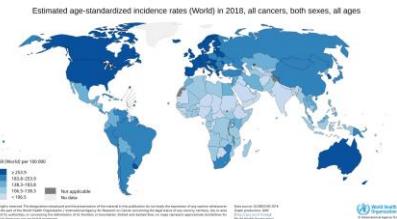
double aveugle : patient et médecine ne connaissent pas

- les études non expérimentales ou observationnelles

Exemples : études de prévalence et d'incidence

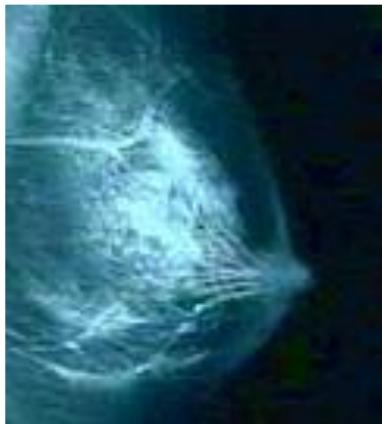
études de cohortes (exposés / non exposés au facteur de risque)

études cas témoins (sujets malades / non malades)



Etudes épidémiologiques

Etablir des marqueurs diagnostics et pronostics



tissus humains
tumorectomie



paraffine



congélation

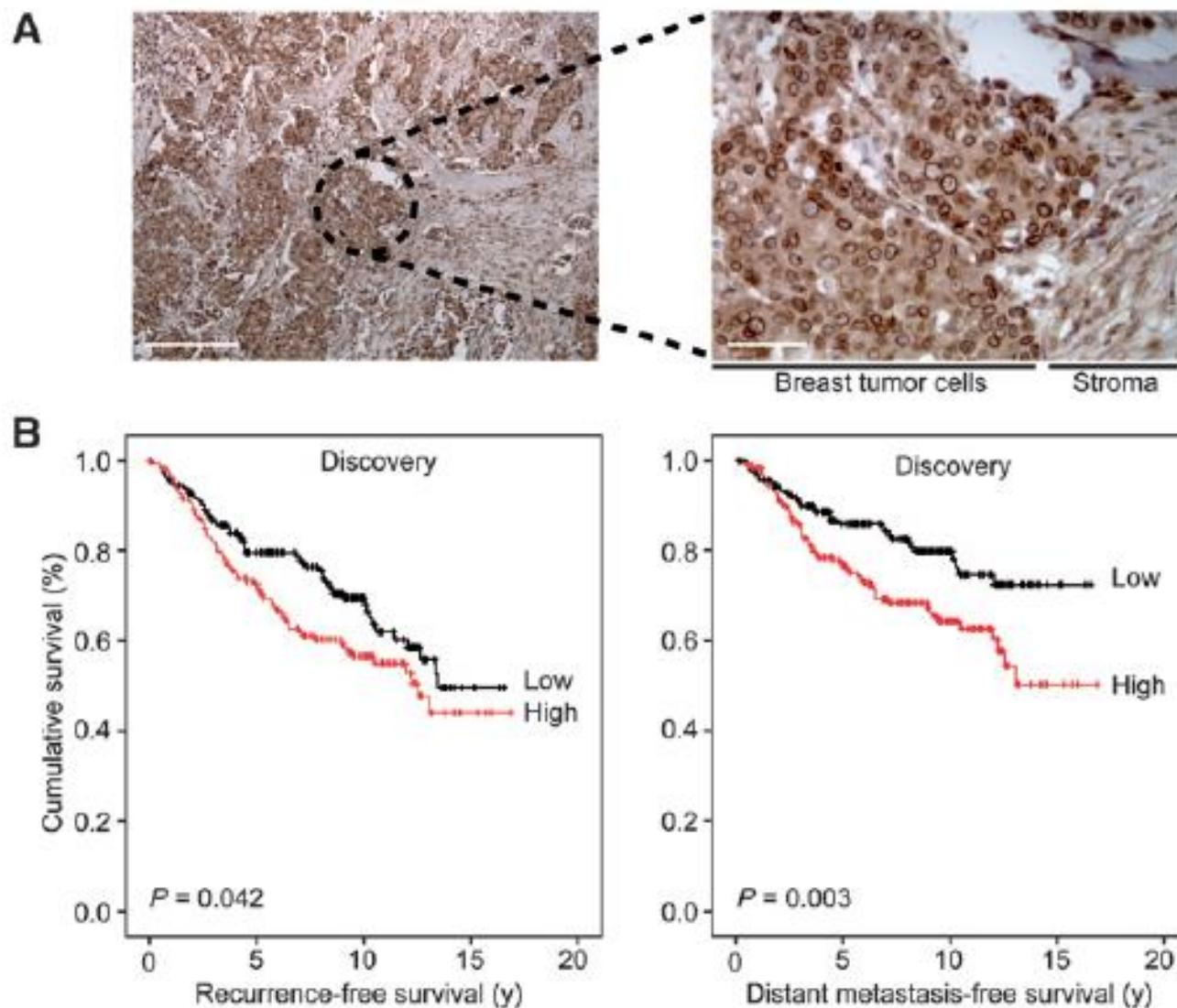


coupes de tissus
immunohistochimie

extraction d'ARNm
RT-PCR

Etudes épidémiologiques

Figure 1. TRPM7 is a strong and independent prognostic marker for breast cancer progression and metastasis. A, TRPM7 protein expression in a breast tumor section (brown). Nuclei are counterstained with hematoxylin (blue). Left, scale bar, 500 μ m. Right, scale bar, 100 μ m. Indicated are breast tumor cells and stroma. B, Kaplan-Meier analysis of recurrence-free survival (left) and distant metastasis-free survival (right) according to TRPM7 mRNA expression obtained from microarray analysis on 368 breast cancer patients (discovery cohort). TRPM7-low, $n = 184$; TRPM7-high, $n = 184$. P values are based on Log



Etudes épidémiologiques

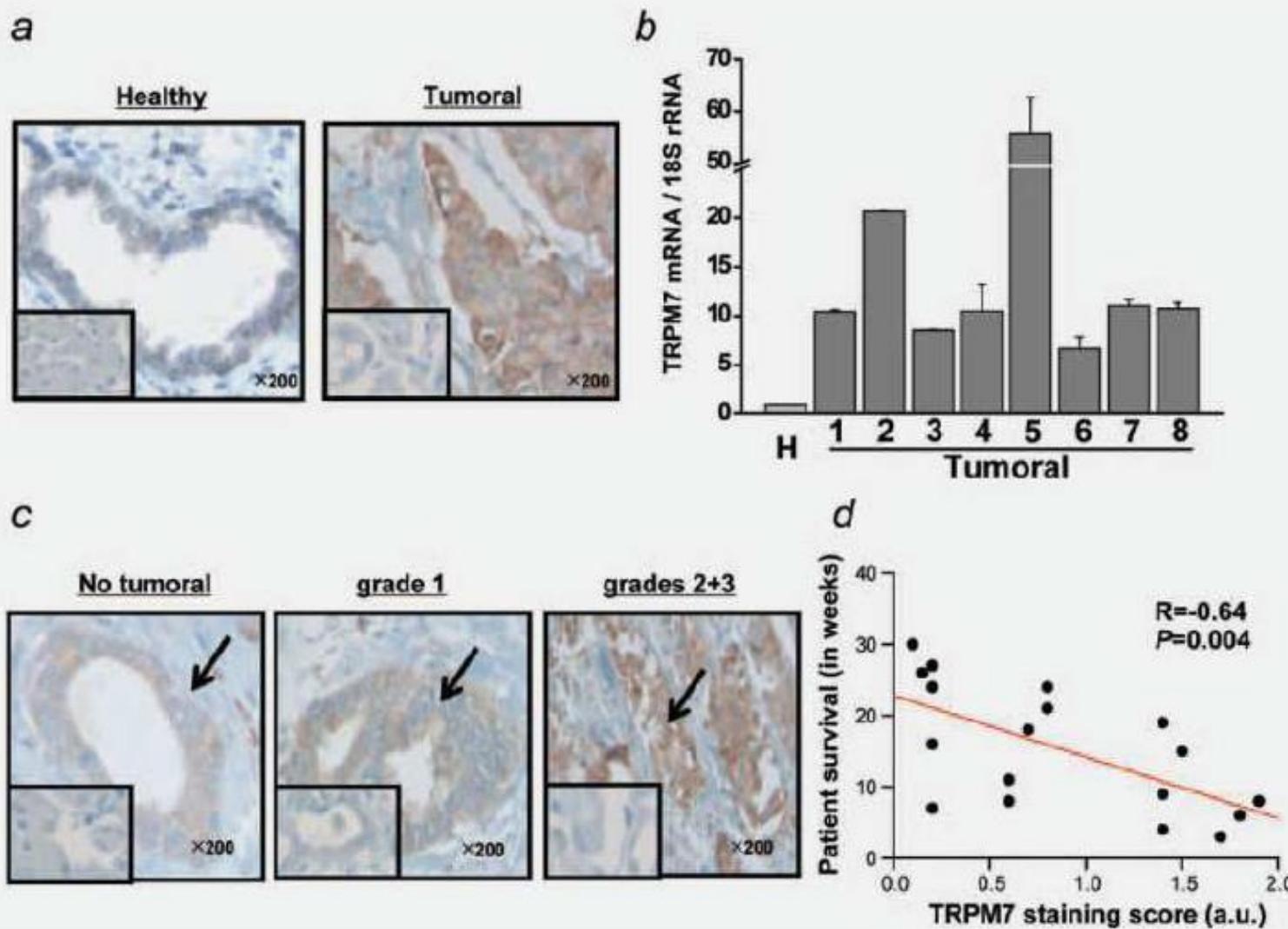


Figure 5. TRPM7 is overexpressed in PDAC; its expression depends on tumor grade and survival. (□) Left panel: no staining was observed

Rybarczyk *et al.*, 2012

Etudes *in silico*

Analyse des banques de données :

Exemple du TCGA (The Cancer Genome Atlas) et de GTEx (Genotype-tissue Expression)

A - ESCA

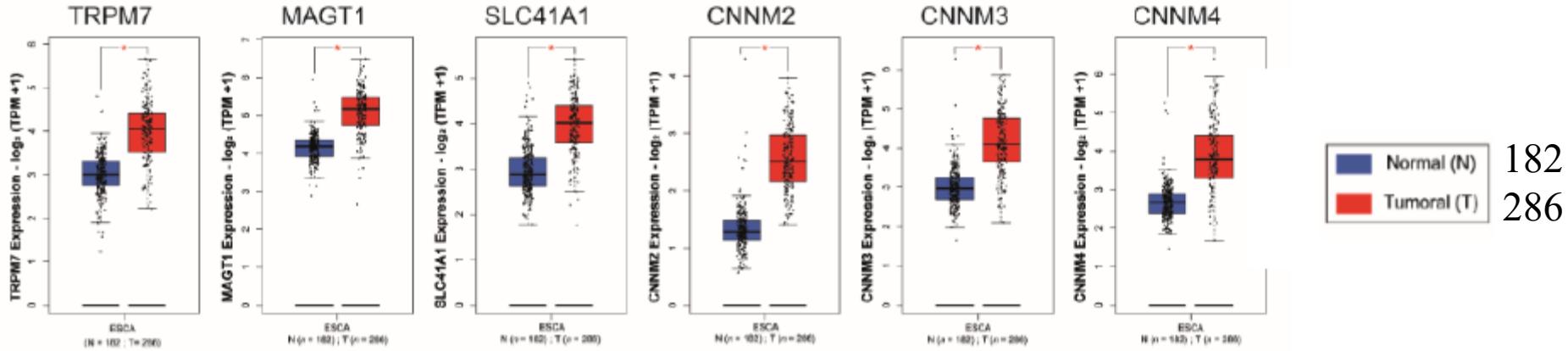


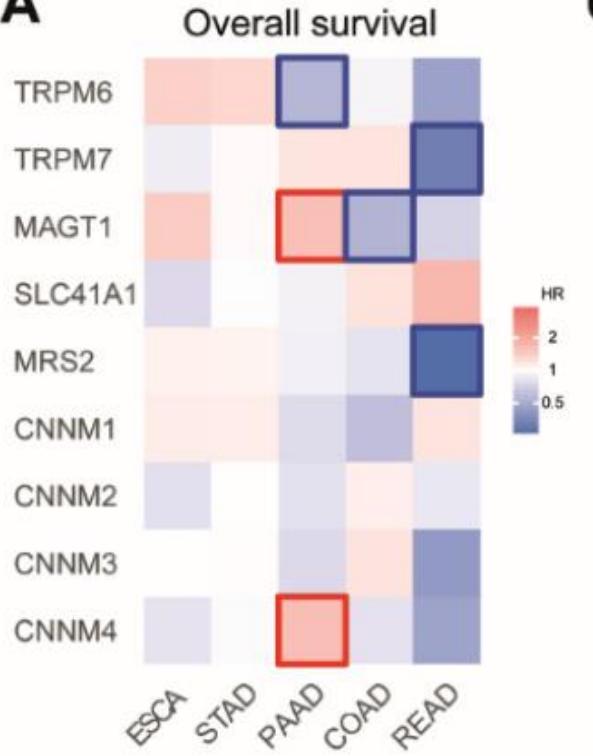
Figure 3. Relative mRNA expression of magnesium transporters in digestive cancers and normal tissues. Whiskers boxplots for Mg²⁺ transporters mRNA (TRPM6, TRPM7, MAGT1, SLC41A1, MRS2, CNNM1, CNNM2, CNNM3, CNNM4) were generated using GEPIA2 from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx) samples. TCGA datasets were (A) Esophageal carcinoma (ESCA),

Etudes *in silico*

Analyse des banques de données :

Exemple du TCGA (The Cancer Genome Atlas) et de GTEx (Genotype-tissue Expression)

A



C

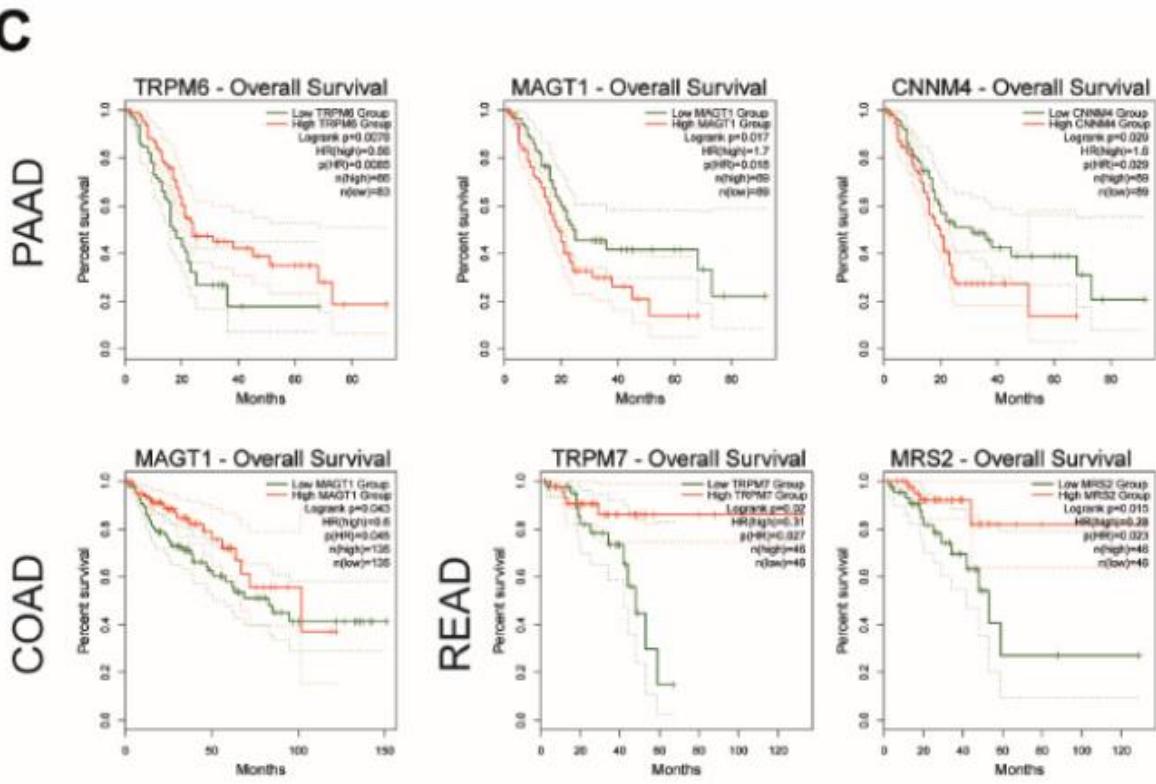


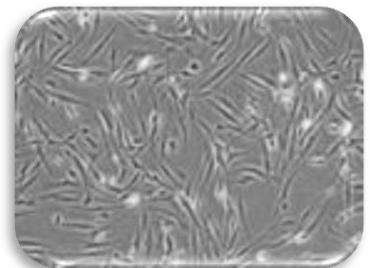
Figure 4. Analysis of patient survival in digestive cancers. Survival heatmaps were generated using GEPIA2 with TCGA data for overall survival (A) and disease-free survival (B) for Esophageal Cancer (ESCA), Stomach Adenocarcinoma (STAD), Pancreatic Adenocarcinoma (PAAD), Colon Adenocarcinoma (COAD) and Rectum Adenocarcinoma (READ) datasets.

Modèles *in vitro*

- les **cultures organotypiques** : tranches ou morceaux d'organes



- les **cultures primaires** : culture de cellules dans une boîte de Pétri à partir d'un prélèvement d'organe ou de tissu (temps de vie limité)



- les **lignées cellulaires** : culture dans une boîte de Pétri de cellules immortalisées (temps de vie illimité, immortalisation spontanée ou transfection)

Modèles *in vitro*

Les cultures organotypiques

Exemple de test de chimiothérapies sur biopsie d'adénocarcinome pancréatique

culture organotypique de fragments
de la tumeur du patient

Etude :

- Quelle substance agit sur la biopsie ?
- Transfert au patient



Modèles *in vitro*

Les cultures primaires

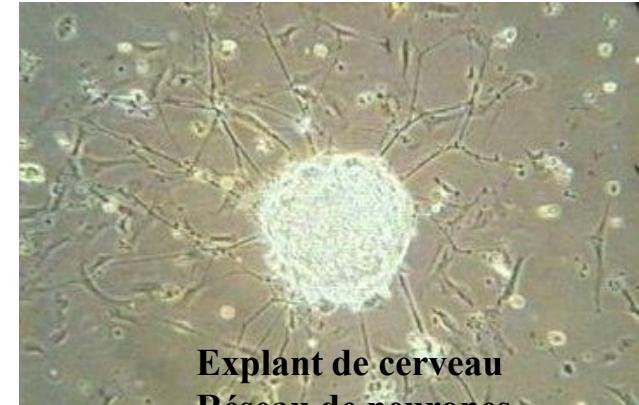
Méthode d'obtention de la culture primaire

2 types de cellules dans organisme

- cellules circulantes ou libres (cellules sanguines)
- cellules des tissus solides

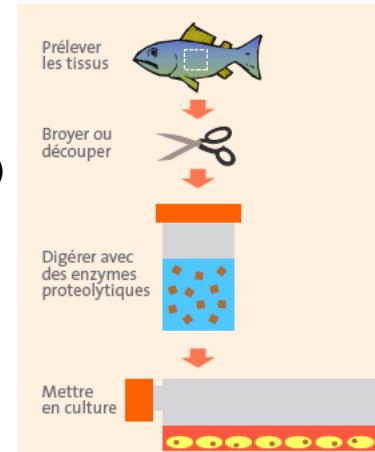
Récupération

- cellules circulantes : centrifugation différentielle (facile)
- cellules tissus solides : 2 procédés (plus difficile)
 - 1) migration cellulaire à partir d'explant
(explant = prélèvement d'un morceau de tissu ou organe)
 - 2) dissociation du tissu avec libération des cellules
(mécanique, chimique EDTA, enzymatique collagénase hyaluronidase)



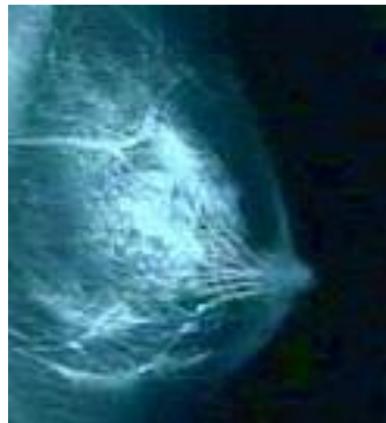
Explant de cerveau
Réseau de neurones

⇒ Culture de cellules obtenues à partir d'organe ou de tissu
= primoculture ou culture primaire.

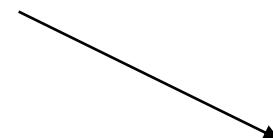


Modèles *in vitro*

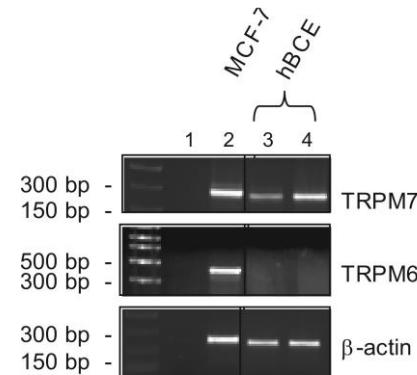
Les cultures primaires Exemple du cancer du sein



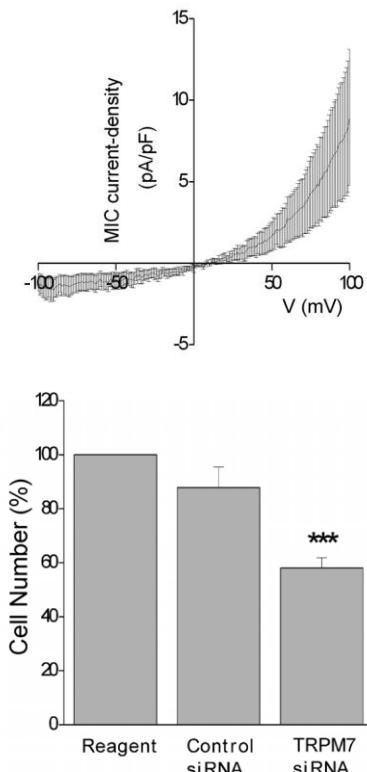
tissus humains
tumorectomie



culture primaire (hBCE)
études fonctionnelles



frais



Prolifération
Migration/invasion
Patch-clamp / imagerie

Modèles *in vitro*

Les lignées cellulaires

Définition de la notion de lignée : basée sur la longévité de la cellule

Cultures normales ou définies

Cellules ne se multiplient que pendant un nombre limité de divisions (30 à 50 repiquages)
Multiplication ralentie
Mort par vieillesse (sénescence)

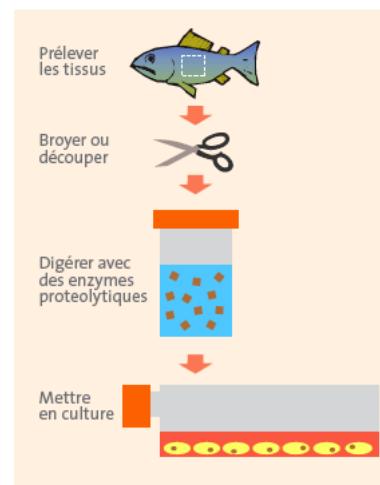
Culture continue ou lignées transformées ou cellules immortelles

Cellules se multiplient pendant un temps indéfini et ne meurent pas
Cellules normales immortalisées, cellules embryonnaires ou souches
Ou cellules issues de Transformation bénigne ou maligne

Cultures primaires, cultures définies et lignées cellulaires :

Majorité C primaires ↗
Qlq C survivent et X indéfinies

Lignée cellulaire



Culture primaire

Modèles *in vitro*

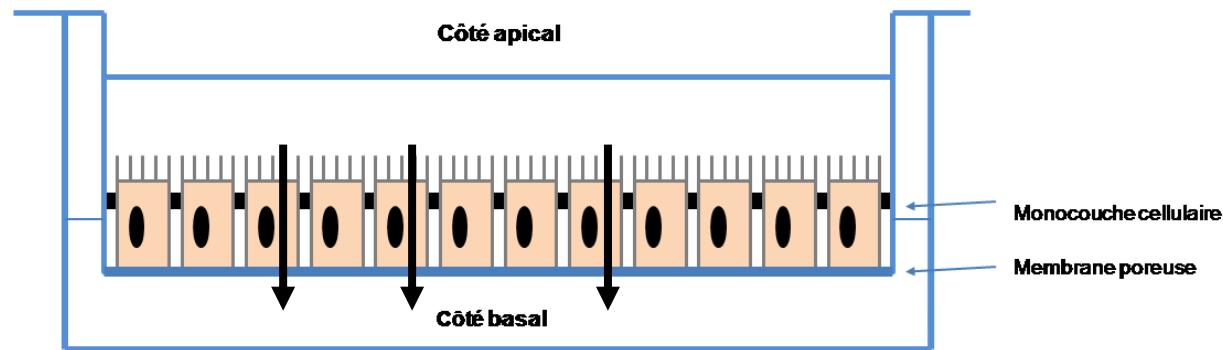
Les lignées cellulaires

Exemple de l'étude de l'absorption intestinale « *in vitro* » : cellules Caco-2

Cellules d'adénocarcinome de colon humain

Adénocarcinome = cancer des cellules épithéliales

Division illimitée



Intérêt

Bonne corrélation avec le niveau d'absorption intestinale chez l'homme

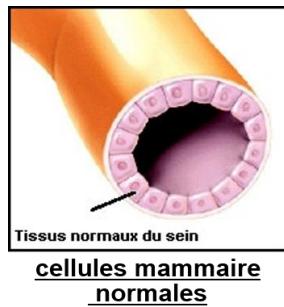
Bien adaptée pour évaluer la diffusion passive

Modèles *in vitro*

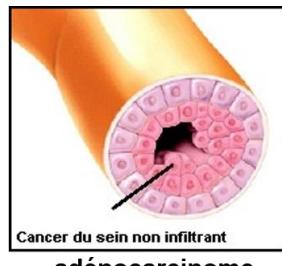
Les lignées cellulaires

Exemple du cancer du sein

Cellules d'adénocarcinome mammaire représentant les différents stades de l'évolution :



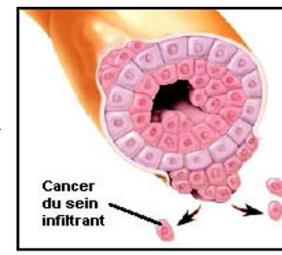
MCF10A
hTERT



tumeur localisée

MCF-7
T47D

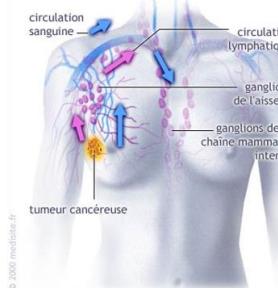
- ganglions lymphatiques axillaires
- os, foie, poumons, cerveau



tumeur invasive

sang
lymphé

métastases

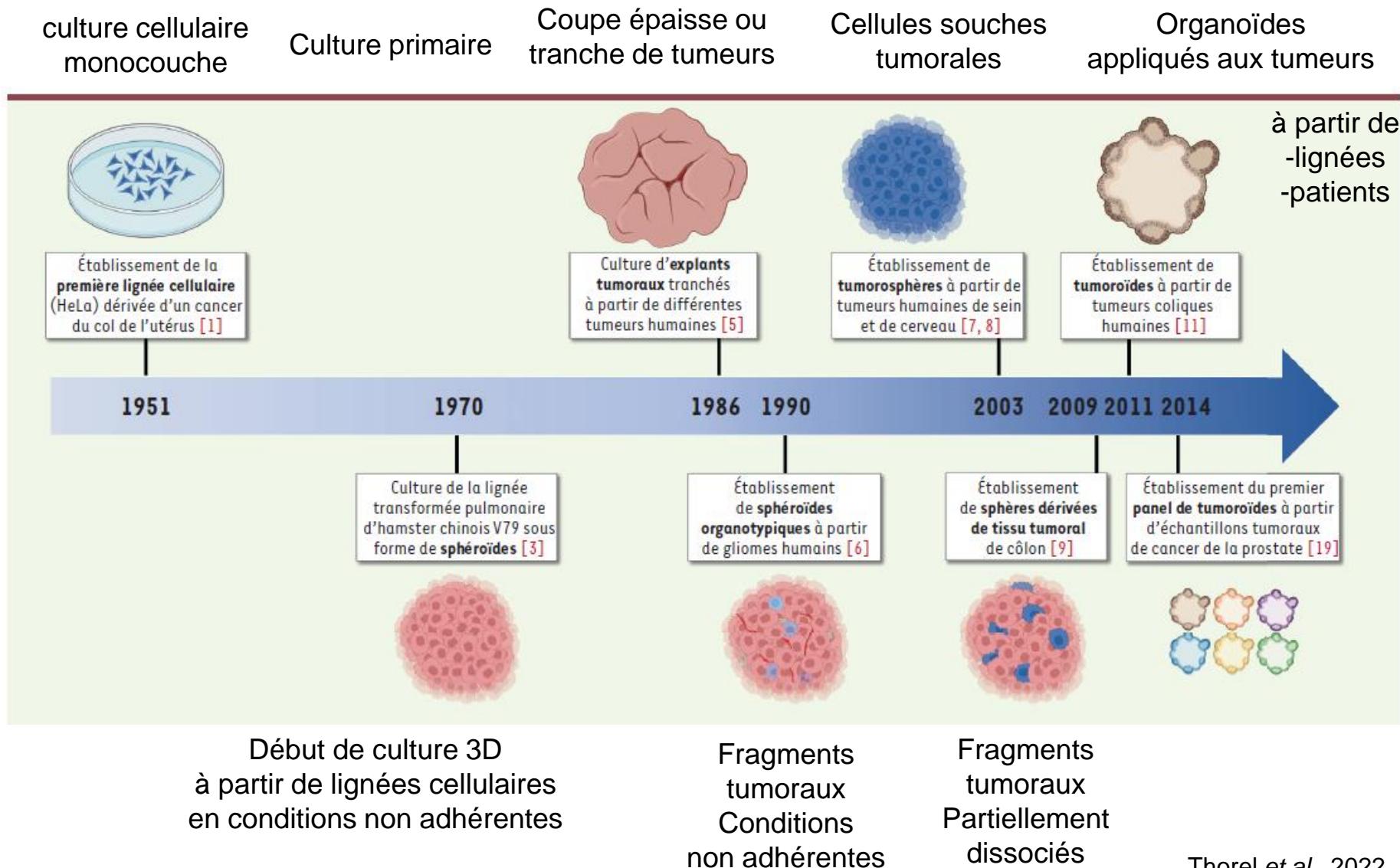


MDA-MB-231

MDA-MB-231 BrM
brain metastasis

Modèles *in vitro*

Modèles cellulaires en cancérogenèse



Modèles *in vitro*

Les organoïdes tumoraux = organes de synthèse ?

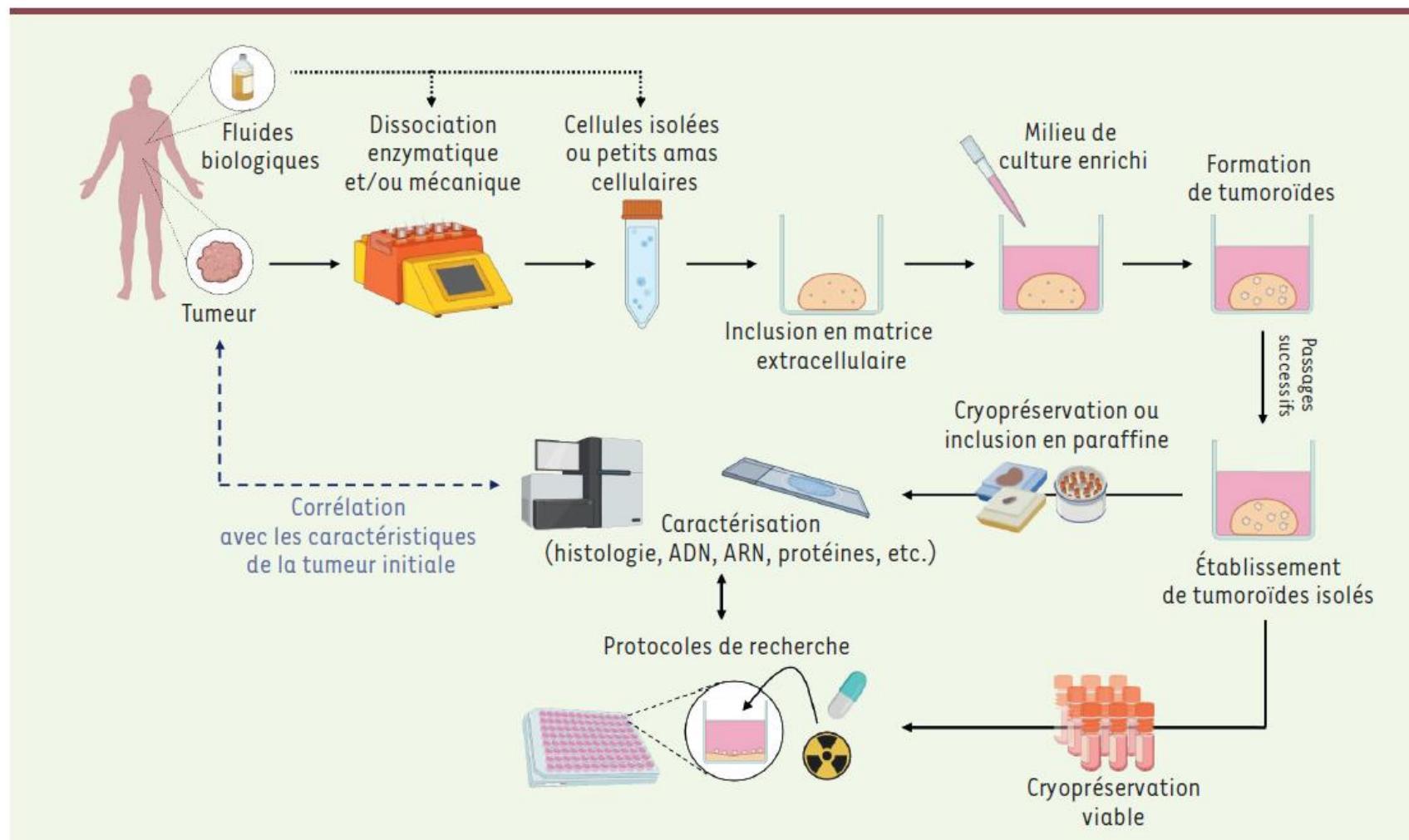


Figure 2. Représentation schématique des différentes étapes de production et d'utilisation des organoïdes tumoraux à visée de recherche.

Modèles *in vitro*

Les organoïdes tumoraux

- se rapprochent de la physiologie des tumeurs :
amélioration des tumoroïdes avec différents types cellulaires

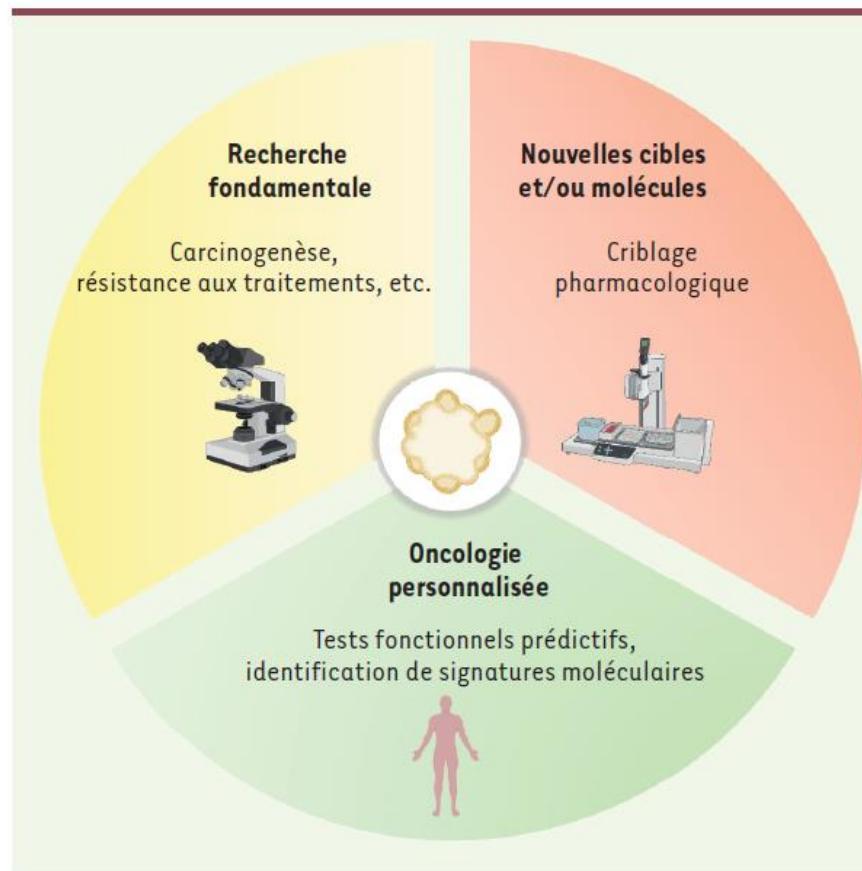


Figure 3. Domaines d'applications des tumoroïdes en oncologie.

Modèles *in vitro*

Les organoïdes tumoraux

- vers une oncologie personnalisée ?

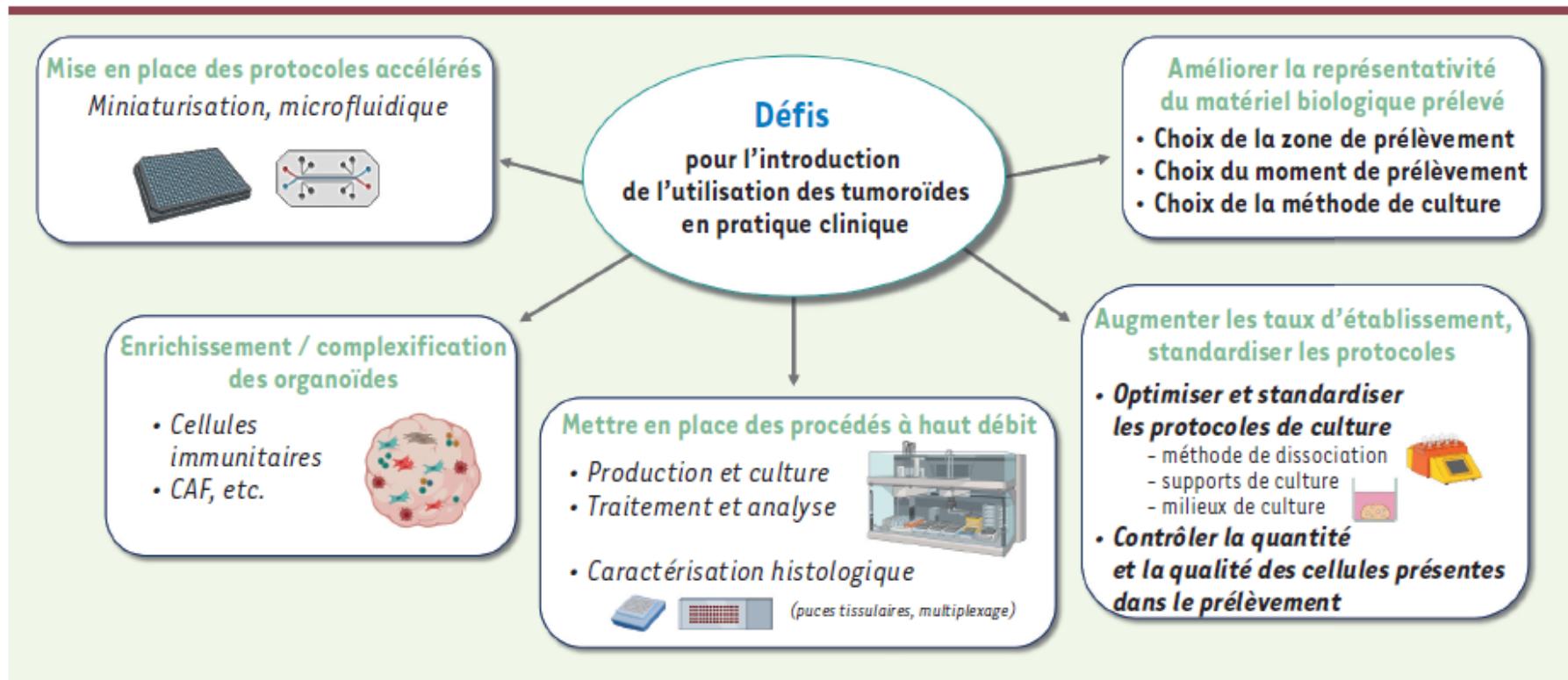


Figure 2. L'introduction de l'utilisation des tumoroïdes en routine clinique nécessite encore la résolution de diverses difficultés. Ces défis font l'objet de nombreux développements de la part de la communauté scientifique et médicale, dans un contexte multidisciplinaire. CAF : Cancer-Associated Fibroblast.

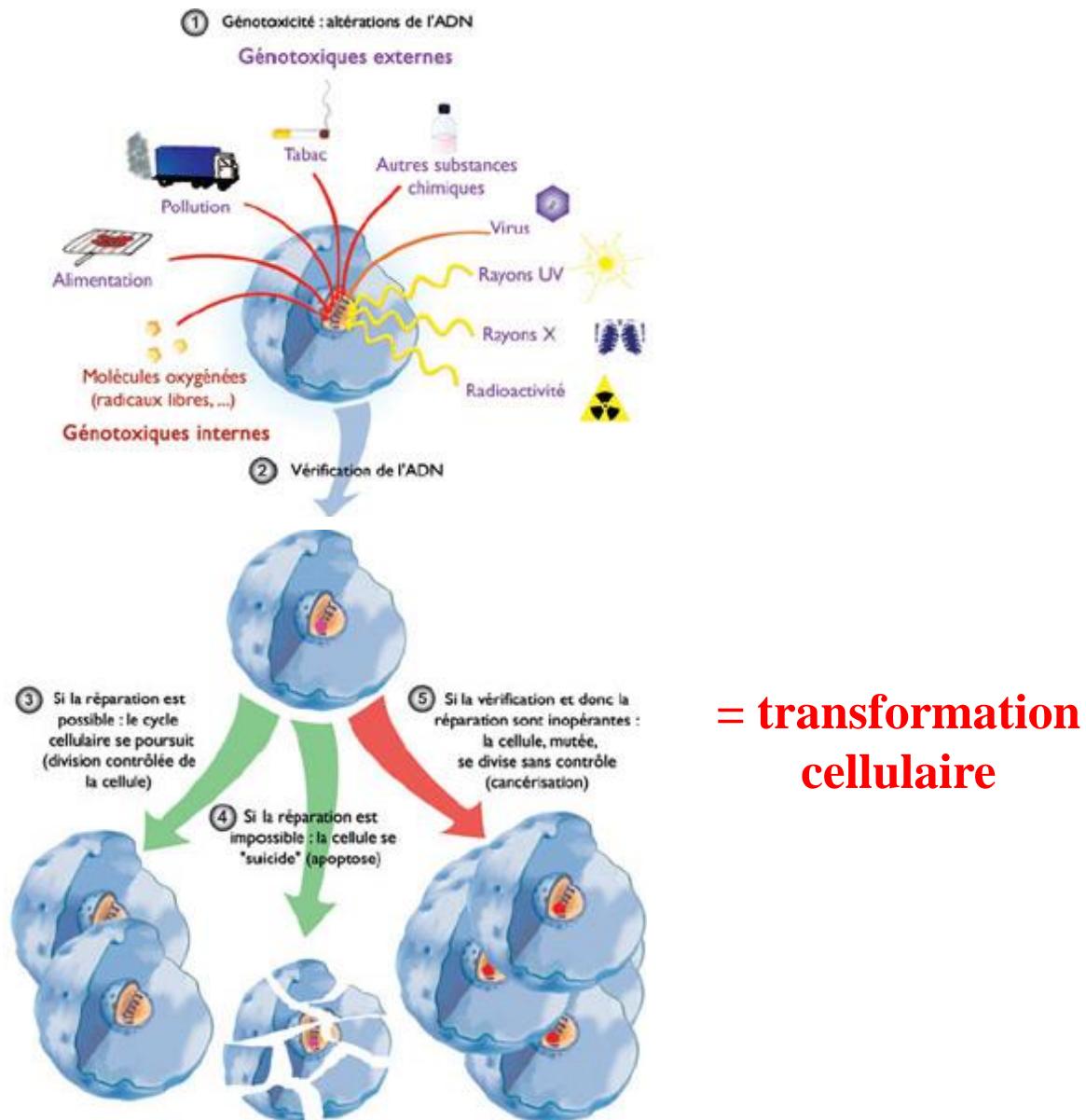
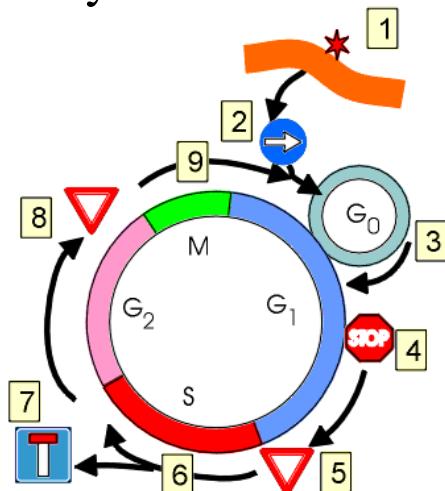
« Modèles animaux en cancérogenèse »

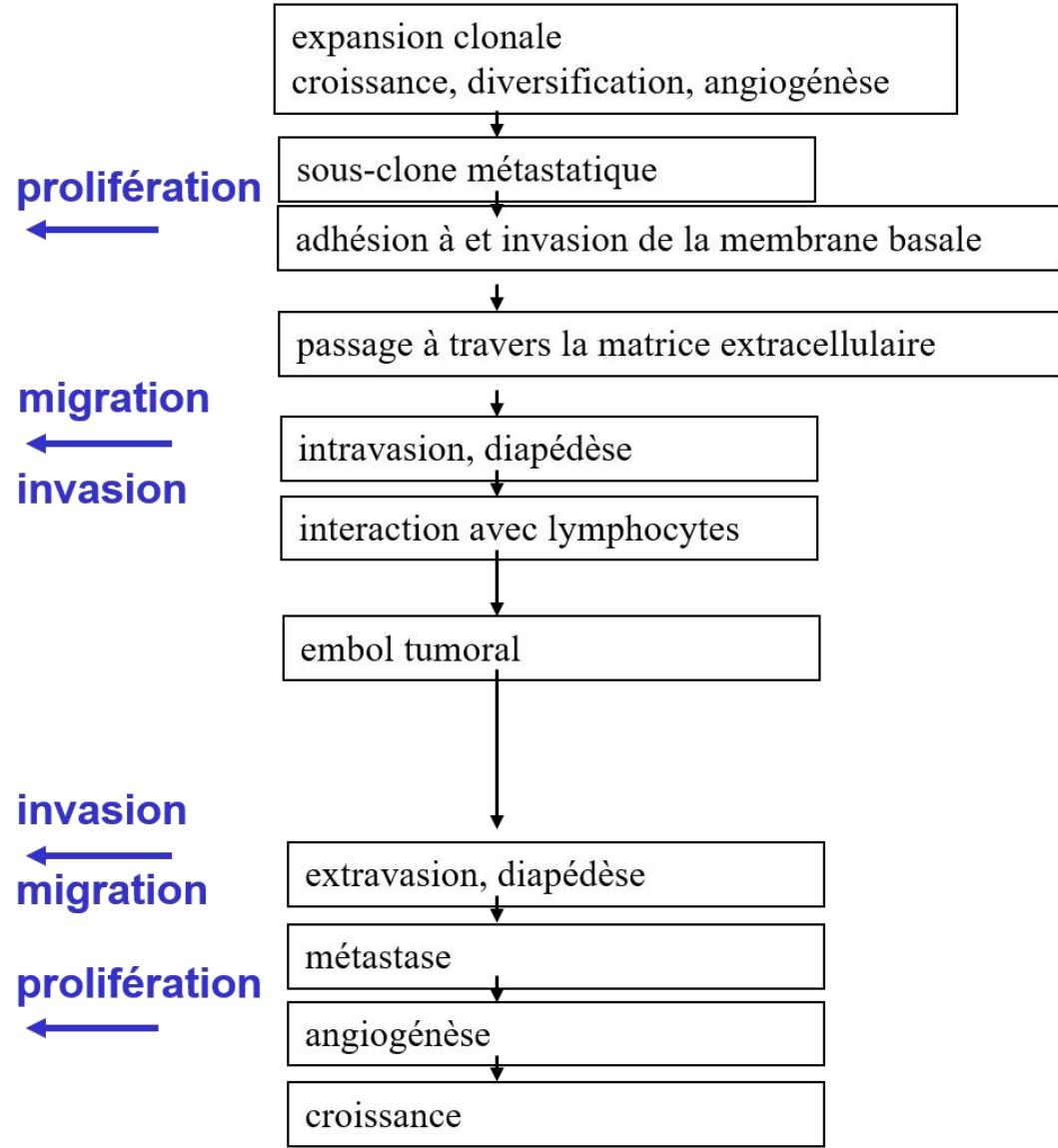
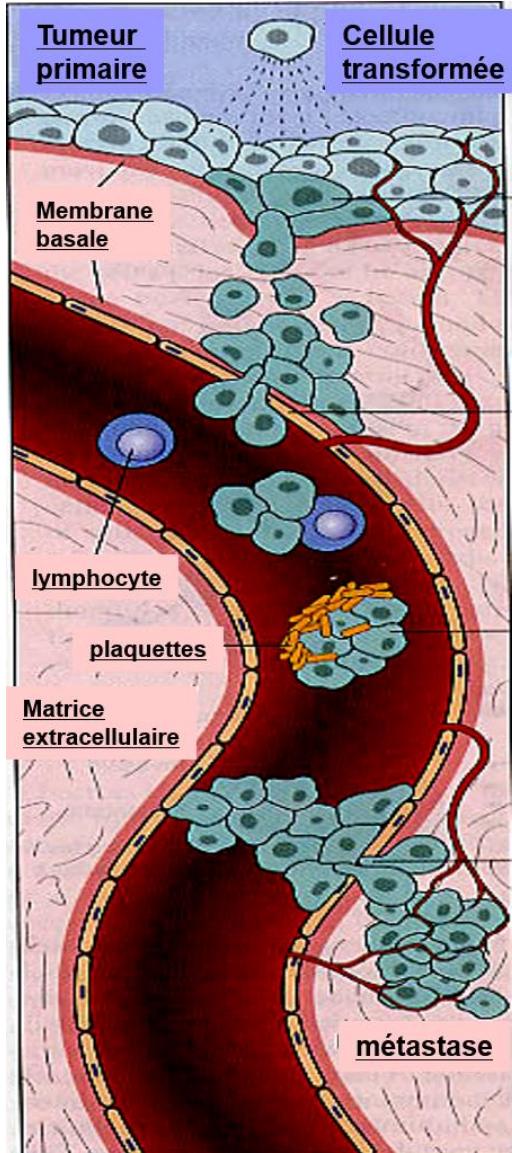


Mécanisme général de carcinogenèse

- facteurs cancérogènes : altération de l'ADN
- stimulation des oncogènes inhibition des anti-oncogènes

perte de contrôle du cycle cellulaire





Modèles d'animaux en cancérogenèse

Tumeur induite
physiquement ou chimiquement

Modèles syngéniques

Injection lignées de cancer murines
Induction par agents chimiques



Tumeur humaine greffée

Xénogreffes

Injection lignées de cancer humaines
Implantation de tumeurs primaires humaines
Position sous-cutanée
Position orthotopique
Position intraveineuse

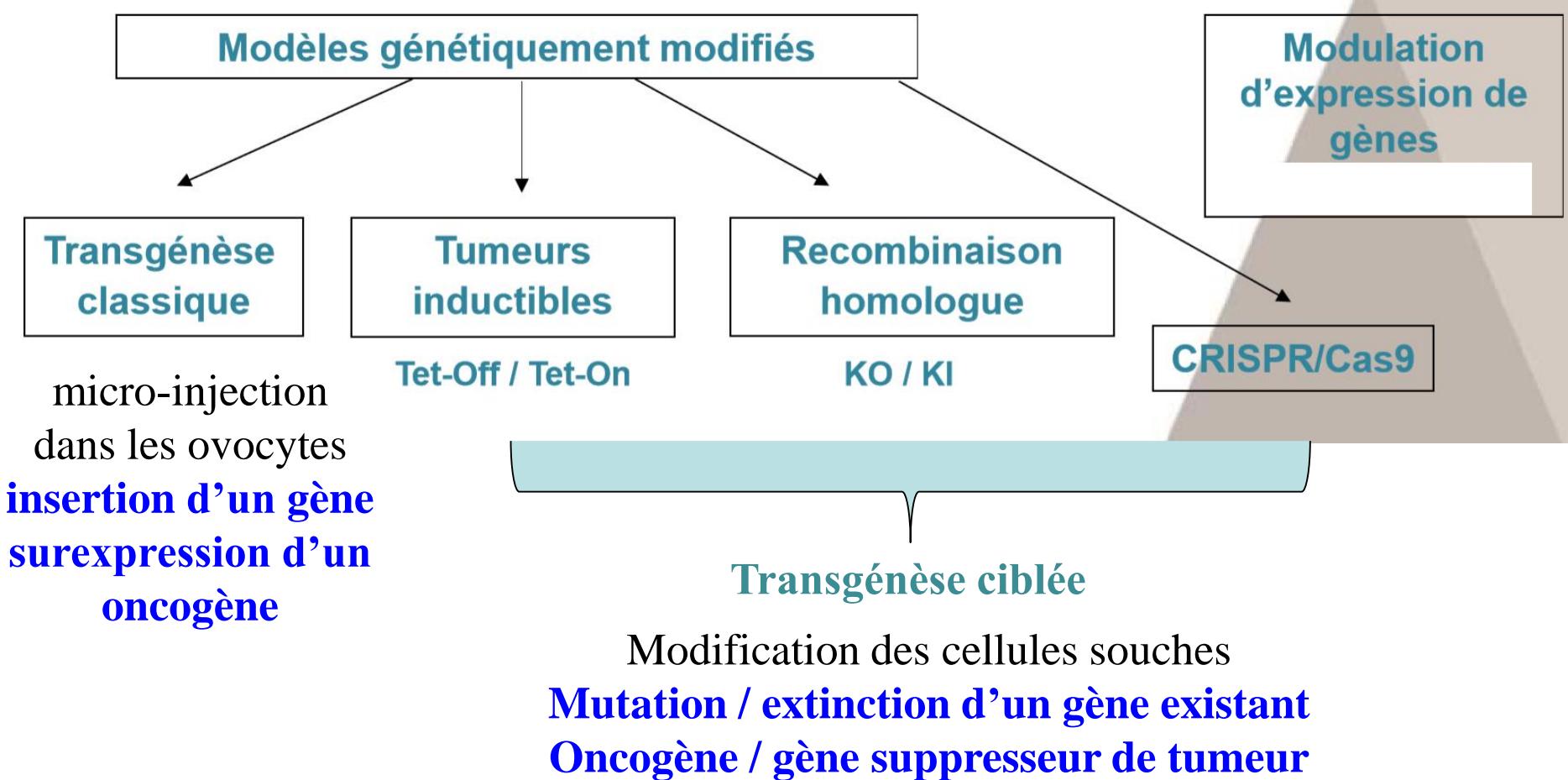


Modèles transgéniques ou knock-out

Surexpression d'oncogènes
Inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs

Tumeurs spontanées
chez souris mutées ou transgéniques

1- Les modèles transgéniques



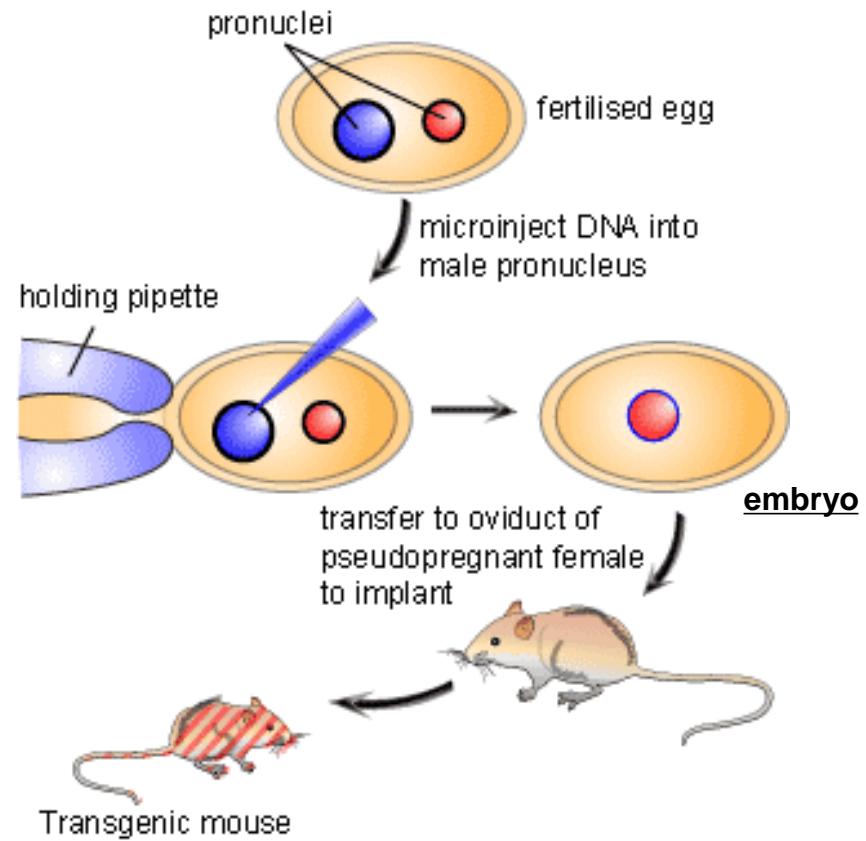
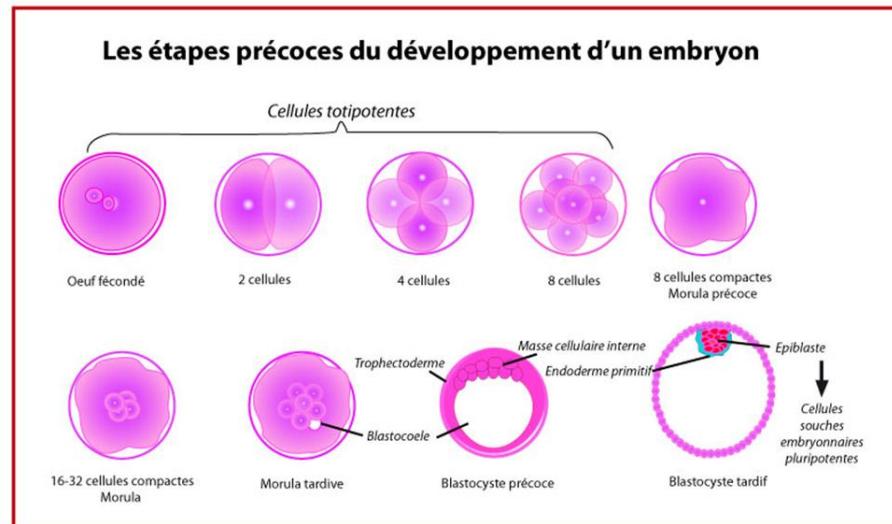
applications :
modèles animaux de cancer
mutations spécifiques des patients

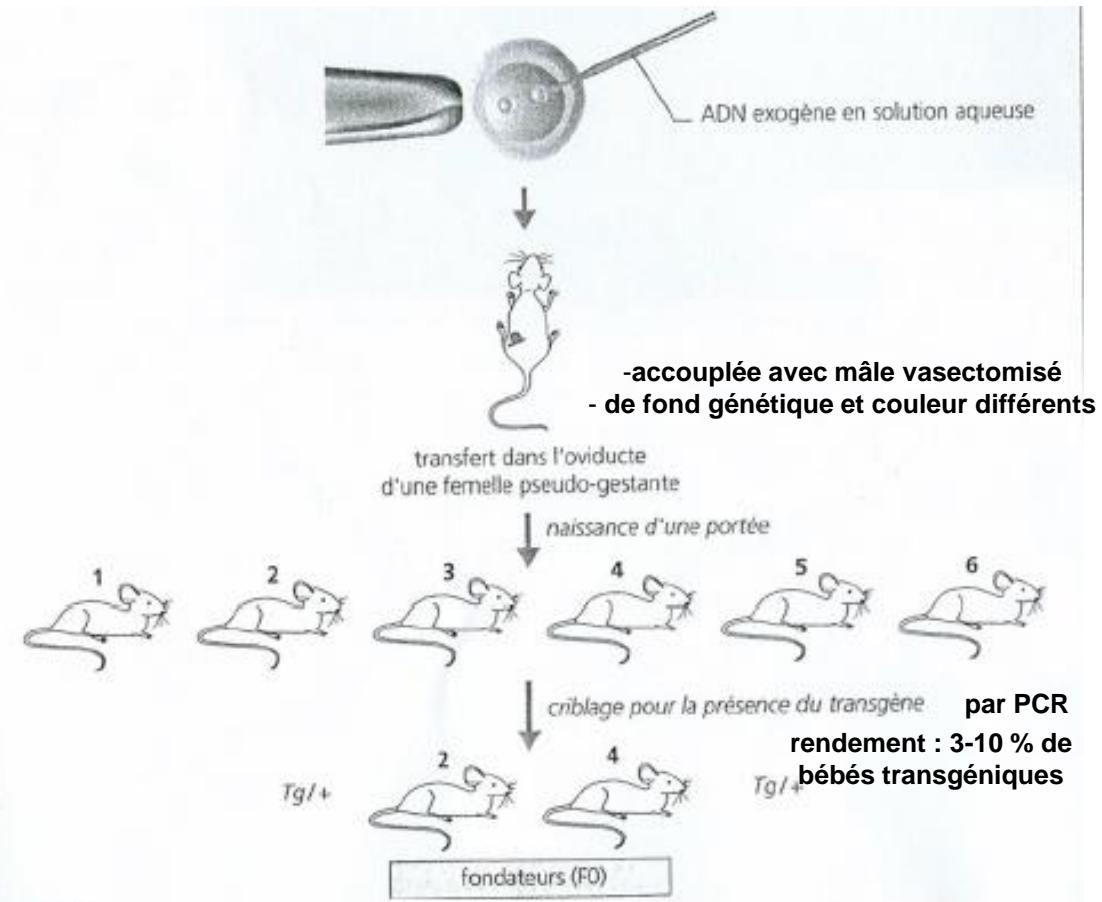
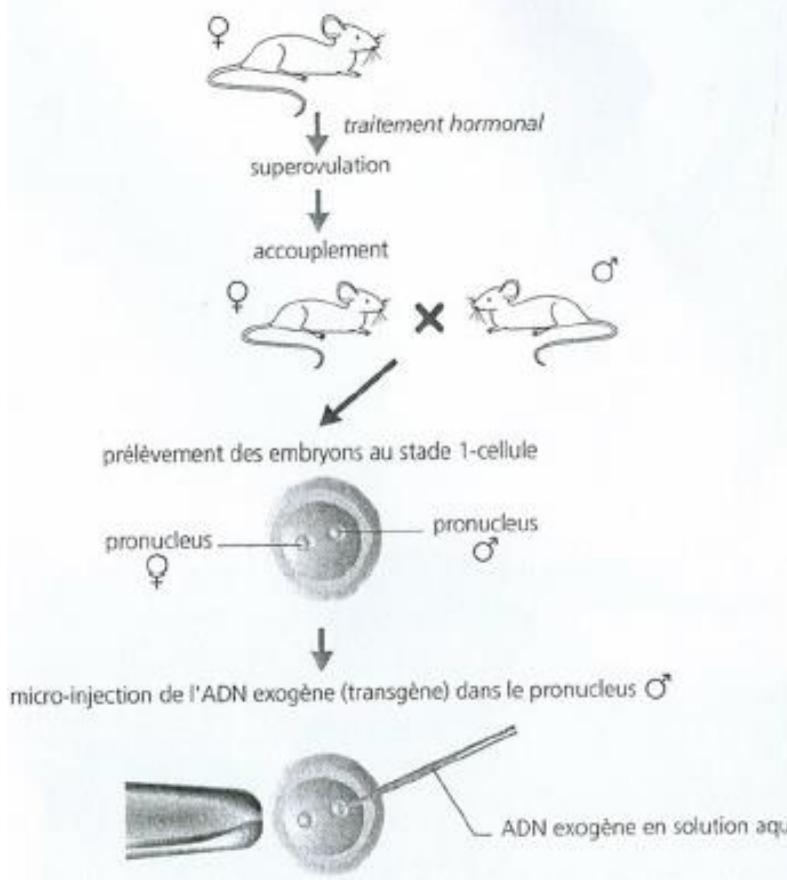
pour :
comprendre les mécanismes
tester de nouvelles thérapies

La transgenèse classique

- Transgénèse classique ou additive:

Addition d'un nouveau gène ou d'un gène déjà existant





Lignée de souris transgéniques

3-6 mois

Exemple : animaux exprimant hGH

1ère souris transgénique : Surexpression du gène codant pour l'hormone de croissance (GH).

Recherche effectuée par l'équipe de Brinster en 1982

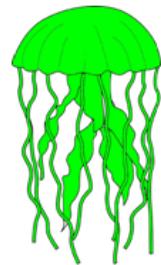


Souris de taille normale.

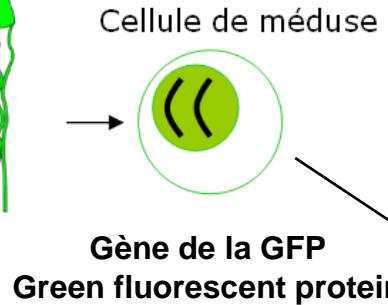
Souris transgénique géante

Exemple : animaux exprimant la GFP

Méduse émettant une lumière verte



Cellule de méduse

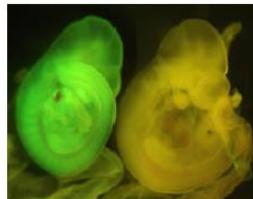
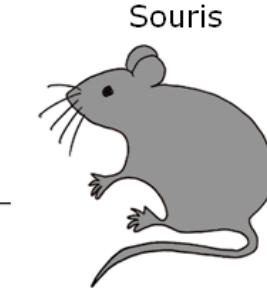
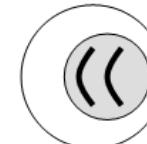


Gène de la GFP

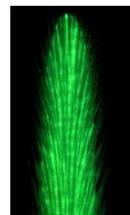
Green fluorescent protein

Transgénèse

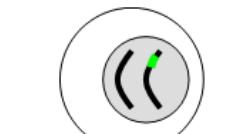
Ovule fécondé



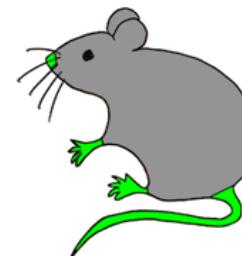
9.5 day embryos -
GFP and wt



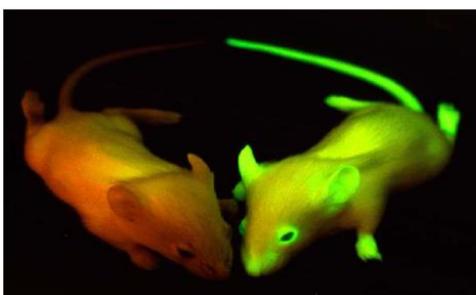
Tail tip



Sourceau fluorescent



GFP transgenic mice
NAGY



Souris transgénique pour la GFP
(green fluorescent protein) : rend
les souris fluorescentes lors d'une
exposition aux rayons ultraviolets.

La lueur émanant de la peau
est camouflée par les poils

Exemples : production de médicaments

protéine anti-coagulante
anti-thrombine III (ATIII)



traitement des patients
Subissant un pontage
aorto-coronarien par greffe

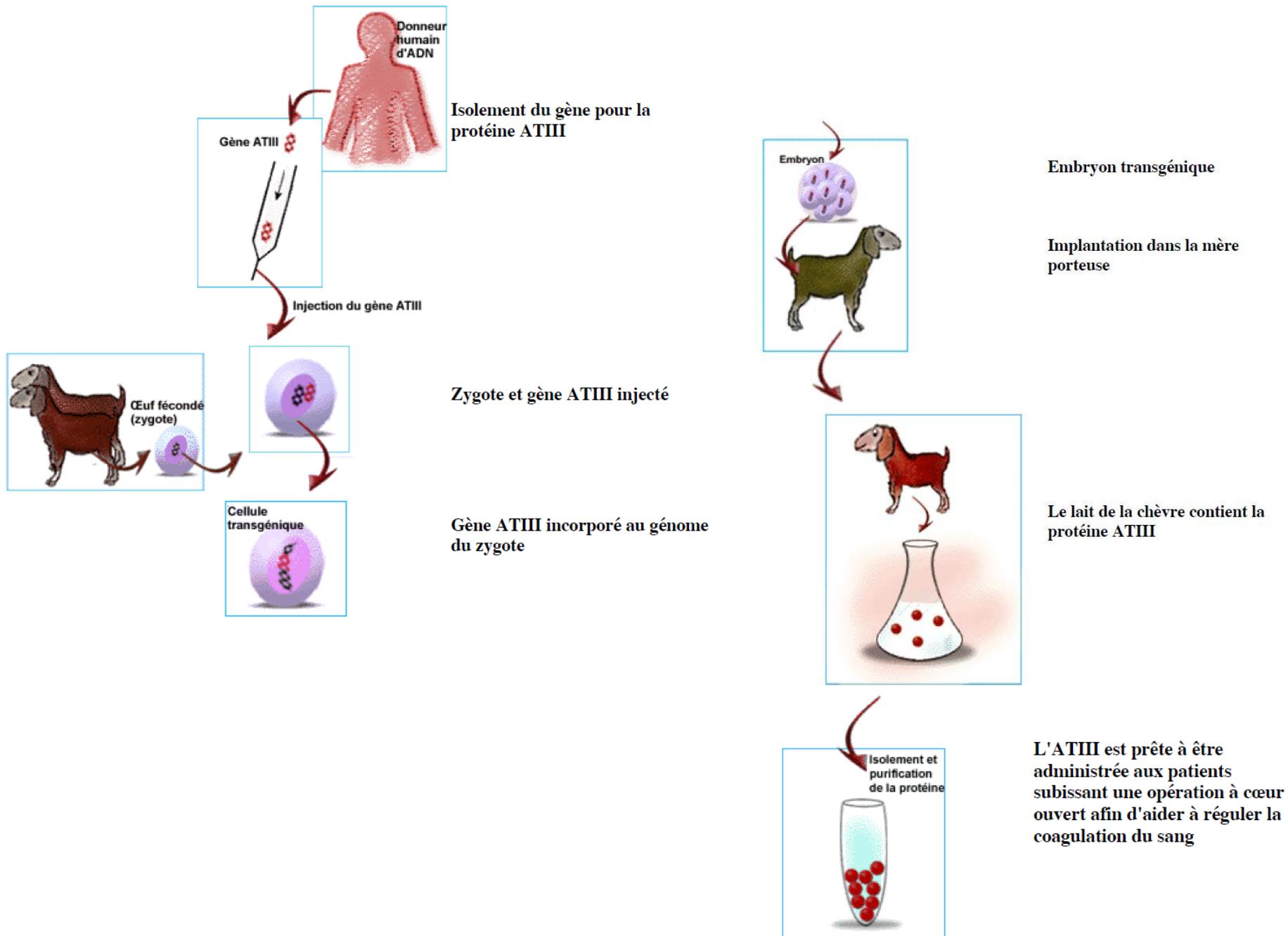


produite dans
le lait de chèvre



protéines recombinantes
stade d'essais cliniques
aux Etats-Unis et en Europe

**L'utilisation du produit protéique transgénique ATIII chez les humains comme illustré ci-après s'effectue dans le cadre d'essais cliniques depuis l'automne 1998.



Exemples : production de médicaments

actuellement produit chez
souris génétiquement modifiés

anti-cancéreux
Cetuximab
(anticorps monoclonal)

traitement des patients atteints
de cancers colorectaux

produite dans
le lait de chèvre

10 g de cetuximab / litre de lait

une chèvre produit environ 800 l de lait par an :
environ 8 kg de cetuximab / an / chèvre



en attente d'autorisation
pour utilisation humaine

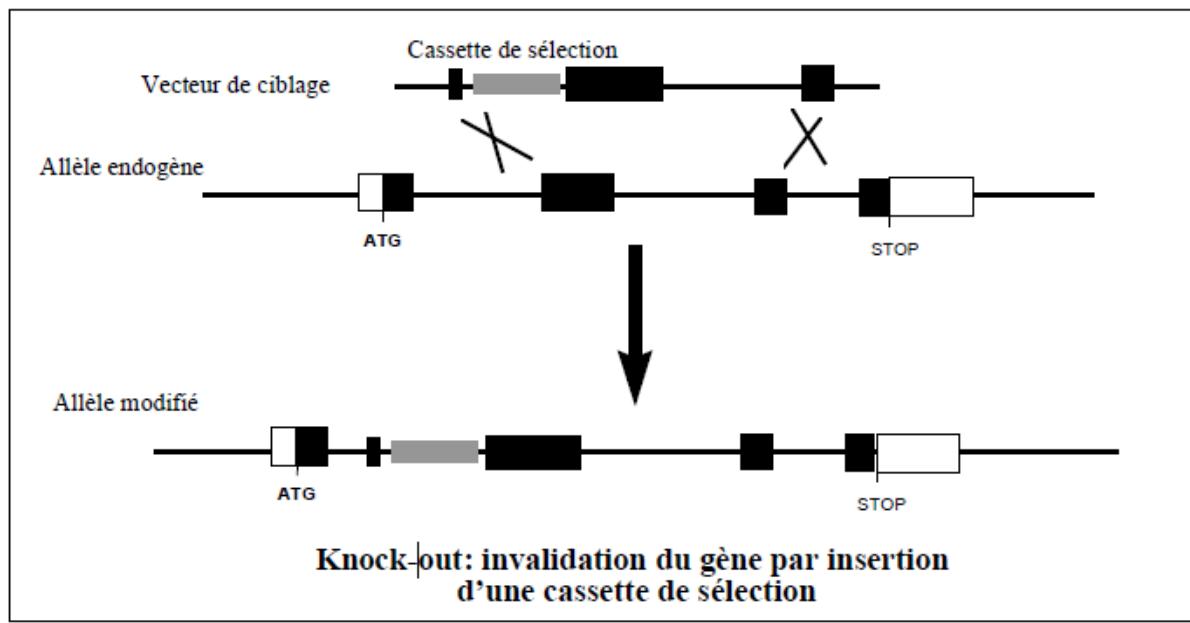
La transgenèse ciblée

- Transgenèse ciblée ou Recombinaison homologue:

modification d'un gène déjà existant dans l'animal

Knock out :

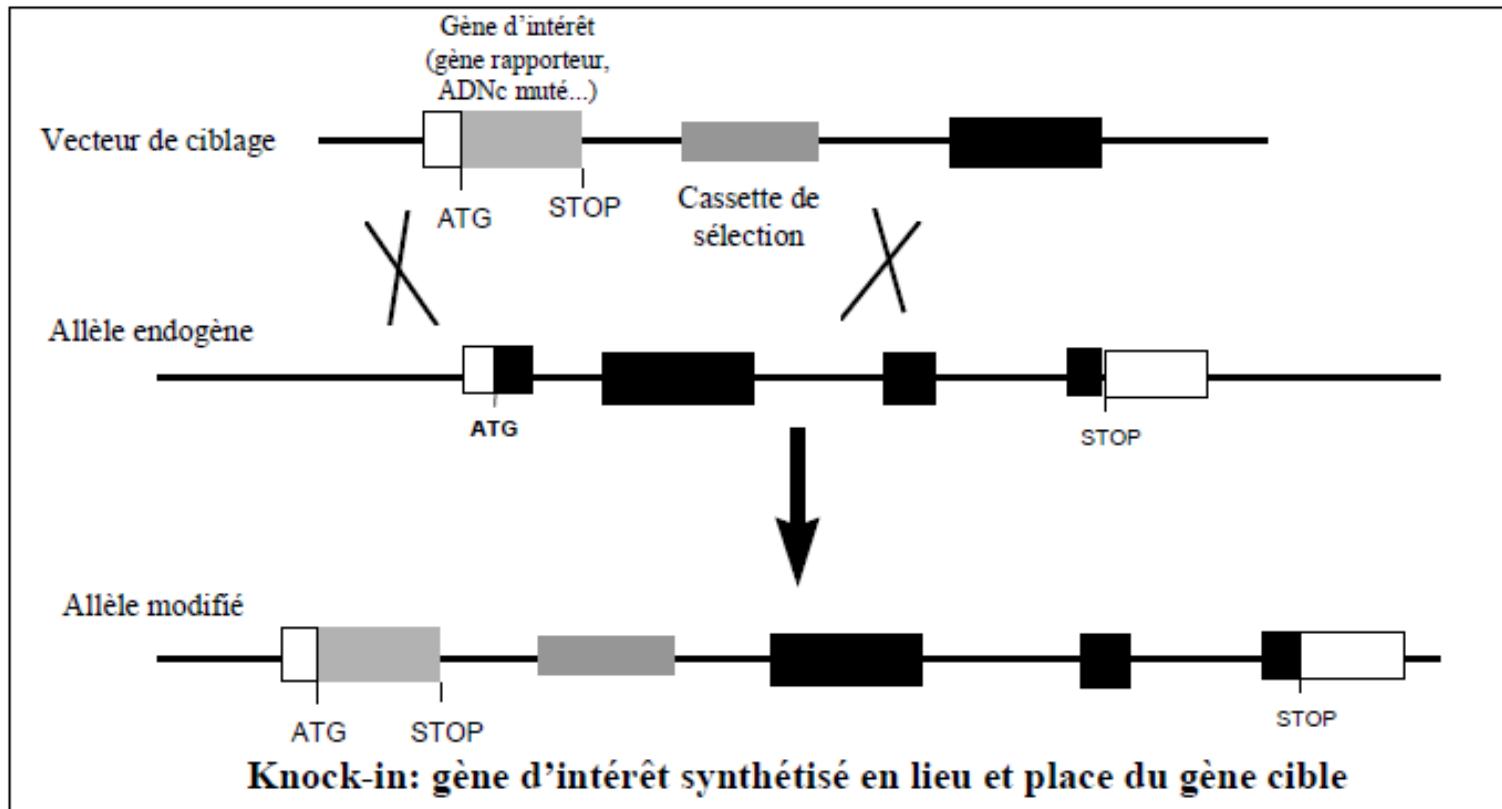
Le gène est enlevé entièrement ou partiellement par transgénèse ciblée via des cellules (ES) préalablement modifiées.



Principe du Knock-out

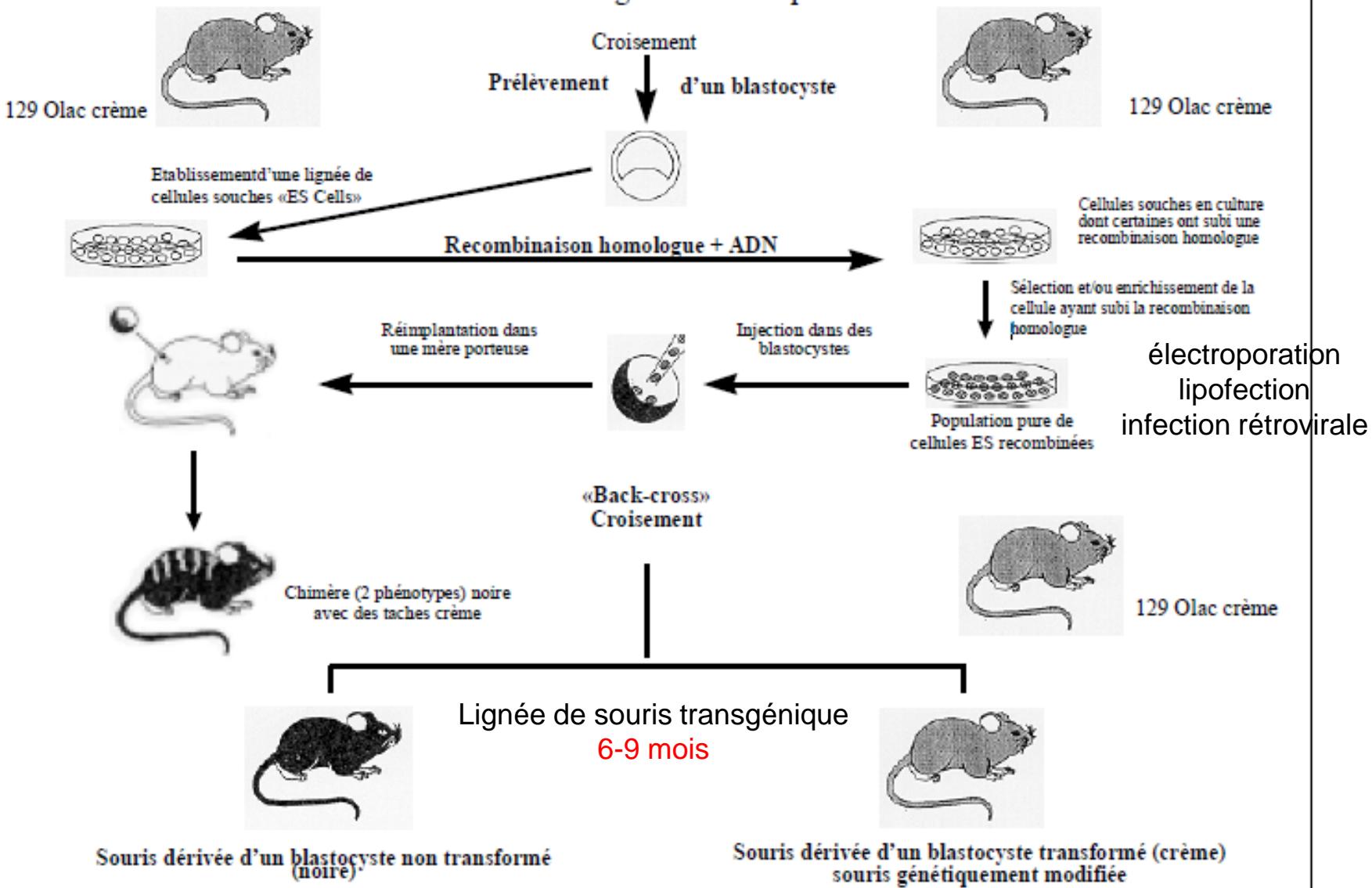
Knock in :

Le gène sauvage est remplacé par un gène muté, déleté, activé ... via la technique de recombinaison homologue



Principe du Knock-in

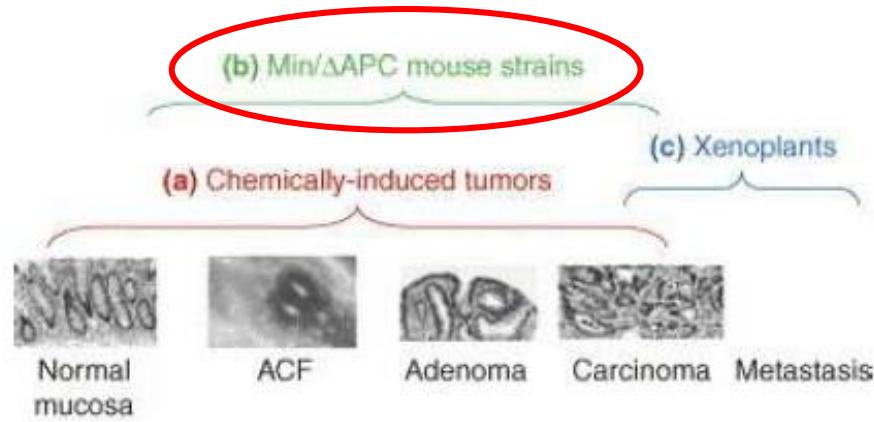
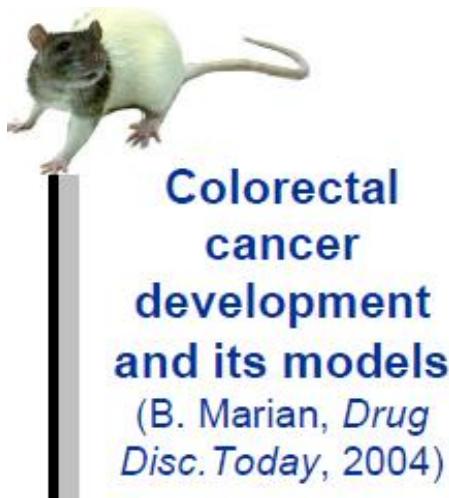
Génération de lignées chimériques



Les différentes étapes de la technique par recombinaison homologue et cellules ES

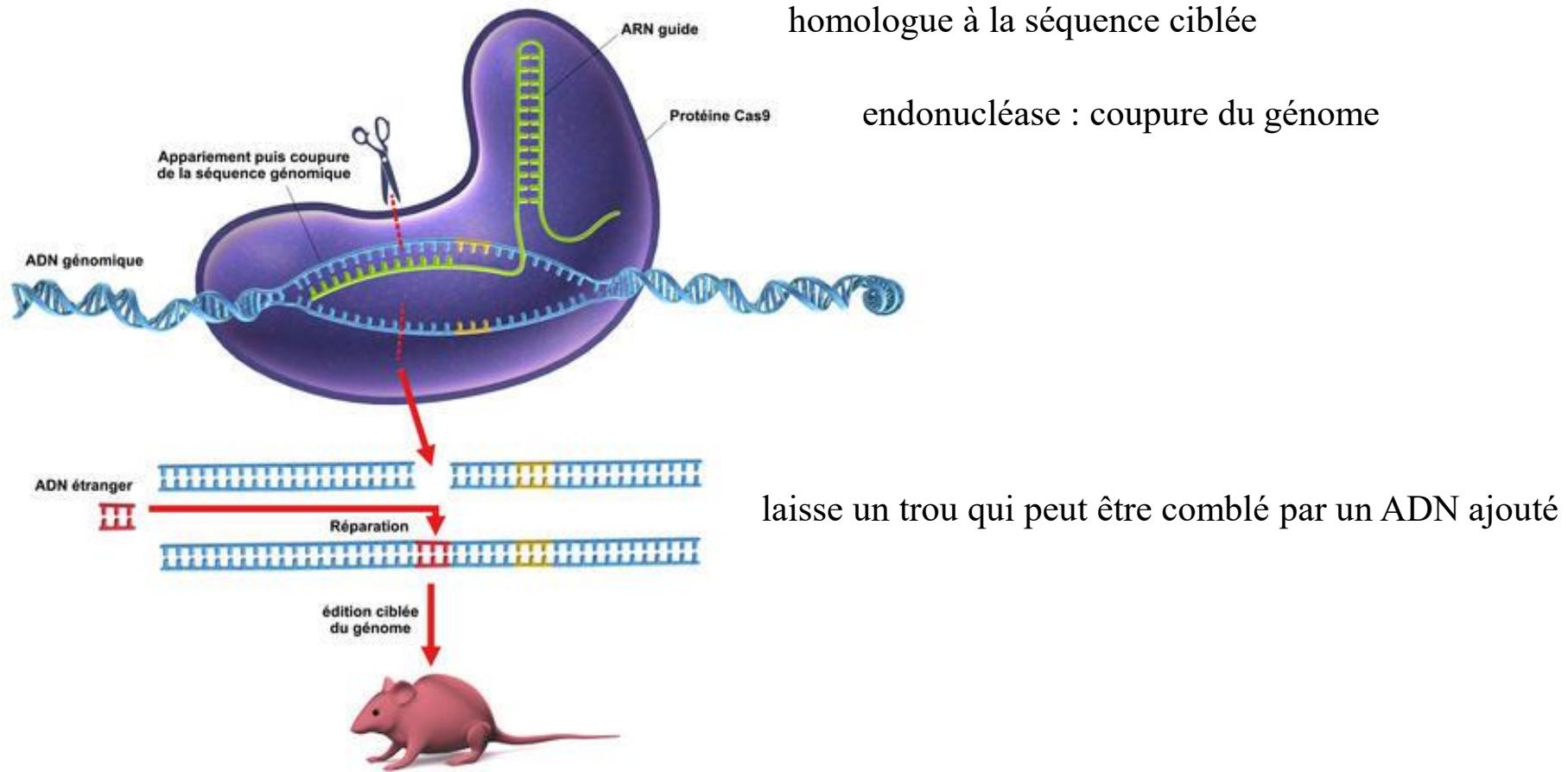
Exemple : souris mutées Apc pour le cancer du colon

- Le gène Apc (adenomatous polyposis coli) est muté dans 60-80% des tumeurs du côlon chez l'Humain
- Les souris mutées Apc : les mutations conduisent à différent phénotypes.
 - Souris Apc 716 : 250 polypes
 - Souris Apc 1309 : 30 polypes
 - Souris Apc 1638 : 3 polypes



Les modèles animaux CRISPR-Cas9

Le complexe CRIPSR-Cas9 = ciseaux génétiques
enlever, modifier ou remplacer un gène
cible une zone spécifique de l'ADN, la coupe et y insère la séquence souhaitée



Les modèles animaux CRISPR-Cas9

Les modifications génétiques ciblées réalisables :

voies de réparation de l'ADN activées par les cellules :

NHEJ

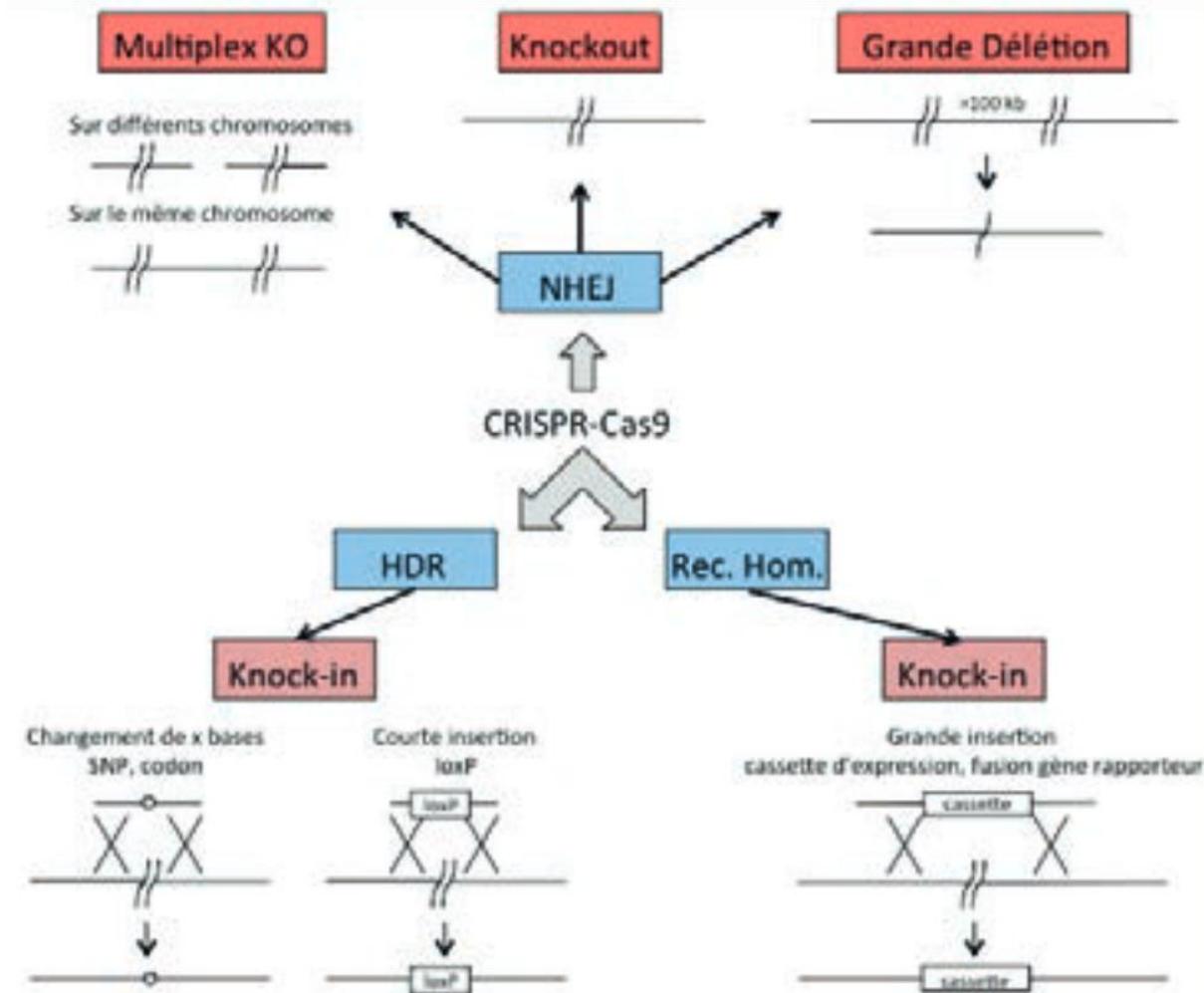
Non-Homologous End Joining

HDR

Homology Direct Repair

Rec Hom

Recombinaison Homologue



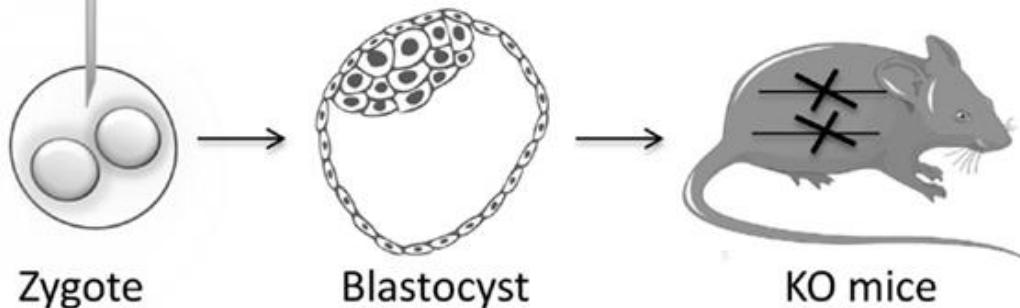
Les modèles animaux CRISPR-Cas9

Exemples :



guide RNA + Cas9

Induit un décalage cadre de lecture ou création codon STOP
Génération d'animaux KO



Guide RNA + Cas9 + gène homologue muté
Génération d'animaux KI
Par le processus HDR

Injection dans cytoplasme
Plus facile et moins毒ique que dans le pronucléus



→



→



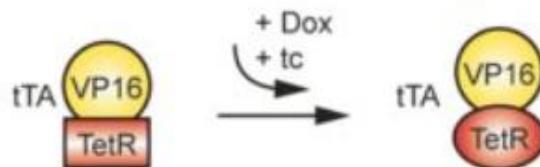
Zygote

Blastocyst

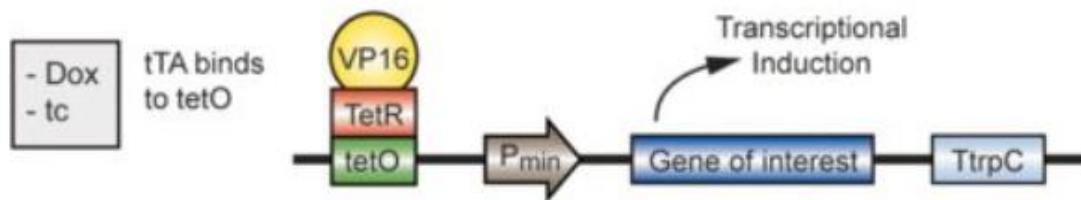
KI mice

Les modèles animaux inducibles Tet Off/On

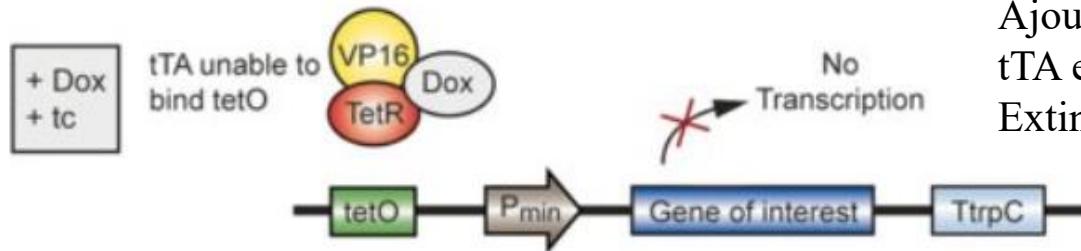
a



Fusion de VP16 + Tet repressor
= Transactivateur tTA dépendant de la Tétracycline



tTA se fixe sur séquence spécifique TetO
Transcription du gène d'intérêt



Ajout de Tétracycline ou analogue Doxycycline
tTA est incapable de se fixer sur promoteur
Extinction du gène cible

Dox, doxycycline; VP16, transcriptional activator domain from herpes simplex virus; tc, tetracycline; TetR, tetracycline-dependent Tet repressor; tetO, tetracycline operator sequence; tTA, tetracyclin-dependent transactivator; TtrpC, trpC terminator from *Aspergillus nidulans*; P_{min}, minimal promoter.

TET-OFF system

Insertion de 2 constructions :

tTA

protéine d'intérêt avec TetO dans Promoteur

Absence de Tet:

Expression de tTA puis du gène cible

Présence de Tet:

Expression de tTA qui interagit avec Tet

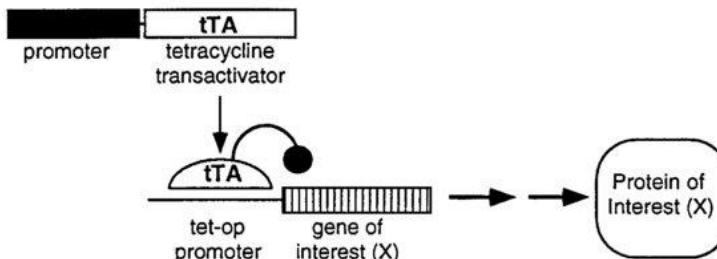
Pas d'expression du gène cible

Exemple : expression tissus spécifique

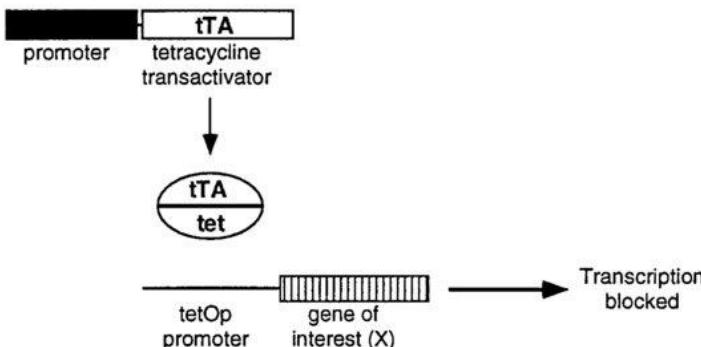
Promoteur de tTA sous influence de facteur de transcription spécifique du cerveau

pas d'expression dans le cerveau

absence of tet



presence of tet



TET-inducible transgenic mice



Mouse expressing tTA in specific tissue (brain)



Mouse harboring, but not expressing, gene of interest



Presence of tet



Absence of tet

expression
dans le cerveau

Conditions d'hébergement des animaux transgéniques

Classement des animaux transgéniques en fonction des **risques** qu'ils présentent ou suivant leur **degré de pathogénicité**

	animaux abritant un gène ...	animaux susceptibles de relarguer des particules virales ...	
Classe 1 :	n'ayant aucun effet nuisible connu pour l'homme ou l'environnement	pas de particule virale ou de classe 1 (ne donne pas de maladie à l'homme)	cancers
Classe 2 :	ayant un effet nuisible connu pour l'homme ou l'environnement	de classe 2 (pathogénicité susceptible pour l'homme)	
Classe 3 :	ayant un effet nuisible connu pour l'homme ou l'environnement	de classe 3 ou prion muté (pathogénicité pour l'homme) = menace pour le personnel	
Classe 4 :	ayant un effet nuisible connu pour l'homme ou l'environnement	de classe 4 (pathogénicité pour l'homme sans traitement) = menace pour le personnel et danger pour l'environnement	

4 classes de risque → 4 confinements / types d'animalerie

animaux	animalerie	caractéristiques
Classe 1	A1	animalerie conventionnelle
		

animaux	animalerie	caractéristiques
Classe 1	A1	animalerie conventionnelle
Classe 2	A2	barrières spécifiques renforcées : sas, hotte flux laminaire (PSM type II), portoirs ventilés, filtration de l'air en sortie



animaux	animalerie	caractéristiques
Classe 1	A1	animalerie conventionnelle
Classe 2	A2	barrières spécifiques renforcées : sas, hotte flux laminaire (PSM type II), portoirs ventilés, filtration de l'air en sortie
Classe 3	A3	mêmes conditions qu'animaux virémiques : double sas, salle en pression négative, filtres air (entrée / sortie)

animaux	animalerie	
Classe 1	A1	
Classe 2	A2	
Classe 3	A3	
Classe 4	A4	sas et salle en pression négative, filtration contrôlée, PSM type III, scaphandre



2- Les modèles de xénogreffes

1^{er} modèle : la souris Nude

Souris dont l'épithélium thymique
ne se différencie pas
(pas de lymphocytes T =
souris immunodéprimées)



- ▶ Un modèle représentatif de la tumeur initiale :
 - conservation des caractéristiques histologiques
 - conservation des caractéristiques moléculaires
 - réponse à la chimiothérapie et corrélation avec la réponse des patients

Conditions d'hébergement des animaux immunodéprimés

Animalerie de type A1/A2 : conditions stériles

hotte flux laminaire (PSM type II)

portoirs ventilés

cages à filtre

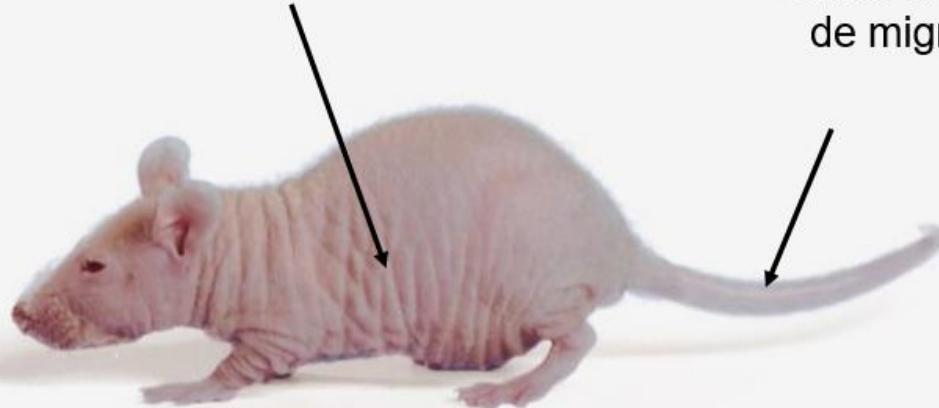
stérilisation de l'eau, l'alimentation, la litière



Injection des cellules cancéreuses

Sous-cutanée
(dans les flancs de l'animal)

étude des mécanismes
de prolifération



Intra-veineuse

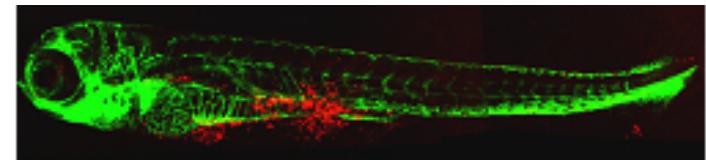
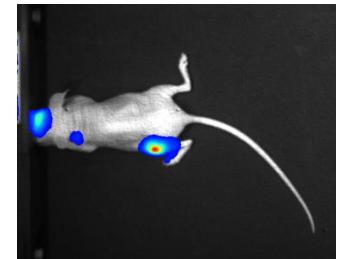
étude des mécanismes
de migration/invasion

Orthotopique
(dans l'organe d'intérêt)

étude des mécanismes
de prolifération puis
de migration/invasion

Techniques d'imagerie pour suivre la progression tumorale

- bioluminescence
 - croissance tumorale (détection et suivi de métastases)
- marqueurs fluorescents
 - croissance tumorale (métastases)
- imagerie par résonance magnétique (IRM)
 - évolution cancer, dépistage phénotypes, suivi thérapies
- technologie d'émission de positrons (micro TEP)
 - détection précoce de cancer,
 - mesure de radioactivité plasmatique



Exemple : étude de la prolifération tumorale

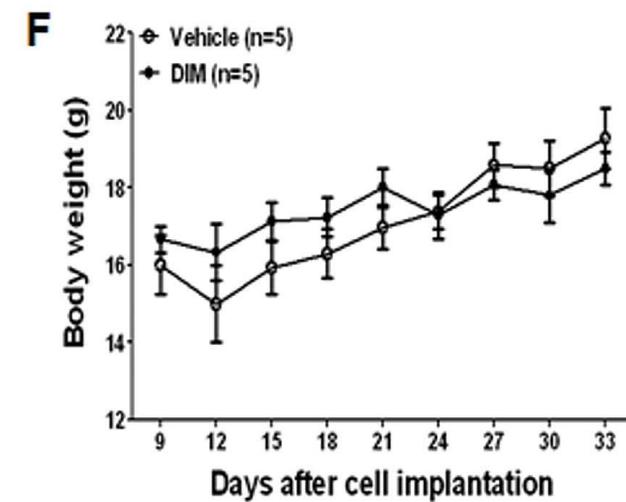
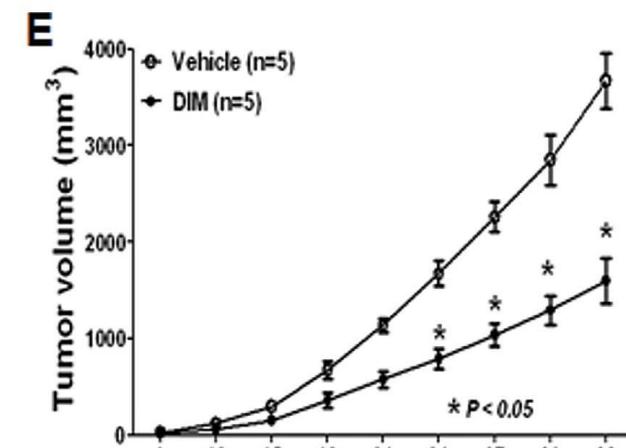
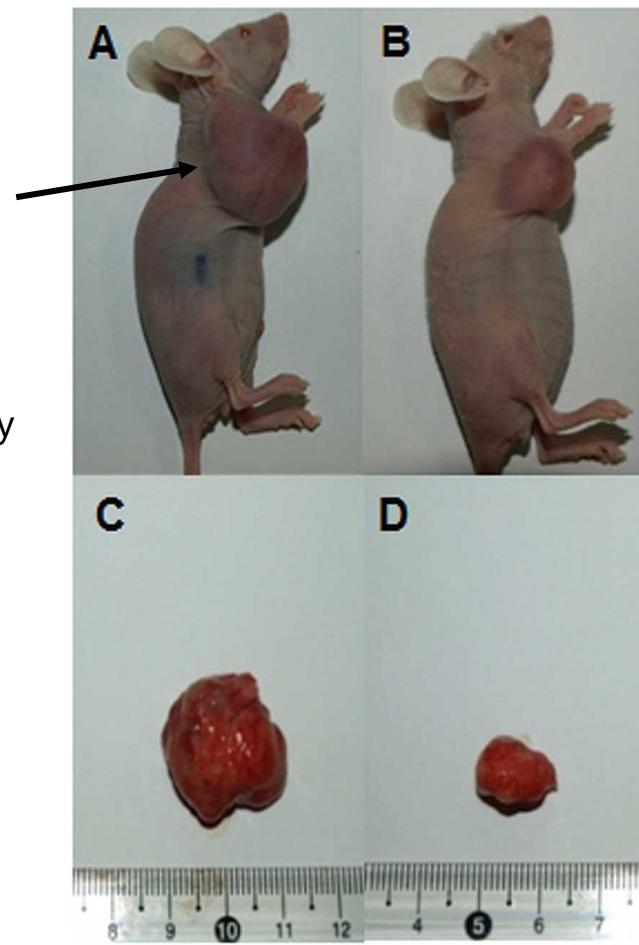
Injection sous-cutanée de lignées cancéreuses humaines

Effet anti-tumoral du 3,3-diindolylmethane (DIM) dans le cancer gastrique

DIM contenu dans végétaux crucifères (brocolis, choux bruxelles, choux, choux frisé)

0.1 ml Matrigel containing
 7×10^6 SNU-484
human gastric cancer cells

DMSO or 10 mg/kg DIM
were injected subcutaneously
every day for 30 days.





notion de point limite d'éthique



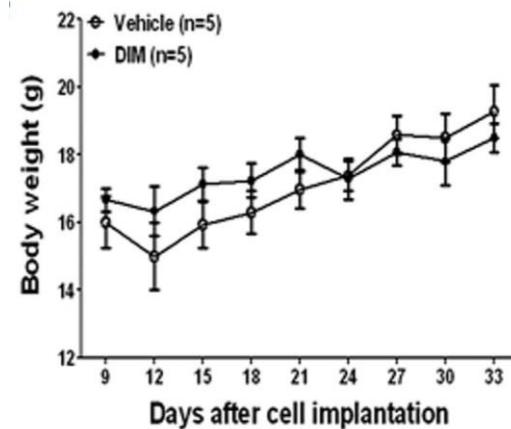
Exemples de points limites en cancérologie :

-la masse de la tumeur ne devrait augmenter ni au point d'interférer significativement avec les fonctions normales du corps ni au point d'induire, du fait de son emplacement, une souffrance et/ou une détresse (tumeurs solides);

La charge tumorale ne devrait pas excéder 5 % du poids normal de l'animal lors de passages de routine de tumeurs ou 10 % pour les animaux sujets d'expériences thérapeutiques (pour une tumeur sous-cutanée du flanc, 10 % correspondent typiquement à un diamètre de 17 mm pour une souris de 25 g, ou de 35 mm pour un rat de 250 g). Des courbes d'étalonnage devraient être établies dans le cadre de la caractérisation de tout nouveau système tumoral (Workman, et al., 1998).

-une perte de poids dépassant 20 % du poids du corps d'un animal normal semblable (en tenant compte de la masse tumorale);

-ulcération/infection à l'emplacement de la tumeur;
-envahissement des tissus voisins par une tumeur localisée;
-trauma auto-induit persistant.

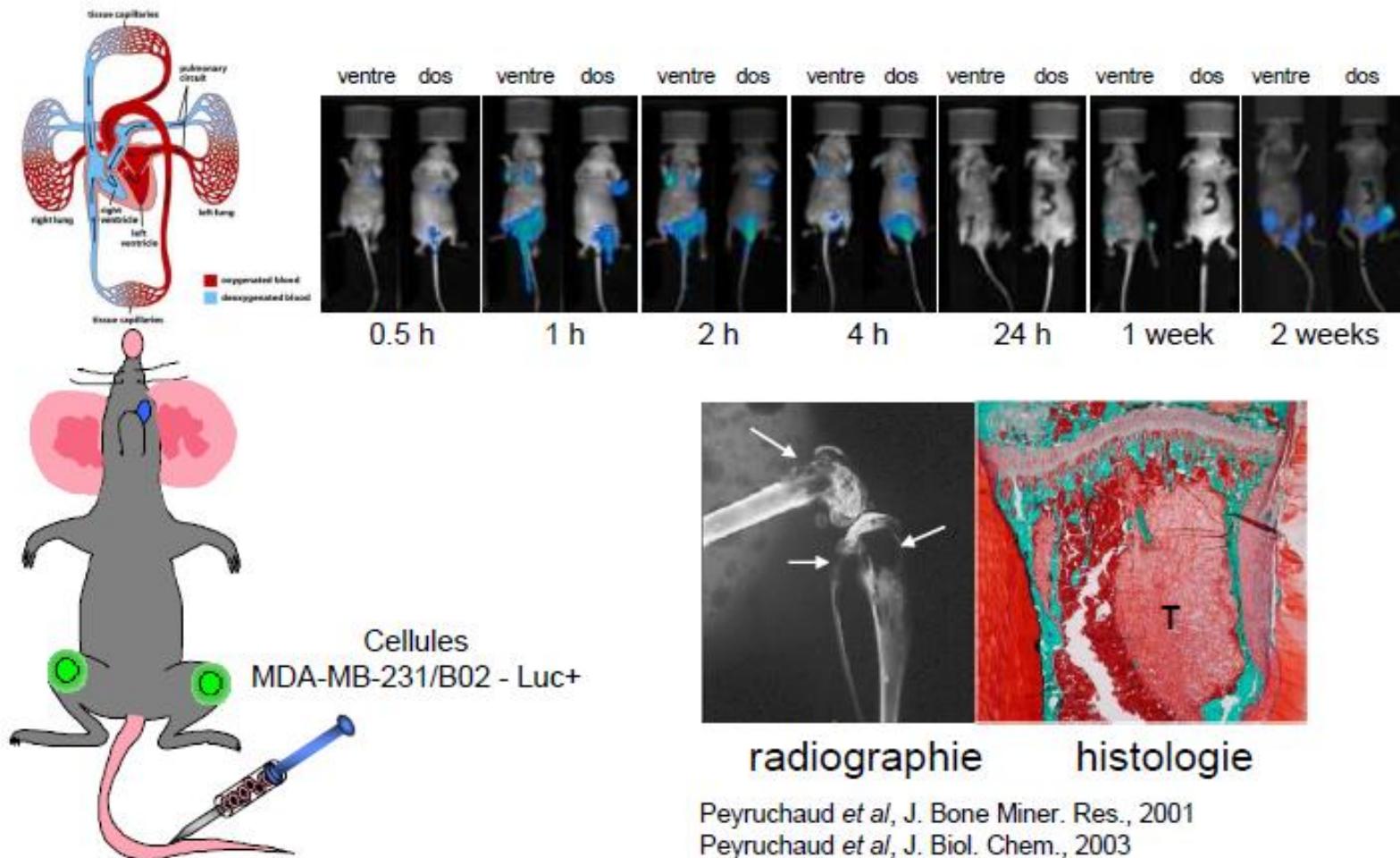


Exemple : étude de la formation de métastases

Injection intra-veineuse de lignées cancéreuses humaines

Modèle de métastases osseuses pour le cancer du sein

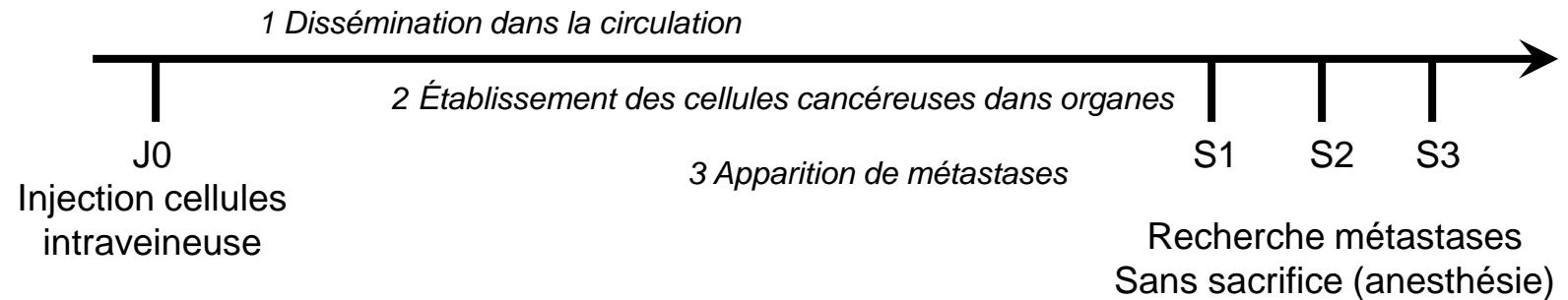
Injection intraveineuse



Peyruchaud et al, J. Bone Miner. Res., 2001
Peyruchaud et al, J. Biol. Chem., 2003

exemple d'imagerie par bioluminescence

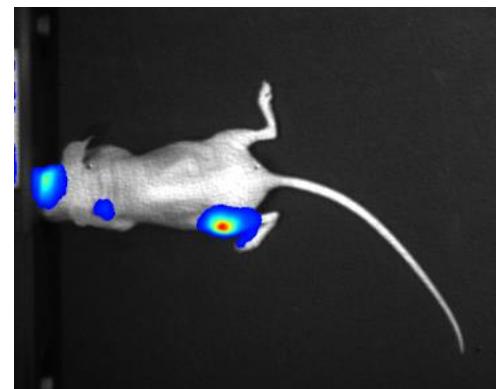
injection MDA-MB-231 luc (cellules épithéliales cancéreuses mammaires humaines surexprimant un gène « luciférase ») dans des souris immunodéprimées de type Nude



Souris Nude

Injection de D luciferine (substrat de luciférase donnant mol bioluminescente)

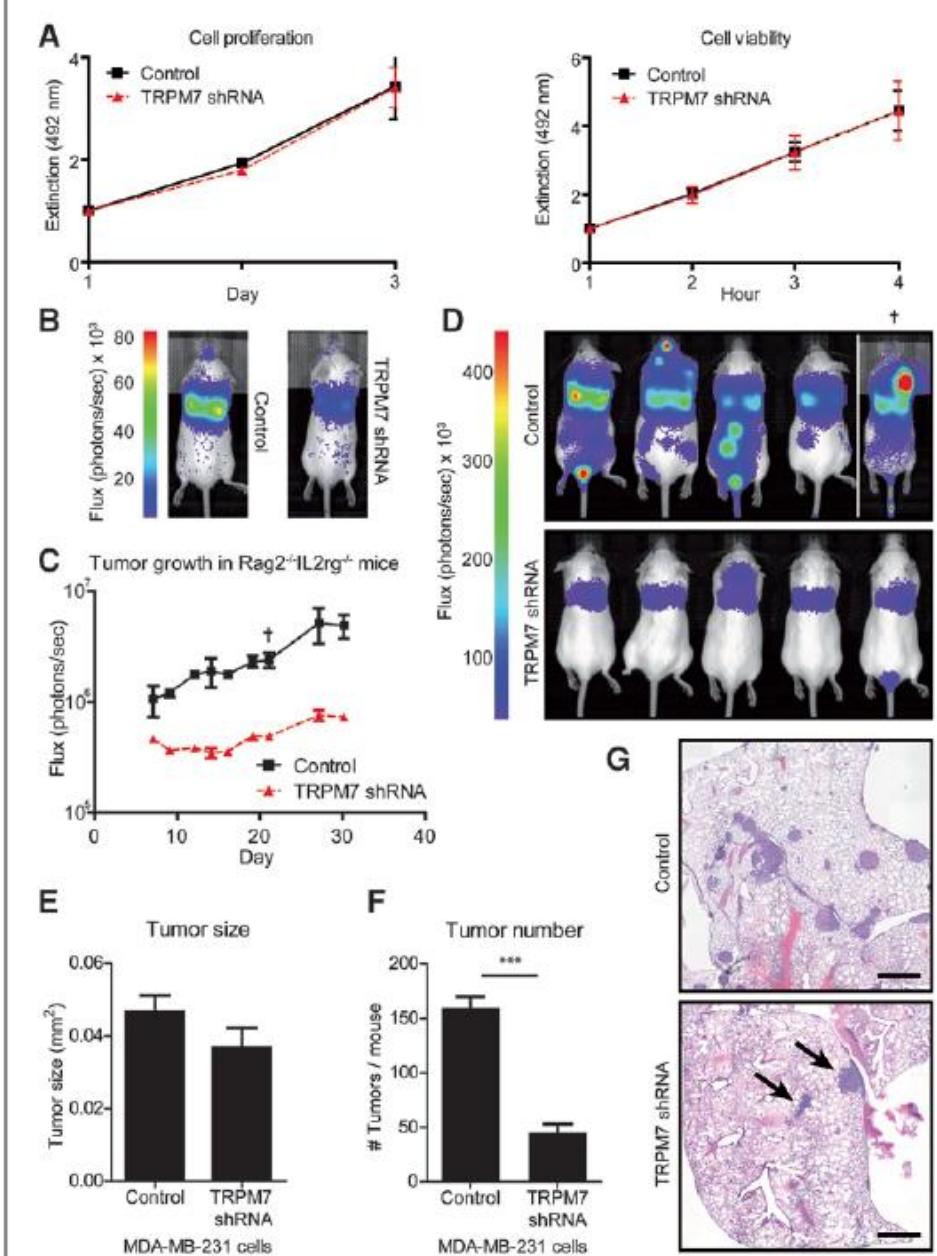
Points lumineux = métastases



Modèle de métastases osseuses pour le cancer du sein

Injection intraveineuse

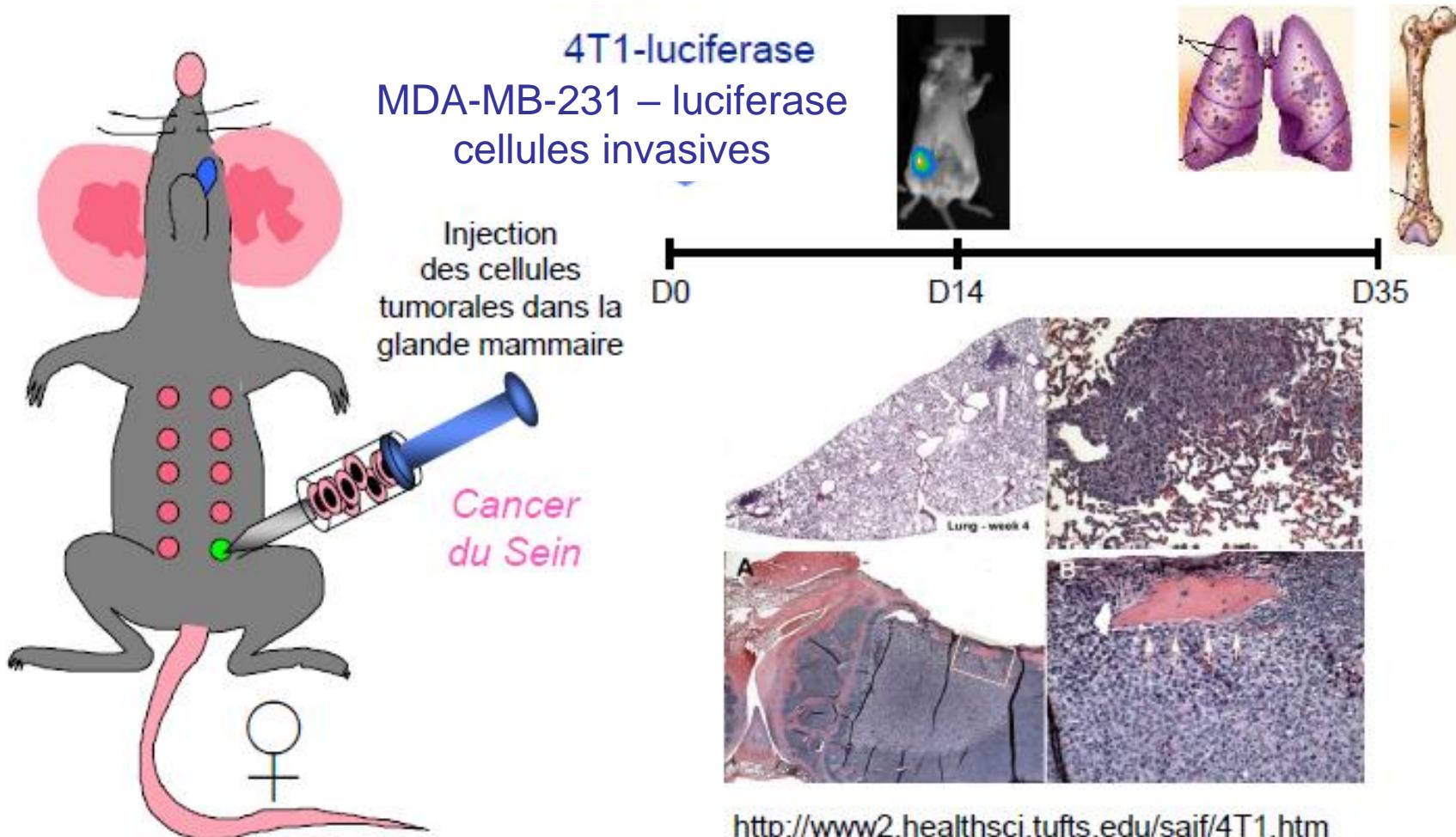
Figure 2. Reduced TRPM7 expression interferes with the metastatic potential of MDA-MB-231 human breast cancer cells *in vivo*. /



Exemple : étude de la formation de tumeur primitive puis métastases

Modèle orthotopique (injection dans l'organe)

Modèle orthotopique du cancer du sein Injection de lignées cancéreuses humaines

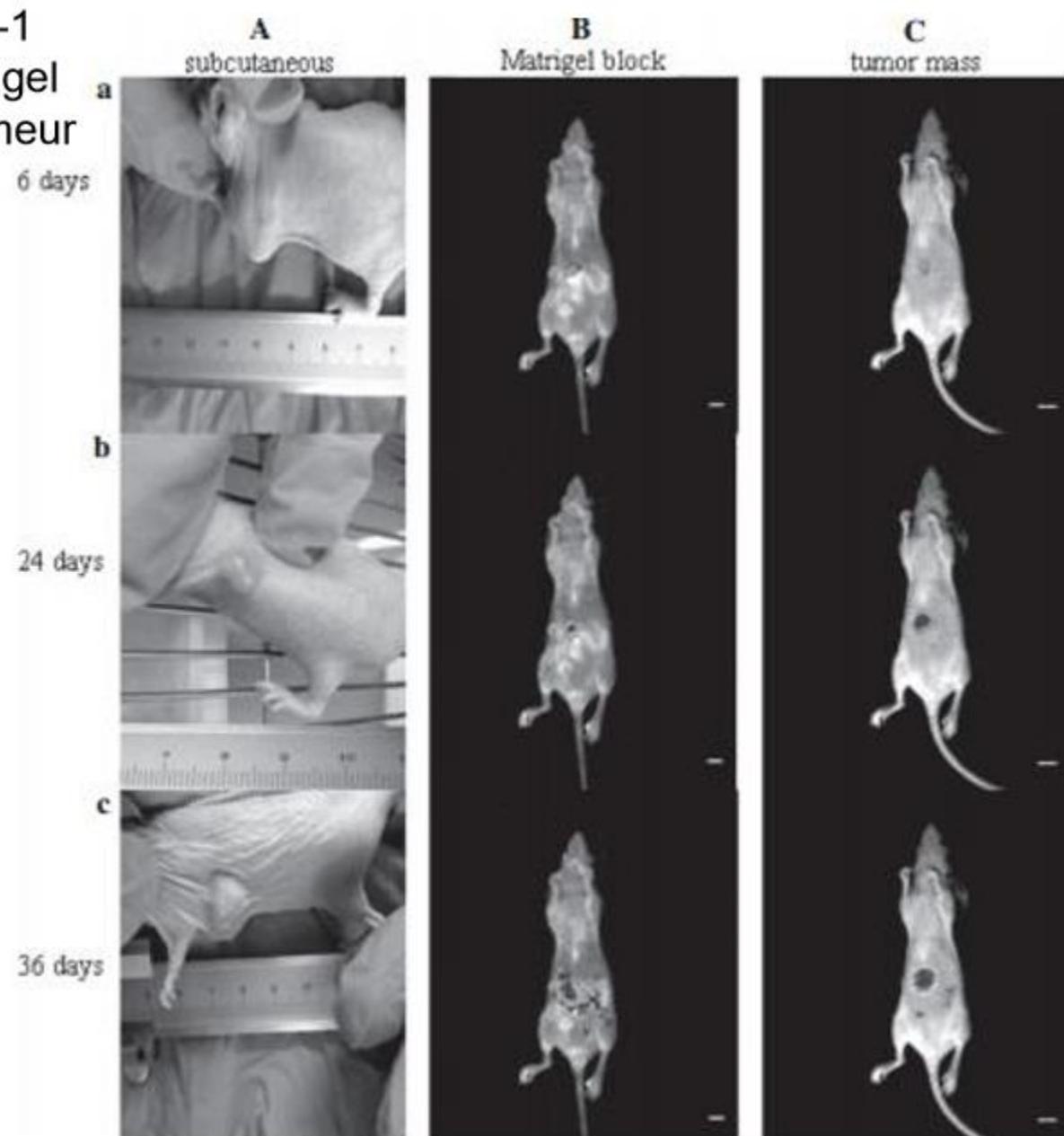
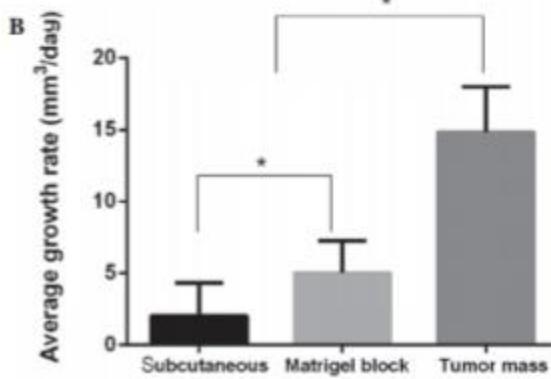
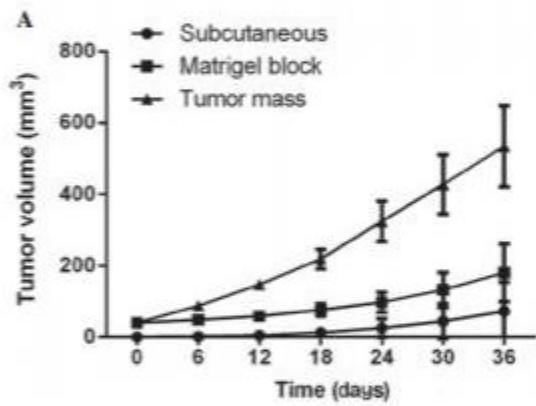


Modèle orthotopique du cancer du pancréas (Lei Dai et al., 2015)

A- sous-cutané: cellules AsPC-1

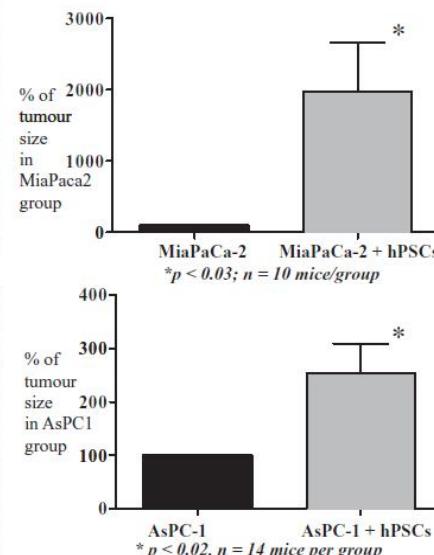
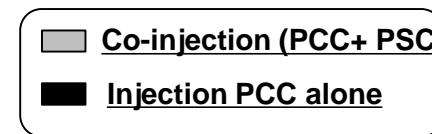
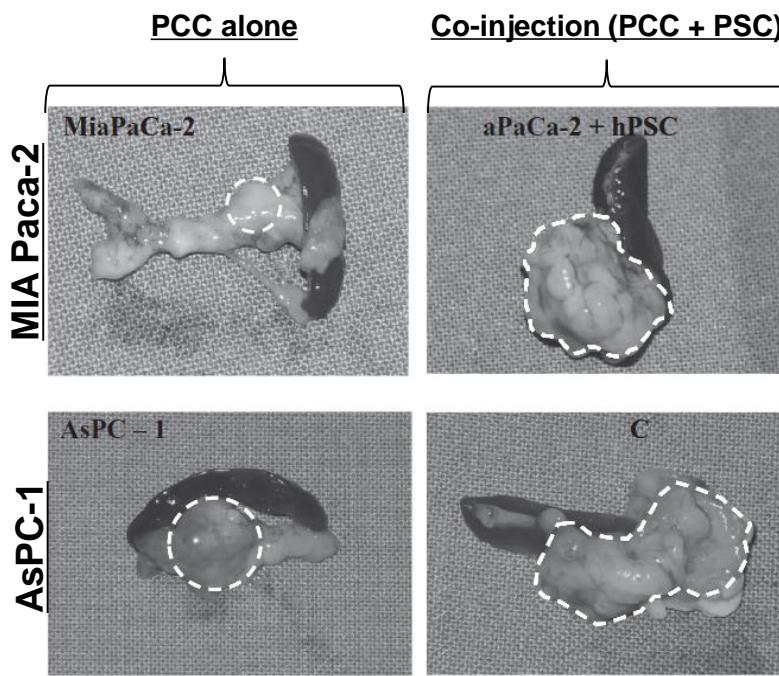
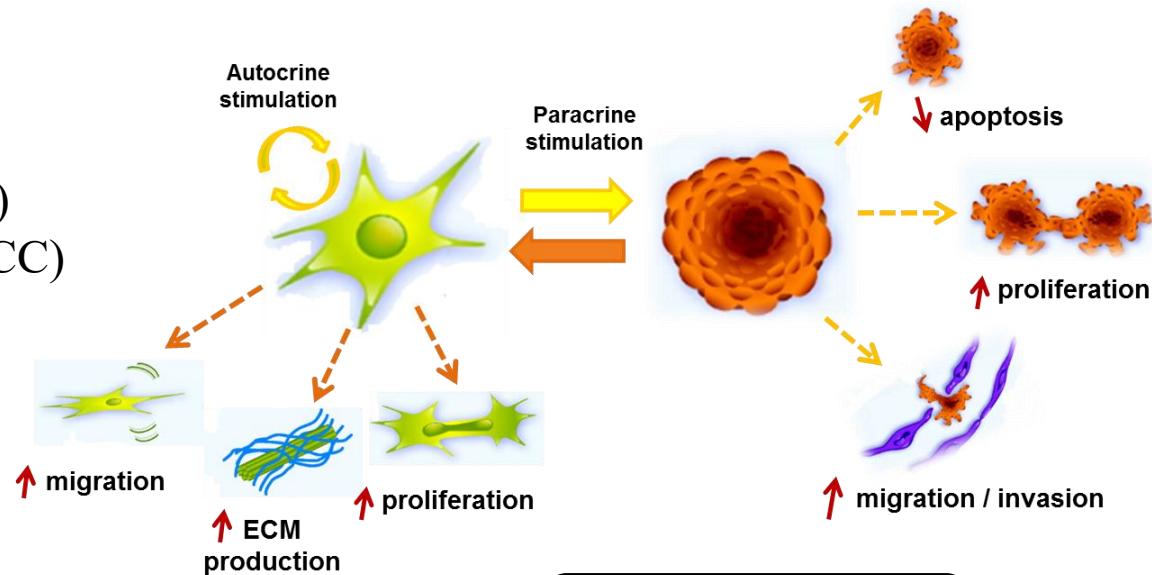
B- orthotopique: cellules+matrikel

C- orthotopique: portion de tumeur



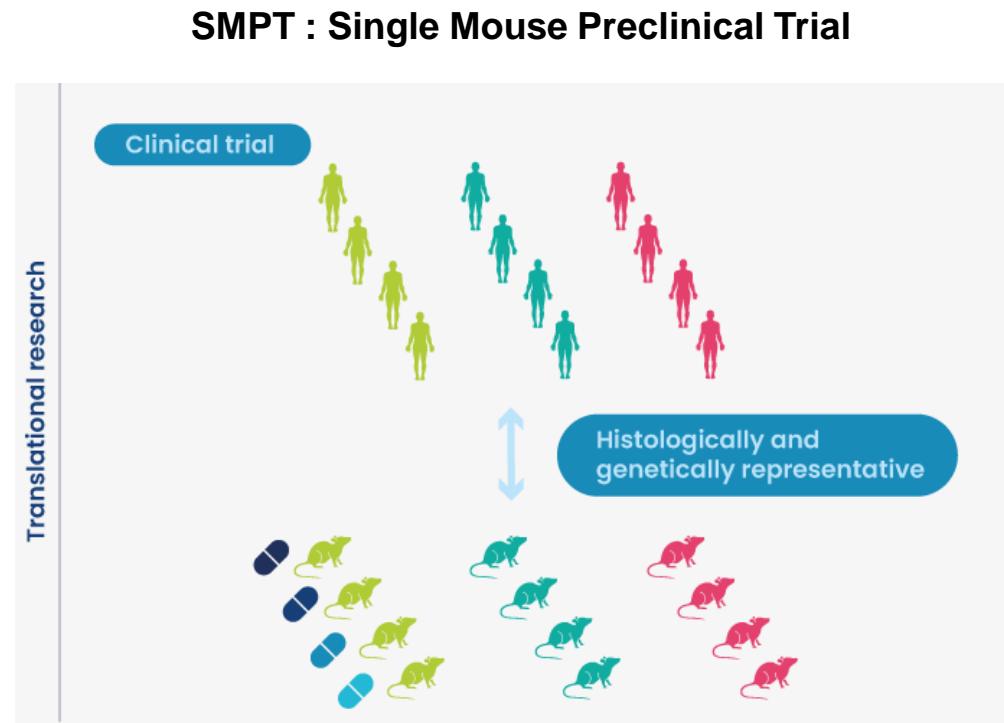
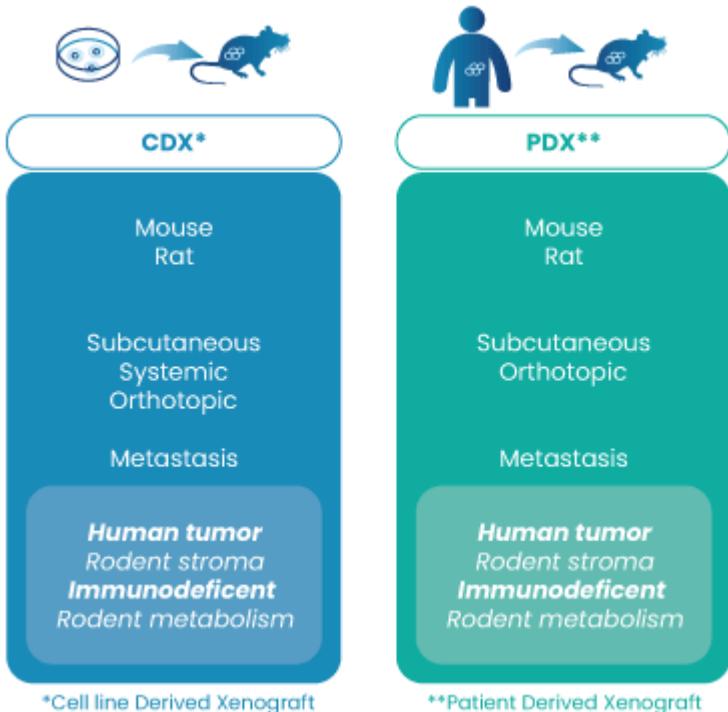
Modèle du cancer du pancréas (Parker et al., 2008)

Communication entre les cellules stellaires (PSC) et les cellules cancéreuses (PCC)



En développement : application aux patients

- Modèle de tumeurs PDX : injection de cellules cancéreuses de patients
- Ciblage de molécules ? essais pré-cliniques ?



Injection d'une tumeur de patients à 1 ou 2 souris pour mimer hétérogénéité chez l'humain

Les modèles de xénogreffes

2^{ème} modèle : le zébrafish (*Danio Rerio*)

Le génome zébrafish contient les orthologues des oncogènes humains. Les tumeurs se développent avec les même profils histopathologique et génique que les tumeurs humaines.

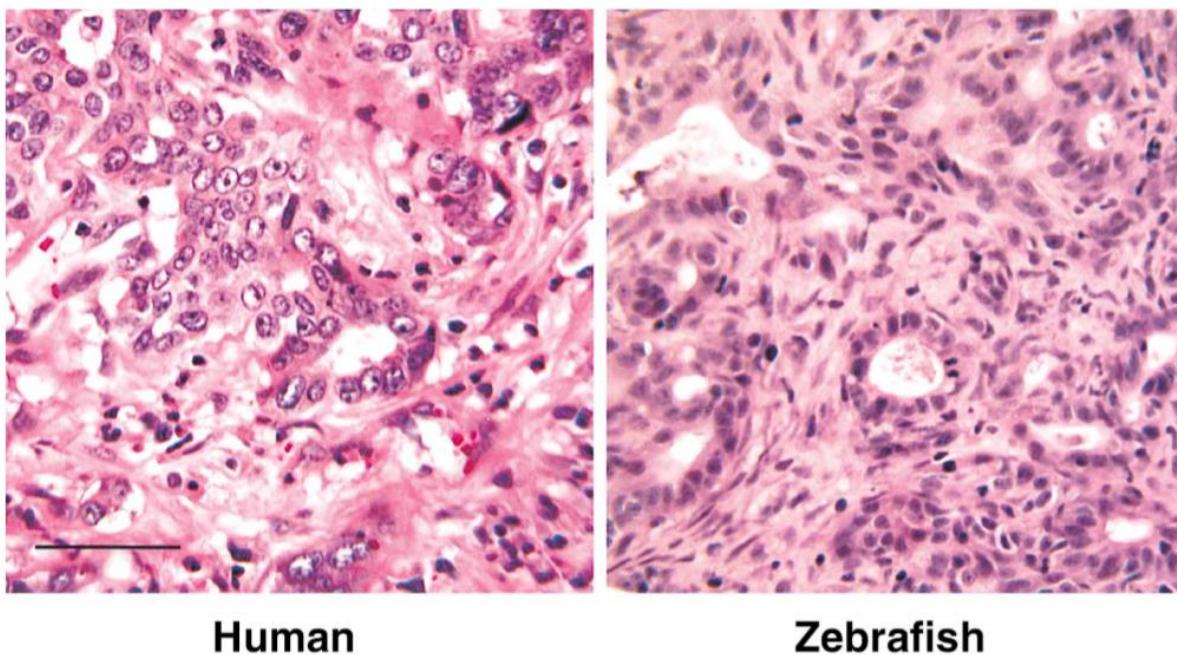


Figure 1. Histology of cholangiocarcinoma in human and zebrafish

Cholangiocarcinoma is a malignant bile duct neoplasm that occurs in both humans and zebrafish. The histologic appearance, including atypical nuclei, haphazard arrangement of irregularly shaped glands, and increased mitotic activity, is very similar in the two organisms. Bar is 50 µm.

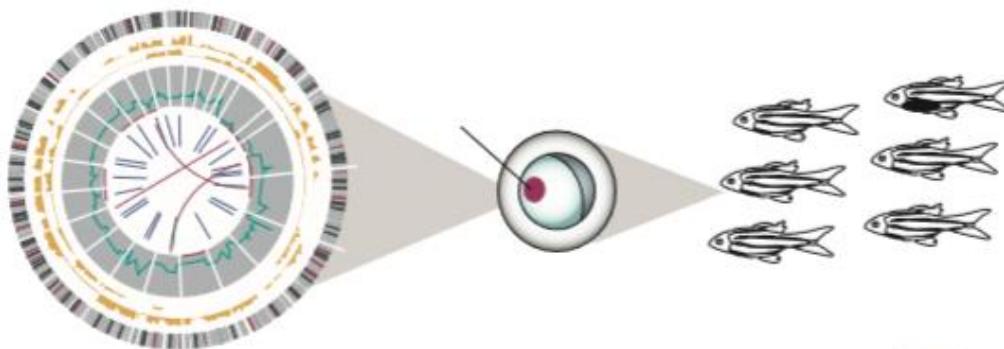
Conditions d'hébergement des zebrafish

Aquarium :
taille, volume
température de l'eau
vitesse de flux

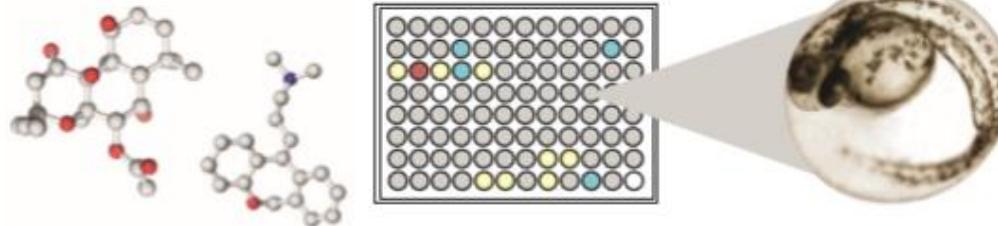


Utilisation en cancérologie

(a) Multigenic screening of cancer genes



(b) Chemical-genetic screening



(c) Modeling metastatic behaviour



Adultes :

Surexpression de gènes
Formation de tumeurs

embryons :

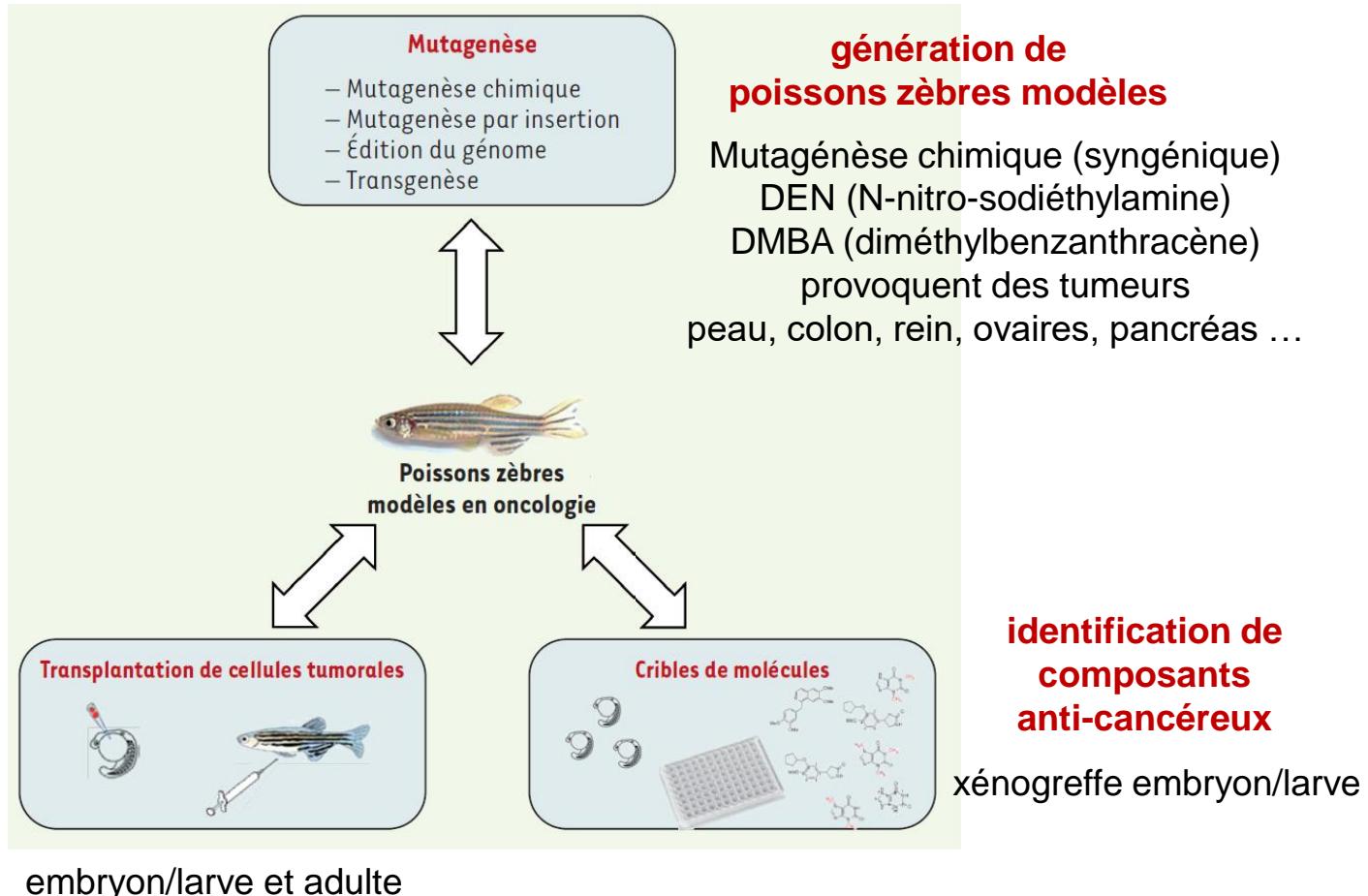
Ciblage de banques chimiques

Adultes:

Formation de métastases

Utilisation en cancérologie

xénogreffé :
suivre le comportement
des cellules
(migration, prolifération)



Modèles transgéniques

Table 1 | Transgenic models of cancer in the zebrafish

Cancer	Oncogene	Tumour suppressor	Use in cancer biology	Refs
Melanoma	<i>mitfa</i> -BRAF ^{V600E}	<i>tp53</i> ^{-/-}	Genetic and chemical modifier screens	27, 30,31
	<i>mitfa</i> :EGFP:NRAS ^{Q61K}	<i>tp53</i> ^{-/-}		
	<i>kita</i> -Gal4 × <i>uas</i> -HRAS			
Pancreatic	<i>ptf1a</i> -KRAS ^{G12V} -GFP		Genetic modifier screens	22,97
	<i>ptf1a</i> :Gal4-VP16 × <i>uas</i> -KRAS ^{G12V} -GFP			
T cell lymphoma or leukaemia	<i>rag2</i> -myc		Cancer modelling and <i>in vivo</i> imaging	14,98 99 100,101 39
	<i>rag2</i> -lox-dsRED2-lox-EGFP-mMyc × <i>hsp70</i> -cre		Inducible cancer model	
	<i>rag2</i> -NOTCH1		NOTCH1 interaction with Bcl-2	
	<i>rag2</i> -myc × <i>rag2</i> -bcl2		Mechanisms of leukaemia dissemination	
B cell leukaemia	<i>Xenopus</i> Spp. EF1α or zebrafish B actin-TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)		Initiating events in B cell leukaemia	34
Numerous	b-actin-lox-GFP-lox-KRAS ^{G12D} × <i>hsp70</i> -cre		Inducible cancer model	102 103
	<i>krt4</i> :Gal4VP16;14 × <i>uas</i> : <i>smao1</i> -EGFP × <i>uas</i> : <i>myrAKT1</i>		Cooperation of hedgehog and AKT pathways	
Rhabdomyosarcoma	<i>rag2</i> -KRAS ^{G12D}		Identification of tumour-initiating cell populations	29
Neuroblastoma	dβh:EGFP-MYCN		Cooperation of MYCN and ALK	23 23
	dβh:EGFP and dβh:ALK ^{F1174L}		Cooperation of MYCN and ALK	

Modèles de xénogreffe : Injection des cellules cancéreuses humaines

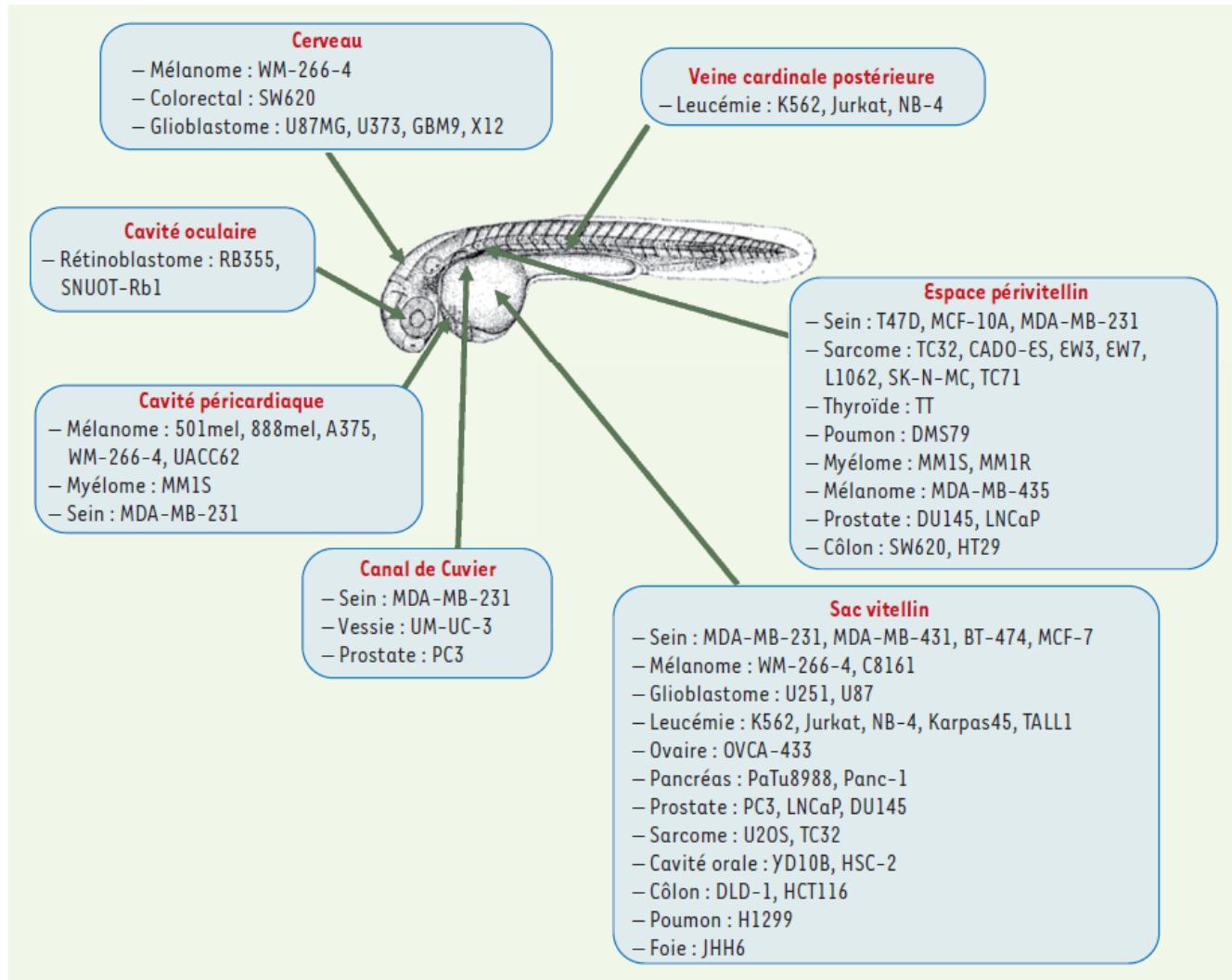
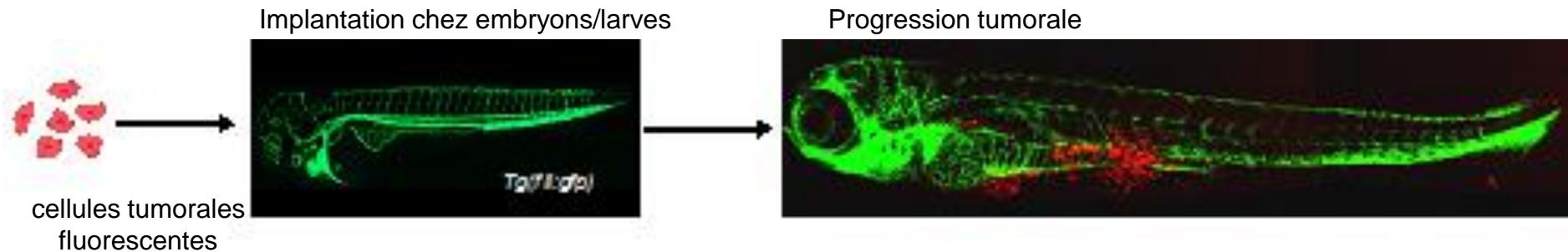


Figure 3. Illustration des sites d'injection les plus communs utilisés lors des expériences de xenotransplantation dans les embryons de poisson zèbre de 2 jours. De nombreuses lignées cellulaires humaines issues de différents organes ont été utilisées et injectées en divers sites de l'embryon.

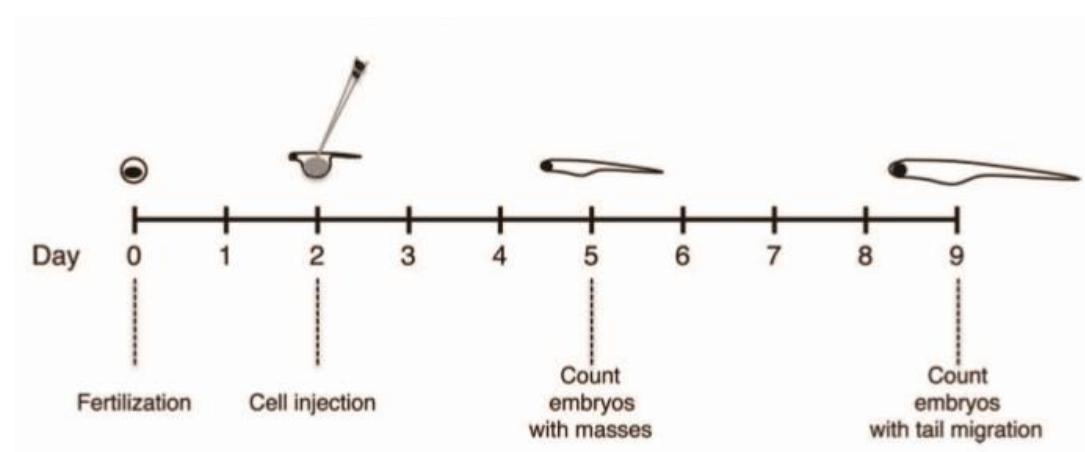
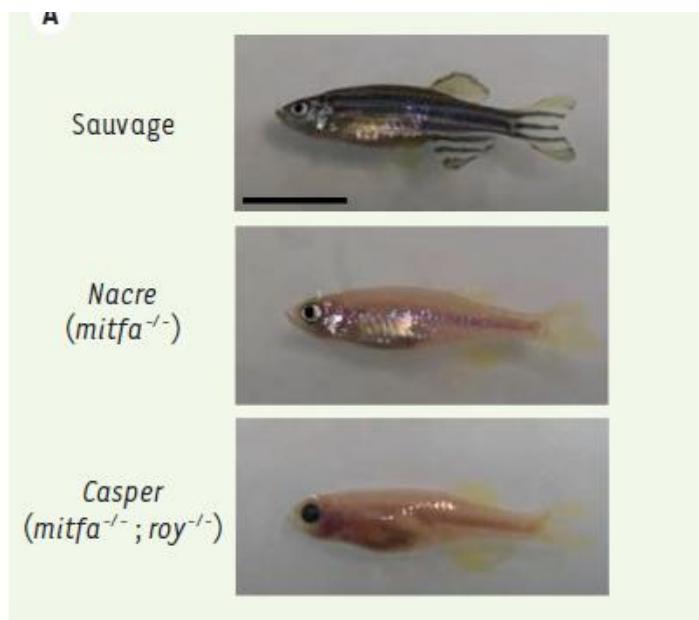
Völkel *et al.*, 2018

Exemple : étude de la migration des cellules tumorales



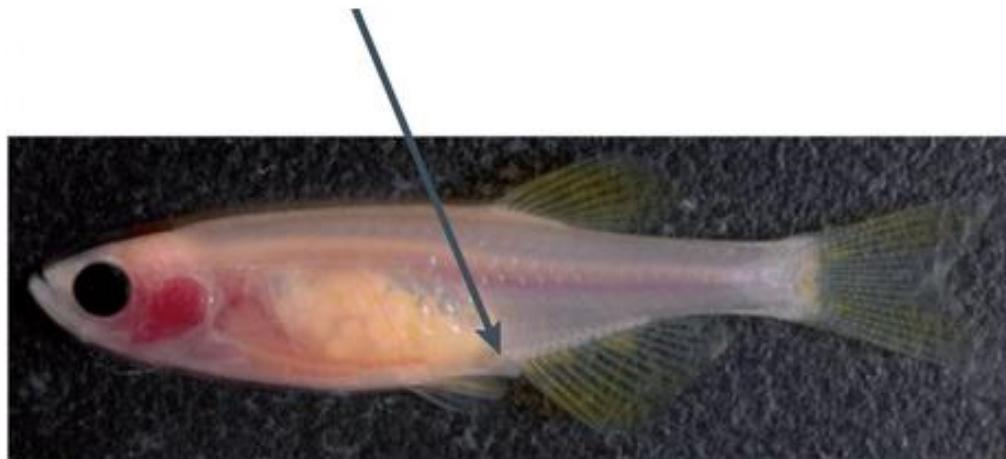
peau transparente
(mutants avec défaut de pigmentation)

résultats en 1-2 semaines



Exemple : étude de la formation de métastases

Cellules MDA-MB-231 GFP



Implantation chez adultes

↓
Readout: growth or
dissemination and metastasis



Métastase unique

Single metastasis
~200 cells

Local engraftment

Greffé de tumeur locale

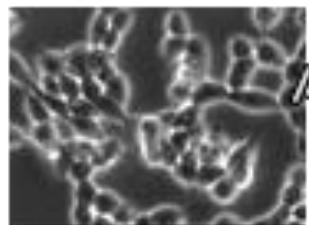
Avantages/inconvénients des zébrafish

Avantages et limites du modèle poisson zèbre en oncologie

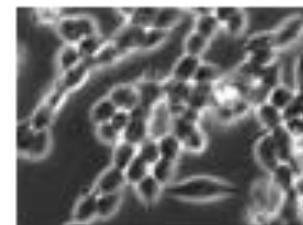
Avantages	Limites
De nombreux embryons transparents se développent rapidement <i>ex utero</i>	La durée de vie du poisson zèbre est courte, limitant l'étude des cancers liés au vieillissement
Le poisson zèbre est un vertébré qui possède un système immunitaire proche de celui de l'homme	Certains organes (poumon, sein, prostate) sont absent chez le poisson zèbre. D'autres (reins) en sont des versions simplifiées
De nombreux mutants sont disponibles	L'incidence des cancers spontanés est faible
Des méthodes puissantes de génétique directe et de génétique inverse sont disponibles	Le poisson zèbre possède deux orthologues pour certains gènes, à la suite d'une duplication du génome chez les téléostéens
De nombreuses lignées transgéniques sont disponibles	Peu d'anticorps efficaces chez le poisson zèbre sont disponibles
Chez le poisson zèbre, les tumeurs sont similaires sur le plan histologique et moléculaire aux tumeurs humaines	La taille des organes du poisson zèbre (vaisseaux sanguins) est plus petite que celle de l'homme
La transparence des embryons et les mutants sans pigmentation permettent le suivi de la croissance tumorale <i>in vivo</i>	Le poisson zèbre est poïkilotherme (animal à sang froid) et croît à 28 °C plutôt qu'à 37 °C ; les études liées au rôle de l'homéostasie de la température dans les phénotypes oncogéniques sont donc limitées
La transplantation de cellules cancéreuses humaines dans l'embryon de poisson zèbre permet l'étude des propriétés de ces cellules	Les embryons xénotransplantés sont maintenus à 35 °C. Cette température n'affecte pas le développement du poisson zèbre mais peut avoir des effets sur le résultat de l'étude
Le crible de molécules permet l'identification de composés anticancéreux	Les composés pénètrent par le système digestif, la peau et les branchies

3- Les modèles syngéniques

Injection de lignées cancéreuses murines : allogreffes



Fibroblastes p8^{+/+}
ras^{V12}/E1A



Fibroblastes p8⁺⁺⁺
ras^{V12}/E1A

Sous-cutanée
Orthotopique
Intra-veineuse

p8 : impliquée dans la réponse au stress

p8^{+/+} : injection sous-cutanée
développement de tumeurs

p8 nécessaire au développement tumoral

Les modèles syngéniques

Induction par agents chimiques



Cancérogènes du Côlon

- **Hydrazines** (noix de cycas, champignons)
DMH (DiMéthylHydrazine), AOM, MAM
- **Nitrosamines** (charcuteries, bières, endogène)
MNNU (MéthylNitrosoUrée), MNNG, ...
- **Amines hétérocycliques** (viande grillée)
PhIP, IQ, MeIQ
- **Ulcérants non génotoxiques** (caraghénanes ?)
DSS (dextran sulfate sodium)



Autres sites que le côlon

- **Prostate:** initiation / N-methyl-N-nitroso-urée et promotion / testosterone (12 mois), Rat Lobund-Wistar : 90% des animaux un adécarcinome prostatique à 11 mois. Modifications prénéoplasiques (type de PIN), visibles avant la détection clinique des tumeurs.
- **Sein:** Rates initiation: NMU ou DMBA à 49-50 j puis suivi de croissance par palpation des tumeurs.
- **Œsophage:** initiation: N-nitrosoMethylBenzylAmine (NMBA)
- **Foie :** initiation: DiEthylNitrosamine (DEN), sélection AAF, promotion Hépatectomie Partielle

Exemple : induction du cancer du sein par DMBA

(Barros et al., 2004)



Figure 1 - Administration of DMBA by gavage.

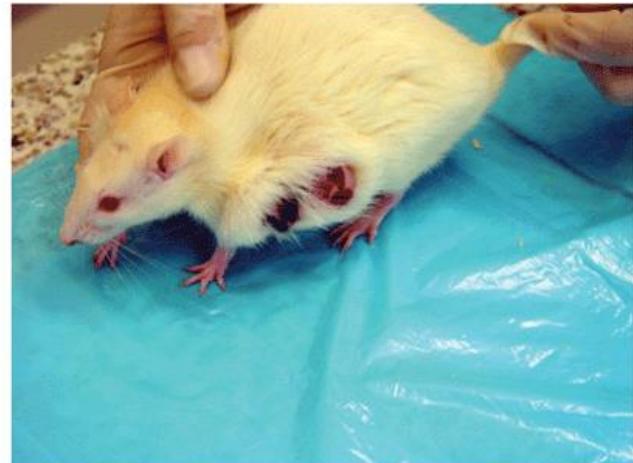


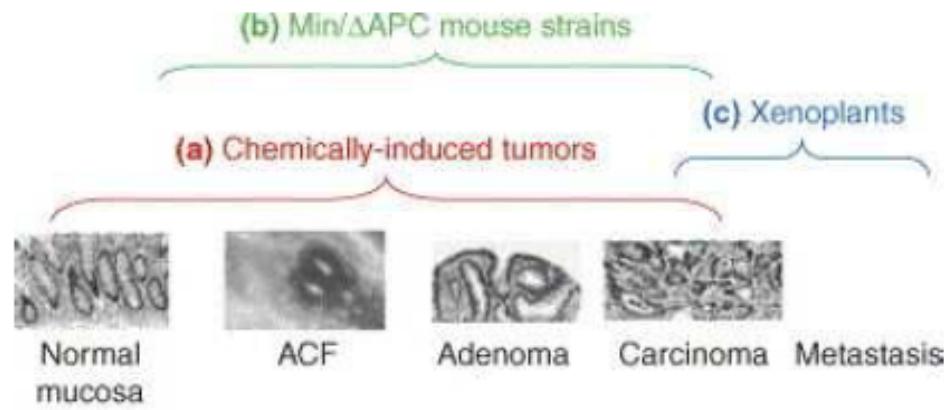
Figure 2 - Breast carcinomas induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA).

conclusion

Résumé sur les modèles animaux du cancer du colon



Colorectal
cancer
development
and its models
(B. Marian, *Drug
Disc. Today*, 2004)



In vivo animal models = distinct stages of CRC development

- (a) chemically induced tumors (AOM-rats)
- (b) Min mouse strains
- (c) **xenograft models** reflect tumor growth and **metastasis**
(surgical implantation of human tumor in nude mice).