

# 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](mailto:isabelle.dhennin@u-picardie.fr)

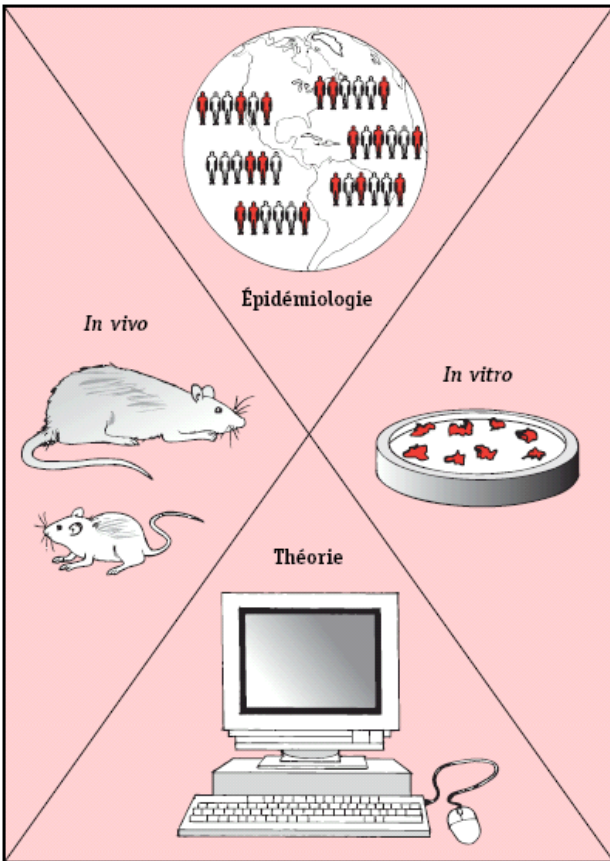
Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire EA4667

# « 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

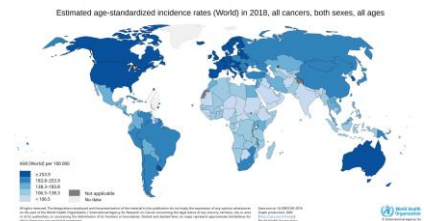


### - les **études non expérimentales ou observationnelles**

Exemples : études de prévalence et d'incidence

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

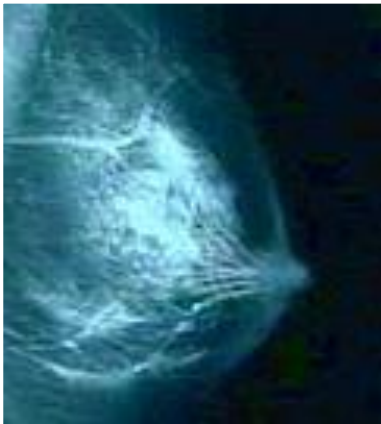
études cas témoins (sujets malades / non malades)



# Etudes épidémiologiques

---

Etablir des marqueurs diagnostics et pronostics



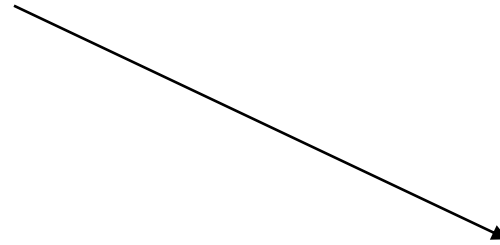
tissus humains  
tumorectomie



paraffine



coupes de tissus  
immunohistochimie

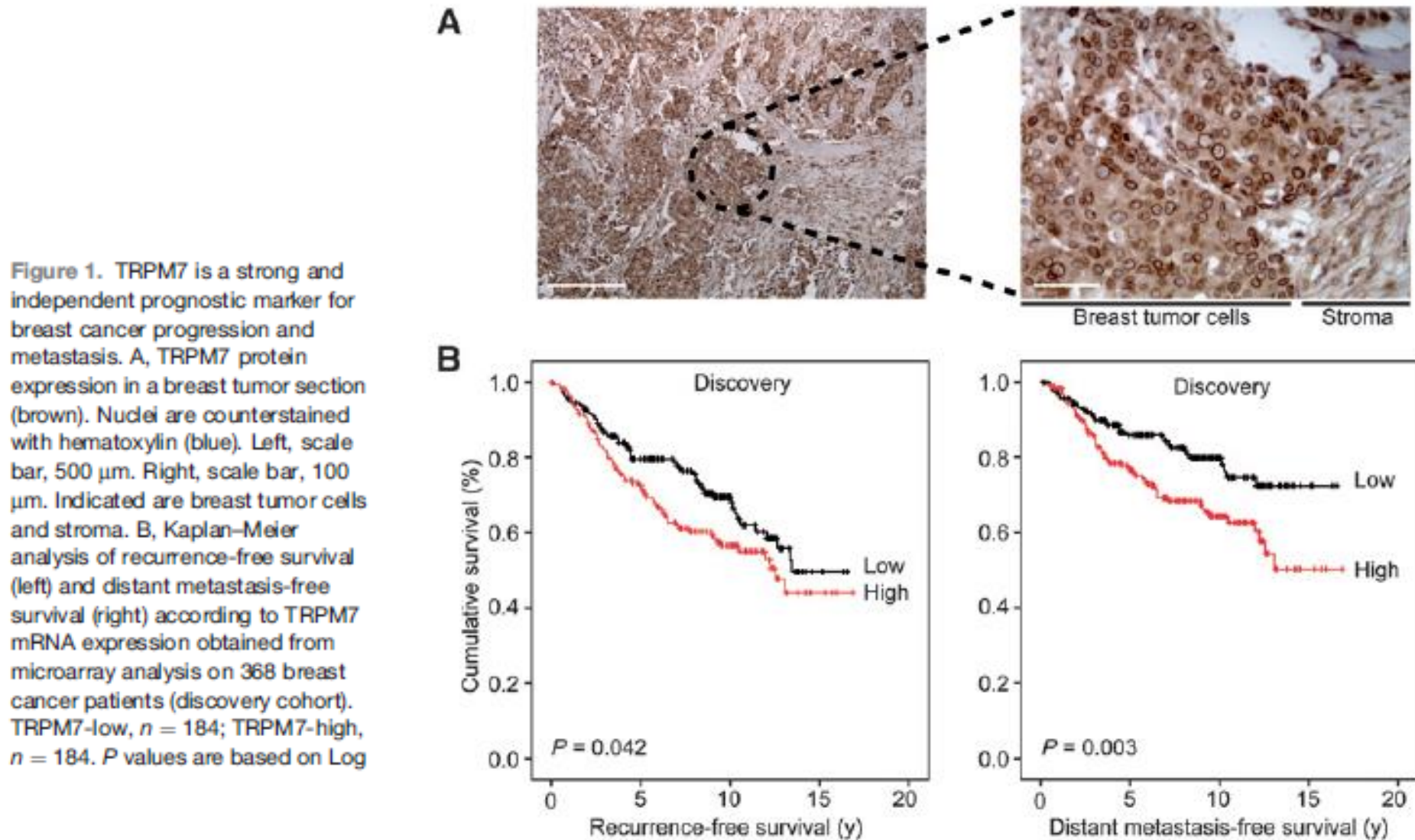


congélation



extraction d'ARNm  
RT-PCR

# Etudes épidémiologiques



# Etudes épidémiologiques

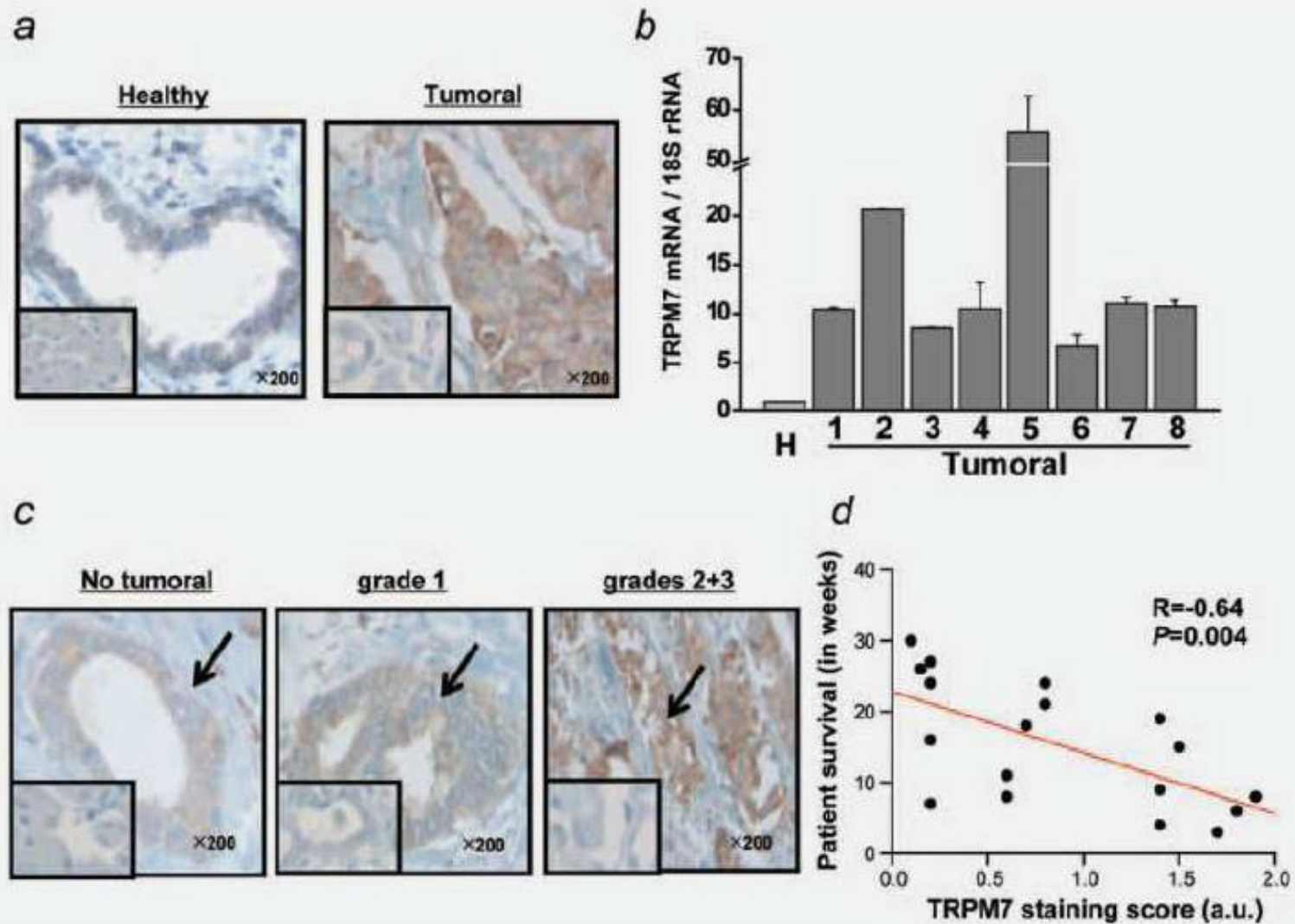


Figure 5. TRPM7 is overexpressed in PDAC; its expression depends on tumor grade and survival. (a) Left panel: no staining was observed

# Etudes *in silico*

## Analyse des banques de données :

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

### A - ESCA

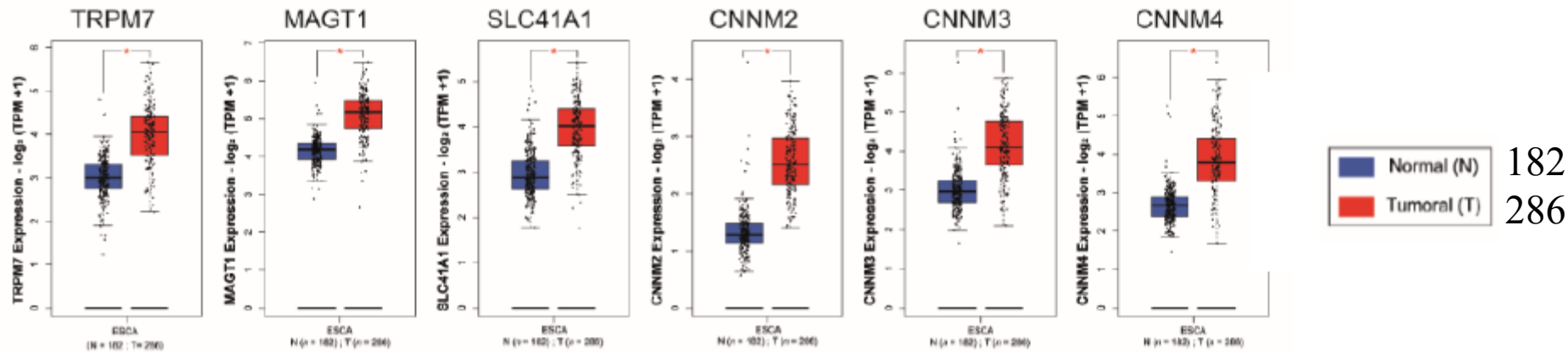
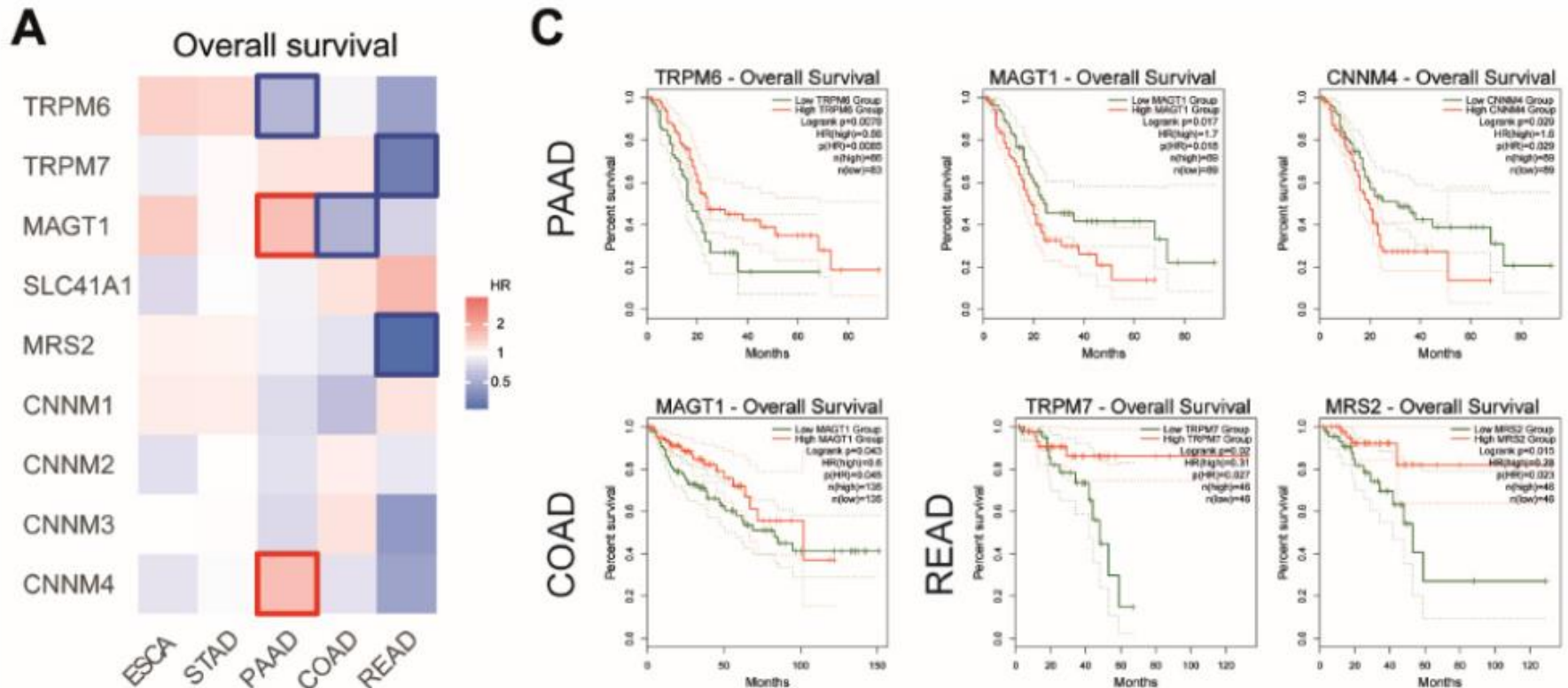


Figure 3. Relative mRNA expression of magnesium transporters in digestive cancers and normal tissues. Whiskers boxplots for  $\text{Mg}^{2+}$  transporters mRNA (TRPM6, TRPM7, MAGT1, SLC41A1, MRS2, CNNM1, CNNM2, CNNM3, CNNM4) were generated using GEPIA2 from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue 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)



**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.

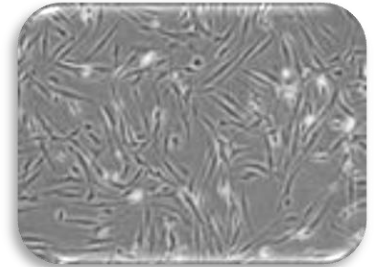
# Modèles *in vitro*

---

- 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*

---

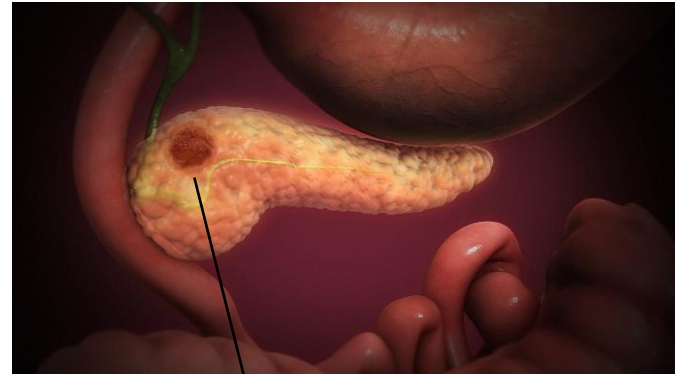
## Les cultures organotypiques

### 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

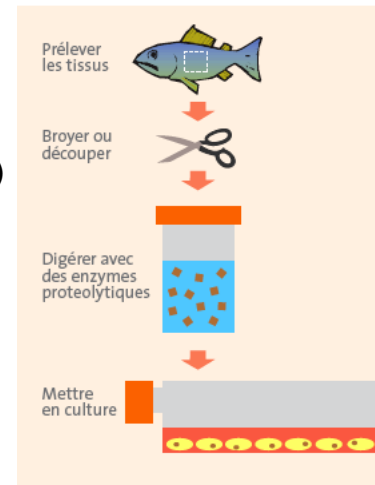
#### 2 types de cellules dans organisme

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

#### Récupération

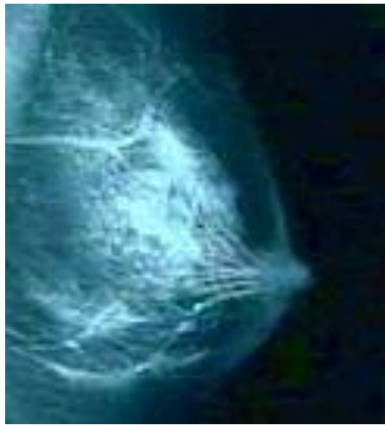
- cellules circulantes : centrifugation différentielle (facile)
- cellules tissus solides : 2 procédés (plus difficile)
  - 1) migration cellulaire à partir d'explant  
(explant = prélèvement d'un morceau de tissu ou organe)
  - 2) dissociation du tissu avec libération des cellules  
(mécanique, chimique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

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

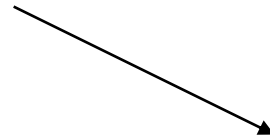


# Modèles *in vitro*

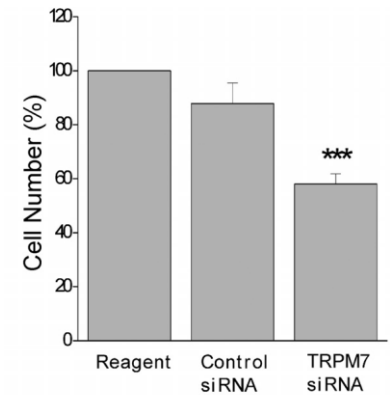
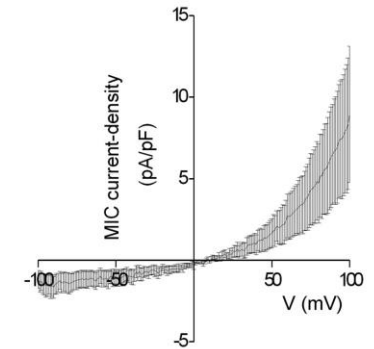
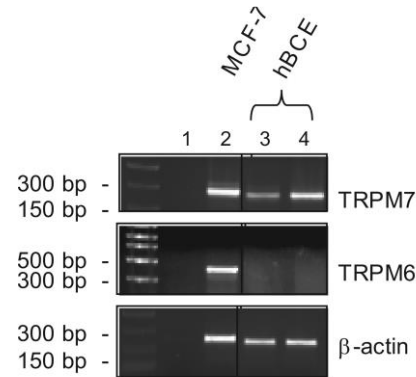
## Les cultures primaires Exemple du cancer du sein



tissus humains  
tumorectomie



**frais**  
culture primaire (hBCE)  
études fonctionnelles



**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

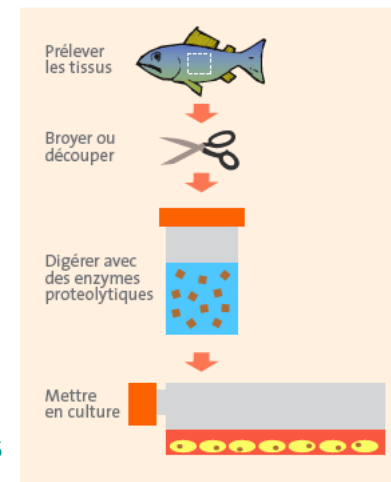
Ou cellules issues de Transformation bénigne ou maligne

### Cultures primaires, cultures définies et lignées cellulaires :

Majorité C primaires ?  
Qlq C survivent et X indéfinies

Lignée cellulaire

Culture primaire



# Modèles *in vitro*

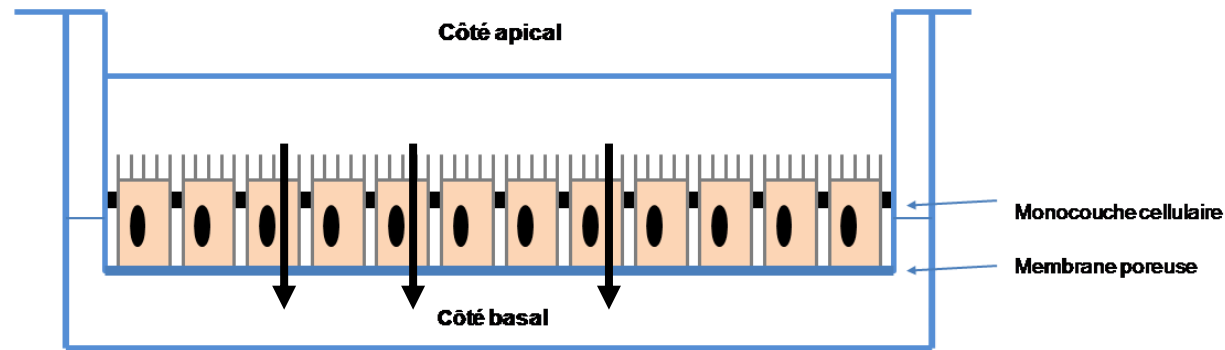
## Les lignées cellulaires

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

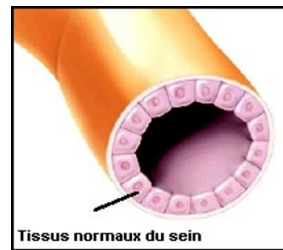
Bien adaptée pour évaluer la diffusion passive

# Modèles *in vitro*

## Les lignées cellulaires

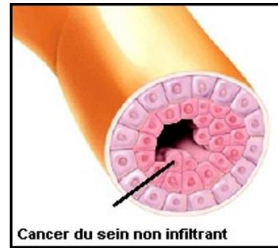
### Exemple du cancer du sein

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



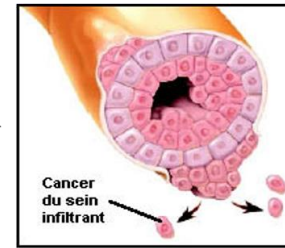
cellules mammaire normales

MCF10A  
hTERT



adénocarcinome canalaire *in situ*  
tumeur localisée

MCF-7  
T47D



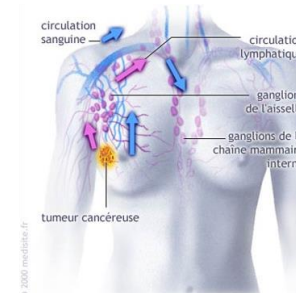
adénocarcinome canalaire invasif  
tumeur invasive

MDA-MB-231

sang  
lympe

métastases

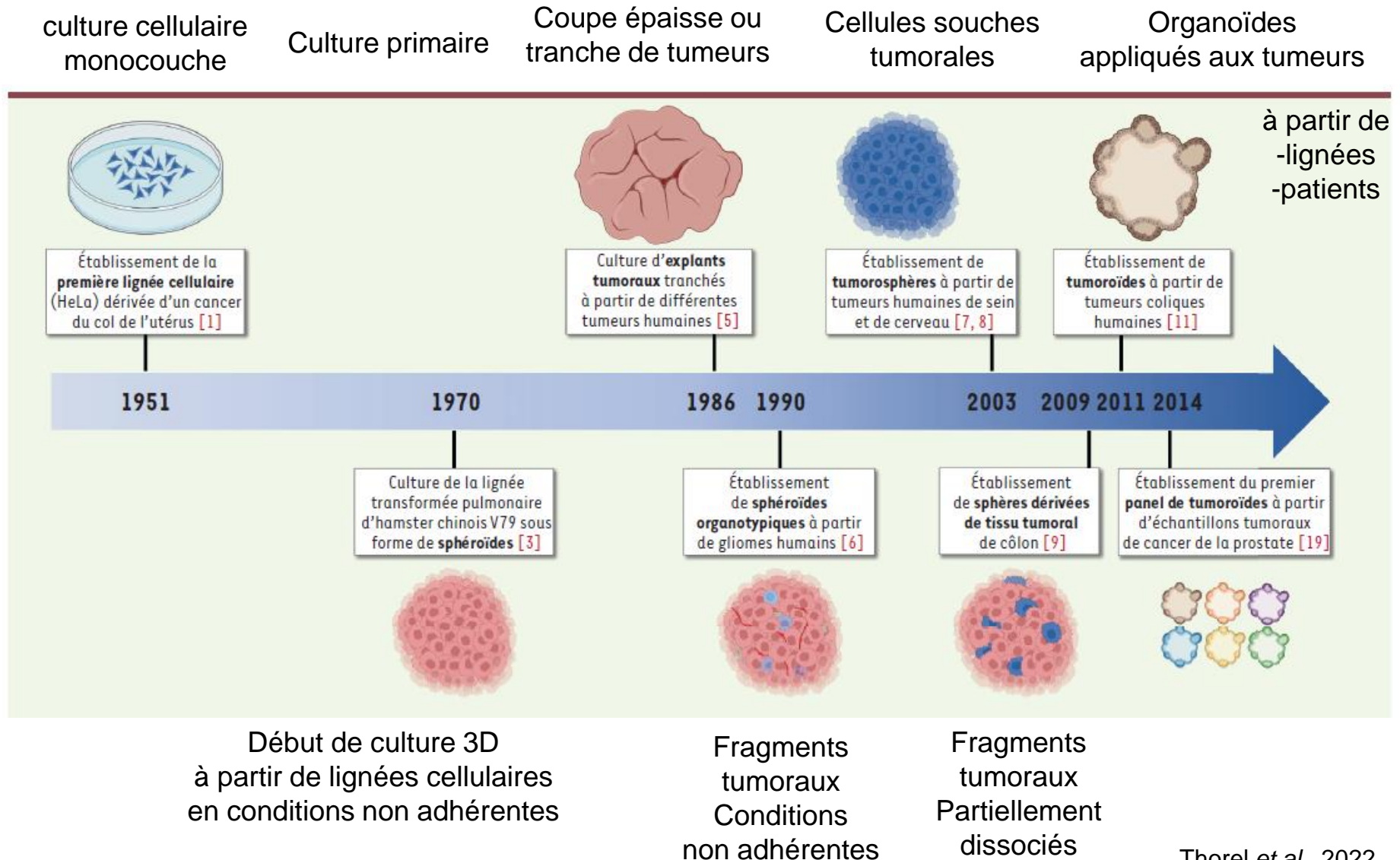
- ganglions lymphatiques axillaires
- os, foie, poumons, cerveau



MDA-MB-231 BrM  
brain metastasis

# Modèles *in vitro*

## Modèles cellulaires en cancérogenèse



# Modèles *in vitro*

Les organoïdes tumoraux = organes de synthèse ?

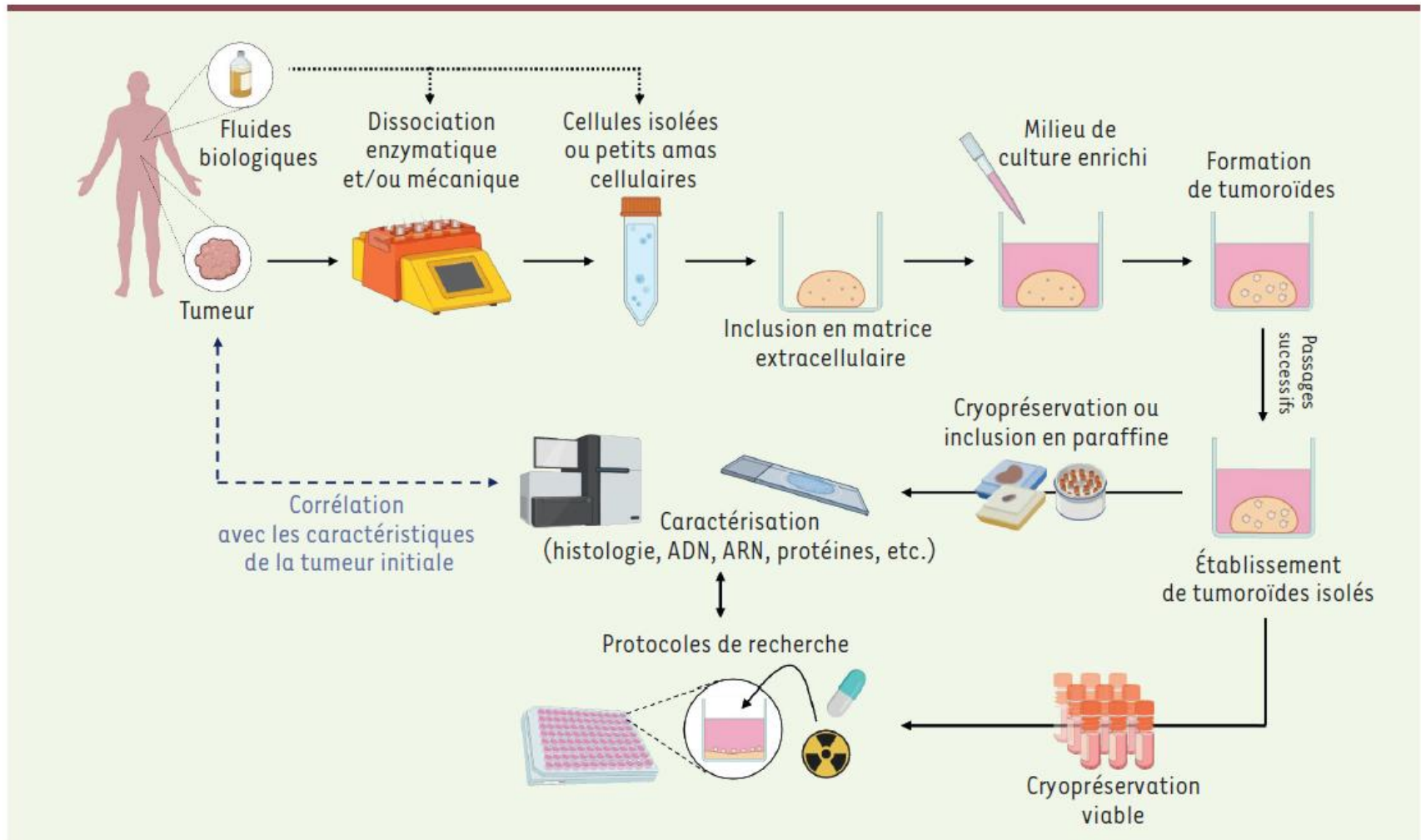


Figure 2. Représentation schématique des différentes étapes de production et d'utilisation des organoïdes tumoraux à visée de recherche.

# Modèles *in vitro*

## Les organoïdes tumoraux

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

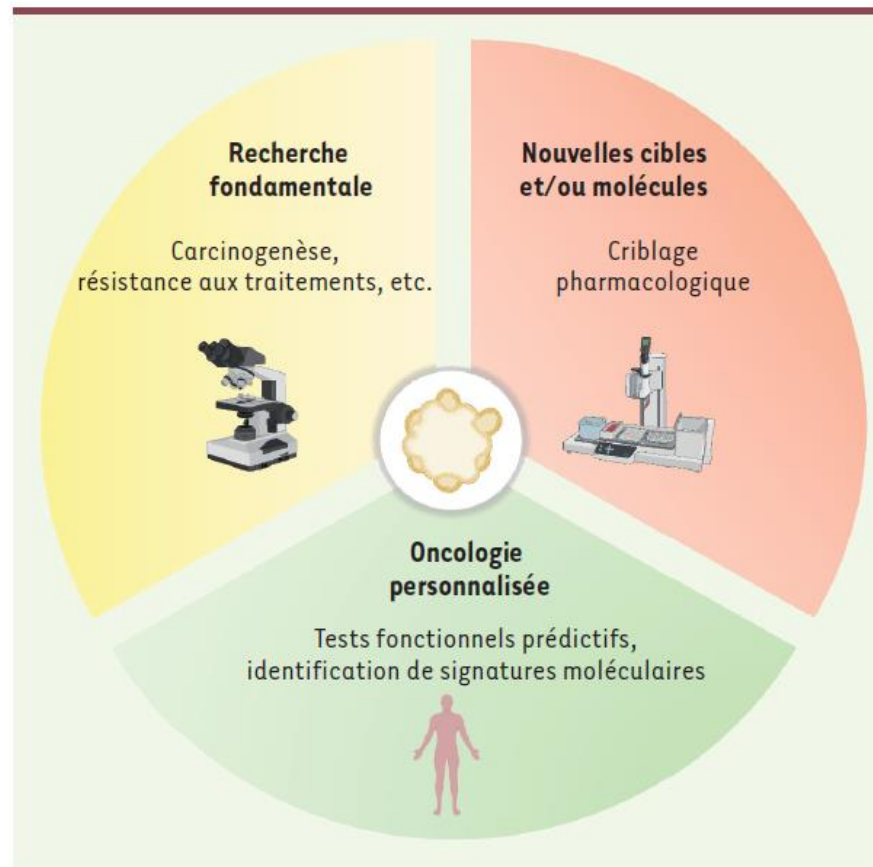
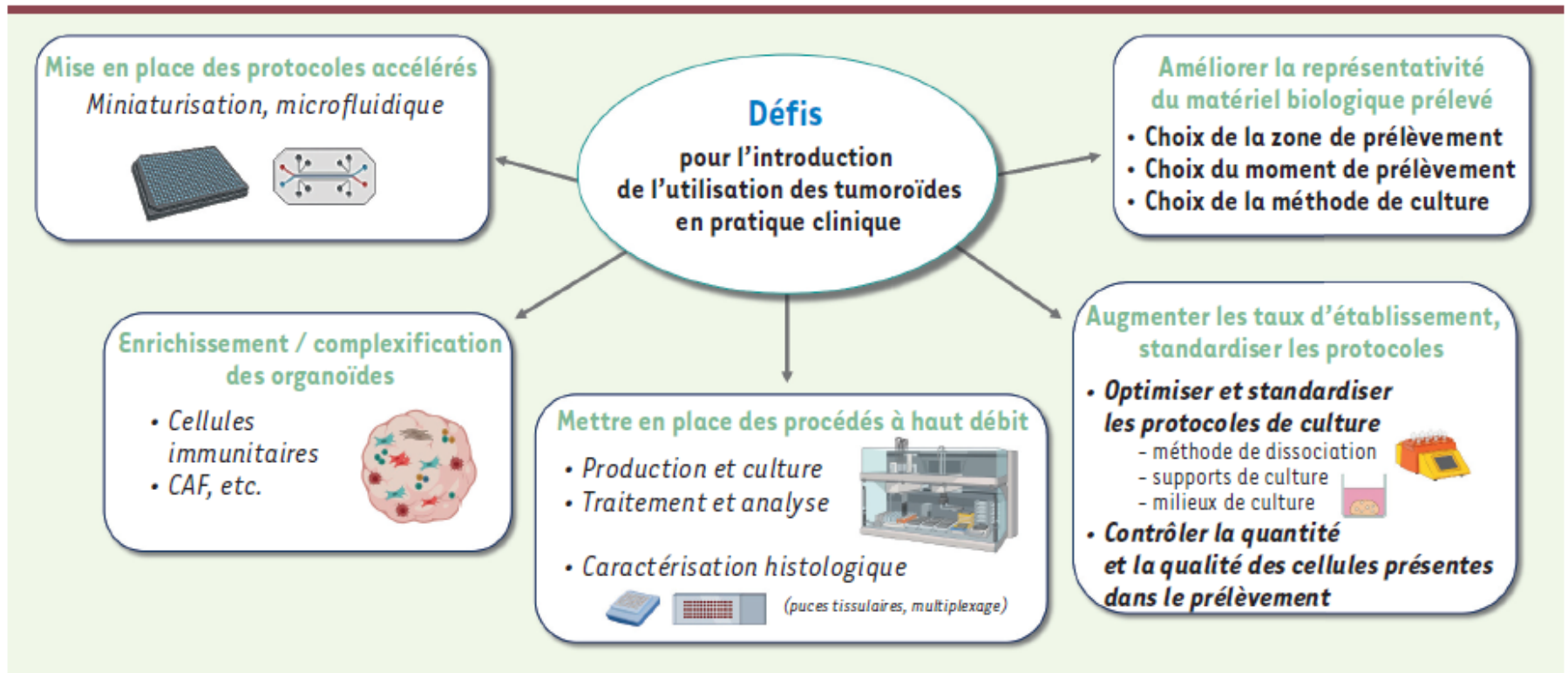


Figure 3. Domaines d'applications des tumoroides en oncologie.

# 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.

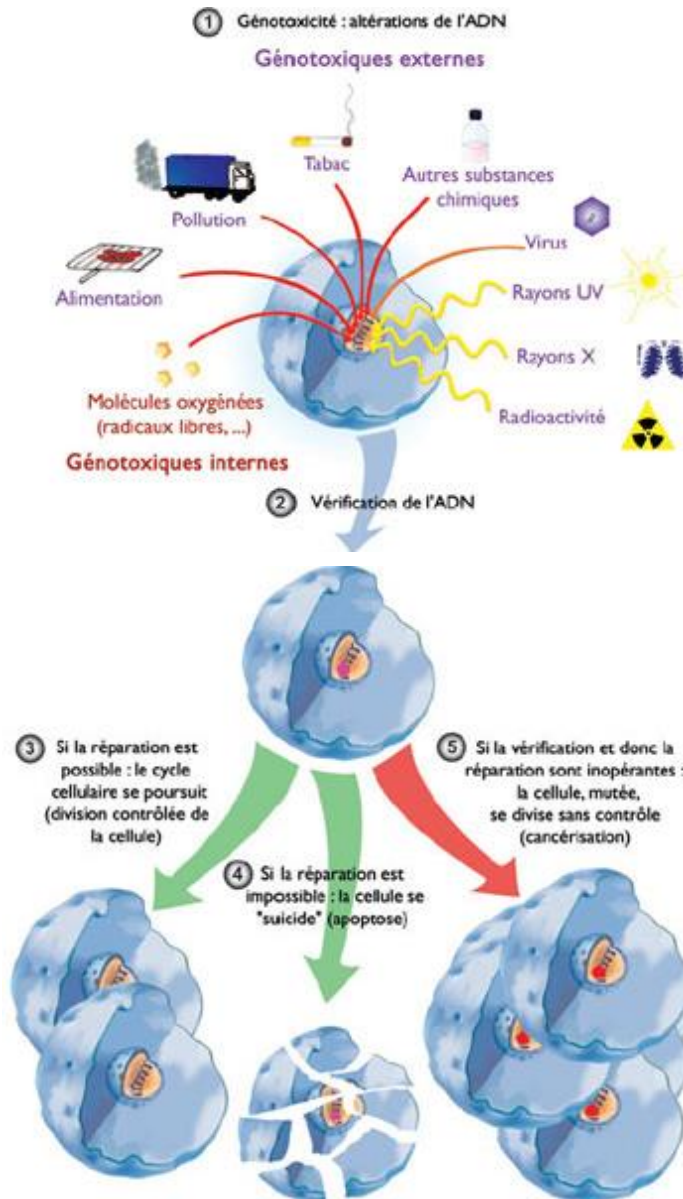
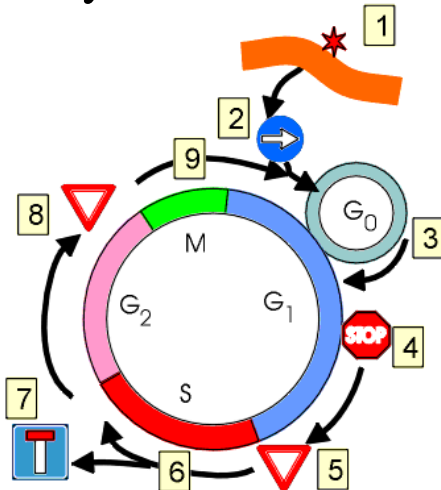
# « Modèles animaux en cancérogenèse »



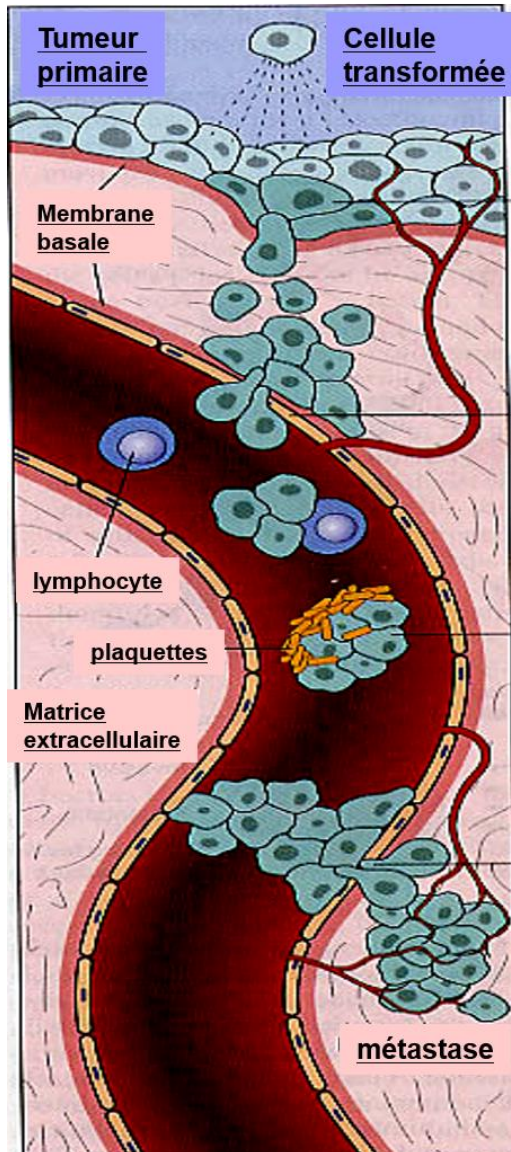
# Mécanisme général de carcinogenèse

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

perte de contrôle  
du cycle cellulaire



= transformation  
cellulaire



**prolifération**

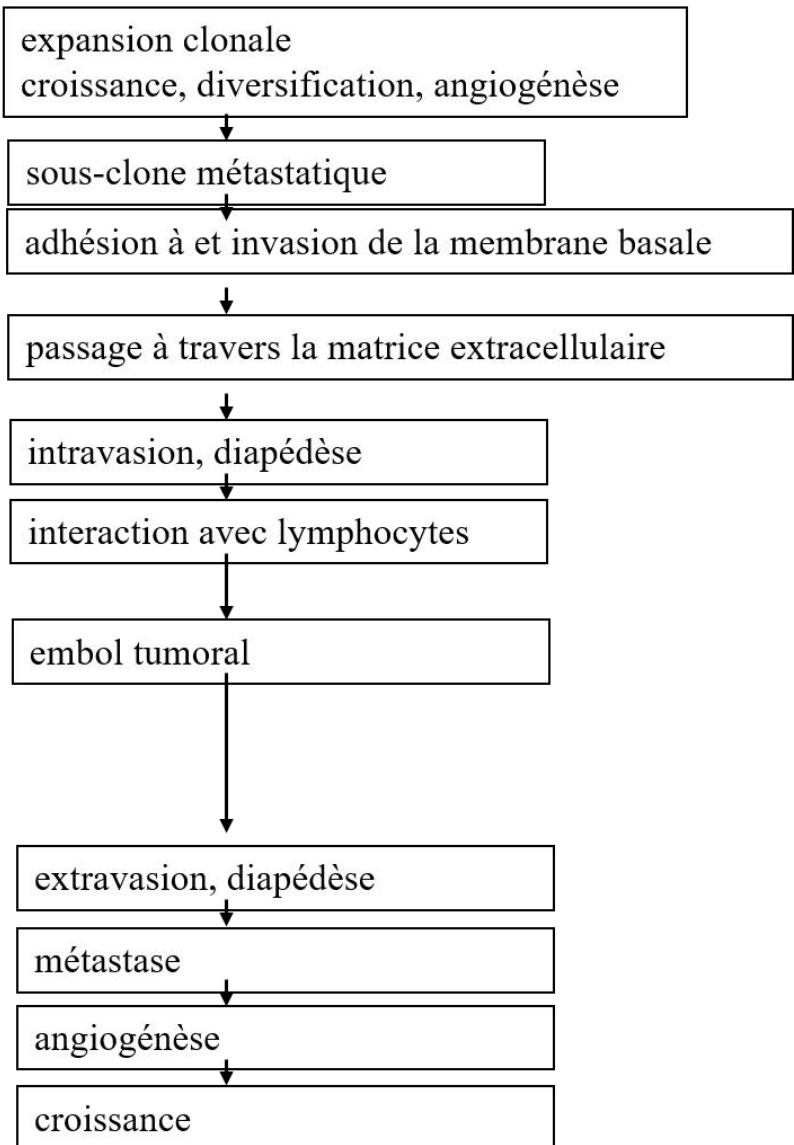
**migration**

**invasion**

**invasion**

**migration**

**prolifération**



# Modèles d'animaux en cancérologie

Tumeur induite  
physiquement ou chimiquement

Tumeur humaine greffée

## Modèles syngéniques

Injection lignées de cancer murines  
Induction par agents chimiques

## Xénogreffes

Injection lignées de cancer humaines  
Implantation de tumeurs primaires humaines

Position sous-cutanée  
Position orthotopique  
Position intraveineuse

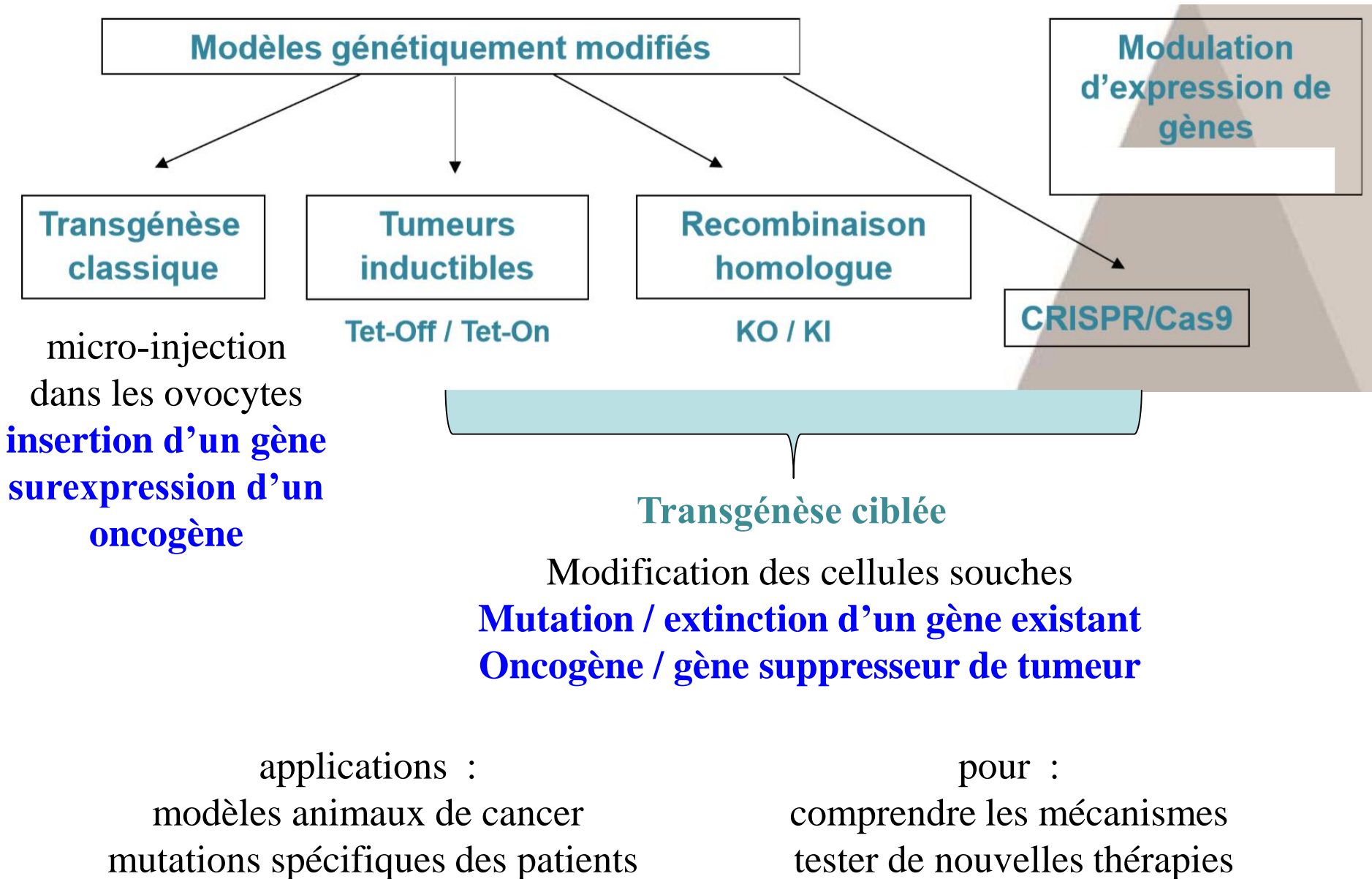


## Modèles transgéniques ou knock-out

Surexpression d'oncogènes  
Inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs

Tumeurs spontanées  
chez souris mutées ou transgéniques

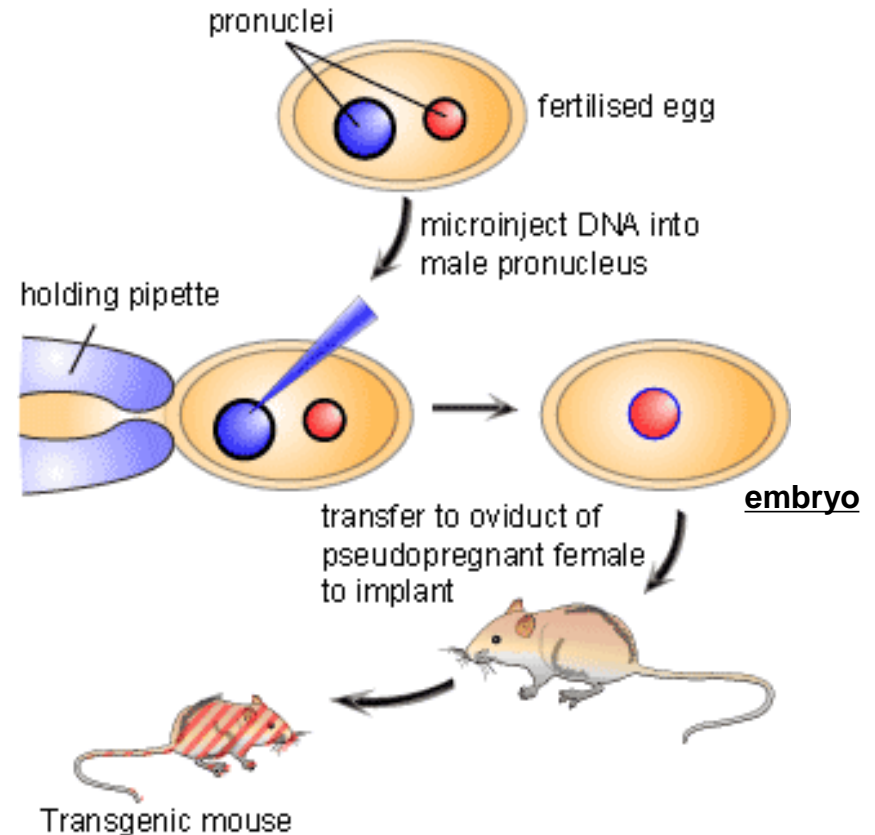
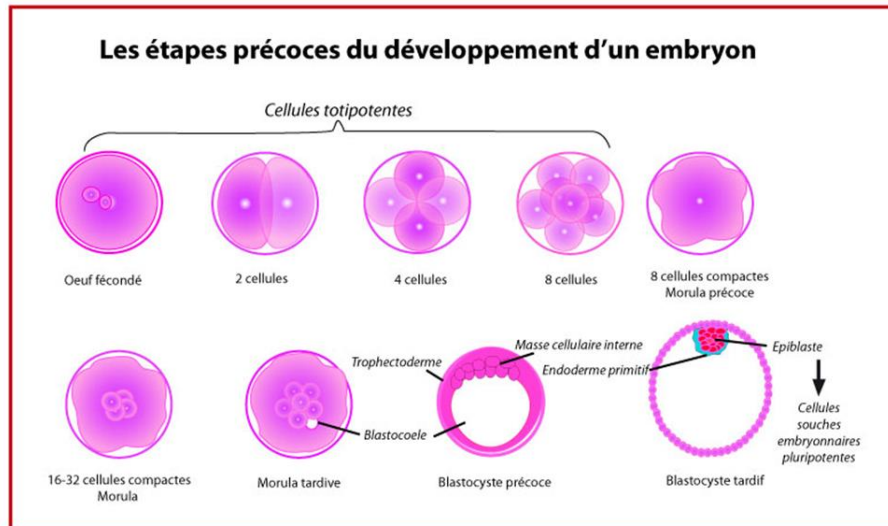
# 1- Les modèles transgéniques

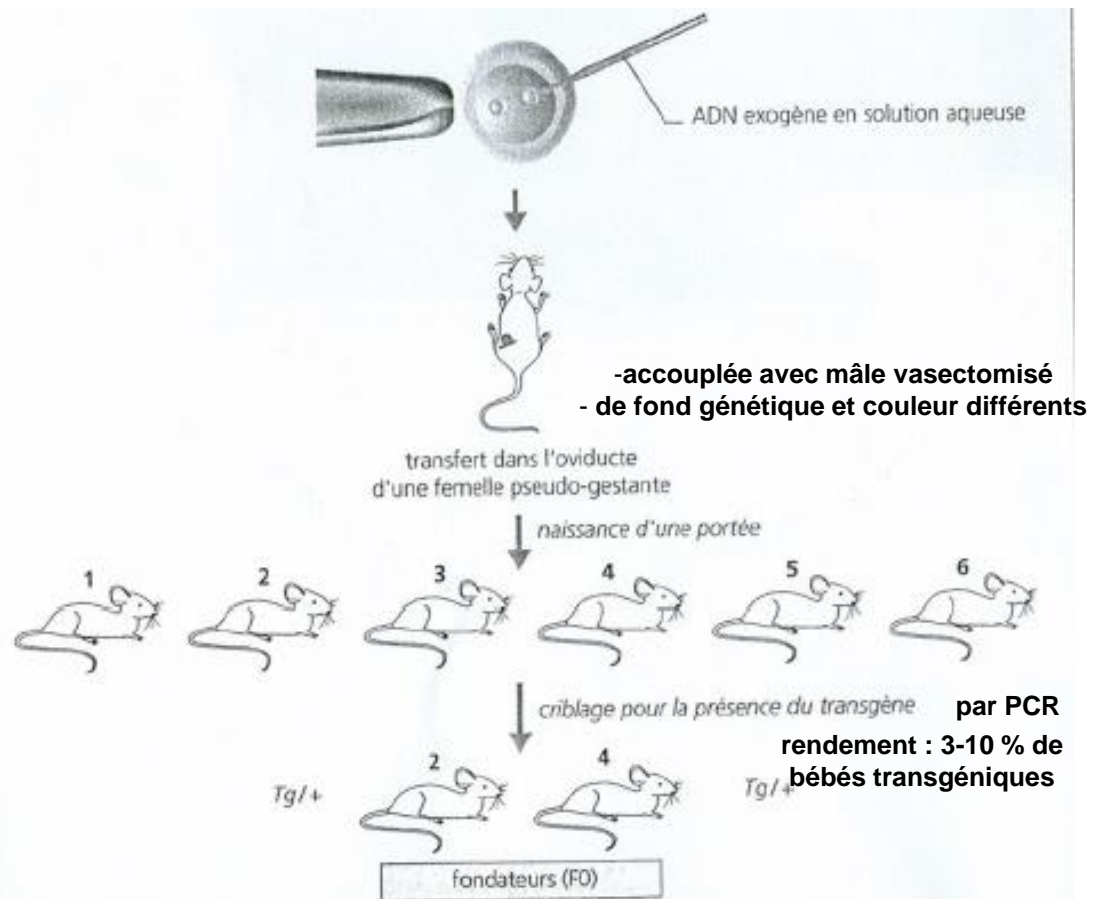
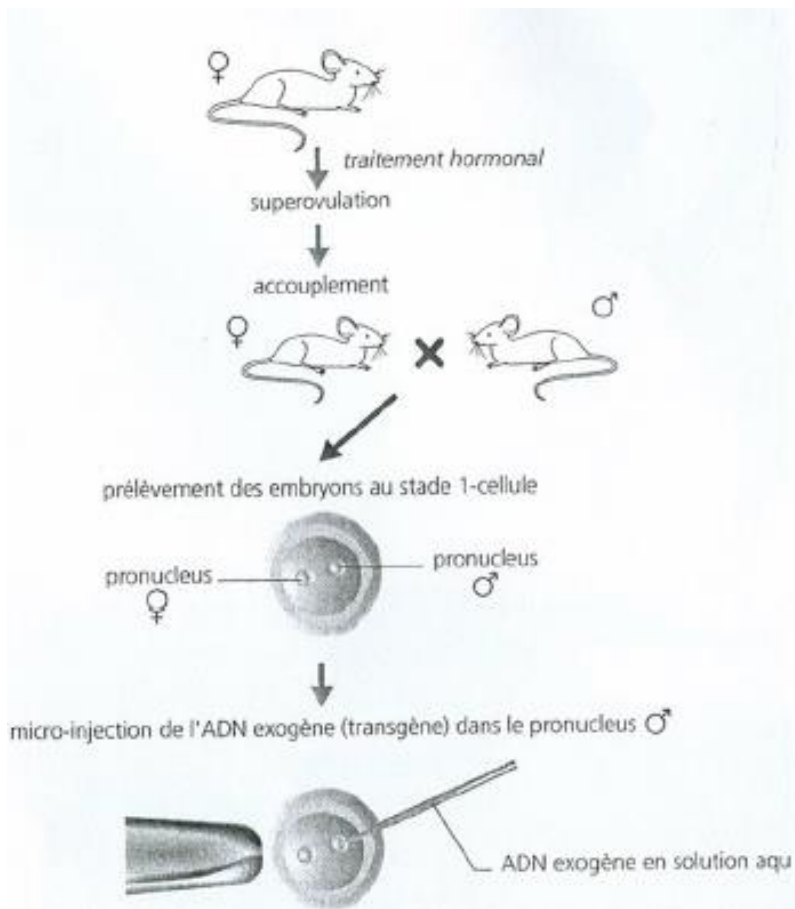


# La transgénèse classique

- 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

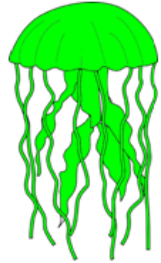


Souris de taille normale.

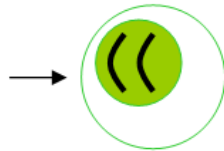
Souris transgénique géante

# Exemple : animaux exprimant la GFP

Méduse émettant une lumière verte



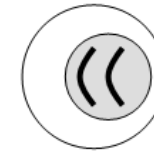
Cellule de méduse



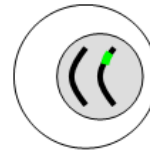
Gène de la GFP  
Green fluorescent protein

Transgénèse

Ovule fécondé



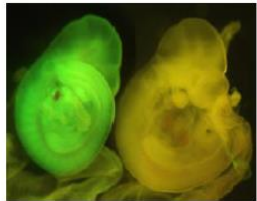
Souris



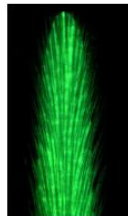
Souriceau fluorescent



Souris adulte



9.5 day embryos -  
GFP and wt



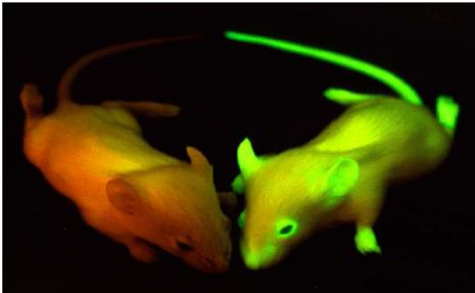
Tail tip

GFP transgenic mice  
NAGY



La lueur émanant de la peau  
est camouflée par les poils

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



# Exemples : production de médicaments

protéine anti-coagulante  
**anti-thrombine III (ATIII)**



traitement des patients  
Subissant un pontage  
aorto-coronarien par greffe

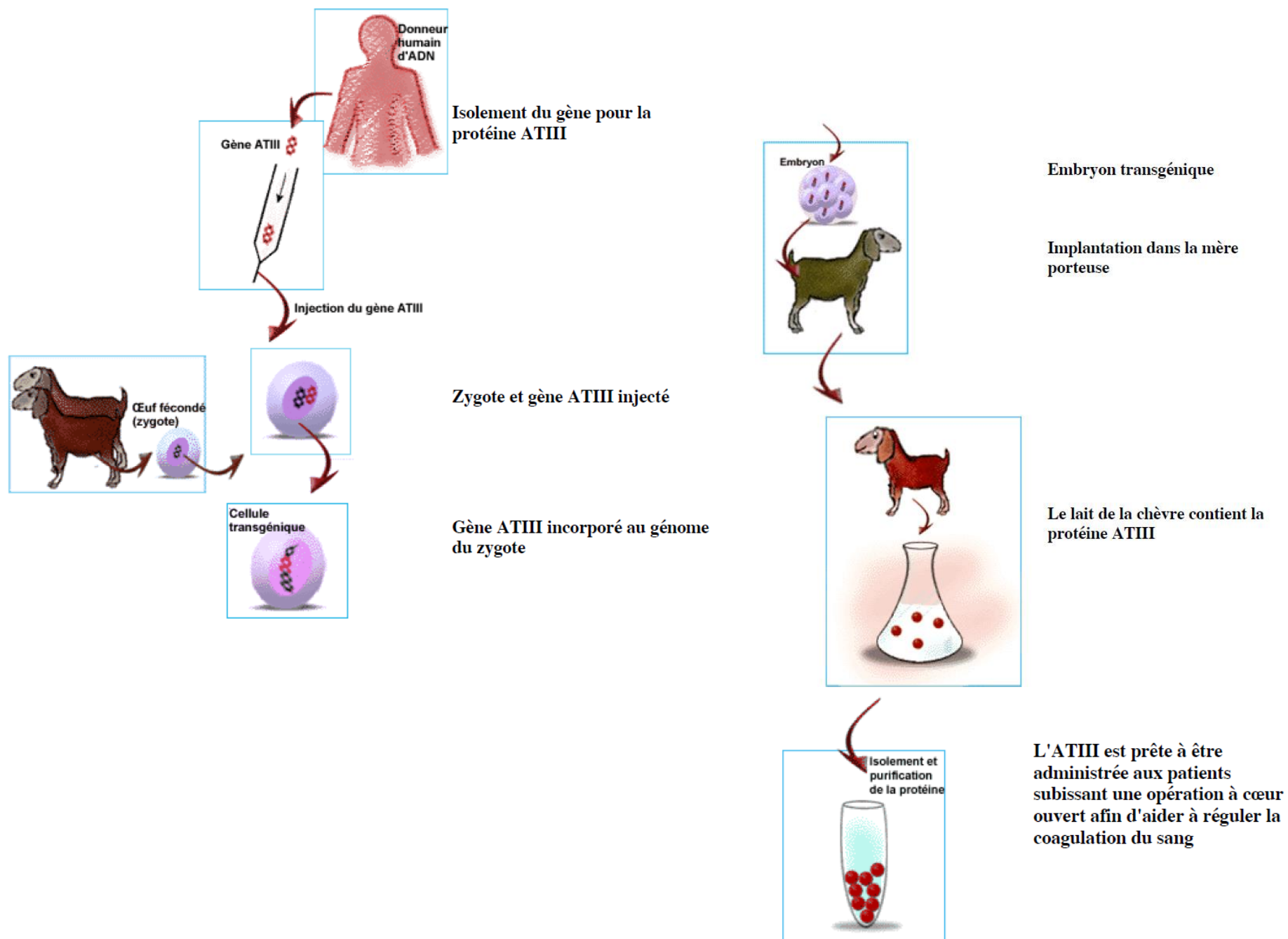


produite dans  
le lait de chèvre



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 cétuximab / litre de lait

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



en attente d'autorisation  
pour utilisation humaine

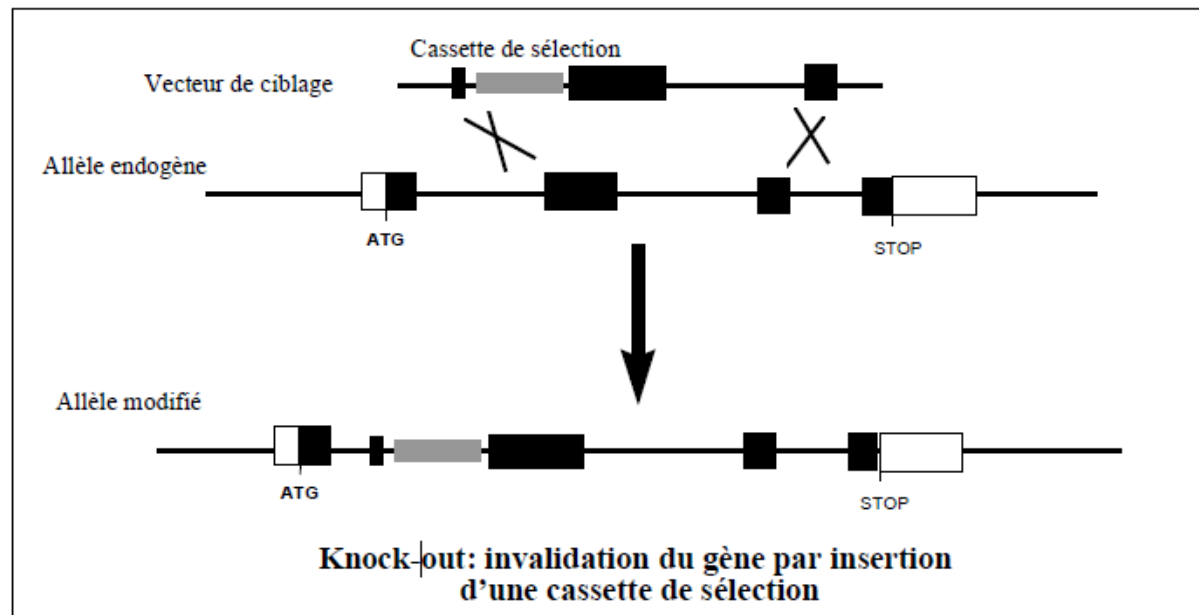
# La transgénèse ciblée

- Transgénèse ciblée ou Recombinaison homologue:

modification d'un gène déjà existant dans l'animal

## *Knock out :*

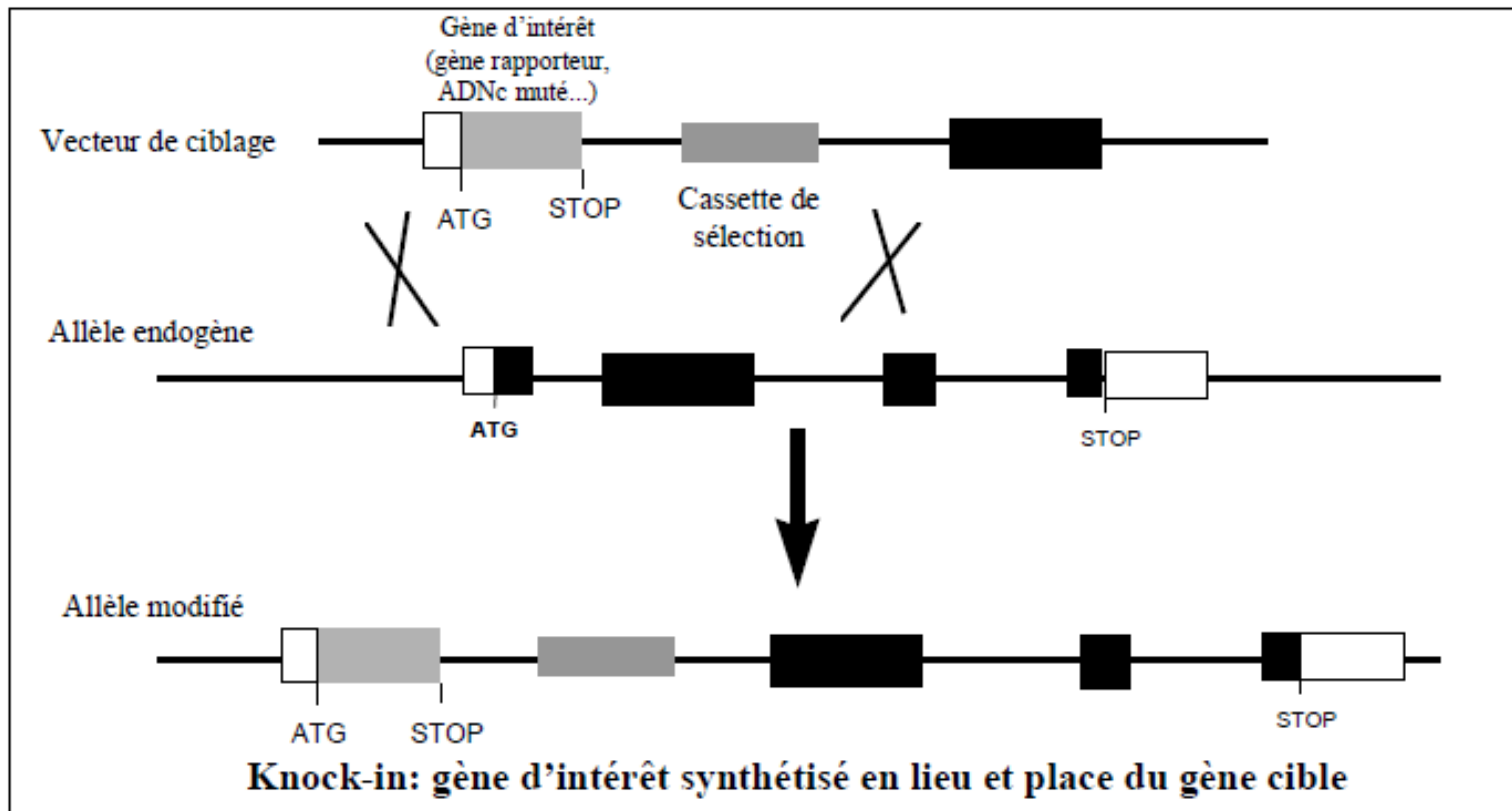
*Le gène est enlevé entièrement ou partiellement par transgénèse ciblée via des cellules (ES) préalablement modifiées.*



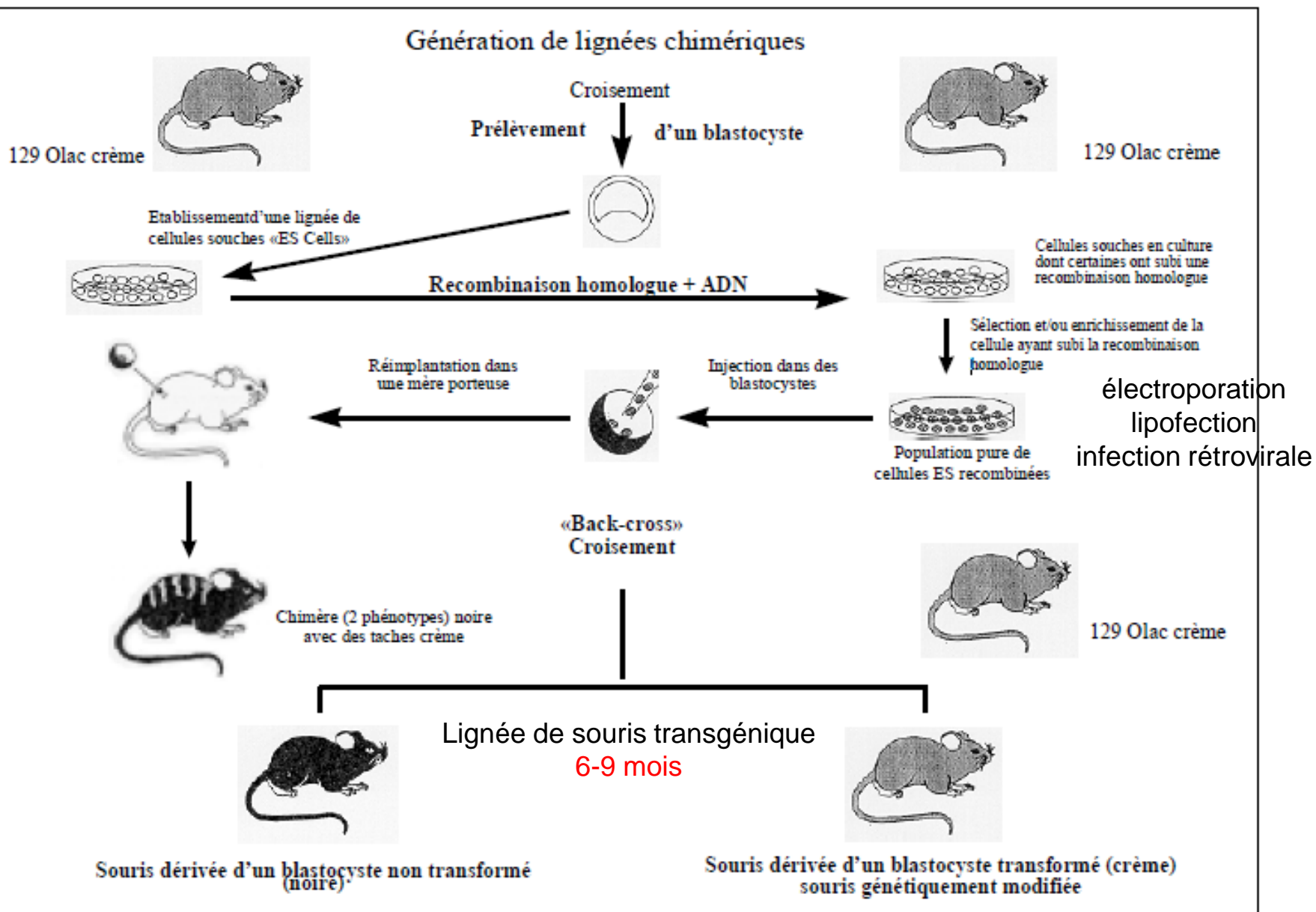
Principe du Knock-out

## Knock in :

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



**Principe du Knock-in**



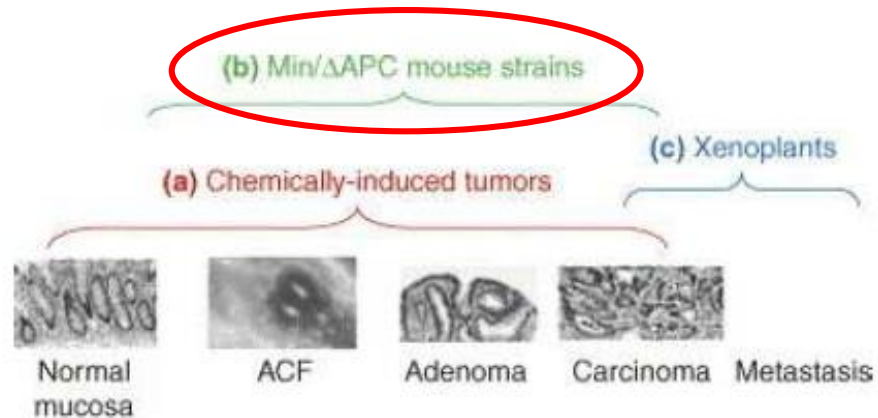
**Les différentes étapes de la technique par recombinaison homologue et cellules ES**

# 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

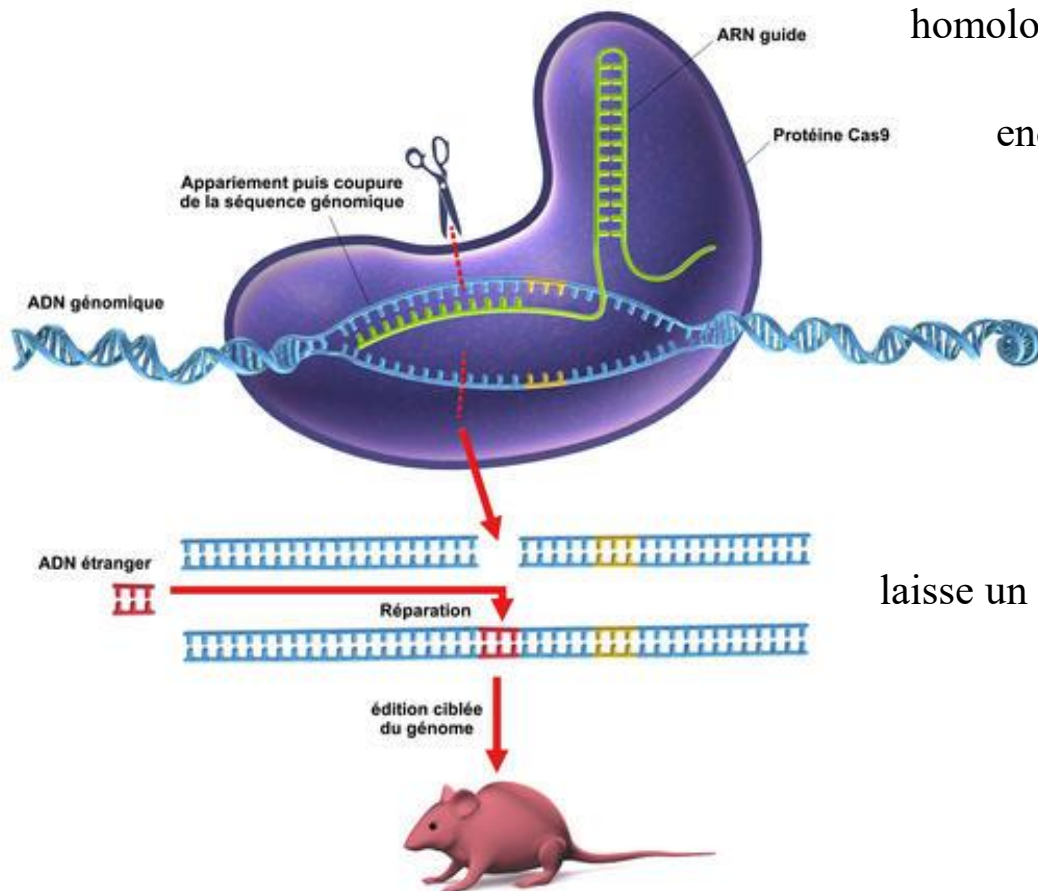


**Colorectal  
cancer  
development  
and its models**  
(B. Marian, *Drug  
Disc.Today*, 2004)



# Les modèles animaux CRISPR-Cas9

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



homologue à la séquence ciblée

endonucléase : coupure du génome

laisse un trou qui peut être comblé par un ADN ajouté

# Les modèles animaux CRISPR-Cas9

## Les modifications génétiques ciblées réalisables :

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

NHEJ

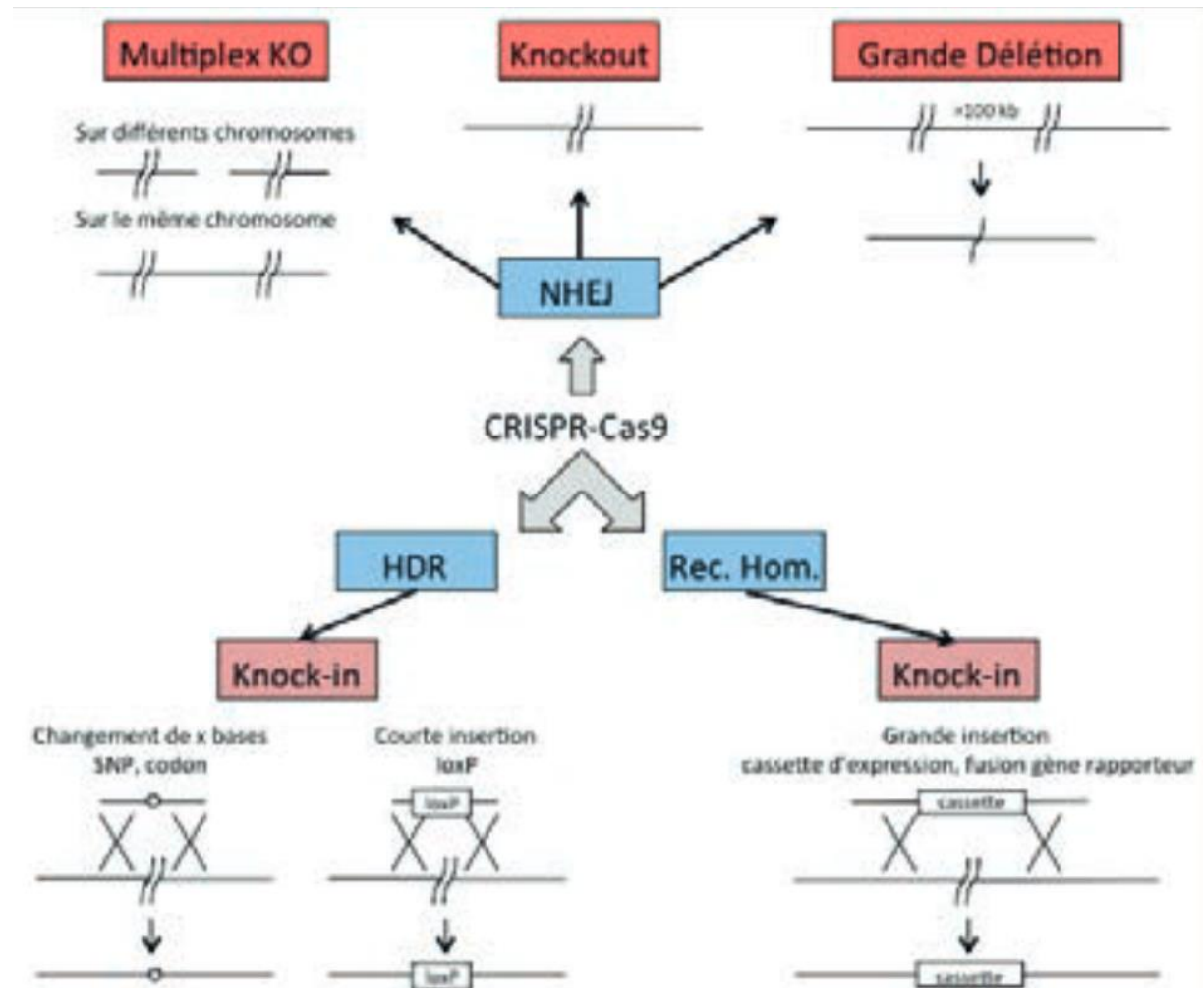
Non-Homologous End Joining

HDR

Homology Direct Repair

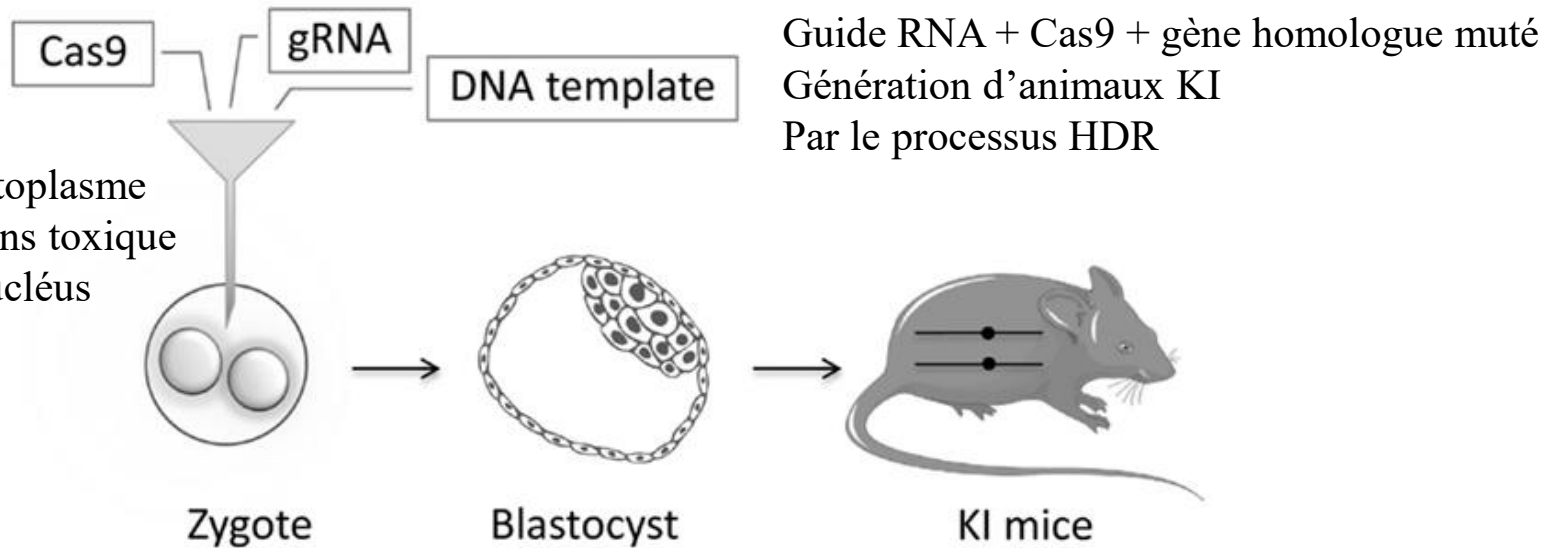
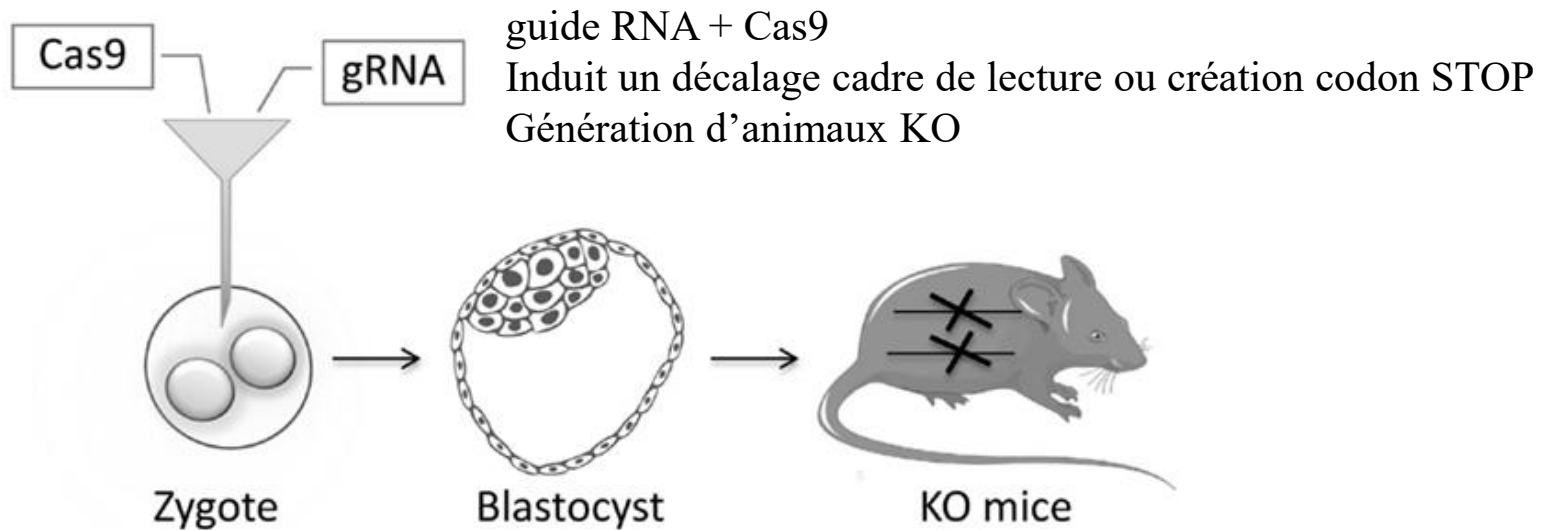
Rec Hom

Recombinaison Homologue



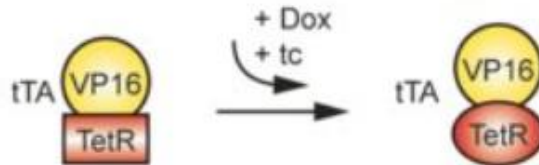
# Les modèles animaux CRISPR-Cas9

## Exemples :

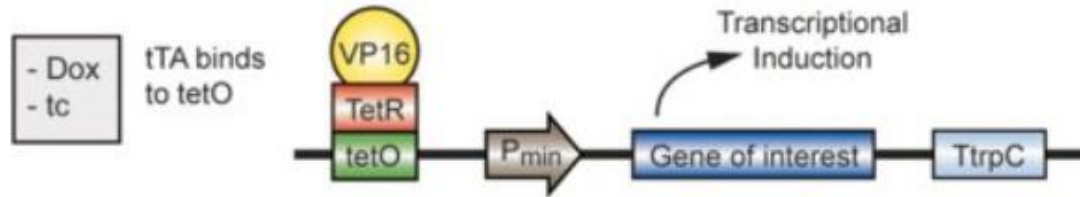


# Les modèles animaux inductibles Tet Off/On

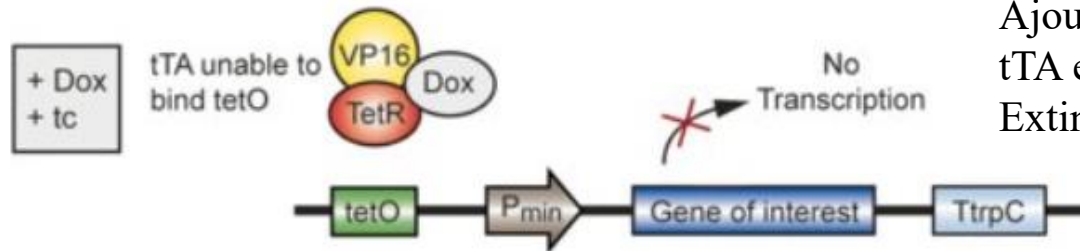
a



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*; Pmin, minimal promoter.

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

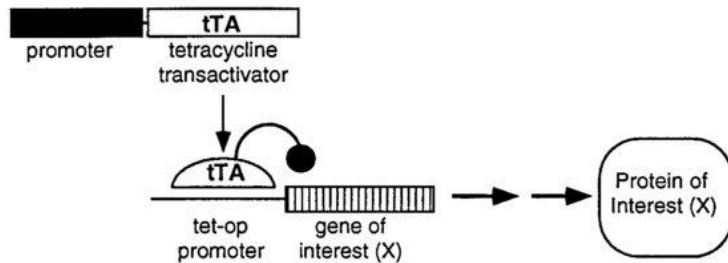
Pas d'expression du gène cible

Exemple : expression tissus spécifique

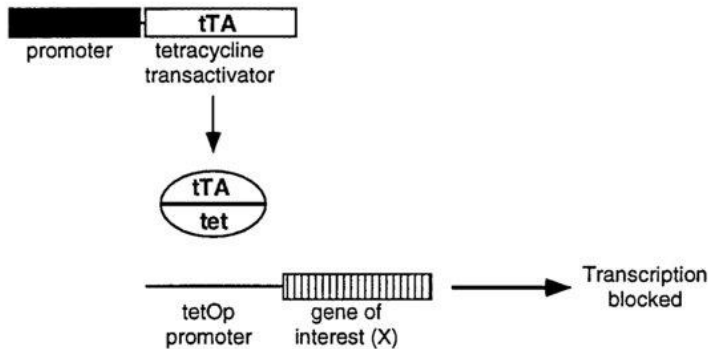
Promoteur de tTA sous influence de  
facteur de transcription spécifique du  
cerveau

## TET-OFF system

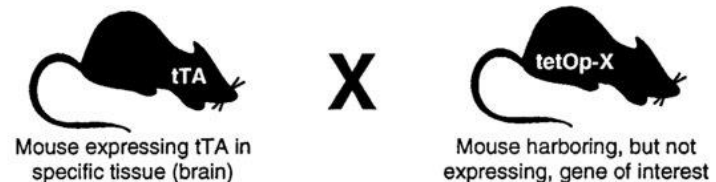
absence of tet



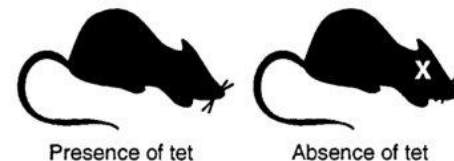
presence of tet



## TET-inducible transgenic mice



pas d'expression  
dans le cerveau



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 <b>abritant un gène ...</b>	animaux susceptibles de <b>relarguer des particules virales ...</b>	
<b>Classe 1 :</b>	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)	<b>cancers</b>
<b>Classe 2 :</b>	ayant un effet nuisible connu pour l'homme ou l'environnement	de classe 2 (pathogénicité susceptible pour l'homme)	
<b>Classe 3 :</b>	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	
<b>Classe 4 :</b>	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
<b>Classe 1</b>	<b>A1</b>	animalerie conventionnelle
<b>Classe 2</b>	<b>A2</b>	<p>barrières spécifiques renforcées :  sas, hotte flux laminaire (PSM type II),  portoirs ventilés, filtration de l'air en sortie</p>



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

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



## 2- Les modèles de xénogreffes

---

### 1<sup>er</sup> 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 ....



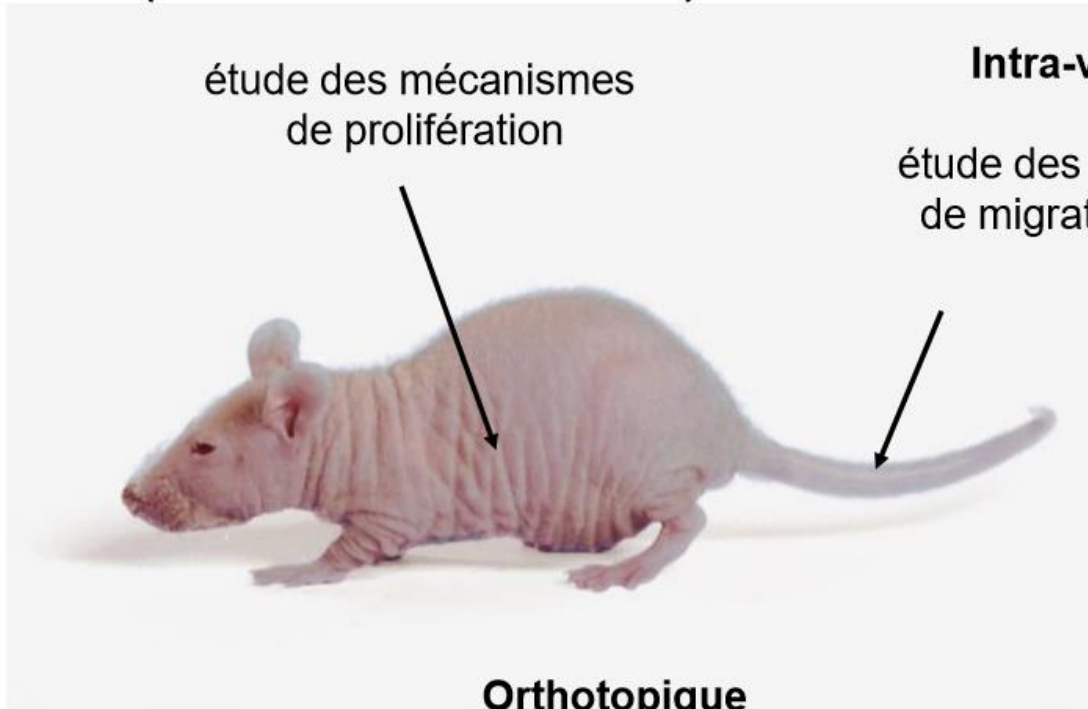
# Injection des cellules cancéreuses

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

étude des mécanismes  
de prolifération

**Intra-veineuse**

étude des mécanismes  
de migration/invasion

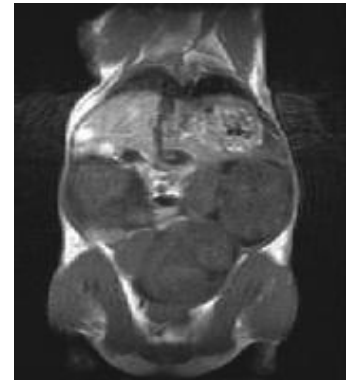
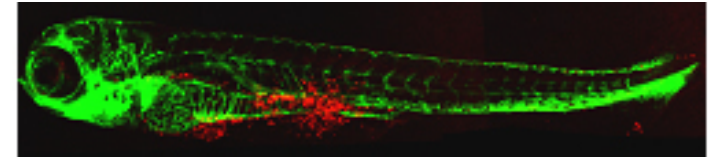
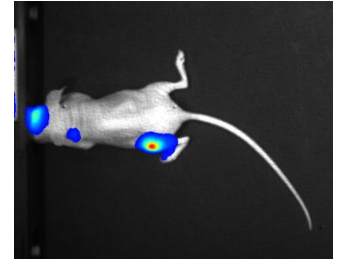


**Orthotopique**  
(dans l'organe d'intérêt)

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

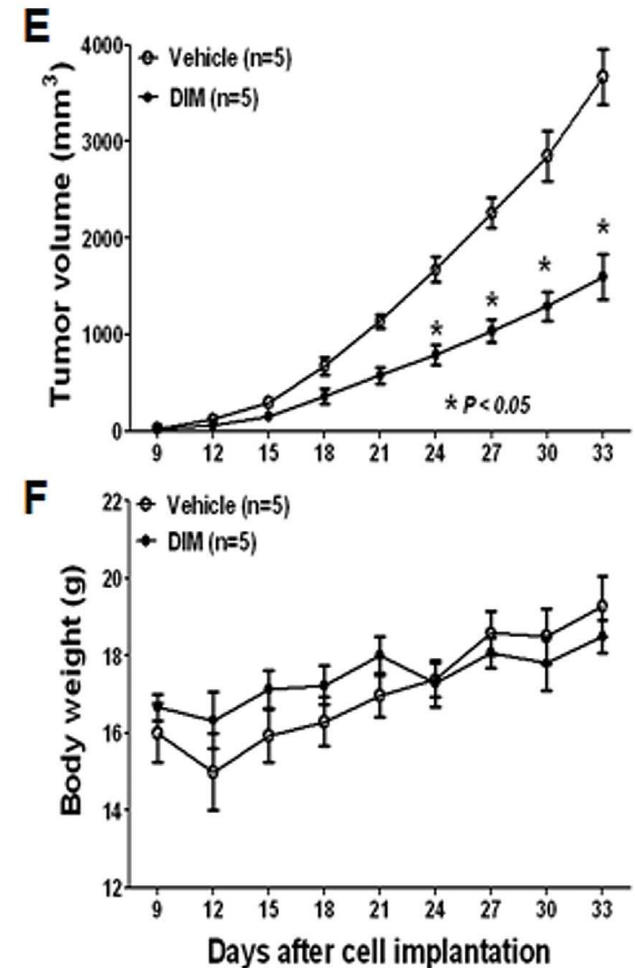
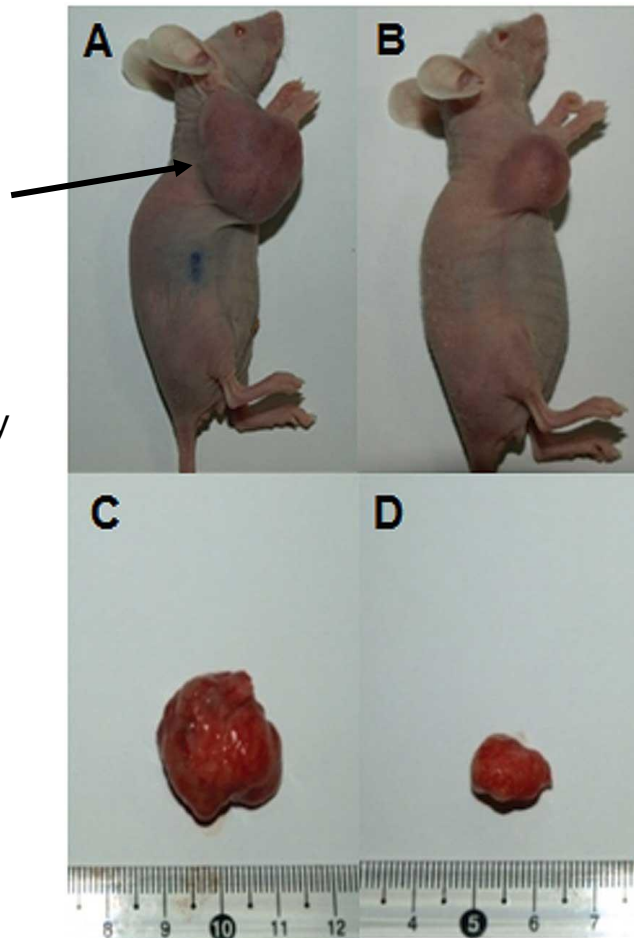
## Injection sous-cutanée de lignées cancéreuses humaines

### 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  
 $7 \times 10^6$  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 :

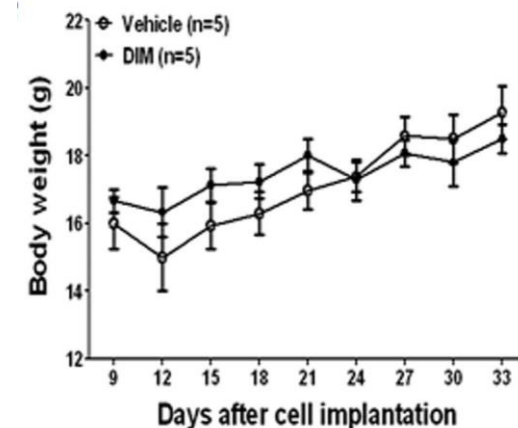


- la masse de la tumeur ne devrait augmenter ni au point d'interférer significativement avec les fonctions normales du corps ni au point d'induire, du fait de son emplacement, une souffrance et/ou une détresse (tumeurs solides);

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.

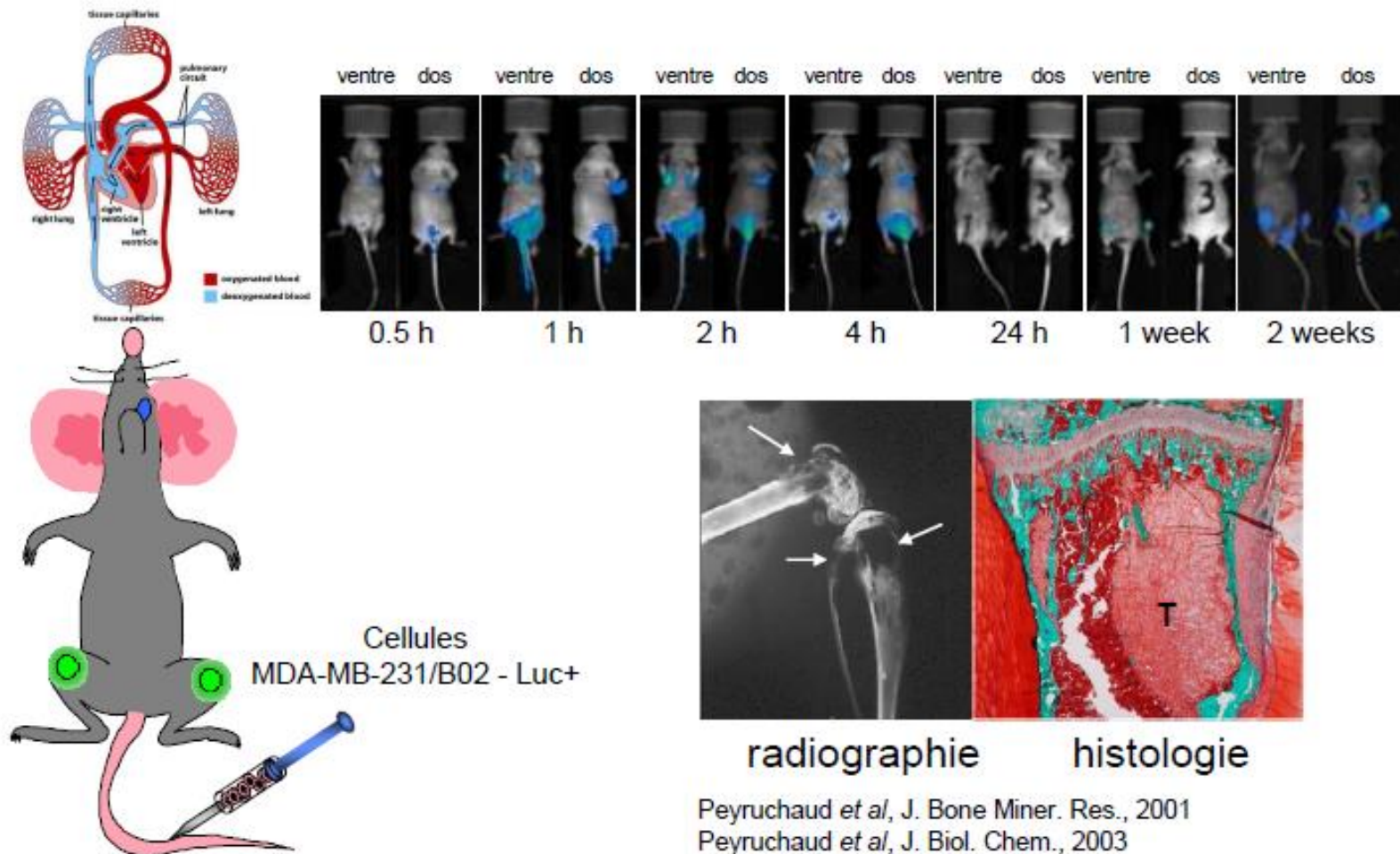


# Exemple : étude de la formation de métastases

## Injection intra-veineuse de lignées cancéreuses humaines

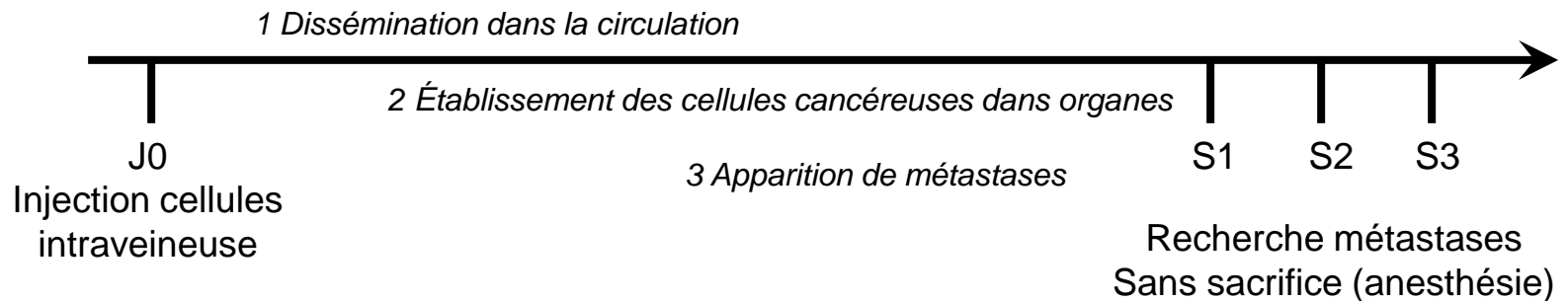
### Modèle de métastases osseuses pour le cancer du sein

#### Injection intraveineuse



## exemple d'imagerie par bioluminescence

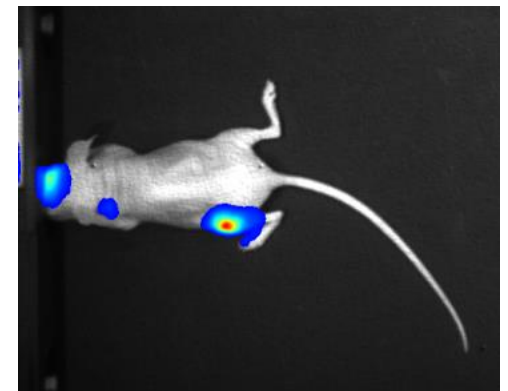
injection MDA-MB-231 luc (cellules épithéliales cancéreuses mammaires humaines surexprimant un gène « luciférase ») dans des souris immunodéprimées de type Nude



**Souris Nude**

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

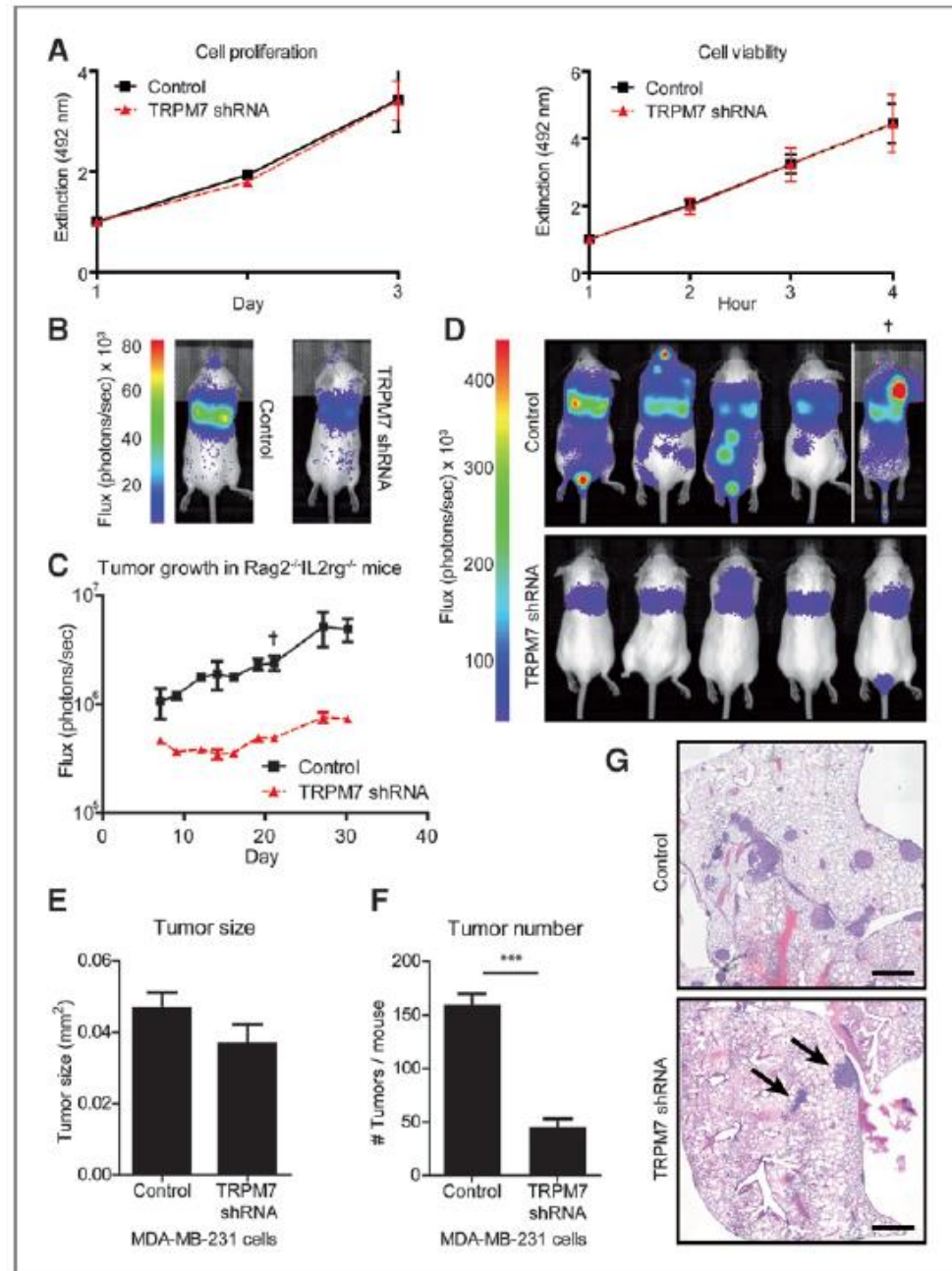
**Points lumineux = métastases**



# 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*.

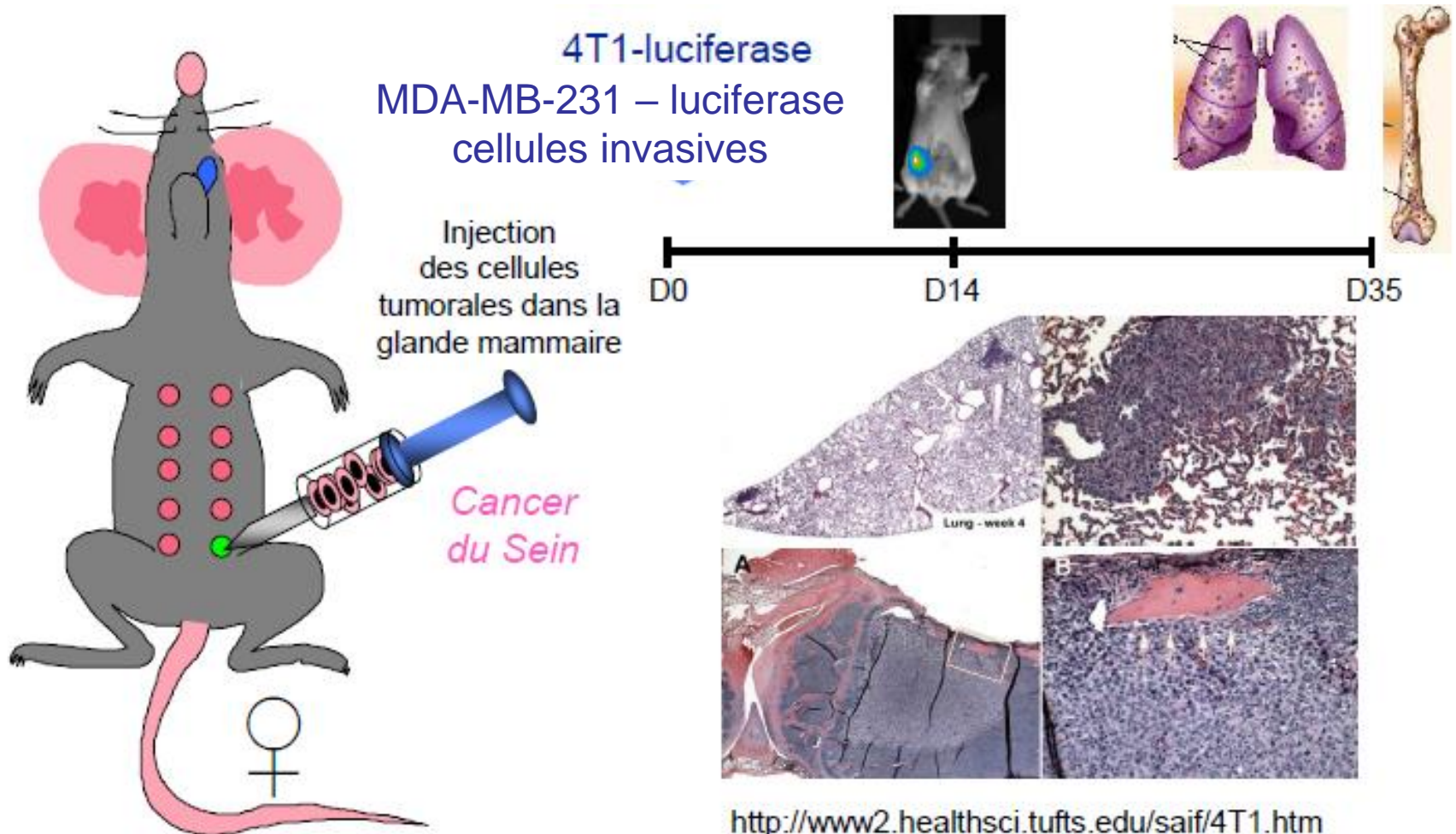


# Exemple : étude de la formation de tumeur primitive puis métastases

## Modèle orthotopique (injection dans l'organe)

### Modèle orthotopique du cancer du sein

#### Injection de lignées cancéreuses humaines

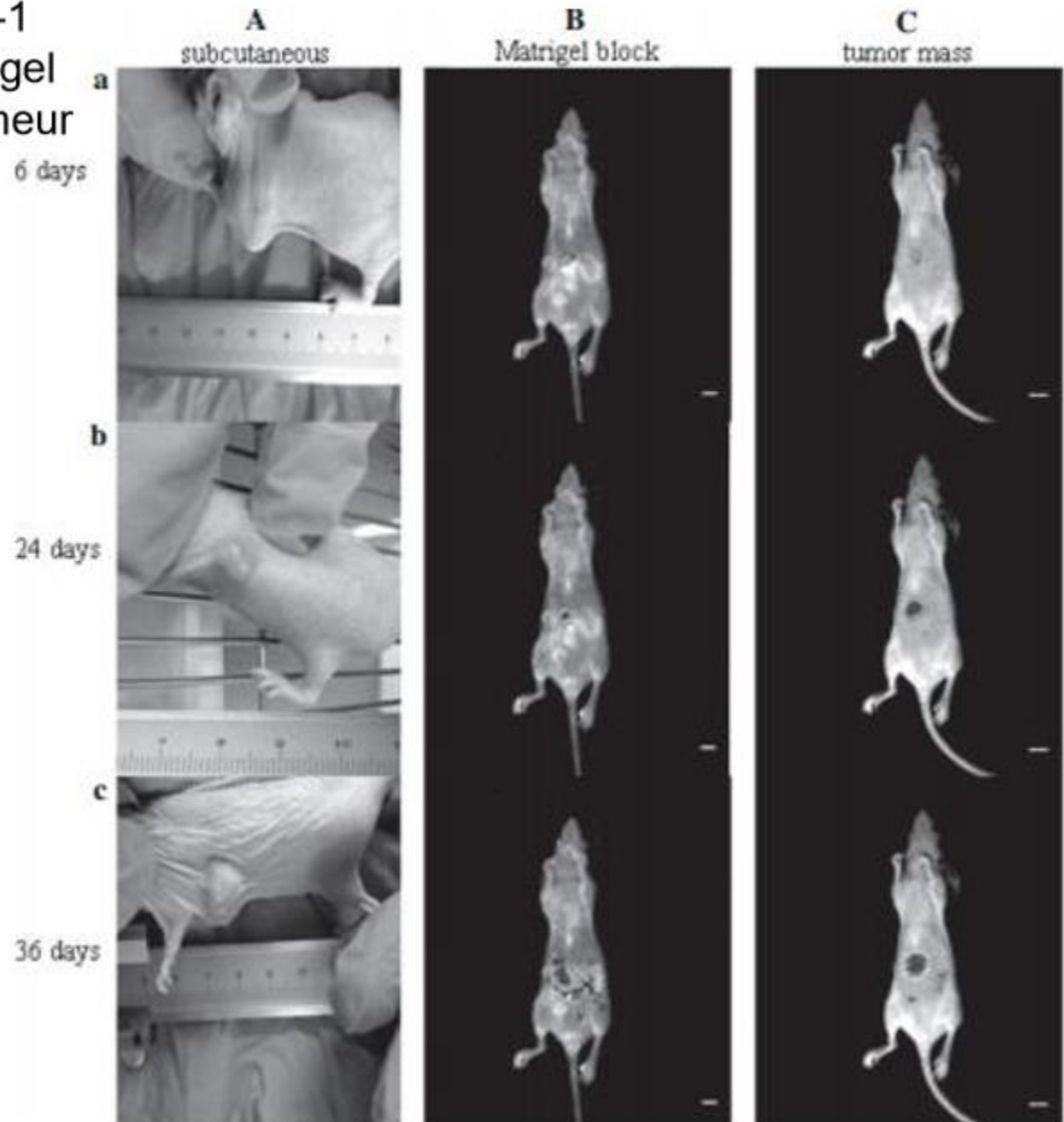
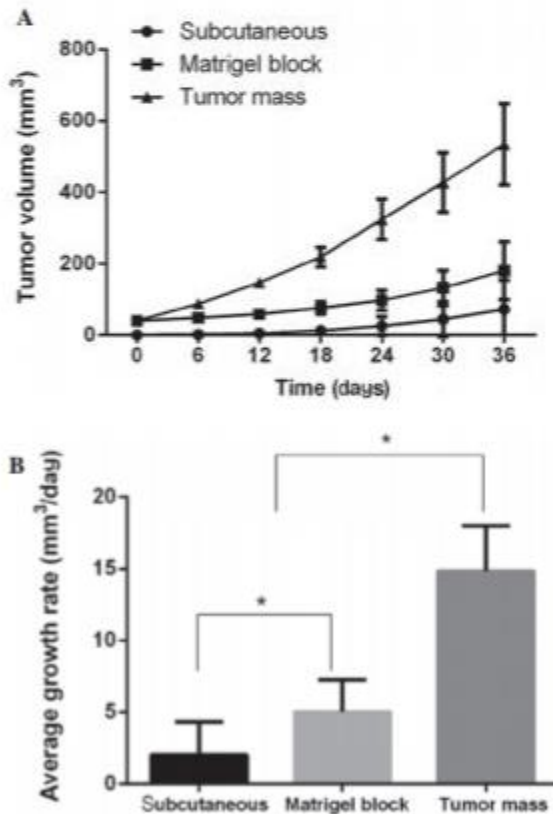


# Modèle orthotopique du cancer du pancréas (Lei Dai et al., 2015)

A- sous-cutané: cellules AsPC-1

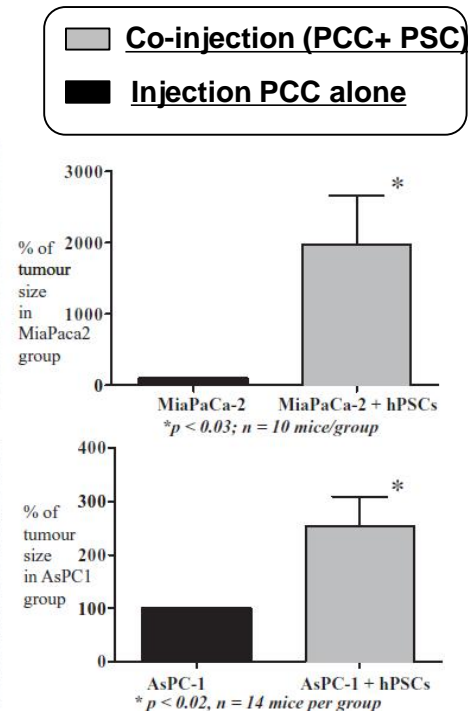
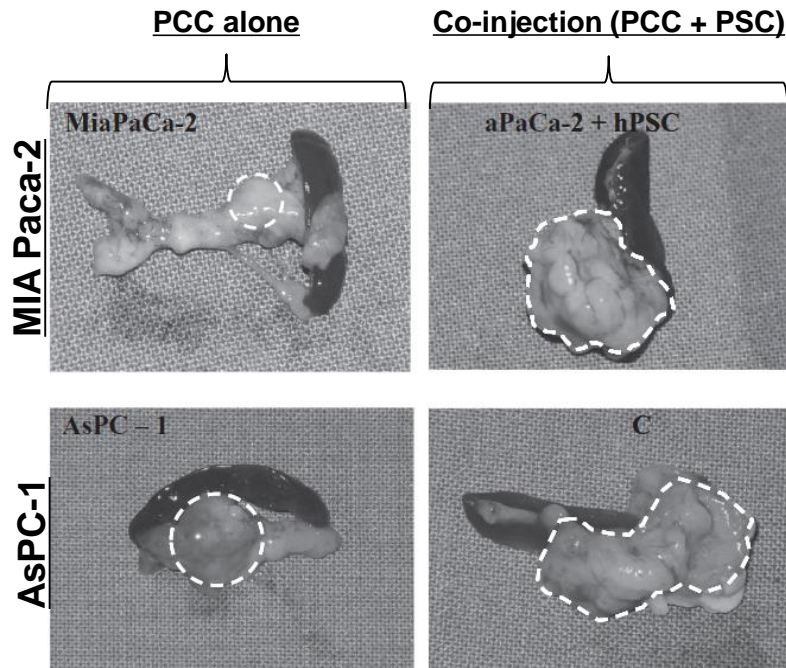
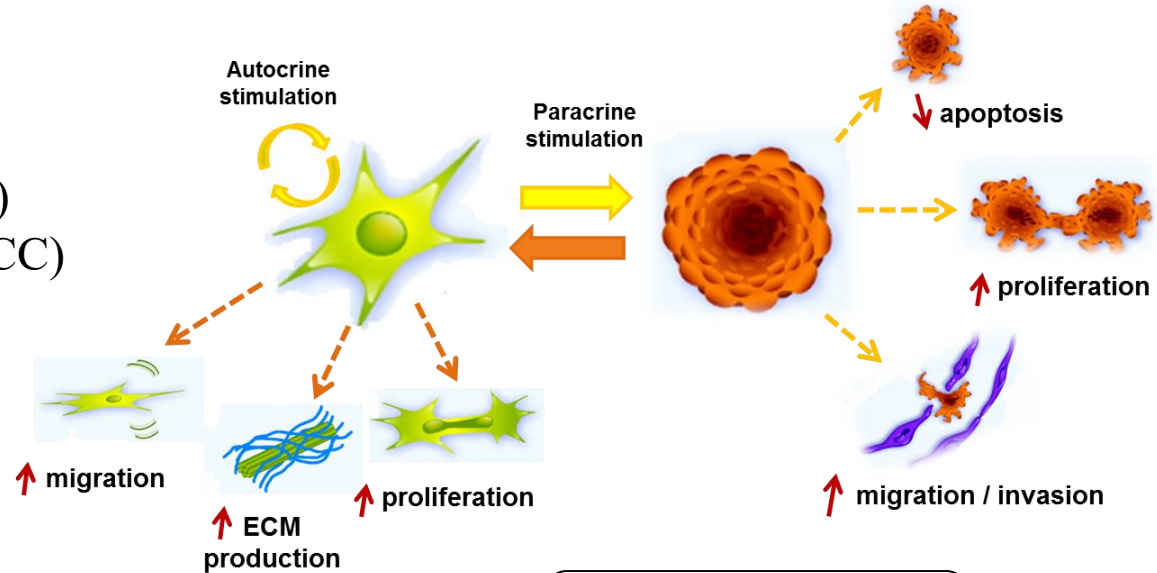
B- orthotopique: cellules+matrigel

C- orthotopique: portion de tumeur



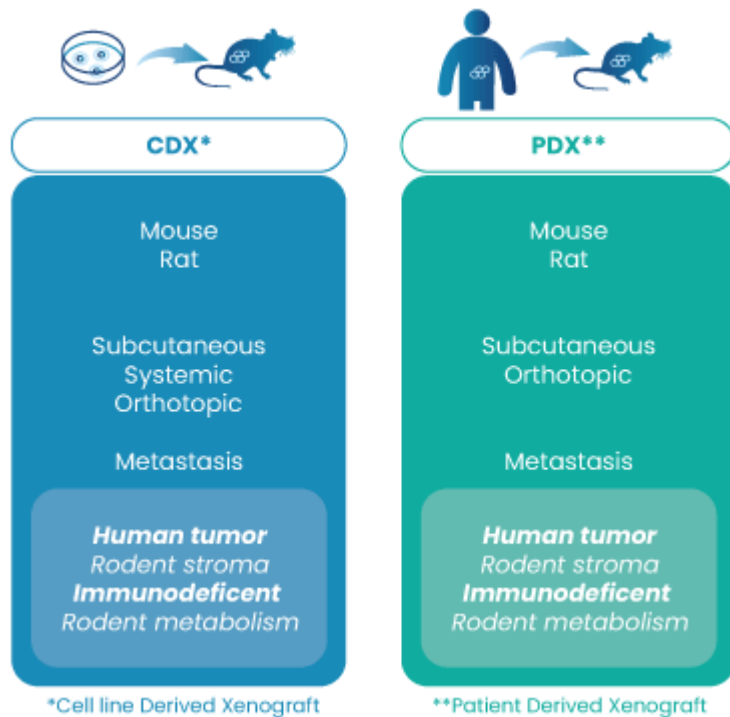
# Modèle du cancer du pancréas (Parker et al., 2008)

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

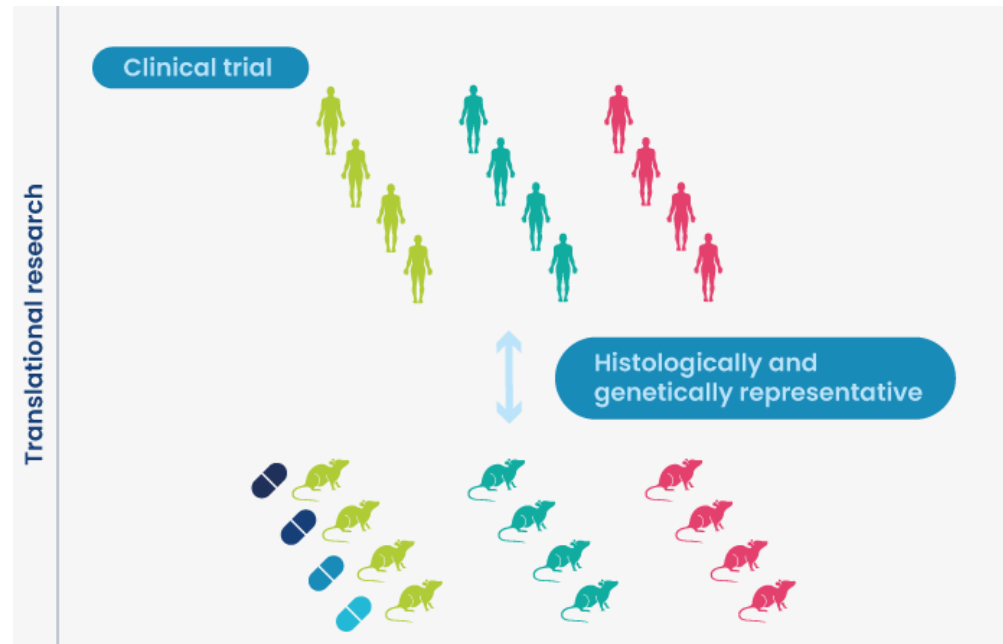


# En développement : application aux patients

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



## SMPT : Single Mouse Preclinical Trial



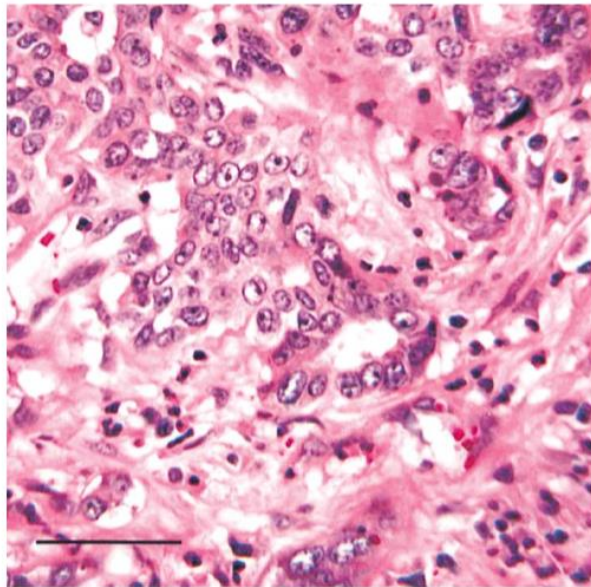
Injection d'une tumeur de patients à 1 ou 2 souris pour mimer hétérogénéité chez l'humain

# Les modèles de xénogreffes

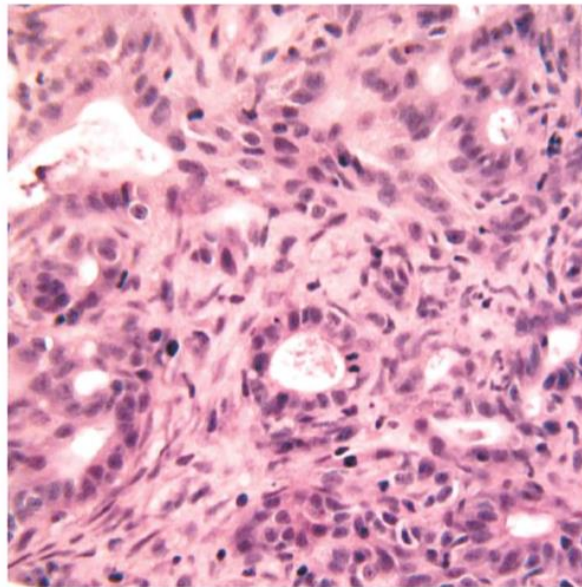
---

## 2<sup>ème</sup> 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.



Human



Zebrafish

**Figure 1.** Histology of cholangiocarcinoma in human and zebrafish

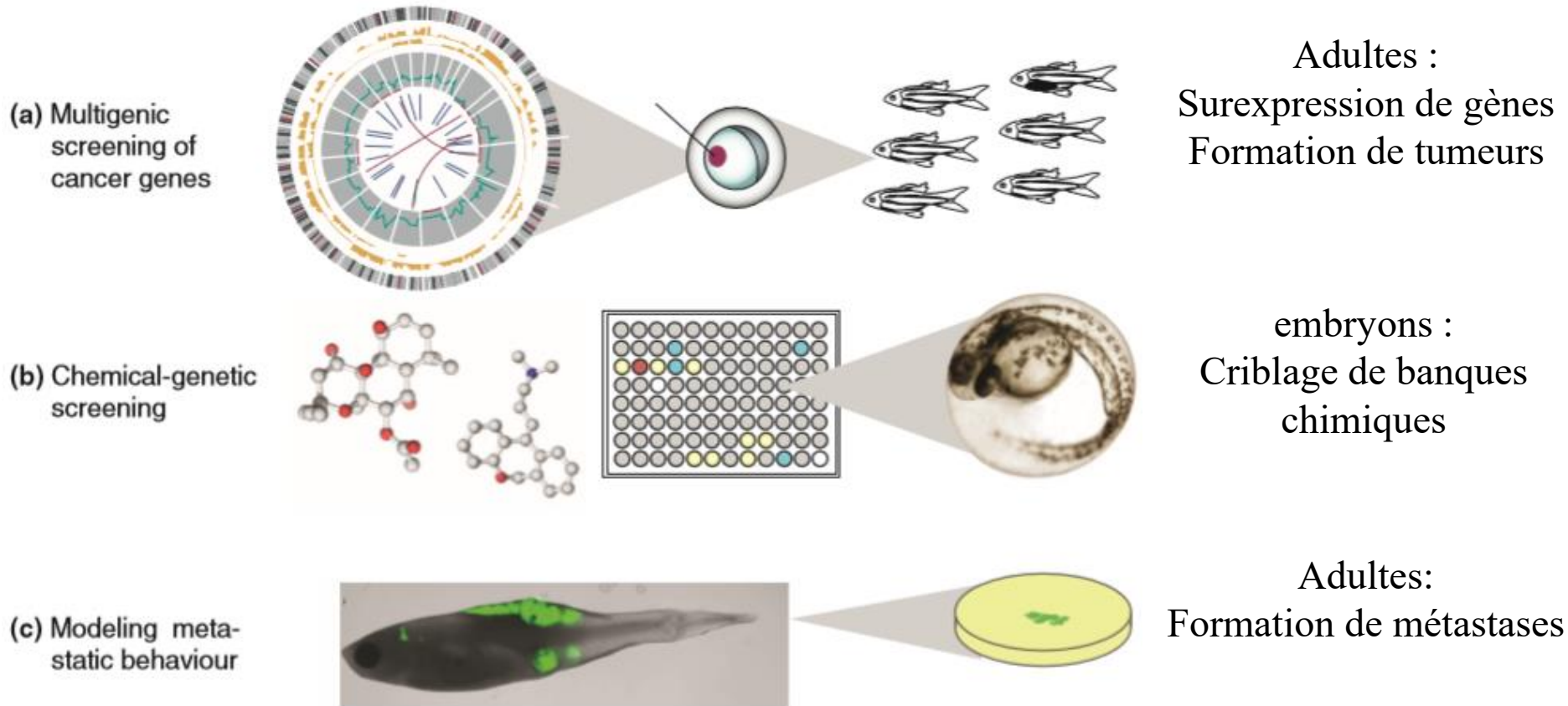
Cholangiocarcinoma is a malignant bile duct neoplasm that occurs in both humans and zebrafish. The histologic appearance, including atypical nuclei, haphazard arrangement of irregularly shaped glands, and increased mitotic activity, is very similar in the two organisms. Bar is 50  $\mu$ m.

# Conditions d'hébergement des zebrafish

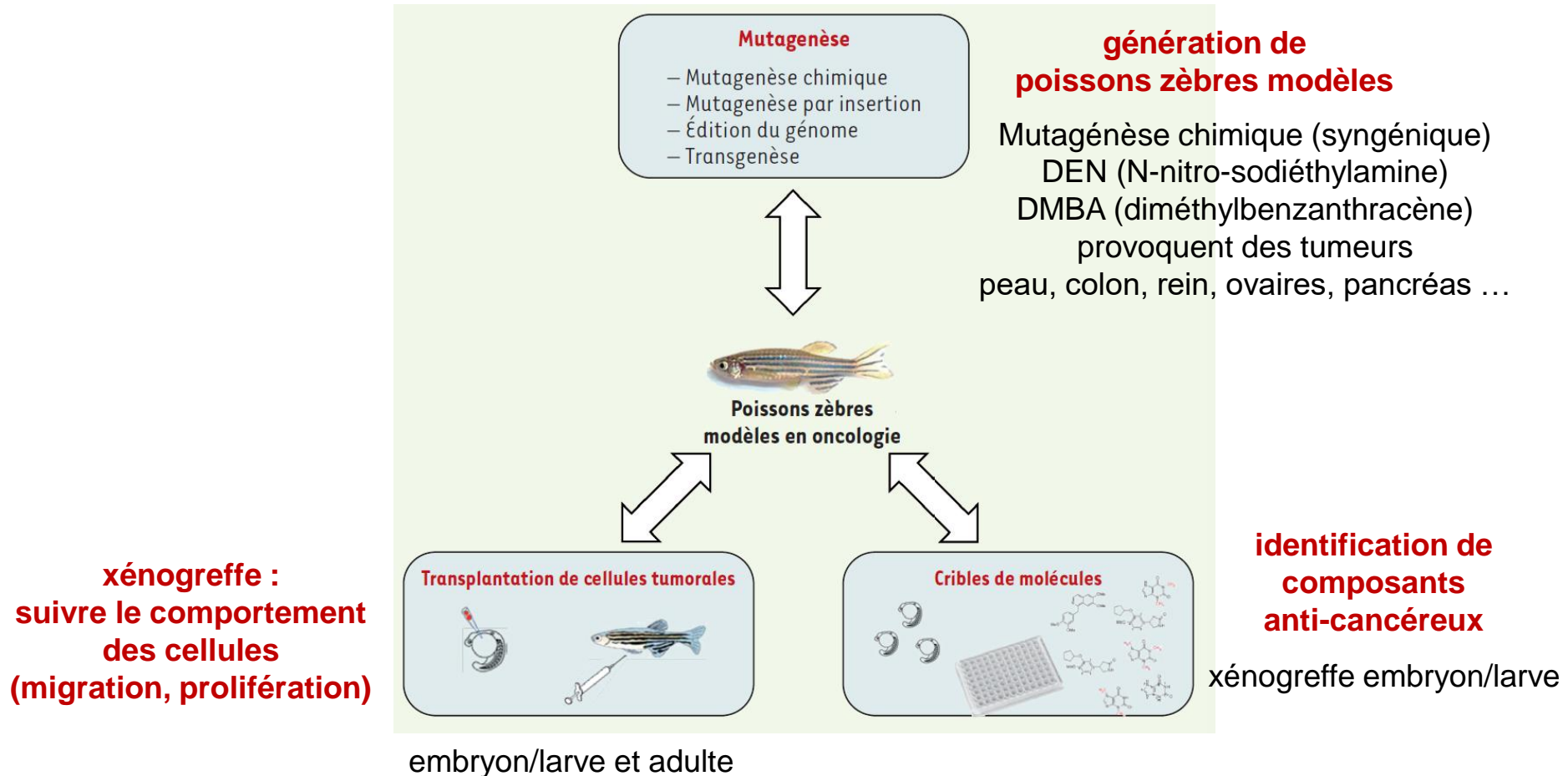
Aquarium :  
taille, volume  
température de l'eau  
vitesse de flux



# Utilisation en cancérologie



# Utilisation en cancérologie

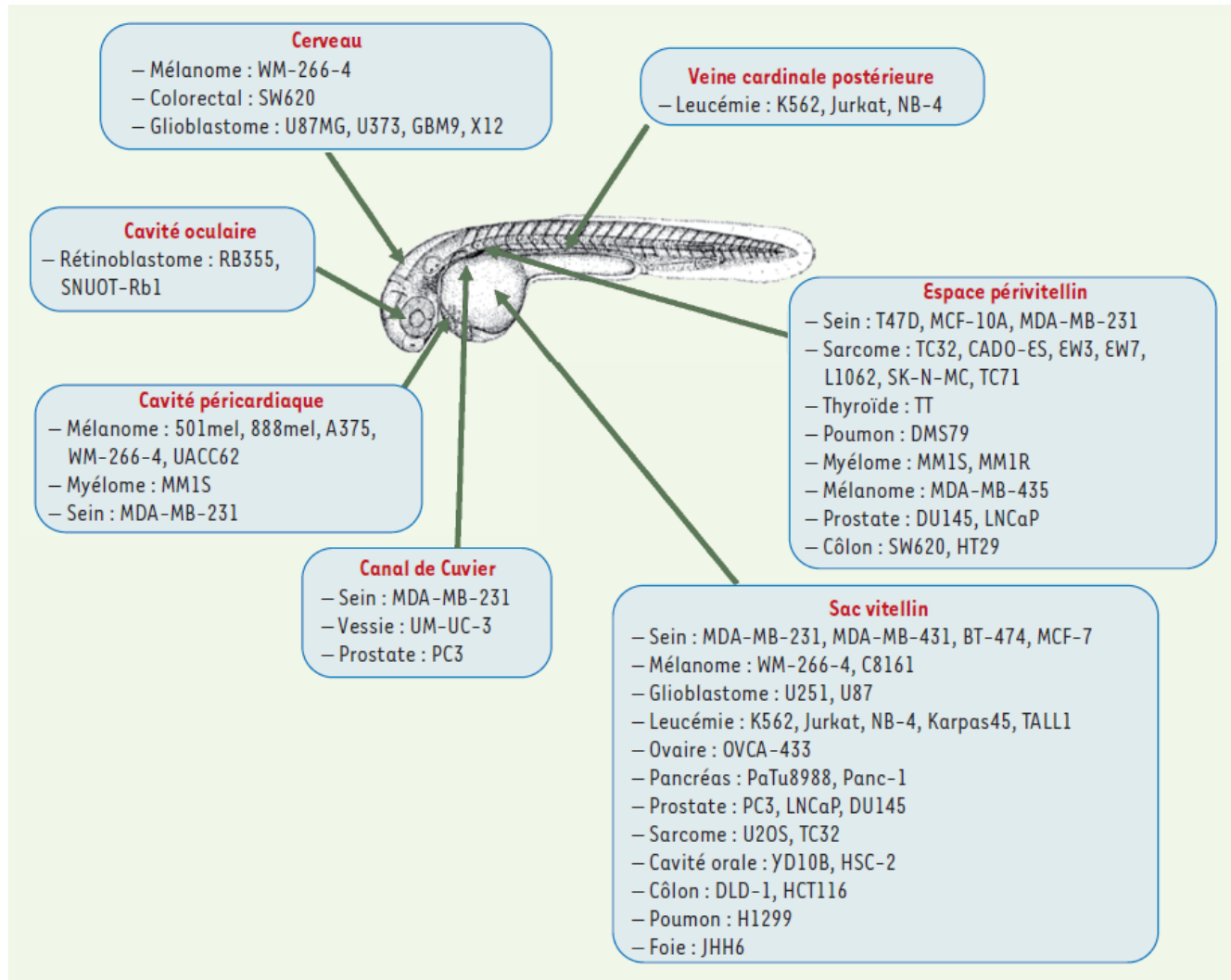


# Modèles transgéniques

Table 1 | **Transgenic models of cancer in the zebrafish**

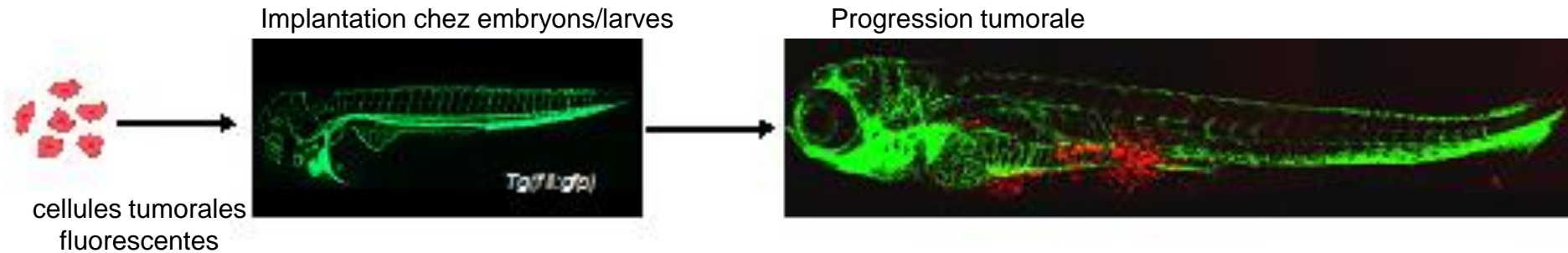
Cancer	Oncogene	Tumour suppressor	Use in cancer biology	Refs
Melanoma	<i>mitfa</i> – <i>BRAF</i> <sup>V600E</sup>	<i>tp53</i> <sup>-/-</sup>	Genetic and chemical modifier screens	27, 30,31
	<i>mitfa</i> :EGFP: <i>NRAS</i> <sup>Q61K</sup>	<i>tp53</i> <sup>-/-</sup>		
	<i>kita</i> –Gal4 × <i>uas</i> – <i>HRAS</i>			
Pancreatic	<i>ptf1a</i> – <i>KRAS</i> <sup>G12V</sup> –GFP		Genetic modifier screens	22,97
	<i>ptf1a</i> :Gal4–VP16 × <i>uas</i> – <i>KRAS</i> <sup>G12V</sup> –GFP			
T cell lymphoma or leukaemia	<i>rag2</i> – <i>myc</i>		Cancer modelling and <i>in vivo</i> imaging	14,98
	<i>rag2</i> –lox–dsRED2–lox–EGFP–mMyc × <i>hsp70</i> –cre		Inducible cancer model	99
	<i>rag2</i> – <i>NOTCH1</i>		NOTCH1 interaction with Bcl-2	100,101
	<i>rag2</i> – <i>myc</i> × <i>rag2</i> – <i>bcl2</i>		Mechanisms of leukaemia dissemination	39
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– <i>KRAS</i> <sup>G12D</sup> × <i>hsp70</i> –cre		Inducible cancer model	102
	<i>krt4</i> :Gal4VP16;14 × <i>uas</i> : <i>smoa1</i> –EGFP × <i>uas</i> : <i>myrAKT1</i>		Cooperation of hedgehog and AKT pathways	103
Rhabdomyosarcoma	<i>rag2</i> – <i>KRAS</i> <sup>G12D</sup>		Identification of tumour-initiating cell populations	29
Neuroblastoma	dβh:EGFP–MYCN		Cooperation of MYCN and ALK	23
	dβh:EGFP and dβh:ALK <sup>F1174L</sup>		Cooperation of MYCN and ALK	23

# Modèles de xénogreffe : Injection des cellules cancéreuses humaines



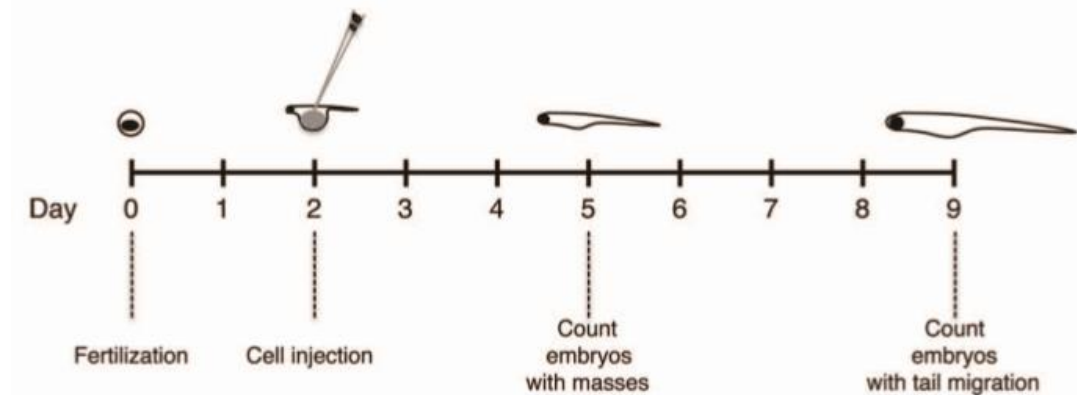
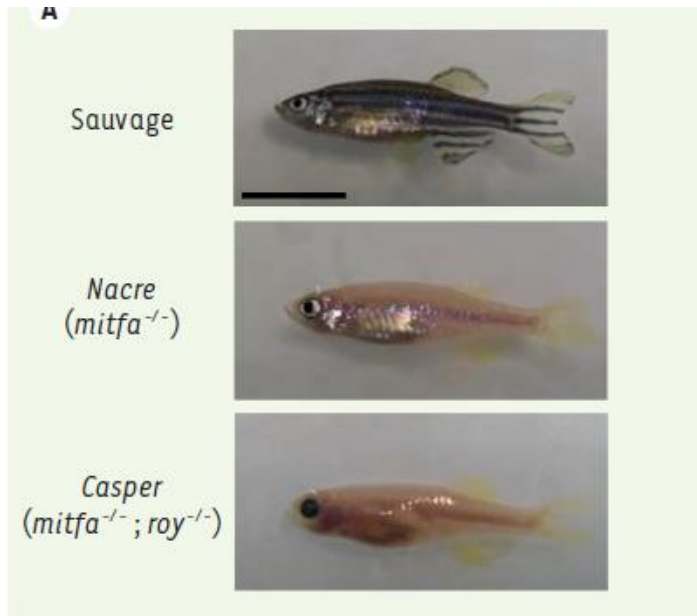
**Figure 3.** Illustration des sites d'injection les plus communs utilisés lors des expériences de xénotransplantation dans les embryons de poisson zèbre de 2 jours. De nombreuses lignées cellulaires humaines issues de différents organes ont été utilisées et injectées en divers sites de l'embryon.

## Exemple : étude de la migration des cellules tumorales



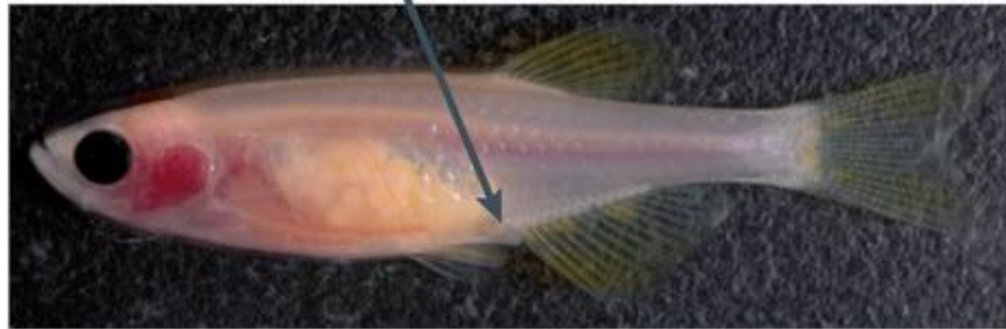
peau transparente  
(mutants avec défaut de pigmentation)

résultats en 1-2 semaines



## Exemple : étude de la formation de métastases

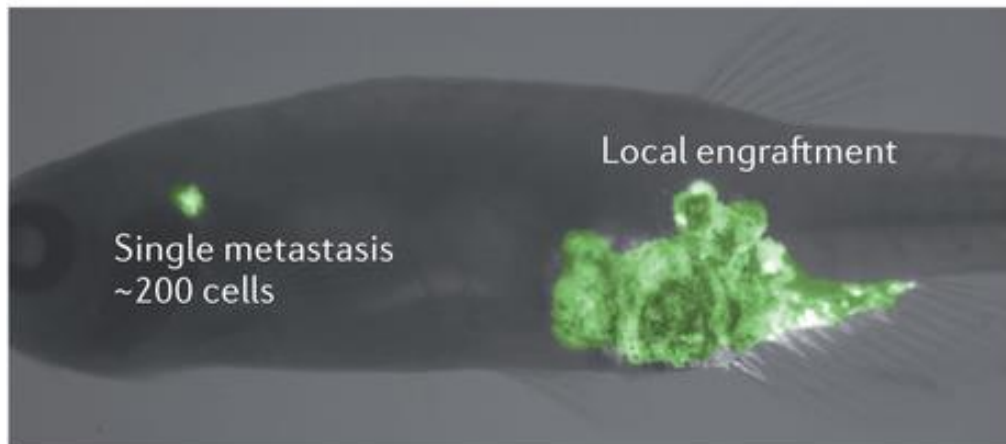
Cellules MDA-MB-231 GFP



Implantation chez adultes



Readout: growth or  
dissemination and metastasis



Greffe de tumeur locale

Métastase unique

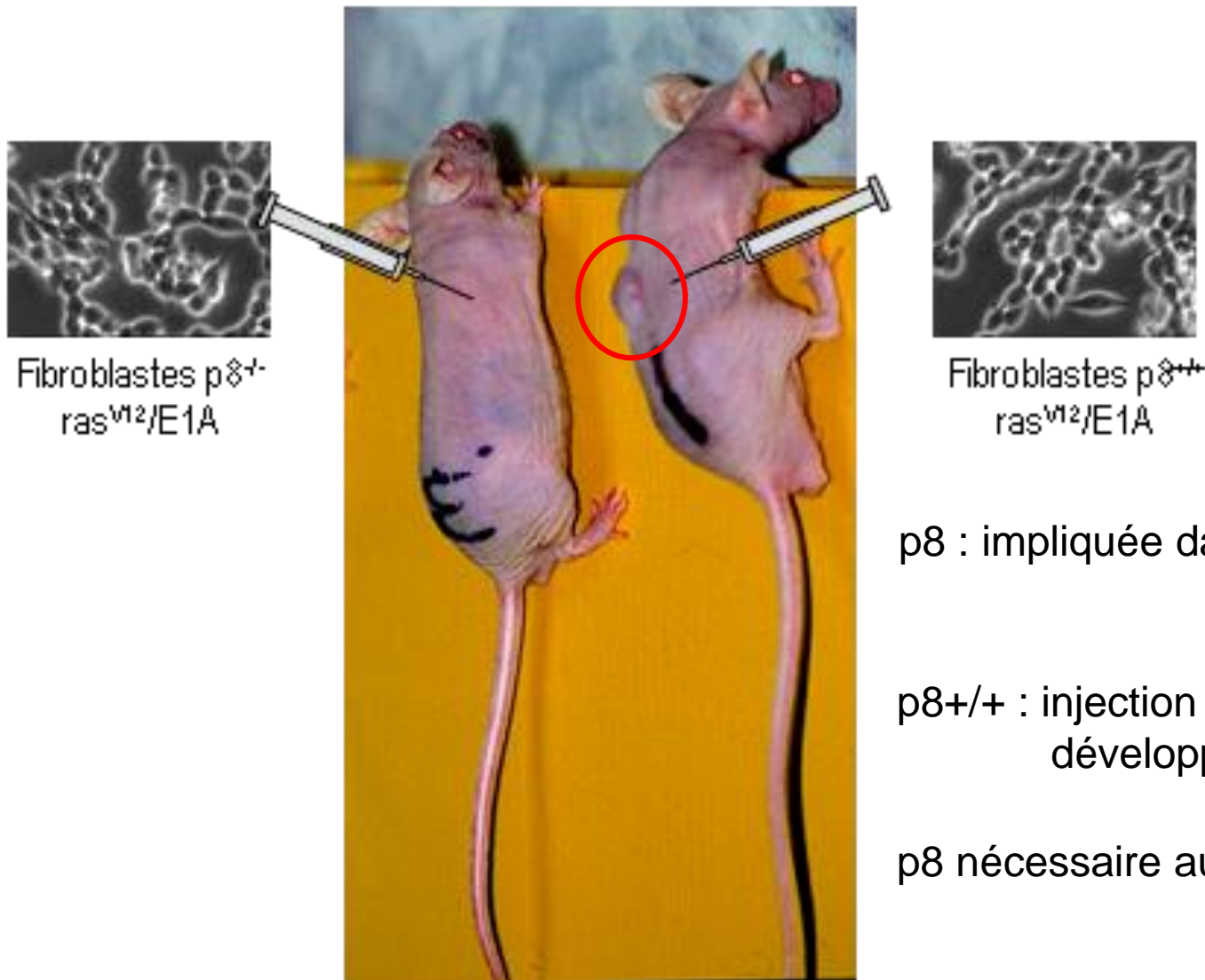
# Avantages/inconvénients des zébrafish

## 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 absents 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



Sous-cutanée  
Orthotopique  
Intra-veineuse

p8 : impliquée dans la réponse au stress

p8<sup>+/+</sup> : 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)  
MNU (MéthylNitrosoUrée), MNNG, ...
- **Amines hétérocycliques** (viande grillée)  
PhIP, IQ, MeIQ
- **Ulcérissants non génotoxiques** (carraghénanes ?)  
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.

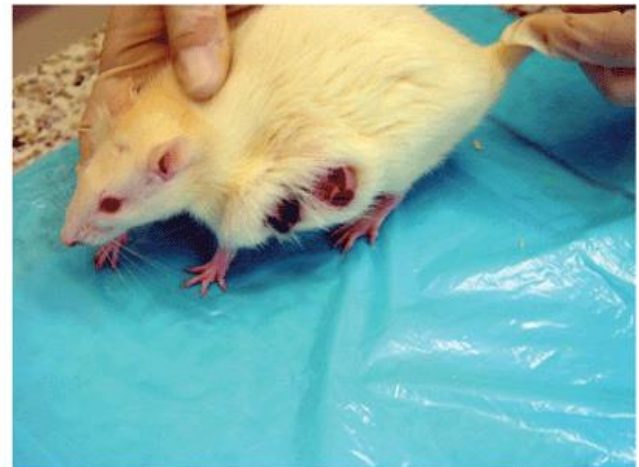


Figure 2 - Breast carcinomas induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA).

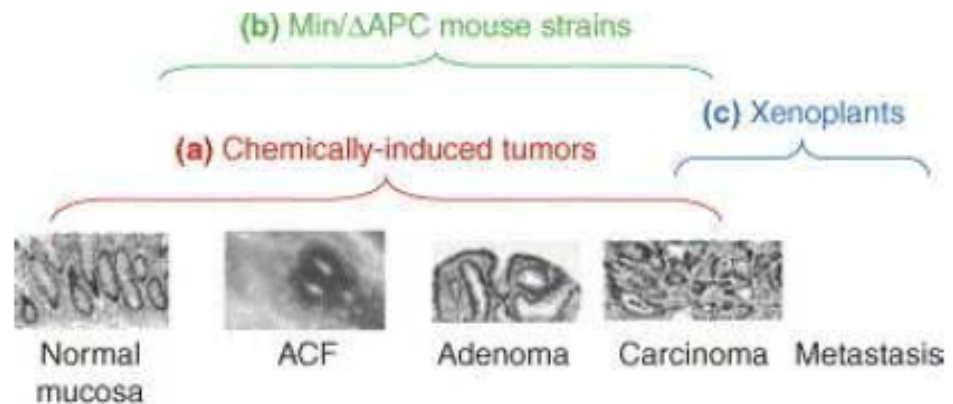
# conclusion

## 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).