



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 10861

To cite this version :

Lopez, Mélinda. *Les modèles murins de cancers : synthèse bibliographique et contribution à la mise en place d'un modèle orthotopique de cancer du colon pour des études précliniques d'évaluation thérapeutique*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2013, 85 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

ANNEE 2013 THESE : 2013 – TOU 3 – 408

LES MODÈLES MURINS DE CANCERS : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE ET CONTRIBUTION A LA MISE EN PLACE D'UN MODÈLE ORTHOTOPIQUE DE CANCER DU COLON POUR DES ÉTUDES PRÉCLINIQUES D'ÉVALUATION THÉRAPEUTIQUE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

LOPEZ Mélinda

Née le 30 mai 1987 à Saint-Jean-de-Luz (64)

Directeur de thèse : Mme Isabelle RAYMOND-LETRON

JURY

PRESIDENT :

Mme Monique COURTADE-SAÏDI

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Isabelle RAYMOND-LETRON
M. Giovanni MOGICATO

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

M. Bruno GOMES

Docteur Vétérinaire, Centre de Recherche en Oncologie, Pierre
Fabre, TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

Remerciements

A mon président de thèse,

Madame le Professeur Monique COURTADE-SAÏDI

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Histologie — Cytologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommages respectueux.

A mon jury de thèse,

Madame le Professeur Isabelle RAYMOND-LETRON

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Anatomie pathologique

Pour avoir encadré cette thèse, pour sa patience, son amabilité et son aide,

Sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Giovanni MOGICATO

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Anatomie — Imagerie Médicale

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,

Sincères remerciements.

A mon maître de stage,

Monsieur le Docteur Bruno GOMES

Pour m'avoir accueillie et encadrée pendant mon stage, pour ses conseils et ses critiques, et

pour m'avoir permis de découvrir l'univers de la recherche pharmaceutique,

Sincères remerciements.

A mes parents, pour leur amour et leur soutien ;

A Sara et Yona, mes petites sœurs adorées ;

Aux membres de la famille Salva, qui nous ont offert leur précieuse amitié ;

A mes amis de l'ENVT et d'ailleurs, à qui je pense malgré la distance ;

A Jean-François qui saura pourquoi ;

A Bahia et Néo.

Table des matières

Table des illustrations	11
INTRODUCTION.....	13
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	15
1. Les modèles animaux en oncologie.....	15
1.1. Le développement des modèles de tumeurs : perspective historique.....	15
1.2. Les espèces animales utilisées.....	16
1.2.1. Prépondérance des modèles murins	16
1.2.2. Autres animaux de laboratoire	20
1.2.3. Animaux de compagnie.....	22
1.3. Les différents types de modèles tumoraux	24
1.3.1. Modalités d'implantation des tumeurs	24
1.3.2. Nature et origine des cellules tumorales.....	25
1.3.3. Modalités d'administration des traitements	27
1.4. Intérêt et limites des modèles de xénogreffes orthotopiques	28
1.4.1. Comparaison avec les modèles ectopiques	28
1.4.2. Limites des modèles	31
1.5. Méthodes de suivi de la croissance et de la dissémination tumorale	33
1.5.1. L'imagerie par bioluminescence	34
1.5.1.1. La bioluminescence dans l'Histoire	34
1.5.1.2. Cycle de la bioluminescence chez la luciole	35
1.5.1.3. Principe de l'Imagerie par Bioluminescence.....	36
1.5.2. Intérêt des différentes techniques d'imagerie.....	39
2. Un exemple de modélisation de tumeur : l'adénocarcinome colique	41
2.1. Le cancer colorectal chez l'homme.....	41
2.1.1. Etiologie	41
2.1.2. Physiopathologie	41
2.1.5. Diagnostic.....	42
2.1.4. Traitements.....	43
2.2. Les modèles animaux de cancer colorectal	43
2.2.1. Carcinogenèse induite	43
2.2.2. Modèles transgéniques	44
2.2.3. Xénogreffes	46
2.2.4. Avantages et limites des différents modèles de cancer colorectal	48

**DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE - MODELE INTRACAECAL
D'ADENOCARCINOME COLIQUE CHEZ LA SOURIS 51**

1. Matériel et méthodes	51
1.1. Animaux	51
1.2. Provenance des greffons.....	51
1.3 Greffes	52
1.3.1. Techniques de greffes.....	52
1.3.1. 1. Greffes sous-cutanées.....	52
1.3.1.2. Greffes orthotopiques	52
1.4. Suivi de l'évolution des tumeurs	55
1.5. Constitution des lots pour les études pharmacologiques.....	55
1.6. Protocoles des traitements	56
2. Résultats	56
2.1. Greffes intracaecales	56
2.1.1. Premier lot de greffe intracaecale.....	56
2.1.1.1. Croissance tumorale	57
2.1.1.2. Métastases	58
2.1.2. Deuxième lot de greffe intracaecale.....	58
2.1.2.1. Croissance tumorale	59
2.1.2.2. Métastases	60
2.1.3. Troisième lot de greffe intracaecale	61
2.1.3.1. Croissance tumorale	62
2.1.3.2. Métastases	62
2.1.4. Quatrième lot de greffe intracaecale	62
2.1.4.1. Croissance tumorale	62
2.1.4.2. Métastases	64
2.2. Etudes pharmacologiques.....	65
2.2.1. Etude pharmacologique 1	65
2.2.2. Etude pharmacologique 2.....	67
2.3. Synthèse des résultats.....	68
3. Discussion	69
CONCLUSION.....	73
<i>Bibliographie</i>	77

Table des illustrations

TABLEAUX

Tableau 1 : Comparaison des modèles ectopiques et orthotopiques	30
Tableau 2 : Taux de réponse au traitement chez des patients atteints de cancer dans le cadre d'essais cliniques de Phase I (d'après Kamb 2005 et Roberts, Goulart et al.)	31
Tableau 3 : Incidence des métastases à l'autopsie de patients atteints de cancer colorectal sur une cohorte de 145 patients (Welch and Donaldson 1979).....	42
Tableau 4 : Paramètres de greffe	54
Tableau 5 : Lots de l'étude pharmacologique 1	55
Tableau 6 : Lots de l'étude pharmacologique 2.....	56
Tableau 7 : Métastases à J50 - greffe 4	64
Tableau 8 : Quantification des métastases pulmonaires - greffe 4.....	65
Tableau 9 : Evolution du T/C au cours de l'étude pharmacologique 1	66
Tableau 10 : Evolution du T/C au cours de l'étude pharmacologique 2	68

FIGURES

Figure 1 : Souris SCID (Charles River)	19
Figure 2 : Souris C57BL/6 (Charles River)	19
Figure 3 : Souris Swiss Nude (Charles River)	19
Figure 4 : Rôle de DNA-PK dans la maturation des lymphocytes.....	20
Figure 5 : Poisson-zèbre de souche Casper (White, RM)	22
Figure 6 : Visualisation de la tumeur primaire et des métastases par fluorescence (White, RM)	22
Figure 7 : Voies d'injection courantes chez la souris	27
Figure 8 : Le cycle de bioluminescence chez la luciole (Lehninger, Nelson et al. 2008).....	35
Figure 9 : Structure du gène Luc de <i>Photinus pyralis</i> (de Wet, Wood et al. 1987). Ps, Sp, Xb, RI, Bs, et RV sont les abréviations des sites de restriction.	37
Figure 11 : Composants d'un CCD (Janesick 2001)	38
Figure 10 : Caméra CCD NightOWL II (a : cliché M. Lopez ; b: Berthold 2008).....	37
Figure 12 : Voie de signalisation Wnt.....	46

Figure 13 : Greffe caecale de fragment tumoral sur une pastille de papier.....	53
Figure 14 : Greffe caecale de fragment tumoral par invagination iatrogène du caecum	53
Figure 15 : Résection de la tumeur intracaecale à J14	54
Figure 17 : Imagerie par bioluminescence de la greffe intracaecale 1 à J7.....	57
Figure 16 : Suivi par bioluminescence de la croissance tumorale pour la greffe intracaecale 1	57
Figure 18 : Tumeur caecale de souris NOD SCID (HEx100)	58
Figure 19 : Image de bioluminescence suggérant des métastases pulmonaires.....	58
Figure 20 : Suivi par bioluminescence de la croissance tumorale pour la greffe intracaecale 2 pour la période complète.....	59
Figure 21 : Suivi par bioluminescence de la croissance tumorale pour la greffe intracaecale 2 – Détail de la période J0 à J29.....	59
Figure 22 : Bioluminescence à J48 - greffe 2.....	60
Figure 23 : Métastase pulmonaire de souris NSG à J52.....	60
Figure 24 : Métastase hépatique de souris NSG à J52	61
Figure 25 : Suivi par bioluminescence de la croissance tumorale pour la greffe intracaecale 3	61
Figure 26 : Suivi par bioluminescence de la croissance tumorale pour la greffe intracaecale 4 – J0 à J21	63
Figure 27 : Suivi par bioluminescence de la croissance tumorale pour la greffe intracaecale 4	63
Figure 28 : Bioluminescence à J50 - greffe 4.....	64
Figure 29 : Poumons de souris fixés au liquide de Bouin	65
Figure 30 : Comparaison de la croissance tumorale du lot témoin et du lot traité à l'irinotecan pour l'étude pharmacologique 1.....	66
Figure 32 : Comparaison de la croissance tumorale du lot témoin et du lot traité à l'irinotecan pour l'étude pharmacologique 2 par bioluminescence.....	67
Figure 33 : Comparaison de la croissance tumorale du lot témoin et du lot traité à l'irinotecan pour l'étude pharmacologique 2 par mesure du volume tumoral au pied à coulisse	68

INTRODUCTION

Les cancers sont une cause majeure de décès, derrière les maladies cardio-vasculaires. Ils représentent environ 13% de la mortalité mondiale.

La croissance tumorale et la dissémination métastatique sont des processus très complexes et dynamiques dont les mécanismes ne sont pas encore compris dans leur entièreté. La recherche préclinique sur modèles animaux est aujourd'hui une étape indispensable pour améliorer notre compréhension de ces maladies et pour évaluer l'innocuité et l'efficacité des nouvelles thérapies.

Les modèles animaux de tumeurs sous-cutanées ont été développés très tôt dans l'histoire de la recherche en oncologie ; ils ont permis de mieux comprendre ces maladies et d'identifier de nombreux traitements salvateurs. Malheureusement, ces tumeurs diffèrent en général beaucoup du phénotype de la tumeur d'origine. De plus, elles métastasent rarement, même en étant issues de cancers très agressifs. Or l'objectif d'un modèle de cancer est de reproduire le plus fidèlement possible les mécanismes intervenant en pathologie humaine afin de pouvoir prédire l'efficacité clinique des nouvelles molécules anticancéreuses. L'implantation orthotopique de cellules ou de tissus tumoraux permet de se rapprocher de cet objectif, mais ces modèles se heurtent à de nombreuses difficultés techniques et présentent des limites inhérentes.

La première partie de cette thèse est consacrée à l'étude bibliographique des modèles animaux en oncologie et de l'apport des modèles orthotopiques. Nous évoquerons le développement historique des modèles animaux, nous passerons en revue les différents types de modèles existant puis nous nous intéresserons aux méthodes de suivi des greffes tumorales. Enfin, nous consacrerons une section plus approfondie à la modélisation du cancer du colon.

La seconde partie présente une partie des résultats d'un travail de six mois au sein du Centre de Recherche en Oncologie Expérimentale du laboratoire Pierre Fabre à Toulouse, dont le but est de mettre au point un modèle orthotopique d'adénocarcinome colique.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les modèles animaux en oncologie

Les animaux utilisés pour la recherche permettent d'étudier les maladies et leurs traitements sur des systèmes vivants comparables par de nombreux aspects au corps humain.

La variété et la complexité des cancers, ainsi que leur incidence élevée, rendent l'utilisation de modèles animaux cruciale pour comprendre comment le cancer se développe (interactions entre les gènes et les facteurs environnementaux, mécanismes de croissance et de dissémination) et pour améliorer les stratégies préventives, diagnostiques et thérapeutiques (amélioration des moyens de détection, développement de nouveaux traitements, adaptation du traitement au phénotype précis des tumeurs).

1.1. Le développement des modèles de tumeurs : perspective historique

Les cancers apparaissent tôt dans l'histoire de l'humanité : les recherches en paléopathologie permettent en effet d'identifier des tumeurs des os et des cartilages sur des squelettes datant du Néolithique (Thillaud 2006; David and Zimmerman 2010), et les premières descriptions probables de cancer du sein sont consultables sur le papyrus Edwin Smith, un document égyptien datant du troisième millénaire avant J-C (Hajdu 2004). Pendant de nombreux siècles, la cause principale attribuée au cancer est l'excès de bile noire, et le seul traitement efficace pratiqué est la résection tumorale.

La naissance de l'oncologie expérimentale et l'apparition des premiers modèles animaux a probablement lieu au 18^{ème} siècle. En 1773, Bernard Peyrilhe réalise la première xénogreffe de tumeur en injectant des cellules de cancer du sein en sous-cutané sur un chien (Androustos and Karamanou 2009). Cette tentative, bien que guidée par des prémisses erronées - à l'époque, le cancer est considéré comme une maladie infectieuse - inspire le travail d'autres pionniers (Bashford 1907).

Dès le début du 20^{ème} siècle, les greffes de tumeur sous-cutanées sur souris et rats deviennent monnaie courante et permettent l'étude des mécanismes de la carcinogénèse (Levin 1912). Mais c'est après la seconde guerre mondiale que l'identification de nombreuses molécules potentiellement cytotoxiques provoque un besoin accru de systèmes d'évaluation. De nombreuses substances naturelles et de nombreux produits de synthèse sont alors passés au crible, principalement sur des modèles de leucémie murine. Les premières xénogreffes sont réalisées dans les années 60 (Rygaard and Povlsen 1969) et connaissent un essor considérable pendant la seconde moitié du 20^{ème} siècle, notamment grâce à la création de souches de souris très immunodéprimées qui facilitent la prise tumorale (Teicher 2011). Néanmoins, jusque dans les années 90, les modèles syngéniques murins prédominent, et la majorité des études cherchent à déterminer l'efficacité d'un composé sans connaître son mode d'action (Voskoglou-Nomikos, Pater et al. 2003).

Au fil du temps, grâce à l'émergence de la biologie moléculaire, le criblage empirique de molécules pour leur effet cytotoxique a tendance à disparaître pour laisser place à l'évaluation de composés agissant sur une cible bien caractérisée (Suggitt and Bibby 2005).

1.2. Les espèces animales utilisées

1.2.1. Prépondérance des modèles murins

L'espèce animale la plus couramment utilisée comme modèle en oncologie est la souris commune *Mus musculus*. Sa petite taille, sa grande fécondité et son coût de production et d'entretien relativement peu élevé en font un animal de choix pour les laboratoires (Schuh, 2004). De plus, le développement de nombreuses souches consanguines a permis d'obtenir des lots d'animaux génétiquement très similaires, facilitant ainsi les études comparatives. Enfin, le génome de la souris a été séquencé et de nombreux outils permettent de le manipuler, notamment par transgénèse ou mutagénèse ciblée.

Les modèles murins ont notamment permis de déterminer les grands principes de la chimiothérapie : supériorité de la polychimiothérapie par rapport à la monochimiothérapie, utilisation d'une chimiothérapie adjuvante en outre de la résection tumorale, importance du protocole d'administration, influence du volume tumoral sur la réponse au traitement, et prise en compte de la toxicité des agents anticancéreux (Martin, Balis et al. 1986).

Voici quelques souches de souris couramment utilisées et leurs caractéristiques :

- Souris immunocompétentes :

- **BALB/c** : Ce sont des souris albinos produites depuis 1923. Elles sont utilisées dans un grand nombre de domaines de recherche, spécialement en immunologie. Parmi toutes les études publiées entre 2001 et 2005 utilisant des souches consanguines, 30% se servaient de BALB/c (Festing, 2006).

- **C57 BL/6** : Cette souche, créée en 1921, est également une des plus répandues dans le monde : il est estimé qu'elle est utilisée dans 14% des études (Festing 1998). Elle est notamment utile pour les modèles de tumeurs induites (Green, Azar et al. 1973) cf. Figure 2.

- Souris immunodéprimées :

- **Nude** : La mutation Nude fut découverte en 1962 dans une animalerie de laboratoire et caractérisée par Flanagan (Flanagan 1966). Cette mutation concerne le gène codant pour la protéine Forkhead box N1 (FoxN1), qui est un facteur de transcription. La protéine FoxN1 porteuse de la mutation Nude perd son domaine de fixation à l'ADN. Cela provoque entre autres le blocage de la différenciation des cellules épithéliales du thymus et crée à terme une lymphopoièse.

En conséquence, les souris homozygotes pour la mutation Nude sont des souris albinos, sans poils (Figure 3), chez qui une aplasie du thymus provoque une absence de lymphocytes T. Cependant, elles conservent des cellules T-like et des macrophages et cellules natural killer (NK) à l'activité cytotoxique augmentée. Les lymphocytes B sont en quantité normale chez la jeune souris mais diminuent après l'âge de 7 semaines. Leur poids est plus faible et leur durée de vie est plus courte que pour la plupart des autres souris.

Il existe plusieurs souches de souris chez qui la mutation Nude a été obtenue. Historiquement, la première occurrence de cette mutation est apparue chez des souris Swiss (souche Swiss Nude), mais on trouve également des BALB/c nude, des B6 nude, des NIH

nude et des NCr nude. Ces dernières sont la souche athymique standard dans les études menées par le National Cancer Institute.

➤ **SCID (Severe Combined Immunodeficiency)** : Des souris possédant des nœuds lymphatiques de très petite taille et un micro-thymus, et ne produisant pas de lymphocytes B et T matures, ont été découvertes par hasard en 1980 dans un laboratoire de Philadelphie au sein d'une lignée de CB-17 (Bosma and Carroll 1991) (Figure 1). Ces particularités proviennent de la mutation du gène *Prkdc*, provoquant une inactivation de la sous-unité catalytique de la protéine DNA-PK. La fonction principale de cette protéine est de réparer les cassures double brin de l'ADN.

La maturation des lymphocytes B et T repose sur la formation de leurs récepteurs membranaires, les BCR (B-Cell Receptors) et les TCR (T-Cell Receptors). Ces récepteurs présentent une grande diversité qui provient du réarrangement des gènes de leurs régions variables grâce à un processus que l'on appelle recombinaison V(D)J. Or les recombinaisons V(D)J nécessitent de nombreux clivages de l'ADN, lesquels sont réparés par plusieurs protéines. Parmi ces protéines, la fonction de DNA-PK est centrale puisqu'elle recrute les autres protéines et permet leur phosphorylation (Burma and Chen 2004). Une déficience en DNA-PK compromet donc la réparation des cassures double brin et empêche la maturation des lymphocytes (Figure 4 : Rôle de DNA-PK dans la maturation des lymphocytes).

Dépourvues de lymphocytes B et T fonctionnels, les souris de souche SCID tolèrent plus facilement les greffes que les souris Swiss nude. Néanmoins, pour une raison à ce jour inconnue, certaines souris SCID adultes, dites "leaky", peuvent générer des clones fonctionnels de lymphocytes B et T (Bosma 1992). A partir de 10 ou 14 mois d'âge, toutes les souris SCID peuvent être considérées comme étant « leaky ». Pour contourner ce problème, une autre souche de souris, la souche RAG1/RAG2, peut être utilisée. Ces souris ne produisent jamais de lymphocytes matures car un défaut en enzyme RAG empêche tout déclenchement de la recombinaison V(D)J.

Plusieurs souches de souris SCID sont disponibles, dont les C.B-17 SCID et les BALB/c SCID.

➤ **NOD-SCID** : Cette souche est obtenue en provoquant la mutation SCID chez des souris de souche NOD (Non Obese Diabetic). Les souris NOD portent une mutation sur l'exon 2 du gène CTLA-4, qui provoque l'apparition d'un diabète insulino-dépendant chez 80% des souris femelles et 20% des souris mâles à partir de l'âge de 30 semaines (Festing 1998). Comme la mutation SCID empêche la maturation des lymphocytes T, les souris NOD-SCID ne développent pas de diabète. Néanmoins, contrairement aux souris SCID, les souris NOD-SCID n'ont pas de cellules NK et ne sont pas « leaky ». Elles tolèrent donc encore mieux les greffes que les autres souris SCID. Elles ont cependant tendance à développer des lymphomes.

➤ **NSG ou NOD-SCID Gamma** : Il s'agit d'une des souches de souris les plus immunodéprimées. En plus des mutations NOD et SCID, ces souris présentent une déficience en sous-unité gamma des récepteurs IL2 (IL2R γ).

➤ **NOG** : Cette souche aux caractéristiques très proches des NSG (mutations NOD, SCID et IL2R) est très utilisée pour répondre à des problématiques concernant les cellules souches tumorales. Elle présente une plus faible incidence de lymphomes que les souris NOD-SCID.



Figure 2 : Souris C57BL/6 (Charles River)



Figure 1 : Souris SCID (Charles River)



Figure 3 : Souris Swiss Nude (Charles River)

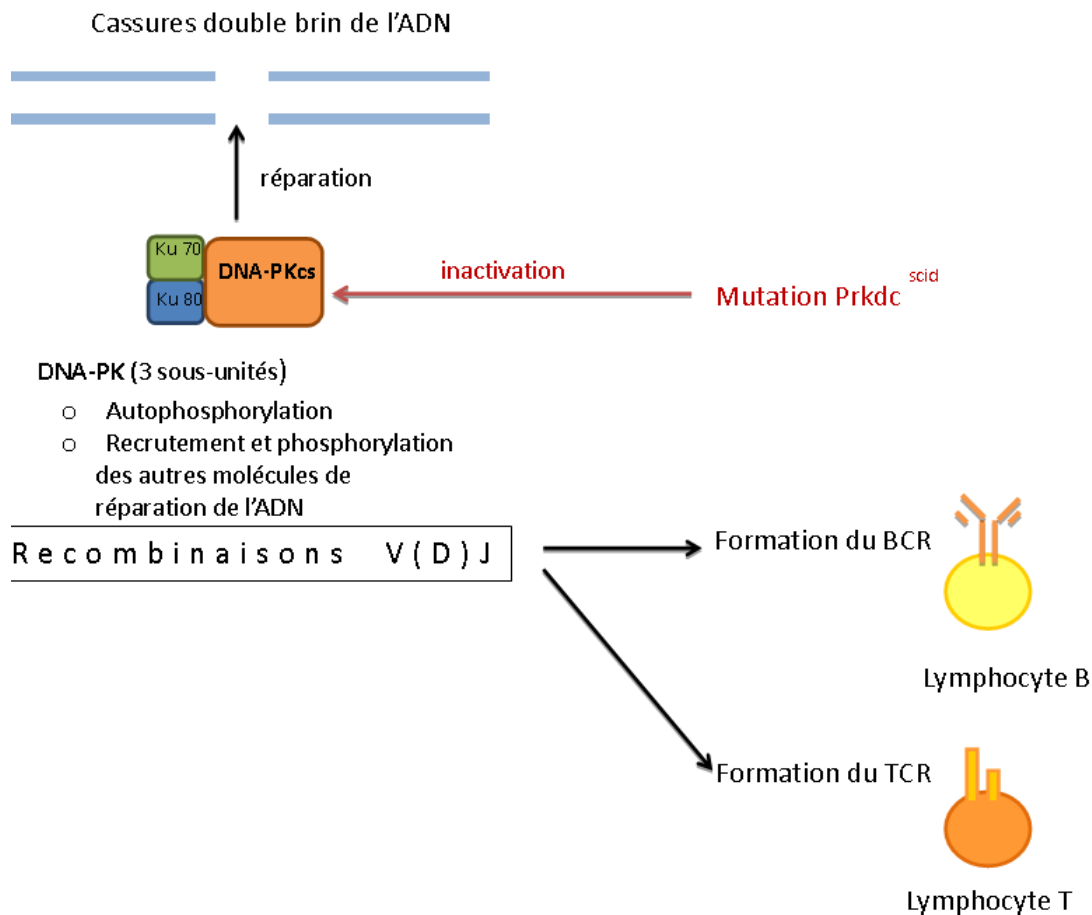


Figure 4 : Rôle de DNA-PK dans la maturation des lymphocytes

1.2.2. Autres animaux de laboratoire

Les autres espèces sont utilisées de façon plus marginale en oncologie. Le rat est l'espèce la plus répandue après la souris, mais présente un certain nombre d'inconvénients par rapport à cette dernière : notamment, son coût est plus élevé, et son poids implique d'utiliser des doses de produits plus importantes. De plus, la croissance des tumeurs est moins rapide chez le rat que chez la souris. Par contre, il jouit d'une plus grande longévité, sa taille permet une plus grande aisance pour les prélèvements et la chirurgie, et il présente une meilleure résistance aux traitements anticancéreux (Teicher 2011).

L'espèce *Rattus norvegicus* est la plus employée. La première souche consanguine, King Albino, a été développée dès 1909. Aujourd'hui, les deux souches les plus utilisées sont les souches Sprague-Dawley et Wistar. A elles deux, elles regroupent 75% de toutes les études parues sur les rats entre 2001 et 2005 (Festing, 2006). Ces rats sont albinos et

immunocompétents. Il existe très peu de rats immunodéficients, le plus commun étant le rat Nude. Tout comme la souris Nude, il est déficient en lymphocytes T, et peut donc subir des xénogreffes.

Le développement d'outils pour la manipulation génétique du rat, similaire à ceux déjà disponible pour les souris, ouvre de nouvelles perspectives pour la construction de modèles. Ainsi, les rats Sprague-Dawley peuvent développer des tumeurs mammaires suite à une mutagenèse chimiquement induite (Zan, Haag et al. 2003). La transgénèse (surtout par vecteur viral) est également de plus en plus utilisée.

Le hamster doré (*Cricetus auratus*) et le hamster de Chine (*Cricetus griseus*) sont de bons modèles pour le cancer du pancréas (Pour, Kruger et al. 1974; Standop, Schneider et al. 2001), le carcinome épidermoïde buccal (Vairaktaris, Spyridonidou et al. 2008) et le lymphome (McNees, Vilchez et al. 2009).

Le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) est parfois utile pour des modèles nécessitant des organismes plus grands que ceux des rongeurs. Par exemple, l'implantation par thoracoscopie de cellules cancéreuses dans l'espace pleural est bien plus facile chez le lapin que chez la souris (Kreuter, El-Abbadi et al. 2008).

Enfin, le poisson-zèbre (*Danio rerio*, *zebra-fish*), un poisson tropical d'eau douce, est un modèle émergent du 21^{ème} siècle. Cette espèce, au départ utilisée en biologie développementale du fait de sa prolificité et de la rapidité de son embryogenèse, présente des tumeurs spontanées et chimio-induites similaires à celles obtenues sur les souris. La transplantation de cellules cancéreuses de mammifères est possible, et la transparence des tissus du poisson-zèbre permet un suivi direct de la propagation des tumeurs (Feitsma and Cuppen 2008). Cf Figure 5 et Figure 6.



Figure 5 : Poisson-zèbre de souche Casper (White, RM)



Figure 6 : Visualisation de la tumeur primaire et des métastases par fluorescence (White, RM)

1.2.3. Animaux de compagnie

La recherche de modèles plus proches de la physiologie humaine et plus éthiques vis-à-vis de l'animal conduisent de plus en plus à se tourner vers l'exploitation des tumeurs spontanées survenant chez l'animal de compagnie, et plus particulièrement chez le chien. En effet, la majorité des cancers humains connus existe aussi chez le chien, du moins sous une forme assez proche. Le chien est notamment la seule autre espèce chez qui on observe des carcinomes prostatiques (Khanna, Lindblad-Toh et al. 2006).

De plus, les similitudes biologiques entre les tumeurs humaines et canines sont souvent frappantes. Ainsi, dans les deux espèces, l'ostéosarcome est plus représenté chez les mâles de grande taille, avec une localisation métaphysaire, un haut grade histologique de malignité dans plus de 90% des cas, et l'apparition de métastases dans plus de 80% des cas post-amputation avec une orientation préférentielle vers les poumons (Withrow, Powers et al. 1991). En ce qui concerne le lymphome non-hodgkinien, le lymphome diffus à grandes cellules B est la forme qui prévaut chez les deux espèces, et il répond aux mêmes molécules thérapeutiques, soit le cyclophosphamide, la doxorubicine, la vincristine et la prednisone (Rowell, McCarthy et al. 2011). Les modèles canins sont également prometteurs pour la

neuro-oncologie : la fréquence des tumeurs cérébrales est similaire dans les populations canine et humaine, et les gliomes en particulier présentent de nombreuses mutations et de nombreux récepteurs communs (Thomson, Kennerly et al. 2005; Dickinson, LeCouteur et al. 2010).

En outre, l'identification des facteurs cancérigènes environnementaux est facilitée par le fait que les animaux de compagnie partagent un environnement commun avec leurs propriétaires. Le délai entre l'exposition à une substance cancérigène et le développement de tumeurs est également plus court chez le chien que chez l'humain, ce qui valide son intérêt en tant qu'animal sentinelle (Gavazza, Presciuttini et al. 2001). Le lien entre l'exposition aux herbicides et l'apparition de lymphomes, par exemple, a été bien documenté tant chez l'homme que chez le chien (Fazzi, Manetti et al. 2010; Takashima-Uebelhoer, Barber et al. 2012). De même, le diagnostic d'un mésothéliome chez le chien peut conduire à rechercher la présence d'amiante dans l'environnement (Glickman, Domanski et al. 1983; Reif 2011). Les études épidémiologiques dans la population canine, en mettant en lumière un lien entre un agent et un type de cancer, peuvent donc révéler un risque potentiel pour la santé publique (Kelsey, Moore et al. 1998).

La longévité de l'espèce canine, même si elle est faible en comparaison de la longévité humaine, permet d'étudier en détail l'efficacité et la toxicité à long terme des traitements de chimiothérapie (Porrello, Cardelli et al. 2004). De plus, la réponse de la tumeur canine à une thérapie reflète fréquemment celle de la tumeur humaine correspondante (Gordon and Khanna 2010). Il se trouve en outre que les essais cliniques chez les chiens ne sont pas soumis aux mêmes contraintes que les études portant sur des êtres humains, ce qui rend possible l'utilisation de nouvelles molécules en première intention de traitement (Gordon, Paoloni et al. 2009). Les sarcomes des tissus mous du chien ont ainsi servi de modèle pour l'utilisation de molécules vasoactives dans le cadre d'une thermoablation, c'est-à-dire la destruction de cellules cancéreuses par l'induction d'une hyperthermie (Vail and MacEwen 2000).

Les ressemblances entre cancers humains et cancers canins sont donc nombreuses, mais la physiologie des deux espèces n'est pas tout à fait identique, ce qui limite l'évaluation de certains traitements. Par exemple, les protocoles de chimiothérapie utilisant des taxanes (paclitaxel, docetaxel) engendrent des phénomènes de toxicité importants chez les chiens, du fait de l'utilisation de crémophore comme dispersant (Gordon, Paoloni et al. 2009). Or cette

classe de molécules anticancéreuses est très prometteuse chez l'humain, notamment pour traiter les carcinomes pulmonaires, ovariens et prostatiques, et les cancers du sein métastasés (Fauzee 2011).

De plus, l'incidence de certains types de cancer est plus faible que chez l'homme. Les cancers d'origine épithéliale sont notamment sous-représentés (Pang and Argyle 2009). Les cancers les plus fréquents chez l'homme (cancers du poumon, du sein, de la prostate, du système digestif) sont moins courants chez le chien (Paoloni and Khanna 2008). Étudier ces cancers avec des modèles canins nécessiterait donc un temps plus long pour rassembler des données statistiquement exploitables, ou la coopération de plusieurs centres d'essais cliniques.

Enfin, malgré tous les arguments apportés par l'oncologie comparative en faveur des modèles de tumeurs spontanées chez les animaux de compagnie, l'aspect logistique est un facteur limitant : ce type d'étude se déroule souvent sur plusieurs années, demande un investissement conséquent, requiert l'accord des propriétaires des animaux, et nécessite une coordination entre professionnels de la santé animale et chercheurs en oncologie

1.3. Les différents types de modèles tumoraux

1.3.1. Modalités d'implantation des tumeurs

Il est possible de classifier les différents types de modèles selon la manière dont la tumeur est implantée dans l'organisme de l'animal étudié. Ainsi, on distingue :

- La carcinogenèse spontanée : on utilise des souris génétiquement modifiées portant des mutations qui les rendent très susceptibles de développer des tumeurs à un âge précoce. Par exemple, une mutation du gène suppresseur de tumeur *Apc* provoque l'apparition de tumeurs dans le tube digestif, dont la localisation dépend de l'exon qui a été modifié (Colnot, Niwa-Kawakita et al. 2004).

- La carcinogenèse chimio-induite : les tumeurs sont provoquées par l'exposition des animaux de laboratoire à des substances cancérigènes, notamment des hydrocarbures aromatiques polycycliques comme le dibenzanthracène et le méthylcholanthrène (Rosenberg,

Giardina et al. 2009). Ce type de modèle est particulièrement utile pour les études de chimio-prévention (Teicher 2006).

- La greffe ectopique ou hétérotopique : il s'agit d'une greffe de cellules ou de tissu cancéreux réalisée sur un site qui ne correspond pas à celui de la tumeur d'origine. Ces greffes sont le plus souvent réalisées en sous-cutané, ce qui permet le suivi de croissance de la tumeur par des mesures au pied à coulisse.

- La greffe orthotopique : c'est une greffe de cellules ou de tissu cancéreux réalisée sur un site correspondant à celui de la tumeur d'origine. Ainsi des cellules de glioblastome seront injectées dans le cerveau, et un fragment d'adénocarcinome colique sera transplanté sur le colon ou le caecum.

1.3.2. Nature et origine des cellules tumorales

On peut également distinguer les modèles tumoraux selon que le greffon provient ou non de la même espèce que l'animal greffé.

Dans les modèles syngéniques, l'animal est greffé avec une tumeur provenant d'un animal de la même espèce. Souvent il s'agit de souris à qui l'on injecte une suspension cellulaire. Une grande partie des lignées de cellules tumorales murines a été obtenue à partir de tumeurs chimio-induites. Comme ils permettent d'utiliser des souris immunocompétentes, ces modèles sont intéressants pour comprendre les relations complexes entre cancer et système immunitaire, ainsi que pour tester l'efficacité des thérapies visant à stimuler ce dernier. Malheureusement, les tumeurs murines sont très différentes biologiquement de leurs équivalents humains. Notamment, elles produisent moins de métastases, et leur croissance est plus rapide (Teicher 2006).

Dans les modèles xénogéniques, les cellules ou les fragments utilisés pour la greffe proviennent de tumeurs humaines. Cela implique d'utiliser des animaux immunodéficients ; les animaleries doivent donc répondre à des critères sanitaires stricts pour garder ces animaux dans un environnement sans germes pathogènes. Les greffons peuvent être obtenus à partir de lignées cellulaires ou sur des tumeurs provenant directement d'un patient.

Les lignées de cellules sont fortement susceptibles de perdre la complexité de la tumeur d'origine au cours de leur culture. De plus, des mutations spontanées apparaissent *in vitro* dans les lignées cellulaires, créant ainsi des sous-populations de cellules qui formeront après greffe des tumeurs aux caractéristiques histologiques très différentes de la tumeur d'origine. Cette dérive clonale est très difficile à modéliser (Schuh 2004).

Les tumeurs issues directement de biopsies de patients ont l'avantage de ressembler plus fortement à la tumeur d'origine : elles en gardent une grande partie des marqueurs protéiques et présentent une diversité de populations de cellules qui a tendance à disparaître lorsque l'on travaille à partir de lignées cellulaires (Kelland 2004). Cependant, il est plus compliqué pour les laboratoires de se procurer des tumeurs de patients que des lignées de cellules, et la variabilité entre les tumeurs rend une reproduction ultérieure des conditions exactes de l'étude difficile. En outre, les tumeurs de patients sont susceptibles de contenir des pathogènes, comme le virus d'Epstein-Barr, qui peuvent interférer avec les résultats de l'étude. Dans le but d'obtenir un modèle murin de lymphome hodgkinien, Meggetto et al. ont réalisé des greffes sous-cutanées à partir de nœuds lymphatiques de patients sur des souris SCID. Les masses sous-cutanées qui ont en résultat n'étaient pas causées par la prolifération de cellules de Reed-Sternberg, caractéristiques des lymphomes hodgkiniens, mais par la prolifération de lymphocytes B immortalisés par le virus Epstein-Barr (Meggetto, Muller et al. 1996).

Les banques de xéno greffes de tumeurs humaines sont en pleine expansion. Elles permettent de prendre en compte la grande hétérogénéité des cancers. En 2011, une équipe française a développé un modèle de tumeur mammaire sur des souris immunodéficientes dont une glande mammaire a été humanisée par injection de fibroblastes, permettant ainsi de rester proche du micro-environnement tumoral d'origine (Cabaud 2011). Les tumeurs, issues directement de patientes, sont injectées sous forme de suspension cellulaire dans la glande humanisée. En fin de protocole, les tumeurs mammaires sont prélevées et analysées en histopathologie pour vérifier que les structures histologiques de la tumeur d'origine sont conservées. La cryoconservation de ce matériel tumoral pourrait permettre de constituer une banque de xéno greffes pour chaque sous-type de cancer du sein.

1.3.3. Modalités d'administration des traitements

Lorsque l'étude a pour but de valider la cohérence d'un modèle à l'aide d'un traitement standard ou de tester l'efficacité d'une nouvelle molécule, on dispose de plusieurs voies d'administration du traitement (Holland 2004). Les plus courantes sont les suivantes :

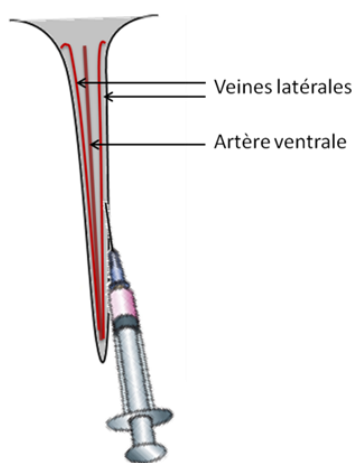
- L'**injection intraveineuse** s'effectue le plus souvent dans la veine ventrale coccygienne, avec une aiguille d'un diamètre de 27 à 30g. Dilater au préalable la veine (en trempant par exemple la queue dans de l'eau chaude) permet de faciliter la ponction veineuse. Voir Figure 7.
- L'**injection sous-cutanée** est plus simple à effectuer, mais la diffusion est plus lente et le volume que l'on peut injecter en un seul point est limité.
- L'**injection intrapéritonéale** s'effectue en général dans le quart caudal droit de l'abdomen, pour éviter le caecum, avec des aiguilles courtes (ex : 26g).



Injection sous-cutanée



Injection intrapéritonéale



Injection intraveineuse

Figure 7 : Voies d'injection courantes chez la souris

Plus rarement, on utilise les voies d'administration suivantes :

- L'**injection intramusculaire** est réalisée dans la cuisse (quadriceps) ou le dos (muscles épaxiaux). Seuls de très petits volumes peuvent être injectés.

- L'**injection intralésionnelle** s'effectue au cœur de la tumeur. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle induit beaucoup de faux positifs, les concentrations de la molécule testée obtenues au site de la tumeur étant beaucoup plus hautes que lors d'une chimiothérapie traditionnelle.

- Les **implants sous-cutanés** permettent une diffusion et une action longue de la molécule. On utilise souvent des capsules en silastique que l'on implante sur la ligne du dos.

1.4. Intérêt et limites des modèles de xénogreffes orthotopiques

1.4.1. Comparaison avec les modèles ectopiques

Les modèles de greffes ectopiques et orthotopiques ont chacun leurs avantages et leurs inconvénients (Tableau 1). Les modèles ectopiques sont généralement plus simples à optimiser. En effet, la technique de greffe (injection sous-cutanée) requiert peu de matériel, est rapide et facile, et souffre donc peu de la variabilité entre les techniciens. De plus, la croissance ou la régression de la tumeur peut être directement observée et le volume mesuré à l'aide d'un pied à coulisse. (Bibby 2004)

Cependant, les modèles ectopiques ne sont pas de très bons prédicteurs de succès thérapeutique. En effet, la réponse d'une tumeur à un traitement dépend en partie de sa localisation. Par exemple, pour un carcinome mammaire, la chimiothérapie a souvent plus d'effet sur les métastases des nœuds lymphatiques et de la peau que sur les métastases osseuses ou pulmonaires (Talmadge, Singh et al. 2007).

Ainsi, Fidler et al. montrent que les cancers du colon implantés sous la peau répondent à la doxorubicine (Fidler, Wilmanns et al. 1994). Or le cancer du colon est l'un des rares pour lesquels la doxorubicine n'est pas efficace en clinique, avec le mélanome et le cancer du rein.

Ces faux positifs peuvent être expliqués par de nombreux facteurs, dont certains peuvent être corrigés en utilisant des modèles orthotopiques :

- Les tumeurs abritent des populations cellulaires hétérogènes, et différents sites d'implantation peuvent favoriser la croissance de différentes cellules. Une tumeur implantée sur un site orthotopique aura plus de probabilité de refléter la composition cellulaire de la tumeur d'origine qu'une tumeur implantée sur un site ectopique (Fidler 1990).
- La diffusion d'une molécule est variable selon les tissus. Tester l'action d'un nouveau traitement sur un modèle orthotopique est donc plus pertinent d'un point de vue pharmacologique.

On peut raisonnablement supposer que les modèles ectopiques induisent également un certain nombre de faux négatifs (c'est-à-dire qu'une molécule possédant une vertu thérapeutique chez l'humain ne montrera aucun effet sur un modèle de tumeur ectopique), mais l'ampleur de ce phénomène est difficile à évaluer puisque par principe, un traitement inefficace en phase préclinique ne sera pas utilisé en phase clinique. Néanmoins, il existe quelques études qui suggèrent que l'utilisation de modèles orthotopiques pourrait limiter les faux négatifs. Par exemple, la cisplatine a une action contre les tumeurs implantées dans les poumons, qui reflète son efficacité en clinique, mais n'agit pas contre les tumeurs sous-cutanées (Kuo, Kubota et al. 1993).

De plus, il est fréquent que les modèles ectopiques ne produisent pas de métastases, même lorsque les tumeurs implantées sont très agressives (Fidler 1990) et ne puissent donc pas permettre de tester des traitements anti-métastatiques. En effet, la production et la dissémination de métastases dépend largement de l'interaction entre la tumeur et son microenvironnement stromal. Cette hypothèse proposée en 1889 par le chirurgien britannique Stephen Paget sous le nom de « seed and soil » (ou « graine-sol », la graine étant la cellule cancéreuse et le sol l'organe cible) a depuis été confirmée par de nombreuses études (Ribatti, Mangialardi et al. 2006; Billottet and Jouanneau 2008). Chaque type de cancer a une affinité pour un ou plusieurs organes. Le corollaire de cette théorie est qu'une tumeur implantée loin de ses organes-cibles, comme dans les modèles ectopiques, est plus susceptible de nécroser et de ne pas produire de métastases, notamment faute de néovascularisation.

Les tumeurs orthotopiques subissent une nécrose minimale par rapport aux tumeurs ectopiques et métastasent plus facilement (Naito, von Eschenbach et al. 1987). Ainsi, certaines tumeurs très difficiles à modéliser à partir de greffes sous-cutanées ont pu être obtenues par greffe orthotopique, notamment les modèles de cancer du colon (Fu, Herrera et al. 1992; Furukawa, Kubota et al. 1993), de cancer du pancréas (Fu, Guadagni et al. 1992), de carcinome rénal (An, Jiang et al. 1999) et de cancer de la langue (Myers, Holsinger et al. 2002).

Il faut noter que sur un même site d'implantation, les greffes de fragment tumoraux produisent fréquemment plus de métastases que les greffes de suspensions cellulaires. C'est le cas pour les cancers du colon, du poumon, de la vessie, des reins et de l'estomac (Hoffman 1999) Par exemple, An et al. comparent le taux de métastases obtenues dans deux modèles murins d'adénocarcinome rénal. Dans le premier modèle, des cellules tumorales en suspension issues de la lignée cellulaire SN12C sont directement injectées entre la capsule et le parenchyme rénal des souris. Dans le deuxième modèle, les cellules sont d'abord implantées en sous-cutané pour obtenir des tumeurs solides dont les fragments sont implantés entre la capsule et le parenchyme rénal des souris. A la fin de l'étude, le taux de métastases est 2 à 3 fois plus important dans le deuxième modèle, qui utilise les fragments tumoraux (An, Jiang et al. 1999).

	<i>Avantages</i>	<i>Inconvénients</i>
Modèles ectopiques	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Rapidité ➤ Reproductibilité ➤ Economie de matériel ➤ Mesure directe de la croissance tumorale 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Métastases rares ➤ Nombreux faux positifs dans la prédiction de l'efficacité d'un traitement
Modèles orthotopiques	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Métastases plus fréquentes ➤ Meilleure reproduction des conditions cliniques ➤ Meilleure prédiction de l'efficacité d'un traitement 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Chirurgies demandant du temps et du matériel. ➤ Grande variabilité entre les opérateurs. ➤ Suivi de la croissance tumorale plus compliqué.

Tableau 1 : Comparaison des modèles ectopiques et orthotopiques

1.4.2. Limites des modèles

Les modèles orthotopiques présentent une plus grande ressemblance avec les tumeurs humaines que les modèles ectopiques, mais leur pouvoir prédictif reste limité. Une proportion conséquente des agents anticancéreux ayant une activité prometteuse en phase préclinique sur des modèles orthotopiques échouent en effet à montrer une quelconque efficacité lors des essais cliniques. Il est rare que le taux de réponse au traitement des patients en essai clinique de Phase I soit supérieur à 10% (Tableau 2), comme le révèle une analyse systématique de 58 essais cliniques de phase I menés entre 1999 et 2002 (Roberts, Goulart et al. 2004; Kamb 2005).

Type de cancer	Nombre de réponses/total (%)
Colorectal	2/476 (0.4%)
Poumon	10/196 (5.1%)
Rein	6/147 (4.1%)
Mammaire	5/94 (5.3%)
Prostate	4/88 (4.5%)
Sarcome	2/86 (2.3%)
Ovaire	2/124 (1.6%)
Tête et cou	1/41 (2.5%)
Mélanome	4/97 (4.1%)
Autre	9/218 (4.1%)
Total	45/1612 (2.8%)

Tableau 2 : Taux de réponse au traitement chez des patients atteints de cancer dans le cadre d'essais cliniques de Phase I (d'après Kamb 2005 et Roberts, Goulart et al.)

Certains proposent une sélection plus rigoureuse des molécules admises en phase clinique pour améliorer la prédictivité des modèles. Ainsi, par le passé, de nombreuses molécules (brucéantine, triciribine phosphate, spirogermanium, anguidine...) ayant seulement montré une activité sur un ou deux modèles murins ont été testées sans succès en phase clinique (Martin, Balis et al. 1986).

Cependant, des différences importantes subsistent entre xénogreffes et tumeurs humaines :

Tout d'abord, le stroma qui se constitue autour d'une tumeur greffée est un stroma d'origine murine. Or le développement de la tumeur et la dissémination de métastases nécessite une coopération entre les cellules stromales et tumorales. Les cellules tumorales sont en effet nourries et soutenues par les cellules stromales de l'hôte (Bhowmick and Moses 2005). Des incompatibilités au niveau des récepteurs et des ligands entre tissu tumoral humain et tissu stromal murin pourraient donc contribuer à l'échec de la mise en place d'un modèle (Rangarajan and Weinberg 2003).

Alors que les tumeurs humaines se développent sur plusieurs mois à plusieurs années, les tumeurs xénogreffées sont sélectionnées pour avoir une croissance plus rapide, afin de limiter la durée des études (Kamb 2005). De plus, dans de nombreuses études, les souris sont traitées à un stade de cancer relativement peu avancé comparé à celui de la majorité des patients participant aux essais cliniques, souvent affligés de métastases nombreuses et volumineuses (Kerbel 2003).

La culture cellulaire provoque souvent une perte d'hétérogénéité de la tumeur. Or, si une lignée cellulaire répond au traitement en phase pré-clinique, il est possible que d'autres lignées provenant du même type de tumeur ne répondent pas. Le nombre de lignées cellulaires sur lesquelles il faudrait tester le traitement pour obtenir une bonne indication de son efficacité réelle est inconnu (Kamb 2005).

Un certain nombre de faux positifs peuvent aussi être expliqués par le fait qu'on ne peut pas toujours obtenir en clinique la concentration sanguine atteinte dans le modèle murin. La DMT (dose maximale tolérée) de la plupart des molécules utilisées en chimiothérapie est en effet quatre à cinq fois plus élevée chez la souris que chez l'humain (Kerbel 2003).

Quelques études ont d'ailleurs comparé l'effet de différentes molécules sur des souris porteuses de tumeurs humaines sous-cutanées à l'activité réelle de ces molécules en clinique (Inaba, Kobayashi et al. 1988; Inaba, Tashiro et al. 1988; Inaba, Kobayashi et al. 1989; Tashiro, Inaba et al. 1989; Maruo, Ueyama et al. 1990). Lorsque le traitement de chimiothérapie était utilisé à la dose maximale tolérée par les souris, les faux positifs étaient bien plus nombreux que lorsqu'on traitait les souris avec une dose correspondant

pharmacocinétiquement à celle utilisée chez les êtres humains en clinique, appelée « dose rationnelle ». Par exemple, le taux de réponse à la mitomycine chez les souris était de 82% à la DMT et de 18% à la dose rationnelle, tandis que le taux de réponse en clinique est estimé aux alentours de 31% (Inaba, Tashiro et al. 1988).

De même, Giovanella et al. démontrent en 1989 l'effet puissant de la 9-aminocamptothécine (9-AC) sur un modèle murin de cancer du colon (Giovanella, Stehlin et al. 1989), mais cette molécule ne dépassera pas le seuil de la phase II des essais cliniques. En effet, le taux plasmatique de 9-AC optimal sur les xénogreffes (soit 690 à 1580 ng/L/h) est myélosuppresseur chez l'humain. Le taux plasmatique maximal atteint en phase clinique était donc bien plus faible : entre 146 et 493 ng/L/h, ce qui est insuffisant pour avoir l'activité anticancéreuse (Kirstein, Houghton et al. 2001; Takimoto 2001).

Enfin, le principe même de la xénogreffe impose l'utilisation de souris immunodéficientes pour éviter les phénomènes de rejet. Or on sait aujourd'hui que le système immunitaire interagit avec la tumeur par de nombreuses façons. On pense par exemple que les macrophages facilitent la progression des métastases. Dans les modèles murins, une déficience en lymphocytes B et T ou en mastocytes réduit l'angiogenèse et l'incidence des cancers, tandis qu'une déficience en cellules NK les augmente (de Visser, Eichten et al. 2006).

1.5. Méthodes de suivi de la croissance et de la dissémination tumorale

Avant l'essor des techniques d'imagerie, les seules méthodes de suivi des greffes utilisables sur animaux vivants étaient la mesure directe du volume tumoral au pied à coulisse pour les tumeurs sous-cutanées et l'hémogramme pour évaluer la progression des leucémies (Van Dyke and Jacks 2002).

Au cours des dernières décennies, de nombreuses méthodes nouvelles, non invasives, se sont développées, chacune présentant des avantages et des inconvénients spécifiques. L'une d'elles, l'imagerie par bioluminescence (IBL), est un outil sensible et non invasif fondé sur la détection de lumière émise par les cellules cancéreuses exprimant le gène de la luciférase. Cette technique nécessite l'utilisation de caméras CCD (Charge-Coupled Device) ultra-sensibles pour capter le signal émis, qui est invisible à l'œil nu.

Nous allons à présent détailler le fonctionnement de cette méthode avant d'offrir une comparaison avec d'autres techniques d'imagerie de pointe.

1.5.1. L'imagerie par bioluminescence

1.5.1.1. La bioluminescence dans l'Histoire

La bioluminescence est une propriété présente chez plus de 300 espèces, essentiellement des arthropodes et des protistes. Ce phénomène est étudié depuis l'Antiquité grecque : Aristote décrit ainsi plusieurs espèces marines capables de produire ce qu'il appelle la « lumière froide », car elle ne dégage aucune chaleur (Harvey 1957). On rencontre également la description de tels organismes chez Pline l'Ancien. Mais il faut attendre le 17^{ème} siècle pour trouver la trace des premières expériences scientifiques tentant d'expliquer le phénomène (Boyle 1667).

C'est le physiologiste Raphael Dubois qui détermine en 1887 le mécanisme permettant l'émission de lumière par les êtres vivants : une réaction d'oxydation d'un substrat, la luciférine, en présence d'une enzyme, la luciférase. La première molécule de luciférine est isolée en 1956 par Green et Mc Elroy à partir de quelques milliers de lucioles récoltées autour de Baltimore (Green and McElroy 1956). Mc Elroy montre alors que la réaction produisant la lumière nécessite la présence d'ATP et d'ions magnésium.

La présence de la bioluminescence dans des taxons très éloignés les uns des autres est l'indice d'une convergence évolutive (Viviani 2002). L'avantage évolutif procuré par cette caractéristique est différent selon les espèces : chez les Dinoflagellés, elle permet d'effrayer les prédateurs ; les Lophiiformes possèdent un leurre brillant fixé à leur nageoire dorsale pour attirer leurs proies ; chez les Lampyridés, dont font partie les lucioles, les signaux lumineux recrutent les partenaires compatibles.

1.5.1.2. Cycle de la bioluminescence chez la luciole

L'activation de la luciférine requiert le clivage d'une molécule d'ATP pour former du luciferyl adénylate. En présence de dioxygène et de luciférase, ce composé subit une décarboxylation oxydative qui produit l'oxyluciférine tout en libérant un photon (Lehninger, Nelson et al. 2008). La fréquence de ce photon, et donc la couleur de la lumière émise, varie selon les espèces et semble dépendre de la structure de la luciférase. Il existe en effet une trentaine de luciférines et de luciférases différentes. Chez la luciole, la fréquence est aux alentours de 550 à 570 nm, ce qui correspond à une lumière verte ou jaune.

L'oxyluciférine subit ensuite des réactions régénératives qui complètent le cycle (Figure 8).

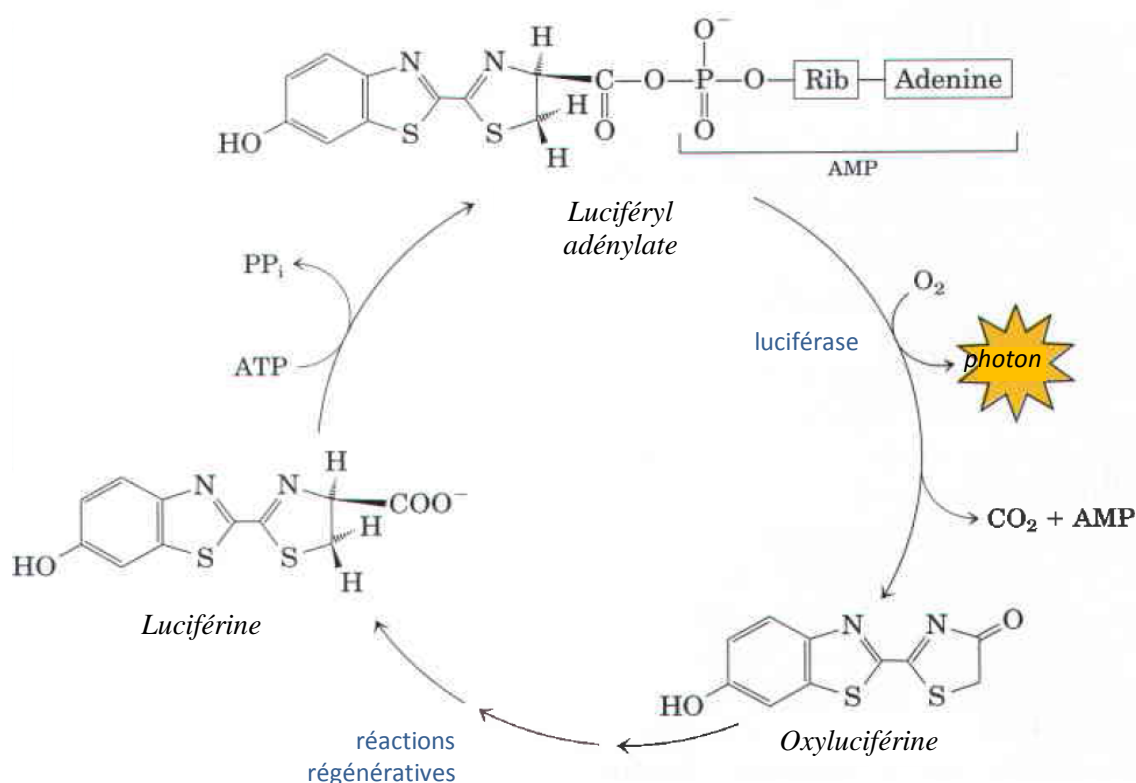


Figure 8 : Le cycle de bioluminescence chez la luciole (Lehninger, Nelson et al. 2008)

1.5.1.3. Principe de l'Imagerie par Bioluminescence

La luciférase de la luciole est codée par le gène Luc, qui est composé de sept exons séparés par six introns (Figure 9). La transfection du gène Luc dans l'ADN de diverses lignées cancéreuses permet d'obtenir chez la souris des tumeurs qui produisent l'enzyme luciférase. Lorsque l'on injecte à ces souris de la luciférine par voie intrapéritonéale, celle-ci est alors dégradée dans les cellules tumorales en émettant des photons (Sato, Klaunberg et al. 2004). Cette lumière est trop faible pour être perçue à l'œil nu, mais peut être mesurée à l'aide de caméras ultrasensibles, les caméras CCD.

Les appareils de mesure de bioluminescence (Figure 10) comportent une chambre noire permettant d'exclure les sources lumineuses de la pièce, à laquelle un système d'anesthésie gazeuse peut être relié. Les souris sont ainsi maintenues sous anesthésie pendant la réalisation des images, qui peut durer plusieurs minutes. Au-dessus de la chambre noire, la hauteur de la caméra CCD peut être ajustée pour optimiser la réception des photons émis par les cellules tumorales. Un système de refroidissement intégré fait baisser la température des capteurs aux alentours de -100°C .

Un CCD (*Charge-Coupled Device*) est un type de capteur photographique (Figure 11). Il convertit un signal lumineux (émission de photons) en un signal électrique (déplacement d'électrons au sein du capteur) du fait de l'effet photoélectrique. Le CCD est formé d'une matrice de pixels aussi appelés photocapteurs. Les photons incidents viennent frapper la surface d'un ou plusieurs pixels, communiquant de l'énergie aux électrons du matériau et créant ainsi des électrons libres à l'origine d'un courant électrique. Chaque pixel comporte un puits de potentiel où les charges électriques viennent s'accumuler (Hiraoka, Sedat et al. 1987). Ces charges peuvent ensuite être quantifiées par un logiciel et utilisées pour créer une image en deux dimensions, représentant la répartition du signal lumineux.

Le fonctionnement d'une caméra CCD repose sur les propriétés de semi-conducteurs de ses capteurs. Les capteurs CCD sont en partie composés de silicium. Or le silicium possède une courte bande d'énergie interdite (1,12 eV) séparant la bande de valence de la bande de conduction. Cela signifie qu'il suffit de communiquer très peu d'énergie aux électrons de ce matériau pour qu'ils « sautent » de la bande de valence à la bande de conduction, et puissent circuler, créant ainsi un courant électrique. Cette énergie peut être d'origine

électromagnétique (donc apportée par les photons), mais aussi thermique, d'où l'importance d'avoir un système de refroidissement efficace qui élimine cette source de signal indésirable. On estime en effet qu'à une température ambiante aux alentours de 20°C, 50 électrons passent dans la bande de conduction par mètre cube et par seconde (Aikens, Agard et al. 1989).

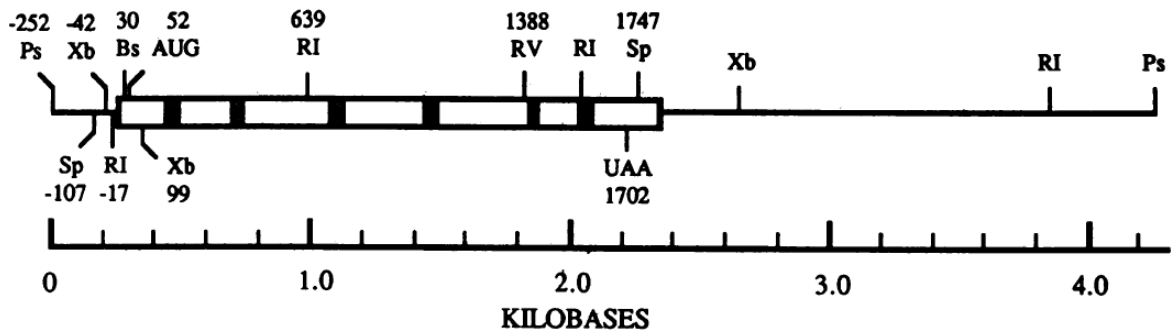


Figure 9 : Structure du gène Luc de *Photinus pyralis* (de Wet, Wood et al. 1987). Ps, Sp, Xb, RI, Bs, et RV sont les abréviations des sites de restriction.

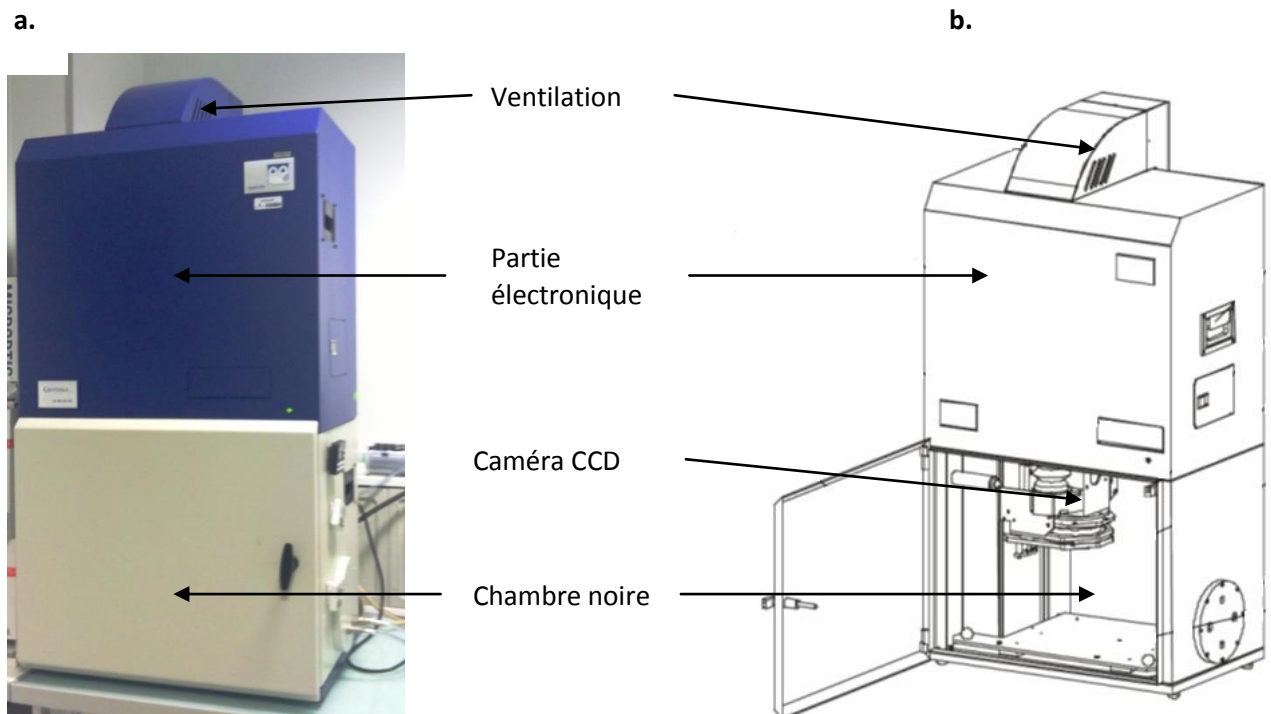


Figure 10 : Caméra CCD NightOWL II (a : cliché M. Lopez ; b: Berthold 2008)

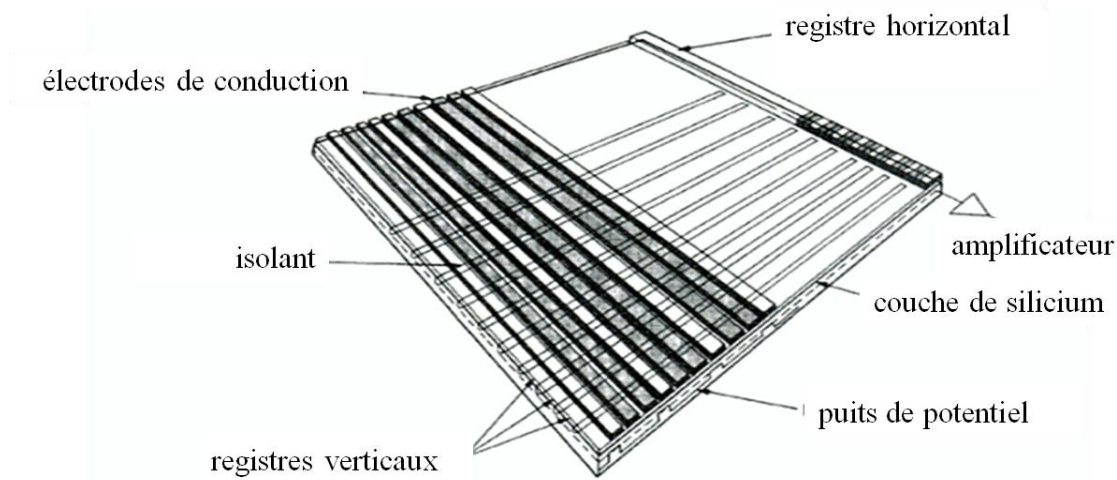


Figure 11 : Composants d'un CCD (Janesick 2001)

Les puits de potentiel qui recueillent les charges électriques ont une capacité comprise entre 50 000 et 1 000 000 électrons, variable selon les modèles (Aikens, Agard et al. 1989). Un signal lumineux trop intense entraînera donc une saturation et ne pourra pas être quantifié de façon appropriée.

Au contraire, lorsque le signal lumineux est faible (par exemple pour la détection de micro-métastases), chaque pixel contient une petite charge électrique difficilement exploitable. Pour pallier à ce problème, on utilise le *binning*. Cela consiste à cumuler les charges contenues par plusieurs pixels adjacents. Ainsi un binning de 2x2 regroupera les charges de 4 pixels adjacents formant un carré. La résolution de l'image s'en trouvera diminuée d'un facteur 4, mais la sensibilité de détection de la lumière en sera améliorée (Sanders, 2005).

Le processus d'acquisition des images subit souvent des interférences dues à des particules autres que des photons, qui vont apporter de l'énergie aux électrons des capteurs et créer ainsi un signal parasite, que l'on désigne sous le nom de « bruit de fond ». Les rayons cosmiques sont une source majeure de particules énergétiques. 98% des particules cosmiques arrivant au niveau de la mer sont des muons, qui ont les mêmes propriétés que les électrons, à l'exception de leur masse, 200 fois plus importante. Les 2% de particules cosmiques restantes sont en majorité des protons et des neutrons (Groom 2002).

Le bruit de fond peut également être produit par la radioactivité des matériaux utilisés dans la composition de la caméra CCD, notamment la radioactivité β (émission d'électrons ou de positrons). L'aluminium peut par exemple contenir des traces d'isotopes radioactifs tels que l'uranium 238 et le radium. Le borosilicate contient parfois de grandes quantités de potassium 40, et on trouve du cobalt 60 dans certains aciers (Florentin-Nielsen 1995).

Pour améliorer la qualité de l'imagerie par bioluminescence, il convient donc de quantifier le bruit de fond et de le soustraire de façon systématique au signal total obtenu lors de l'acquisition de l'image.

1.5.2. Intérêt des différentes techniques d'imagerie

Les techniques d'imagerie de pointe utilisent souvent des appareils spécifiques pour les petits animaux, ce qui entraîne des coûts en matériel très importants, mais elles fournissent des informations détaillées.

La **bioluminescence** offre l'avantage de ne pas avoir de bruit de fond endogène chez la souris. La biodistribution de la luciférine est un facteur important : il faut saturer les enzymes en substrat, pour que l'émission de photons soit maximale. La vascularisation des cellules et la taille des foyers cancéreux jouent aussi sur la qualité du signal. La fenêtre d'émission des photons est variable selon la luciférine utilisée, et la température interne des souris. De plus, l'expression du gène de la luciférase dans les cellules tumorales est parfois instable, et est susceptible de disparaître au cours du temps (Hoffman 2002). Enfin, une partie des photons sont absorbés par les tissus : seule une fraction atteint la surface de la peau et peut être détectée. En général, l'absorption dans les tissus des mammifères est importante dans le spectre bleu-vert (c'est-à-dire en dessous de 565nm) et faible dans le rouge et l'infrarouge (entre 600 et 900 nm). La luciférase de luciole a un spectre d'émission large : de 500 à 700 nm. Elle émet donc en partie dans la région de faible absorption (Kuo, Coquoz et al. 2007).

Il peut y avoir une interférence de signal entre tumeur primaire et métastases : la tumeur primaire, bien plus volumineuse, va émettre beaucoup de photons et masquer les petits foyers métastatiques.

La tumeur primaire peut nécroser, entraînant une perte du signal, ou atteindre un volume si important qu'elle provoque une saturation des capteurs.

L'**imagerie par fluorescence** fonctionne grâce à l'émission de lumière par un fluorophore ou une protéine fluorescente après excitation par une source lumineuse. Cette technique est moins sensible que l'imagerie par bioluminescence (Choy, O'Connor et al. 2003), notamment parce que l'atténuation du signal par les tissus est plus marquée, mais elle présente l'avantage de ne pas nécessiter d'injection de substrat. Le temps de préparation de l'animal est donc plus court.

L'**IRM** (Imagerie par Résonance Magnétique) est une méthode non invasive, de haute résolution, qui procure des images de tissus complexes, par exemple des images de tumeurs cérébrales (Nelson, Algon et al. 2003). Les souris tolèrent plusieurs séances d'IRM par semaine, ce qui permet un suivi précis de l'évolution des tumeurs et de l'implantation de systèmes de délivrance de médicaments intracérébraux. Néanmoins, la préparation de l'animal est plus longue que pour les techniques précédentes, et l'analyse de l'image requiert un spécialiste (Puau, Ong et al. 2011).

La **tomodensitométrie** (ou CT-scan) est plus rapide que l'IRM et plus adapté pour détecter les lésions osseuses. Mais le temps d'imagerie peut durer plusieurs minutes si l'on veut obtenir une meilleure visualisation des tissus mous.

La **tomographie par émission de positrons** (PET-scan) dépasse le CT-scan et l'IRM en spécificité et sensibilité dans le diagnostic de nombreux cancers. Un microPET (PET-scan dédié aux petits animaux) permet d'identifier des tumeurs sous-cutanées de 3 mm de diamètre chez la souris (Yang, Berger et al. 2003). Cependant les isotopes radioactifs utilisés comme traceurs ont une demi-vie relativement courte, ce qui nécessite la présence d'un cyclotron sur le site de l'imagerie. De plus la préparation de l'animal est longue (autour d'1h30) du fait du temps d'incubation nécessaire à la fixation des traceurs sur les foyers tumoraux (Puau, Ong et al. 2011). L'analyse des images requiert également un spécialiste.

2. Un exemple de modélisation de tumeur : l'adénocarcinome colique

2.1. Le cancer colorectal chez l'homme

Le cancer colorectal est un cancer répandu et agressif : il constitue 15% des diagnostics de cancer et occupe la deuxième place en terme de mortalité dans les pays développés (Cespedes, Espina et al. 2007). En France, on compte 40 000 nouveaux cas par an, et plus de 16000 décès. Depuis 2009, un dépistage biennal est organisé sur l'ensemble du territoire pour les hommes et les femmes de 50 à 74 ans. Cinq millions de personnes y ont participé en 2009-2010 (Francim, 2010). Dans l'étude pionnière menée en Bourgogne auprès de 91200 personnes, la mortalité par cancer colorectal des personnes dépistées avait diminué de 33% (Faivre, Dancourt et al. 2004).

2.1.1. Etiologie

Dans 97% des cas, les adénocarcinomes coliques sont sporadiques. Leur apparition est favorisée par de nombreux facteurs environnementaux (l'inactivité physique et une alimentation pauvre en fibre étant les facteurs les mieux documentés) et des prédispositions génétiques polymorphes et mal connues.

Il existe également deux maladies génétiques qui prédisposent au cancer colorectal : la polypose adénomateuse (à l'origine de 1% des adénocarcinomes coliques) et le cancer héréditaire du côlon sans polypose, aussi appelé syndrome de Lynch (2% des adénocarcinomes coliques).

Enfin, les personnes souffrant d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (rectocolite hémorragique, maladie de Crohn) sont deux fois plus susceptibles de développer un cancer colo-rectal que le reste de la population (Pohl, Hombach et al. 2000).

2.1.2. Physiopathologie

La plupart des cancers colorectaux sont des adénocarcinomes. Les lésions précancéreuses forment des polypes dans la muqueuse du colon. Le potentiel cancéreux de ces lésions est fortement corrélé à leur type histologique : les polypes adénomateux évoluent fréquemment (14% en l'espace de 10 ans) en adénocarcinomes. Il est possible que les polypes villosités soient également un facteur de risque. Par contre, le lien entre la présence de polypes hyperplasiques et le cancer colorectal n'est pas prouvé (Cappell 2005).

Les sites métastatiques préférentiels sont le foie, les poumons et les nœuds lymphatiques régionaux (Tableau 3).

Organe	Incidence des métastases (%)
Foie	60
Poumons	43
Pelvis	27
Nœuds lymphatiques régionaux	55
Péritoine	32
Surrénales	18
Intestin grêle	13
Os	10
Thyroïde	5
Pancréas	10
Ovaires	3
Cerveau	6

Tableau 3 : Incidence des métastases à l'autopsie de patients atteints de cancer colorectal sur une cohorte de 145 patients (Welch and Donaldson 1979).

2.1.5. Diagnostic

Les signes cliniques du cancer du colon s'observent plus facilement à un stade avancé de la maladie et sont peu spécifiques : douleurs abdominales, troubles digestifs, saignements colorectaux et perte de poids sont les plus fréquents. Le diagnostic est souvent posé grâce à l'anamnèse et les examens complémentaires.

On recherche la présence de sang occulte dans les selles grâce à un test colorimétrique, dont la sensibilité pour la détection des cancers colorectaux est de 85%.

L'examen colonoscopique permet de visualiser et d'effectuer des biopsies des lésions suspectes. C'est un examen très sensible : 94% des polypes de plus de 1 cm de diamètre sont détectés, ainsi que 73% des polypes plus petits.

Pour les patients à risque (prédisposition génétique, maladie de Crohn, membre de la famille décédé d'un cancer colorectal...) ou présentant des symptômes évocateurs, on peut effectuer un scanner pour détecter une éventuelle tumeur et ses métastases. L'IRM vient en renfort pour caractériser les lésions ambiguës observées avec le scanner, notamment les lésions hépatiques (Cappell 2005).

2.1.4. Traitements

Si la lésion cancéreuse est détectée à un stade précoce (polype), il est possible d'effectuer la résection curative par endoscopie. Autrement, le traitement consiste en une combinaison de chirurgie et de chimiothérapie, voire de radiothérapie.

Selon la localisation de la tumeur, la chirurgie effectuée sera une hémicolectomie droite (côlon ascendant), une hémicolectomie gauche (colon descendant), ou une sigmoïdectomie (colon sigmoïde).

La chimiothérapie augmente les chances de succès de la chirurgie. Les molécules les plus utilisées sont le 5-fluorouracile (5FU), l'oxaliplatine (LOHP), l'irinotécan (CPT-11), le cetuximab. Pour les patients en stade III (implication des nœuds lymphatiques), le National Institute for Health and Care Excellence (NICE) recommande en première intention soit une monothérapie de capécitabine (une fluoropyrimidine qui est transformée en 5-FU au sein de la tumeur), soit une combinaison de 5-fluorouracile, d'oxaliplatine LOHP et d'acide folinique appelée FOLFOX (NICE, 2011).

2.2. Les modèles animaux de cancer colorectal

Il existe trois grands types de modèles animaux d'adénocarcinome colique : les modèles à carcinogenèse induite, les modèles transgéniques, et les modèles de xénogreffe.

2.2.1. Carcinogenèse induite

Les cancers colorectaux apparaissent spontanément chez moins de 1% des souris et des rats (Maekawa 1994; Maekawa 1996). Pour obtenir des tumeurs sur une plus grande proportion d'animaux de manière reproductible, on peut administrer des molécules induisant

la carcinogénèse. La toute première observation de carcinogénèse chimio-induite remonte à 1941 (Lorenz 1941).

Les molécules fréquemment utilisées comprennent le dibenzanthracène, le méthylcholantrene, le méthylazoxyméthanol (MAM), la diméthylhydrazine (DMH, métabolisée en MAM par le foie) et l'azoxyméthane (AOM), un métabolite intermédiaire de la DMH.

La flore intestinale et le statut immunitaire des souris peuvent interférer avec la métabolisation de ces carcinogènes. La voie d'administration influe également sur l'induction du cancer colorectal : en général, l'administration par voie orale est par exemple moins efficace que l'administration par voie sous-cutanée (Kobaek-Larsen, Thorup et al. 2000).

2.2.2. Modèles transgéniques

Depuis l'identification des mutations responsables de la polypose adénomateuse et du syndrome de Lynch, plusieurs types de modèles transgéniques ont été mis au point pour mieux comprendre la progression du cancer colorectal et développer de nouvelles thérapies :

- **Modèles APC**

Les souris hétérozygotes pour certaines mutations du gène APC (Adenomatous polyposis coli) développent de multiples adénomes et adénocarcinomes sur le tube digestif, mimant ainsi la polypose adénomateuse de l'humain (Kobaek-Larsen, Thorup et al. 2000).

De nombreuses souches portant des mutations diverses ont été développées :

- Les souris Min (Multiple Intestinal Neoplasia) sont obtenues par traitement à l'éthylnitrosourée, qui entraîne une délétion du codon 850 du gène APC. Cette mutation est autosomique et dominante (Taketo and Edelmann 2009). Les souris présentent des adénomes évoluant en adénocarcinomes, associés à une anémie. Les femelles Min+ étant trop faibles pour supporter une gestation, le maintien de la mutation se fait en croisant un mâle Min+ et une femelle C57BL.

- Les souris knockout Apc 716 ont des polypeptides tronqués au codon 716 du gène APC et développent de multiples polypes intestinaux, principalement dans l'intestin grêle (Kobaek-Larsen, Thorup et al. 2000).

- Les souris knockout *Apc* 1638N ont des polypeptides tronqués au codon 1638 du gène APC. Tout comme les souris knockout *Apc* 716, elles développent des polypes intestinaux. Cependant ces polypes évoluent la plupart du temps en adénocarcinomes dans l'intestin grêle et non dans le colon (Kobaek-Larsen, Thorup et al. 2000).

La voie Wnt est la voie génétique impliquée dans l'apparition de cancers colorectaux chez les souris porteuses de chaque type de mutation APC. Le gène APC code pour une protéine qui permet, en association avec d'autres protéines, de phosphoryler la β -caténine pour permettre sa dégradation. Si la protéine APC est inactive, la β -caténine s'accumule, puis entre dans le noyau de la cellule et agit comme facteur de transcription pour certains gènes dont l'expression est liée au développement de polypes intestinaux (Taketo and Edelman 2009), voir Figure 12.

- **Modèles MMR**

Les gènes MMR (Mismatch Repair) sont les gènes responsables de la correction des mésappariement de l'ADN.

Parmi eux, les gènes MSH2 et MLH1 jouent un rôle important. Des mutations au niveau de ces gènes peuvent provoquer l'apparition du syndrome de Lynch chez l'humain. Chez la souris, l'inactivation de MSH2 et MLH1 provoque de manière similaire l'apparition d'adénomes et d'adénocarcinomes colorectaux. Les adénomes, en plaque, diffèrent de ceux obtenus avec une mutation APC, qui sont pédiculés (Boivin, Washington et al. 2003).

Il existe des modèles qui combinent des mutations MMR avec des mutations APC, permettant ainsi d'explorer les relations entre les gènes (Edelman, Yang et al. 1999; Kuraguchi, Yang et al. 2001).

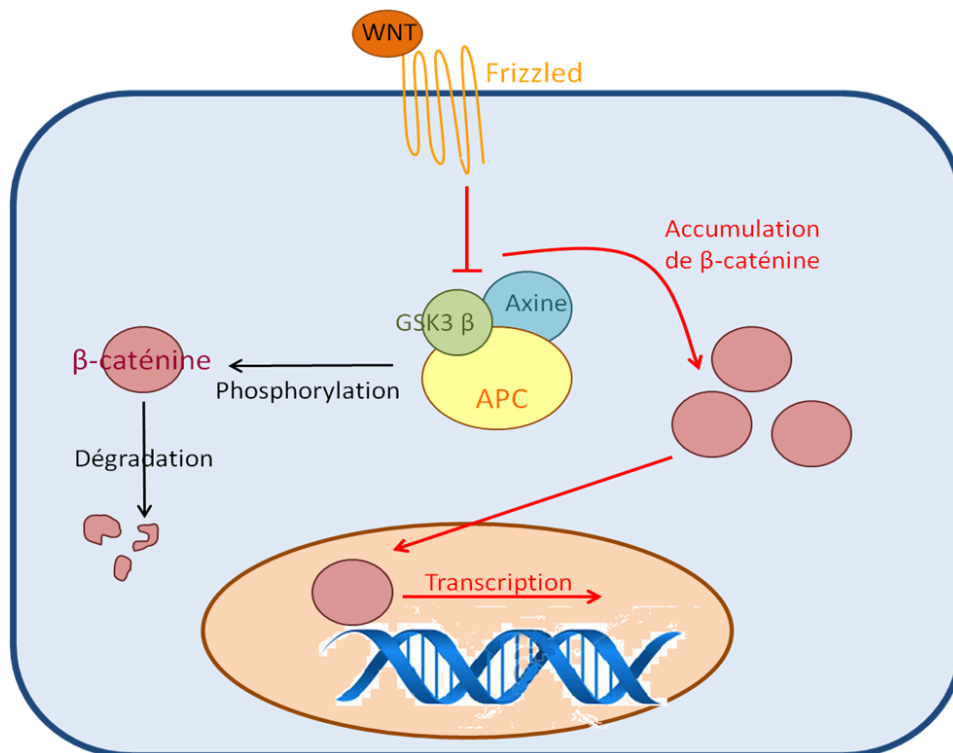


Figure 12 : Voie de signalisation Wnt.

- **Modèles TGF β**

Le facteur de croissance de transformation TGF β contrôle la croissance des cellules, régule la différenciation des cellules épithéliales et protège l'épithélium des mutations génétiques causées par les cellules inflammatoires.

Les souris présentant des altérations de la voie de signalisation de TGF β (inactivation du gène Tgfb1 ou du gène Smad par exemple) développent fréquemment des adénomes et des carcinomes coliques (Boivin, Washington et al. 2003).

2.2.3. Xénogreffes

Les modèles de xénogreffes utilisent des animaux immunodéprimés pour permettre l'implantation de cellules tumorales humaines.

- **Xénogreffes de lignées cellulaires tumorales**

La majorité des modèles développés sont obtenus par l'injection sous-cutanée de cellules issues de lignées cellulaires tumorales. Par exemple, dans le modèle de Bresalier et

al., l'injection de 5×10^6 cellules LS174T (cultivées à partir d'un adénocarcinome colique humain) à des souris a permis d'obtenir des tumeurs de 1 cm de diamètre chez l'ensemble des animaux au bout d'un délai de trois semaines (Bresalier, Raper et al. 1987).

Cependant, dans un souci de se rapprocher au plus près des conditions biologiques normales du développement de la tumeur, de nombreux modèles orthotopiques de cancer colorectal ont vu le jour. Une technique fréquemment utilisée est l'injection de cellules tumorales dans la paroi du caecum. Cespedes et al. effectuent des micro-injection de cellules (HCT-16, SW-620 et DLD-1) entre la muqueuse et la musculature de la paroi caecale de souris Nude au cours d'une laparotomie. La croissance tumorale est ensuite constatée dans 75 à 88% des cas selon la lignée cellulaire utilisée. Les métastases obtenues sont péritonéales, hépatiques, pulmonaires et nodales (Cespedes, Espina et al. 2007). On peut également effectuer des greffes de fragments tumoraux directement sur la paroi du colon ou du caecum.

La laparotomie étant une chirurgie invasive, à l'origine d'une mortalité accrue des animaux de laboratoire, quelques modèles orthotopiques n'y ayant pas recouru ont été développés. Ainsi, Zigmond et al. effectuent des injections de cellules tumorales MC38 sous contrôle colonoscopique (Zigmond, Halpern et al. 2011). Donigan et al. injectent directement des cellules CT-26 dans la paroi distale du rectum (Donigan, Norcross et al. 2009). Enfin, Bhullar et al. utilisent l'électrocoagulation pour faire nécroser en trois points la muqueuse du colon avant d'y instiller 10^6 cellules tumorales (Bhullar, Subhas et al. 2011).

- **Xénogreffes de tumeurs de patients**

On peut également réaliser des xénogreffes à partir de tumeurs provenant directement de patients atteints de cancer colorectal. Julien et al. ont réalisé sur des souris et des rats des greffes sous-cutanées à partir de 85 échantillons tumoraux (tumeurs primaires, métastases et carcinomes péritonéales) caractérisés histologiquement et chimiquement, dans le but d'établir une collection de modèles représentant l'hétérogénéité clinique du cancer colorectal. Les tumeurs obtenues (avec un taux de prise de 63,5%) conservaient l'architecture cellulaire et les caractéristiques histologiques des tumeurs humaines. En revanche, après plusieurs passages successifs sur souris, le stroma humain disparaissait, remplacé par un stroma murin (Julien, Merino-Trigo et al. 2012).

2.2.4. Avantages et limites des différents modèles de cancer colorectal

Les métastases sont un des problèmes les plus importants rencontrés lors de la prise en charge médicale et chirurgicale des patients atteints de cancer colorectal. L'évaluation de la pertinence des modèles doit donc prendre en compte non seulement le développement de la tumeur primaire mais aussi celui des métastases.

Les modèles à carcinogenèse induite sont très utiles pour étudier l'influence du régime alimentaire sur le cancer colorectal. Cependant, une faible proportion des souris traitées développe un cancer, ce qui impose d'utiliser un grand nombre d'animaux. De plus, les métastases sont assez rares (Heijstek, Kranenburg et al. 2005).

Les modèles transgéniques produisent également peu ou pas de métastases (Boivin, Washington et al. 2003). Ils sont principalement utilisés pour connaître le rôle d'un gène dans la pathogenèse du cancer. Les tumeurs obtenues sont génétiquement et histologiquement proches des tumeurs humaines, mais mettent plus de temps à se développer que dans d'autres modèles (Becher and Holland 2006).

Les xénogreffes permettent un développement plus rapide des tumeurs. Les xénogreffes ectopiques, simples à réaliser et facilement reproductibles, sont utiles lorsque l'on veut évaluer l'efficacité d'un grand nombre de molécules. Quant aux xénogreffes orthotopiques, elles reproduisent plus fidèlement le microenvironnement de l'adénocarcinome colique et permettent d'obtenir des métastases plus nombreuses.

Les lignées cellulaires tumorales, qui sont utilisées pour la plupart des xénogreffes, ont l'avantage d'être aisément disponibles, mais elles produisent des tumeurs peu hétérogènes, à croissance très rapide, qui n'imitent pas la diversité cellulaire et moléculaire présente chez les tumeurs humaines. L'utilisation pour les greffes de tumeurs primaires de patients permet d'obtenir des tumeurs histologiquement ressemblantes au cancer humain, à la croissance plus lente, et qui conserve en partie le stroma d'origine. Ainsi, on peut tester l'efficacité de nouvelles molécules sur des modèles murins reproduisant la plupart des sous-types de cancer colorectal (Julien, Merino-Trigo et al. 2012).

Cependant, la majorité des tumeurs primaires de patients sont obtenues après des chirurgies curatives, donc avant que la tumeur n'ait été exposée à la chimiothérapie et que des populations cellulaires résistantes n'aient été sélectionnées. Or la plupart des nouvelles molécules devront valider leur efficacité sur des patients portant des tumeurs résistantes à la chimiothérapie lors des essais cliniques (Kopetz, Lemos et al. 2012). Pour cette raison (et pour d'autres raisons diverses tenant aux différences entre les organismes murin et humain), le succès d'une molécule en phase préclinique ne prédira pas nécessairement sa validation en phase clinique.

Enfin, le problème de la reproductibilité des résultats entre différents laboratoires se pose pour l'ensemble des modèles de cancer colorectal. Le département d'hématologie et oncologie de la société de biotechnologie Amgen (Thousand Oaks, Californie) a notamment tenté de reproduire les résultats de 53 articles, souvent en collaboration avec leurs auteurs, et n'a pu le faire que dans 11% des cas. Or les articles dont les résultats n'étaient pas reproductibles avaient obtenu autant de citations que ceux qui l'étaient (Begley and Ellis 2012). De même, une équipe de Bayer HealthCare (Berlin) a testé la reproductibilité de 67 études menées au sein de leur laboratoire ayant fait l'objet d'une publication. Ils ont pu reproduire les résultats dans seulement 20 à 25% des cas (Prinz, Schlange et al. 2011). Il est intéressant de noter que des changements mineurs dans le protocole (changement de lignée cellulaire, technique de dosage...) n'influaient pas sur le caractère reproductible ou non d'une étude. L'hypothèse que les conditions expérimentales hétérogènes d'un laboratoire à l'autre seraient entièrement responsables des défauts de reproductibilité semble donc invalide.

Une des raisons avancées pour expliquer ce problème est l'existence d'un biais de publication. Les études ayant donné des résultats négatifs ne font que rarement l'objet d'un article, ce qui augmente artificiellement dans la littérature le poids des faux positifs. D'autres raisons invoquent un traitement statistique incorrect des résultats, des oublis dans l'exposition des méthodes utilisées, ou encore des tailles d'échantillons trop faibles.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE - MODELE INTRACAECAL D'ADENOCARCINOME COLIQUE CHEZ LA SOURIS

Cette partie expérimentale correspond à un exemple des travaux menés durant mon stage de A5 dans les laboratoires Pierre Fabre (CROE : Centre de Recherche en Oncologie Expérimentale) à Toulouse, sous la responsabilité du Dr. B. Gomes.

Le but de cette étude est de mettre au point, chez la souris, un modèle de xéno greffe orthotopique métastatique d'adénocarcinome colique, dont on testera la réponse à un traitement chimiothérapeutique de référence et que l'on comparera à un modèle de xéno greffe sous-cutané d'adénocarcinome colique.

Les modèles orthotopiques antérieurs mis au point au sein du laboratoire n'avaient pas permis d'obtenir de métastases hépatiques, et présentaient un taux faible de métastases pulmonaires. Leur intérêt pour les études pharmacologiques était donc limité à l'effet sur la tumeur primaire.

1. Matériel et méthodes

1.1. Animaux

Les animaux sont des souris femelles adultes provenant de chez Charles Rivers Laboratories. Dix souris Swiss Nude ont été utilisées pour le modèle sous-cutané, ainsi que 45 souris NOD-SCID (NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/J, Charles River Laboratories) et 21 souris NSG (NOD.Cg-*Prkdc*^{SCID}*IL2rg*^{tm1Wjl}/SzJ, Charles River Laboratories, Saint-Germain-sur-L'Arbresle, France) pour le modèle orthotopique. Vingt souris BALB/c Nude ont également été utilisées pour obtenir les tumeurs implantées dans les différents modèles.

1.2. Provenance des greffons

Des cellules d'adénocarcinome colique LS-174-T (lignée cellulaire provenant d'une patiente de 58 ans au stade B dans la classification de Dukes) subissent une transfection avec intégration aléatoire du gène de la luciférase de luciole (Luc). Elles sont ensuite cultivées en flasques T75 dans un milieu composé à 90% de EMEM de Gibco®, de 10 % de sérum de

veau fœtal (SVF) et complétement en glutamine et en acides aminés non essentiels. Une suspension cellulaire est ensuite préparée dans du PBS et injectée en sous-cutané sur des souris BALB/c. Lorsque les tumeurs sous-cutanées sont assez grosses ($>100\text{mm}^3$), les souris sont sacrifiées, et les tumeurs prélevées et découpées en fragments utilisables pour une greffe orthotopique intracaecale ou une greffe ectopique sous-cutanée.

1.3 Greffes

Pour mettre au point un modèle d'adénocarcinome colique métastatique, plusieurs greffes ont été réalisées (cf Tableau 4). Les études se chevauchent dans le temps pour répondre à une exigence d'efficacité du laboratoire, et les protocoles ont parfois été adaptés pour tenir compte des données expérimentales obtenues pour les lots précédents (notamment le choix de la souche murine, le délai de résection ou encore la technique de greffe).

1.3.1. Techniques de greffes

1.3.1. 1. Greffes sous-cutanées

Des greffes de fragments tumoraux (2x2mm) prélevés sur souris BALB/c sont effectuées à l'aide d'un trocard sur le flanc droit des souris receveuses.

1.3.1.2. Greffes orthotopiques

Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane 3% dans une boîte à induction puis maintenues endormies sous isoflurane 2%. Elles sont alors placées en décubitus dorsal. Leur abdomen est tondu et désinfecté à la povidone iodée (Bétadine 10%) et recouvert d'un champ transparent adhésif. Une incision de laparotomie médiane est effectuée au scalpel sur une longueur de 1 à 2 cm et le caecum est extériorisé.

Un fragment tumoral prélevé sur souris BALB/c est ensuite greffé sur la paroi du caecum :

- soit directement collé sous une pastille de papier stérile (Figure 13) à l'aide de la colle histologique (dans une variante de cette technique, on abrasera légèrement la paroi caecale au scalpel avant d'y apposer la tumeur, afin de faciliter le passage des cellules tumorales dans la muqueuse et dans la circulation sanguine)
- soit enfoui dans une invagination iatrogène du caecum (Figure 14), laquelle est refermée par un point en croix (Vicryl 5-0).

Le caecum est remplacé dans la cavité abdominale et la paroi est refermée par des agrafes chirurgicales.

Pour éviter que la bioluminescence de la tumeur primaire ne masque les éventuelles métastases, on réalise au bout de deux ou trois semaines une résection chirurgicale de la tumeur caecale (Figure 15), au bistouri électrique, entre deux nœuds de chirurgien (Vicryl 5-0).

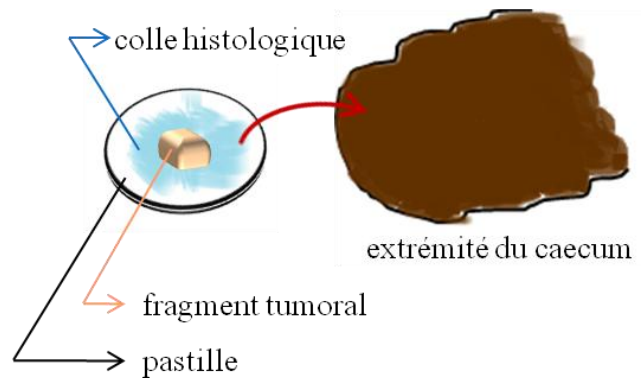


Figure 13 : Greffe caecale de fragment tumoral sur une pastille de papier

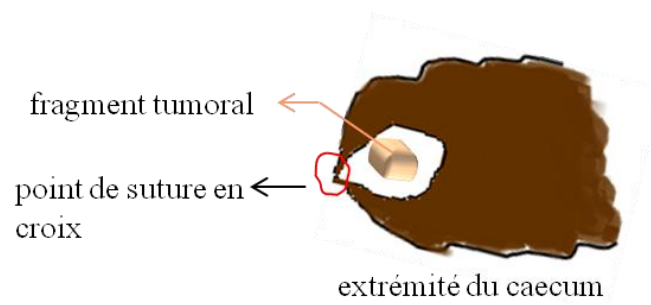


Figure 14 : Greffe caecale de fragment tumoral par invagination iatrogène du caecum

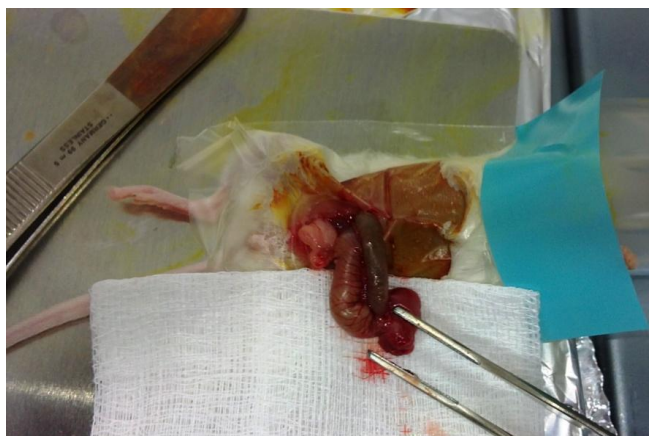


Figure 15 : Résection de la tumeur intracaecale à J14

Grefe	Technique de greffe	Souche murine	Nombre de souris greffées	Résection	Objectif principal
Grefe intracaecale 1	Intracaecale avec pastille	NOD SCID	10	J21	Acquisition de la technique de greffe
Grefe intracaecale 2	Intracaecale avec pastille et lésion préalable de la paroi caecale	NSG	10	J14	Essai sur une autre souche murine
Grefe intracaecale 3	Intracaecale avec invagination du caecum	NOD SCID	10	J21	Essai d'une autre technique de greffe
Grefe intracaecale 4	Intracaecale avec invagination du caecum	NOD SCID	5	J14	Comparaison des techniques de greffe et des souches murines
	Intracaecale avec pastille	NSG	6		
	Intracaecale avec invagination du caecum	NSG	5		
Etude pharmacologique 1	Intracaecale avec pastille	NOD SCID	20	—	Etude pharmacologique
Etude pharmacologique 2	Sous-cutanée	Swiss Nude	10	—	Etude pharmacologique

Tableau 4 : Paramètres de greffe

1.4. Suivi de l'évolution des tumeurs

Le suivi de la croissance tumorale et de la dissémination métastatique est effectué une à deux fois par semaine par bioluminescence avec une caméra CCD NightOwl (Berthold). Chaque souris reçoit une injection intrapéritonéale de 300µL de luciférine (aiguille hypodermique de 26G). Après 7 minutes d'attente, les souris sont placées dans une boîte à induction et anesthésiées à l'isoflurane (3 à 4%) puis installées dans la chambre noire de la caméra, toujours sous isoflurane (2%). Enfin, 10 minutes après l'injection de luciférine, on réalise une photographie puis l'image de bioluminescence. L'image est ensuite traitée et la bioluminescence quantifiée en soustrayant le bruit de fond.

Pour les greffes sous-cutanées, on mesure également les tumeurs au pied à coulisse trois fois par semaine. On calcule le volume tumoral approximatif grâce à la formule suivante : $Longueur \times largeur^2/2$.

L'efficacité du traitement est évaluée par le volume tumoral. On calcule le rapport T/C : rapport volume tumoral médian (ou quantité de bioluminescence médiane) du groupe traité (T) /volume tumoral médian (ou quantité de bioluminescence médiane) du groupe contrôle(C). Eu égard à la taille des lots, l'efficacité thérapeutique est significative si le rapport T/C est inférieur à 42%

Les souris sont pesées avant chaque mesure. L'euthanasie est pratiquée si la perte de poids est trop importante (supérieure à 20 % du poids de départ).

1.5. Constitution des lots pour les études pharmacologiques

Etude pharmacologique 1 : à J10, 19 des 20 souris greffées présentent une tumeur caecale bioluminescente. Deux lots de 6 animaux sont constitués : un lot témoin et un lot qui sera traité à l'irinotecan (Tableau 5).

Lot	Bioluminescence médiane à J10 (millions de photons/pixel/s)
Lot témoin	3,72
Lot traité à l'irinotecan	4,28

Tableau 5 : Lots de l'étude pharmacologique 1

Etude pharmacologique 2 : à J14, 11 des 20 souris greffées ont développé une tumeur sous-cutanée. Deux lots de 5 souris sont constitués après mesure du volume tumoral au pied à coulisse. La médiane à J14 est de 148 mm³ pour le lot témoin et de 249 mm³ pour le lot qui sera traité à l'irinotecan (Tableau 6).

		Volume tumoral à J14 (mm³)
Lot témoin	Souris 1	65
	Souris 2	148
	Souris 3	497
	Souris 4	119
	Souris 5	506
Lot traité à l'irinotecan	Souris 6	249
	Souris 7	669
	Souris 8	285
	Souris 9	75
	Souris 10	138

Tableau 6 : Lots de l'étude pharmacologique 2

1.6. Protocoles des traitements

L'irinotecan (inhibiteur de la topoisomérase I), dilué dans du chlorure de sodium à 0.9%, est administré par voie intraveineuse dans la veine caudale à raison de 20 mg/kg trois fois par semaine durant deux semaines. Le traitement commence deux semaines après la date de la greffe, lorsque les tumeurs ont atteint une taille suffisante.

Les lots témoins reçoivent des injections de chlorure de sodium à 0.9% de volume équivalent à celui du traitement.

2. Résultats

2.1. Greffes intracaecales

2.1.1. Premier lot de greffe intracaecale

L'objectif principal de cette première greffe est l'acquisition du geste chirurgical par l'expérimentateur.

Dix souris NOD SCID subissent une greffe intracaecale avec pastille. L'exérèse de la tumeur primaire est effectuée à J21.

2.1.1.1. Croissance tumorale

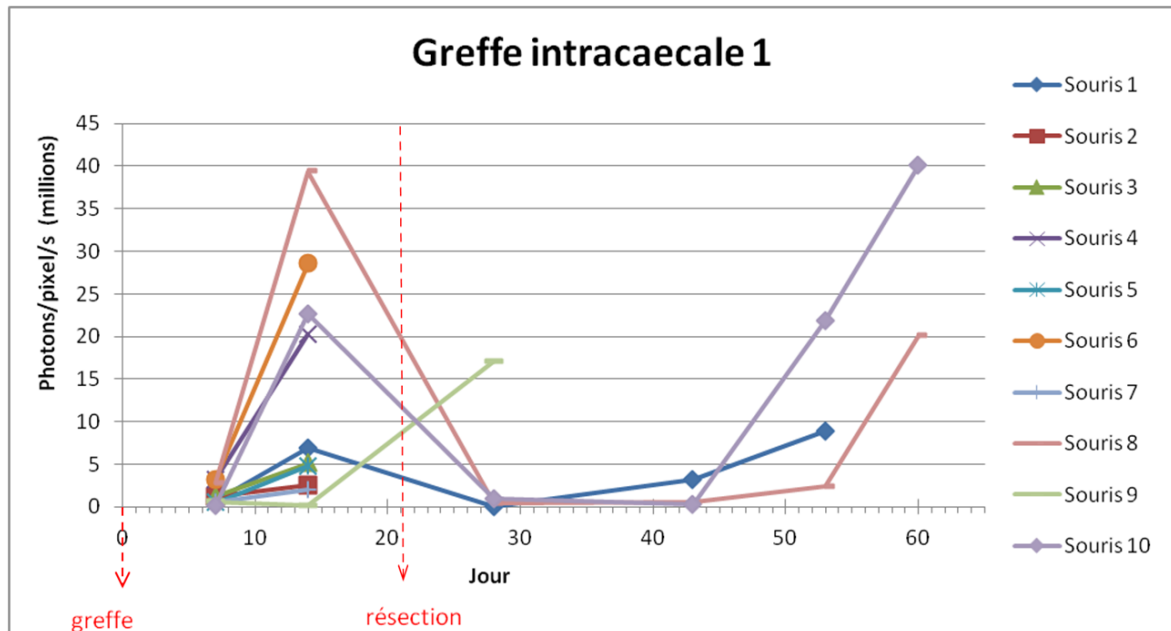


Figure 16 : Suivi par bioluminescence de la croissance tumorale pour la greffe intracaecale 1

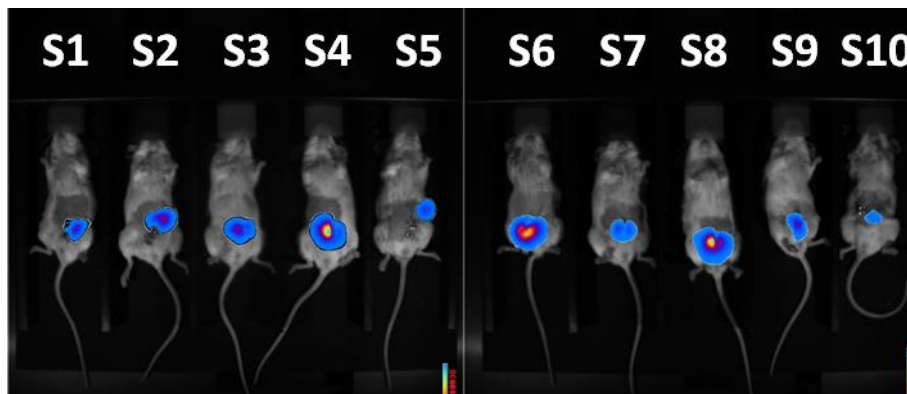


Figure 17 : Imagerie par bioluminescence de la greffe intracaecale 1 à J7

On observe une croissance de la tumeur sur les 10 souris greffées. A J21, on procède à la résection de la portion du caecum qui porte la tumeur. Les tissus sont fixés au formol pour l'examen histopathologique. On y voit notamment des embolus tumoraux qui indiquent que la tumeur a commencé à se disséminer (voir Figure 18).

La mortalité lors de la résection est élevée : 6 souris sur 10 sont décédées pendant ou dans les jours suivant la chirurgie. Du fait de la résection tardive, les tumeurs caecales créent de multiples adhérences par infiltration dans l'abdomen (notamment sur l'intestin grêle et la vessie), ce qui rend leur exérèse difficile et les hémorragies fréquentes. Cela a conduit à

avancer la date de résection à J14 pour la plupart des greffes suivantes. De plus, à partir de la troisième greffe une fluidothérapie (NaCl 0,9% à 10 mL/kg par voie sous-cutanée) et une administration d'antidouleurs (buprénorphine 1mg/kg) systématiques pendant et après la chirurgie ont été mises en place.

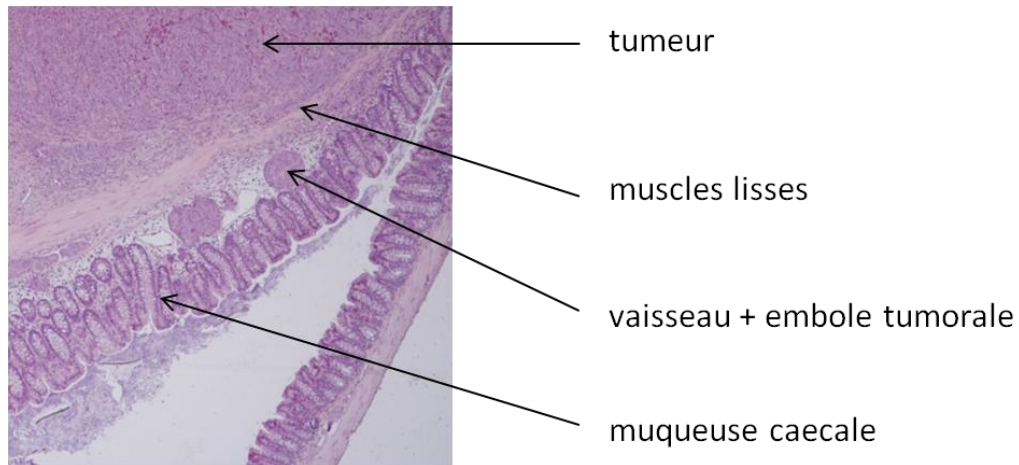


Figure 18 : Tumeur caecale de souris NOD SCID (HEx100)

Quelques semaines après la résection, la tumeur primaire repousse et les souris sont euthanasiées et autopsiées.

2.1.1.2. Métastases

Dans cette première expérimentation, une seule souris sur les quatre survivantes (souris 8) montre à partir de J53 des aires bioluminescentes thoraciques évoquant des métastases pulmonaires (voir Figure 19), confirmées par l'histopathologie.

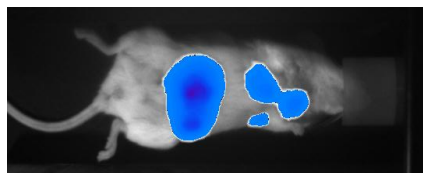


Figure 19 : Image de bioluminescence suggérant des métastases pulmonaires

2.1.2. Deuxième lot de greffe intracaecale

Les objectifs principaux sont ici de confirmer l'acquisition de la technique chirurgicale, avec une variante, et d'essayer la greffe sur une nouvelle souche de souris.

Dix souris NSG subissent une greffe intraecale avec pastille et abrasion de la paroi caecale au scalpel. L'exérèse de la tumeur primaire est effectuée à J14.

2.1.2.1. Croissance tumorale

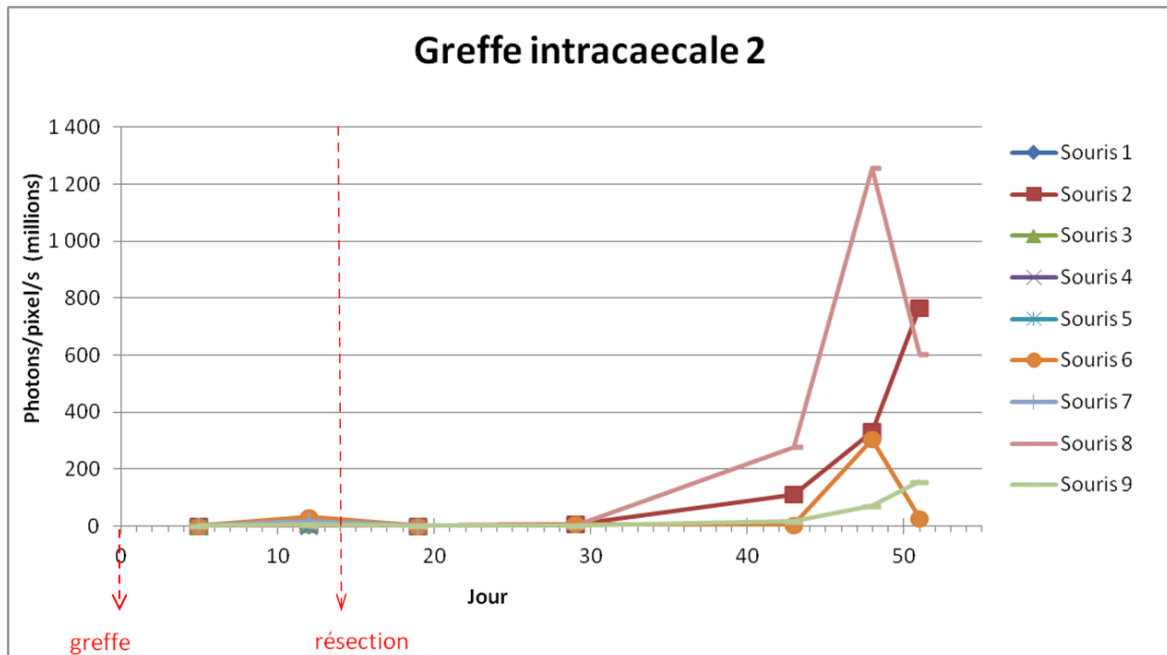


Figure 20 : Suivi par bioluminescence de la croissance tumorale pour la greffe intraecale 2 pour la période complète.

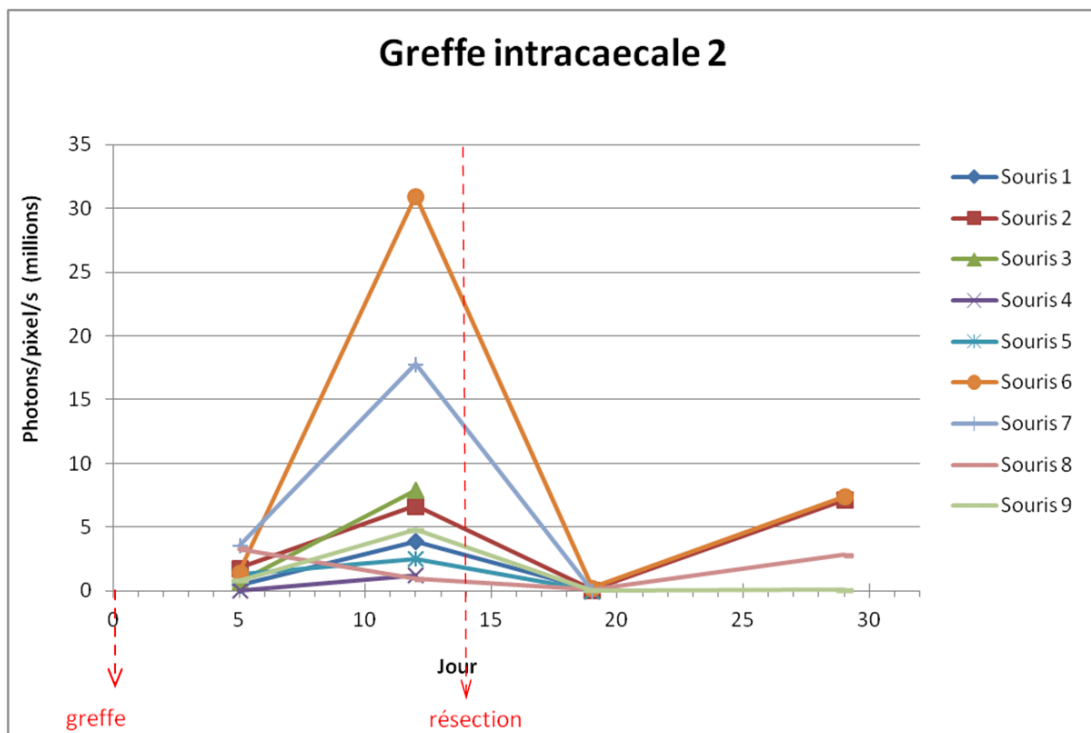


Figure 21 : Suivi par bioluminescence de la croissance tumorale pour la greffe intraecale 2 – Détail de la période J0 à J29

Les résultats de bioluminescence à J14 du deuxième lot de greffe intracaecale sont équivalents à ceux du premier lot. Cependant, cinq semaines après la résection (J53 pour le lot 1 et J48 pour le lot 2), la bioluminescence moyenne est beaucoup plus élevée pour le deuxième lot (11 millions de photons/pixel/s contre 490 millions respectivement).

Comme pour la première greffe, on constate une forte mortalité après la résection partielle du caecum. Une souris est décédée pendant la chirurgie, et quatre autres durant la semaine suivante.

L'observation histologique des caecums a démontré l'existence chez ces souris d'une forte inflammation et d'une septicémie, sans doute due à la technique chirurgicale utilisée lors de la greffe (lésion de la paroi du caecum au scalpel).

2.1.2.2. Métastases

A partir de J48, les quatre souris restantes présentent des aires bioluminescentes évoquant des métastases pulmonaires et/ou hépatiques (voir Figure 22). L'euthanasie et l'autopsie ont lieu à J52 ; les foies et les poumons sont prélevés. L'histologie révèle des métastases pulmonaires et hépatiques de petite taille (< 2mm) sur les quatre souris (voir Figure 23 et Figure 24).

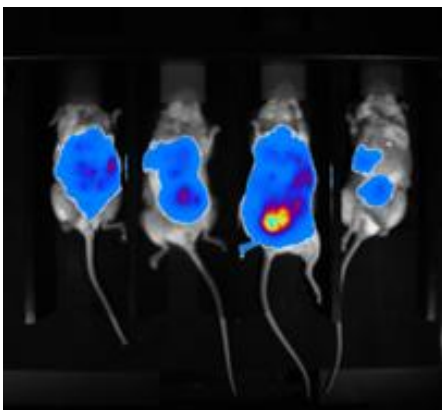


Figure 22 : Bioluminescence à J48 - greffe 2

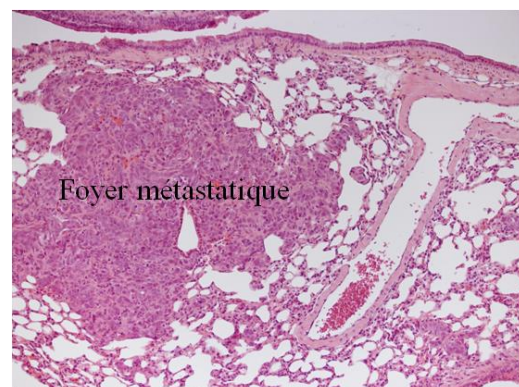


Figure 23 : Métastase pulmonaire de souris NSG à J52

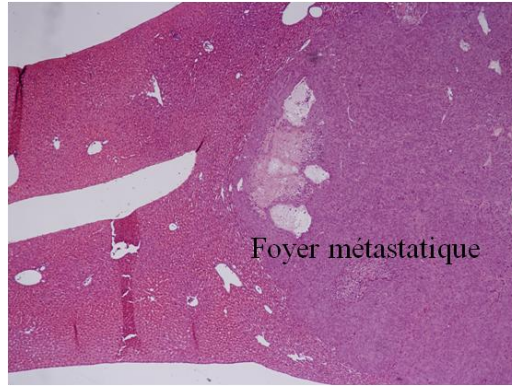


Figure 24 : Métastase hépatique de souris NSG à J52

2.1.3. Troisième lot de greffe intracaecale

L'objectif principal est de tester une nouvelle technique de greffe.

Dix souris NOD SCID subissent une greffe intracaecale avec invagination. L'exérèse de la tumeur primaire est effectuée à J21.

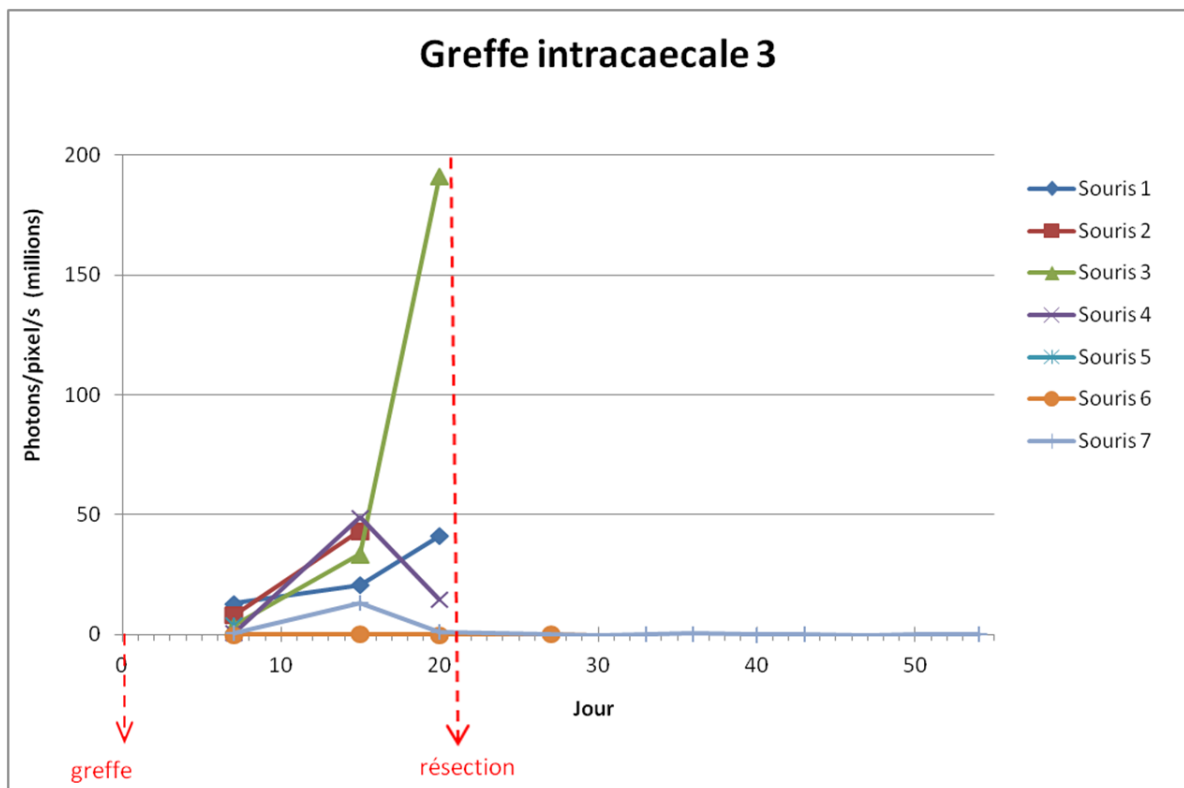


Figure 25 : Suivi par bioluminescence de la croissance tumorale pour la greffe intracaecale 3

2.1.3.1. Croissance tumorale

Avant résection, la croissance tumorale est en moyenne identique à celle du premier lot. En raison des nombreuses adhérences abdominales qui rendent l'intervention chirurgicale difficile, seules deux souris sur 10 survivent à la résection du caecum. Ces souris sont faiblement bioluminescentes au niveau du caecum. Jusqu'à la fin de l'étude à J54, il ne semble pas y avoir de croissance tumorale significative.

2.1.3.2. Métastases

Les deux souris survivantes ne présentent pas de métastases bioluminescentes en fin d'expérimentation.

2.1.4. Quatrième lot de greffe intracaecale

L'objectif est ici de comparer les techniques de greffes et les souches murines utilisées dans les greffes précédentes.

Cinq souris NOD SCID et cinq souris NSG subissent une greffe intracaecale avec invagination, et six souris NSG subissent une greffe intracaecale avec pastille. L'exérèse de la tumeur primaire est effectuée à J14 pour toutes les souris.

Ces paramètres ont été choisis pour compléter les données des études précédentes. Le but était d'une part d'évaluer l'intérêt de la technique avec invagination avec un délai de résection plus court (le lot précédent ayant subi une forte mortalité) et d'autre part de reproduire les paramètres de la deuxième greffe (souris NSG et greffe avec pastille et résection à J14) sans cette fois effectuer la lésion du caecum au scalpel qui avait créé une septicémie.

2.1.4.1. Croissance tumorale

Deux souris NSG sur 5 décèdent pendant la greffe.

Les greffes par invagination ont donné une croissance de la tumeur primaire plus rapide que pour les greffes avec pastille. En conséquence, au moment de la résection, la tumeur a envahi l'ensemble du caecum, ce qui impose son exérèse totale. La mortalité post-résection est plus élevée chez les souris greffées par invagination (4/8) que chez celles greffées avec pastille (1/6).

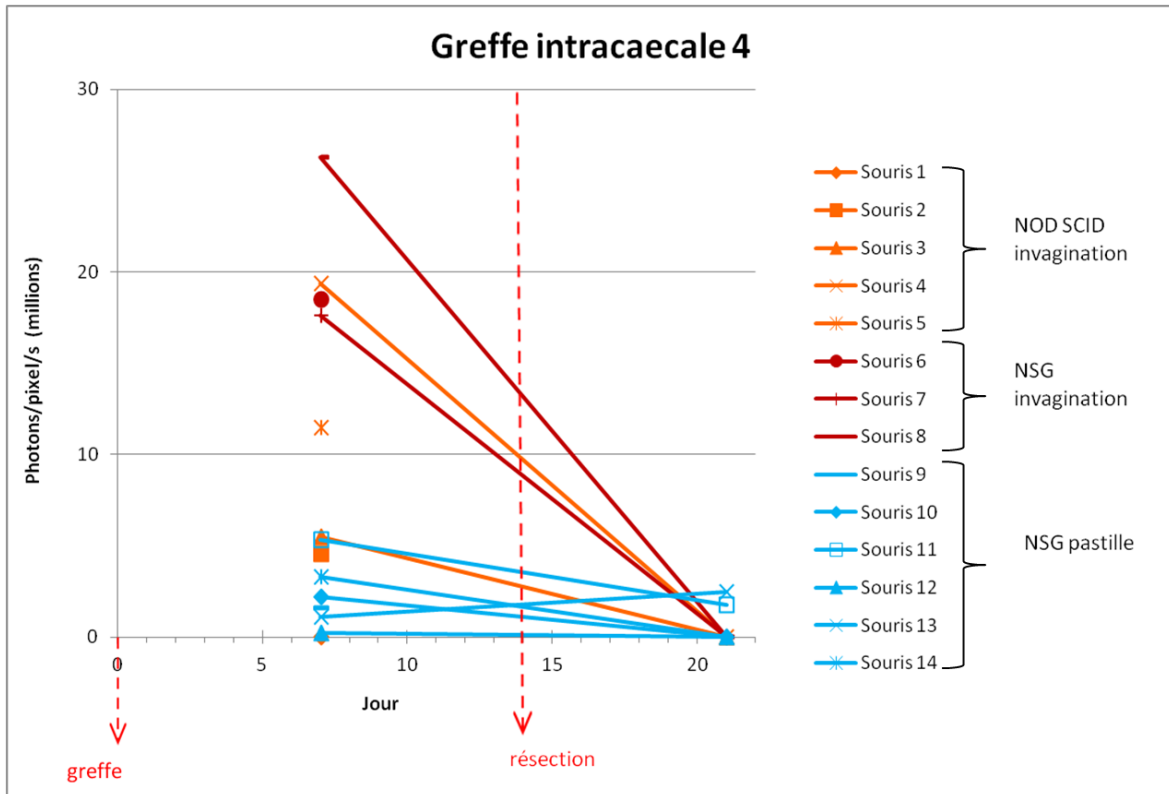


Figure 27 : Suivi par bioluminescence de la croissance tumorale pour la greffe intraecale 4 – J0 à J21

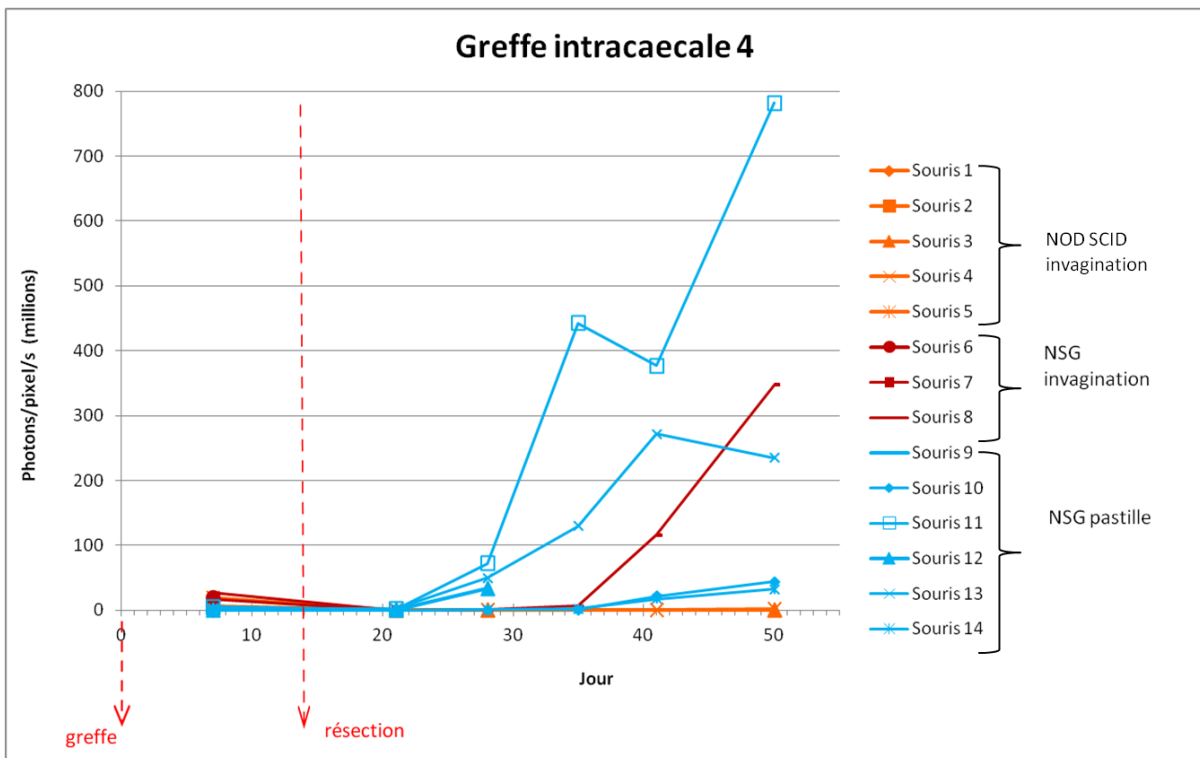


Figure 26 : Suivi par bioluminescence de la croissance tumorale pour la greffe intraecale 4

2.1.4.2. Métastases

Les deux souris NOD SCID survivantes ne présentent pas de signal de bioluminescence (pas de repousse de la tumeur primaire ni de métastases visibles).

La souris 8 (NSG invagination) et la souris 11 (NSG pastille) présentent des aires bioluminescentes compatibles avec des métastases (voir Figure 28).

L'autopsie à J50 révèle des métastases abdominales chez les souris « NSG pastille » qui étaient masquées par la bioluminescence de la repousse de la tumeur caecale (cf Tableau 7).

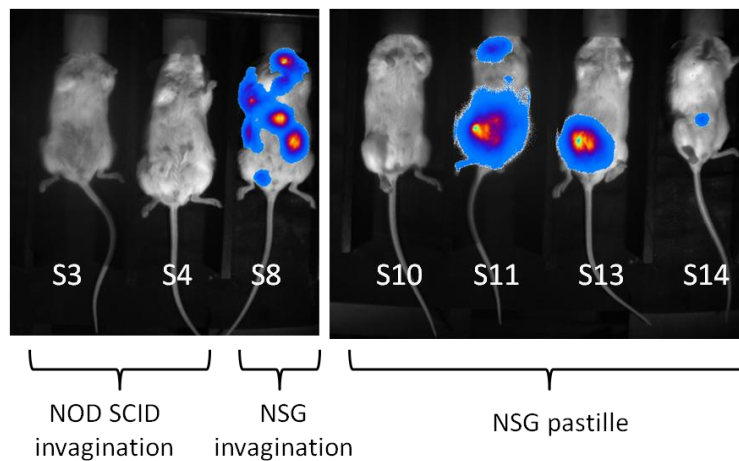


Figure 28 : Bioluminescence à J50 - greffe 4

Groupe	Souris	Métastases visibles	
		par bioluminescence	Métastases visibles à l'autopsie
NOD SCID invagination	3	Non	Poumons
	4	Non	Non
NSG invagination	8	Oui	Ovaire droit Foie Nœud lymphatique axillaire droit Nœud lymphatique mésentérique
	10	Non	Foie
NSG pastille	11	Oui	Poumons Nœud lymphatique inguinal gauche Corne utérine droite Duodénum
	13	Non	Poumons Foie
	14	non	Poumons Foie

Tableau 7 : Métastases à J50 - greffe 4

L'évaluation des métastases pulmonaires est réalisée après fixation au liquide de Bouin et un comptage lobe par lobe, les métastases apparaissant distinctement comme des nodules plus clairs :

Souris	Métastases
3	22
4	0
8	0
10	>100
11	>100
13	30
14	4

Tableau 8 : Quantification des métastases pulmonaires - greffe 4

Toutes les métastases visualisées sont de petite taille (<1mm) et réparties de façon aléatoire sur le parenchyme pulmonaire.

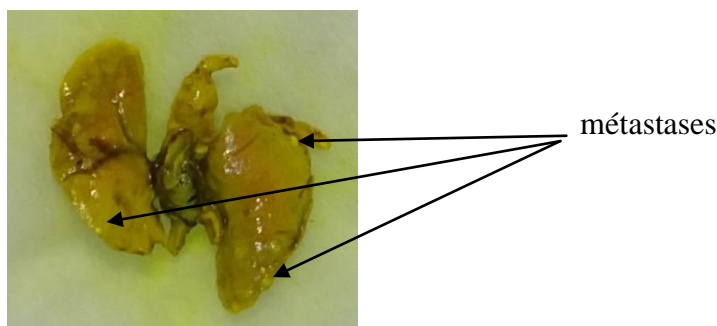


Figure 29 : Poumons de souris fixés au liquide de Bouin

2.2. Etudes pharmacologiques

2.2.1. Etude pharmacologique 1

Vingt souris NOD SCID subissent une greffe intracaecale avec pastille et dix-neuf développent une tumeur caecale. Six d'entre elles reçoivent de l'irinotecan à raison de 20mg/kg par voie intraveineuse trois fois par semaine durant deux semaines. Six autres constituent le groupe témoin et reçoivent du sérum physiologique au lieu du traitement. Le traitement est administré à J13, J15, J17, J20, J22 et J24.

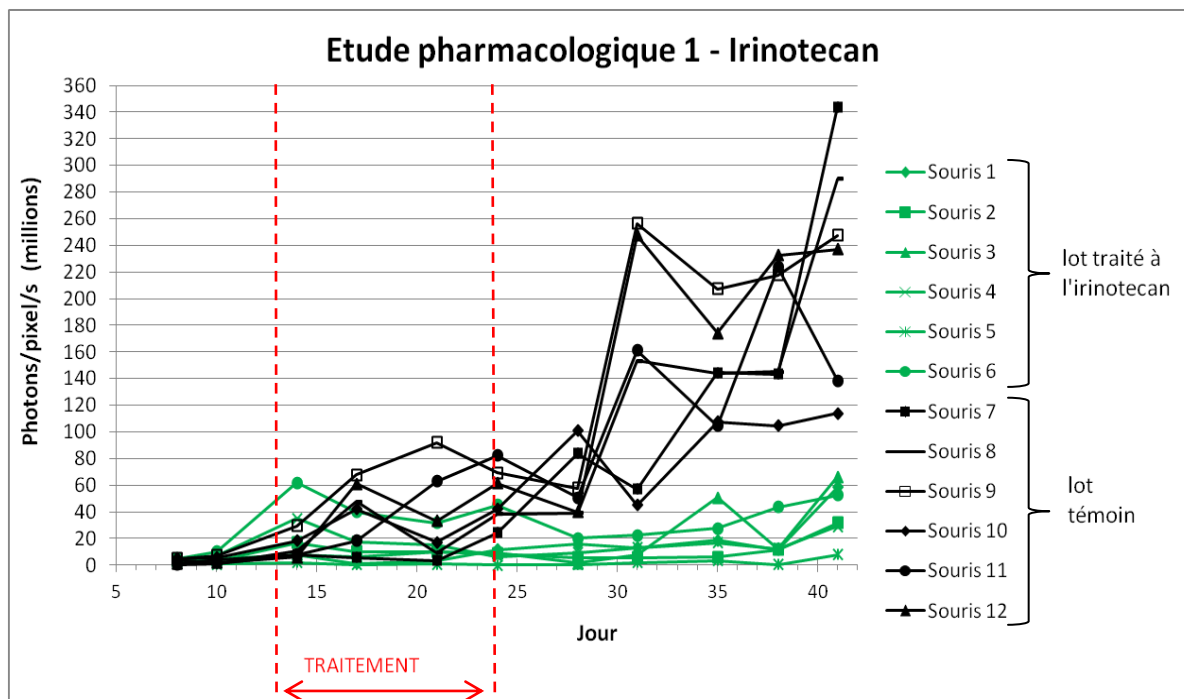


Figure 30 : Comparaison de la croissance tumorale du lot témoin et du lot traité à l'irinotecan pour l'étude pharmacologique 1

Jour	8	10	14	17	21	24	28	31	35	38	41
T/C (%)	137,4	156,9	135,2	18,4	40,4	17,6	14,1	6,4	12,2	6,6	17,4

Tableau 9 : Evolution du T/C au cours de l'étude pharmacologique 1

On observe un ralentissement significatif de la croissance tumorale du lot traité à l'irinotecan par rapport au lot témoin (voir Figure 30 et Tableau 9).

A J41, 3 souris sur 12 (Souris 7, 9 et 11) présentent des taches bioluminescentes dans la région thoracique. Elles faisaient toutes trois partie du lot témoin. Lors de l'autopsie, les poumons sont d'aspect macroscopique normal. Une fixation au liquide de Bouin permet de compter 21 métastases de petite taille sur les poumons de la souris 7, 33 sur ceux de la souris 11, mais aucune sur ceux de la souris 9 (images artefactuelles).

2.2.2. Etude pharmacologique 2

Dix souris Swiss Nude subissent une greffe sous-cutanée de tumeurs LS-174-T. Cinq d'entre elles reçoivent de l'irinotecan à raison de 20mg/kg par voie intraveineuse trois fois par semaine durant deux semaines. Les cinq autres constituent le lot témoin et reçoivent du sérum physiologique à la place du traitement. Le traitement est administré à J17, J19, J21, J24, J26 et J28. Le suivi de la croissance tumorale est effectué à la fois par la mesure de la bioluminescence et par la mesure du volume tumoral au pied à coulisse (Figure 31 et Figure 32).

Le T/C est optimal à J31 (31,2%, voir Tableau 10), cependant les souris du lot témoin ont été sacrifiées à J32 en raison de l'important développement des tumeurs sous-cutanées et de leur ulcération. L'effet de l'irinotecan sur la croissance tumorale est modéré pour ce modèle ectopique d'adénocarcinome colorectal.

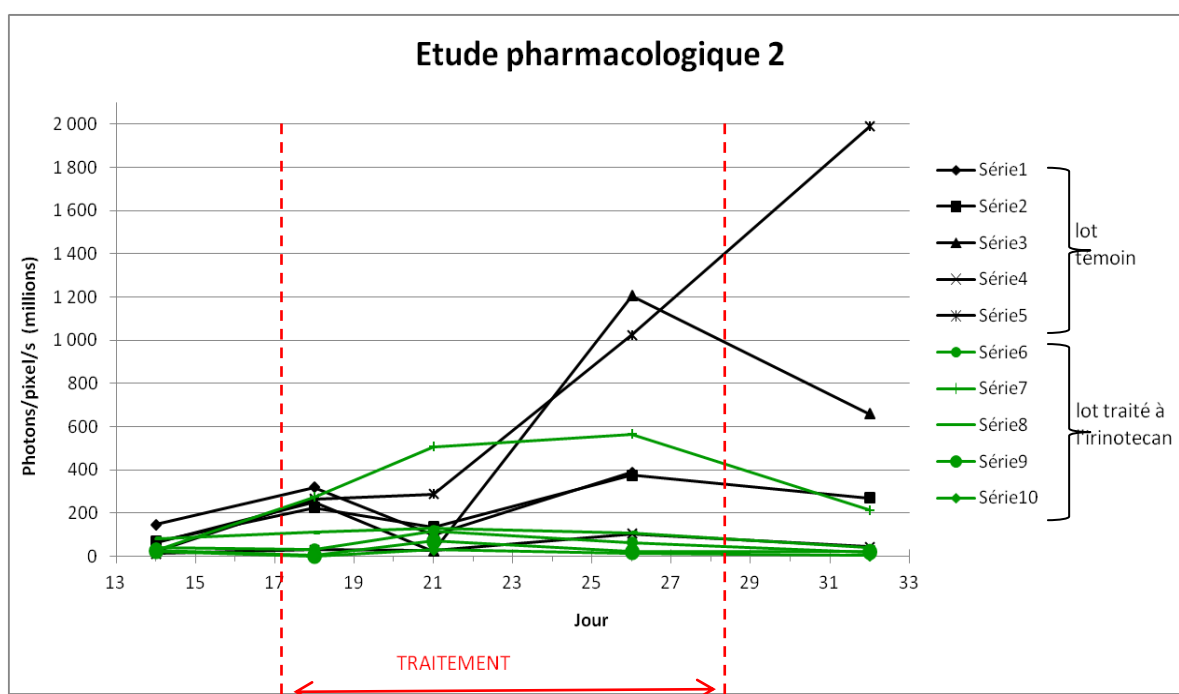


Figure 31 : Comparaison de la croissance tumorale du lot témoin et du lot traité à l'irinotecan pour l'étude pharmacologique 2 par bioluminescence

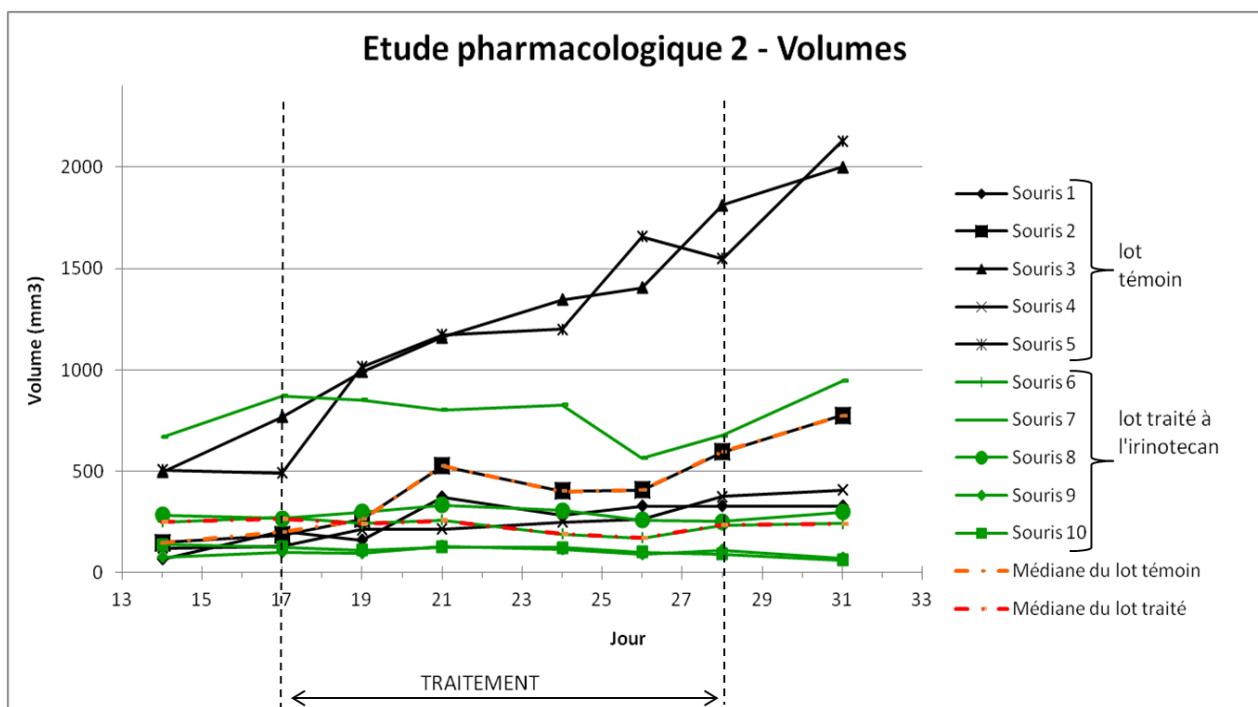


Figure 32 : Comparaison de la croissance tumorale du lot témoin et du lot traité à l'irinotecan pour l'étude pharmacologique 2 par mesure du volume tumoral au pied à coulisse

Jour	14	17	19	21	24	26	28	31
T/C (%)	168.8	131.8	92.2	49.0	47.7	42.2	39.4	31.2

Tableau 10 : Evolution du T/C au cours de l'étude pharmacologique 2

2.3. Synthèse des résultats

Obtention de métastases

Pour les souris NOD SCID ayant subi une greffe intracaecale avec pastille et résection à J21, on obtient des métastases pulmonaires chez 1 souris sur 4.

Pour les souris NSG ayant subi une greffe intracaecale avec pastille et lésion de la paroi caecale, et résection à J14, on obtient des métastases pulmonaires et hépatiques chez 4 souris sur 4.

Pour les souris NOD SCID ayant subi une greffe intracaecale avec invagination et résection à J21, on n'obtient pas de métastases chez les 2 souris survivantes.

Pour les souris NOD SCID ayant subi une greffe intracaecale avec invagination du caecum et résection à J14, on obtient des métastases pulmonaires chez 1 souris sur 2.

Pour les souris NSG ayant subi une greffe intracaecale avec invagination et résection à J14, on obtient des métastases hépatiques, ovariennes et nodales chez la seule souris survivante.

Pour les souris NSG ayant subi une greffe intracaecale avec pastille et résection à J14, on obtient des métastases chez 4 souris sur 4. Il s'agit de métastases pulmonaires chez 3 souris sur 4 et de métastases hépatiques chez 2 souris sur 4. De plus, une souris présente des métastases nodales et utérines.

Effet du traitement de référence sur les modèles testés

L'irinotecan a une activité marginale sur la croissance de la tumeur primaire sous-cutanée et une activité modérée sur la croissance de la tumeur primaire orthotopique.

Son effet sur la croissance des métastases n'a pu être évalué.

3. Discussion

Les expérimentations réalisées dans le cadre de ce stage permettent de mettre en lumière la complexité de la modélisation chez la souris de la maladie cancéreuse métastatique. Elles correspondent à une phase de mise au point de modèles d'études et d'évaluation de leurs avantages et inconvénients respectifs. Les résultats obtenus sur les premiers lots nous ont guidés pour l'adaptation ultérieure des protocoles. Ainsi, la résection de la tumeur primaire, initialement prévue trois semaines après la greffe, a été avancée à deux semaines après avoir constaté que la vitesse de croissance importante de la tumeur rendait difficile son exérèse à J21. De même, l'idée d'abraser la paroi caecale avant d'y coller le greffon a été abandonnée quand il s'est avéré que cela favorisait les septicémies.

Les limitations ont principalement résidé dans la mortalité importante des animaux au cours des expérimentations. L'amélioration du geste chirurgical, le raccourcissement du délai de résection et l'utilisation d'analgésiques devraient faire baisser cette mortalité.

Suivi par bioluminescence

L'imagerie par bioluminescence présente de nombreux avantages. Cependant, elle ne détecte pas toutes les métastases et ne permet pas de s'affranchir de l'examen histopathologique des organes. Dans le lot 4 de greffe caecale, la repousse de la tumeur

primaire, fortement bioluminescente, masque les métastases abdominales chez une souris. De plus, quatre souris présentent à l'autopsie de petites métastases pulmonaires et hépatiques qui n'étaient pas visibles par bioluminescence. Cela peut s'expliquer par l'absorption de photons par les tissus, par un réglage mal adapté de la caméra CCD lors de l'acquisition des images, ou encore par la perte de l'expression du gène Luc par certaines métastases.

Comparaison des souches murines

La souche NSG, plus immunodéprimée que la souche NOD SCID, semble permettre un meilleur taux de prise de la tumeur, une croissance plus rapide et une dissémination plus large des métastases. Toutefois, la faible taille des effectifs de souris et le taux de mortalité variable selon les lots compliquent l'interprétation des résultats.

Comparaison des techniques de greffe

Le taux de prise tumorale (nombre de souris développant une tumeur par rapport au nombre de souris greffées ayant survécu) est proche de 100% pour toutes les greffes orthotopiques réalisées, et bien plus faible pour les greffes sous-cutanées. Cependant les greffes sous-cutanées sont réalisées sur souris Swiss Nude, moins immunodéprimées que les souris NOD SCID ou NSG, ce qui peut influencer le taux de prise tout autant que la technique de greffe. De plus, la chirurgie invasive nécessaire pour réaliser une greffe orthotopique entraîne une mortalité importante, tandis que la perte d'animaux consécutive à une greffe sous-cutanée est nulle pour cette étude. Les greffes orthotopiques, qui récapitulent mieux la physiopathologie de la maladie cancéreuse que les greffes sous-cutanées (cf. paragraphe 1.4.1 dans la partie bibliographique cette thèse), ont donc été bien plus coûteuses en terme de matériel, d'animaux et de temps.

La croissance de la tumeur primaire semble plus rapide avec la technique de greffe par invagination (bioluminescence plus élevée en moyenne) qu'avec la greffe pastille, mais cette technique a également résulté dans la perte du plus grand nombre de souris. En effet, la rupture de la muqueuse caecale et la pénétration de la tumeur à l'intérieur du caecum souvent observées avec cette technique imposaient souvent la résection totale du caecum. En outre, cette technique ne semble pas permettre un développement accru des métastases.

Comparaison des délais de résection

Pour la résection, un compromis est à trouver entre la limitation de la croissance de la tumeur primaire et la dissémination des métastases : plus la résection a lieu tard, plus la

chirurgie est compliquée et dangereuse pour l'animal ; mais si elle a lieu trop tôt, les métastases n'auront en théorie pas eu le temps de disséminer suffisamment. Cependant, un nombre croissant d'auteurs suggèrent que la dissémination des métastases n'est pas forcément un événement tardif dans la maladie cancéreuse, et intervient peut-être avant même que la tumeur primaire ne soit détectable (Coghlin and Murray 2010).

Pour notre étude, la résection à J14 offre de meilleurs résultats qu'à J21 (mortalité moindre), sans baisse observable du taux de métastases. Cependant la forte mortalité globale et la petite taille des échantillons rendent difficile une vraie comparaison des taux de métastases en fonction du délai de résection.

La résection chirurgicale de la tumeur primaire est indispensable pour pouvoir observer d'éventuelles métastases abdominales par bioluminescence. De plus, cette résection pourrait indirectement provoquer le développement de métastases. En effet une augmentation de la croissance des métastases après résection de la tumeur primaire a été démontrée dans plusieurs modèles murins, et il a été proposé que chez l'humain, le traitement chirurgical du cancer du sein pouvait accélérer le développement métastatique de la maladie (Hanin and Korosteleva 2010). De même, pour le cancer colorectal, il a été démontré que la résection de la tumeur primaire inhibait l'apoptose des métastases et stimulait le développement des cellules prolifératives (Peeters, de Waal et al. 2006).

Une solution alternative serait de ne pas effectuer de résection, afin de réduire drastiquement la mortalité durant l'étude, et de rechercher les métastases lors de l'examen nécropsique et en histopathologie. L'imagerie par bioluminescence servirait alors à suivre l'évolution de la charge tumorale globale.

En résumé, la diffusion de métastases la plus efficace a été obtenue sur des souris NSG greffées avec la technique de la pastille, avec une résection à 14 jours. Cependant le taux de métastases et leur variété de localisation restent suboptimaux. L'étape suivante pour tenter d'augmenter l'agressivité des tumeurs LS-174-T est de récupérer des métastases hépatiques produites grâce à ce modèle afin de les mettre en culture pour une greffe orthotopique ultérieure.

Effet des traitements de référence :

L'irinotecan a démontré une efficacité modérée sur la tumeur primaire dans le modèle orthotopique testé. Les souris traitées n'ont pas développé de métastases, contrairement aux souris du lot témoin (3 souris sur 6). Cependant l'effet de la molécule sur des métastases déjà installées n'a pas été évalué. Or c'est cet effet qui est principalement recherché en clinique : chez l'humain, l'irinotecan est utilisé pour traiter les cancers colorectaux résistants au 5-fluorouracile ou comme traitement de première ligne des cancers du colon métastasés (Cunningham, Maroun et al. 2001; Vanhoefer, Harstrick et al. 2001).

Pour évaluer cet effet sur le modèle orthotopique, il faudrait attendre l'apparition des métastases avant de commencer le traitement, et donc sans doute procéder à une résection de la tumeur primaire pour éviter qu'une croissance trop rapide de celle-ci n'affecte l'état général des souris avant qu'elles aient eu le temps de présenter des métastases.

CONCLUSION

Cette étude bibliographique et expérimentale montre la complexité de reproduire la maladie cancéreuse en général, et son évolution métastatique a fortiori.

Les nouveaux modèles murins développés sont de plus en plus prometteurs du point de vue de la reproduction de la pathologie humaine, mais restent des modèles avec des limitations. De manière générale, ils donnent moins de métastases que chez l'homme, et ne reproduisent qu'imparfaitement le déroulement de la maladie. Le fort taux d'échec des agents anticancéreux en phase clinique, bien supérieur par exemple à celui des médicaments développés contre les maladies cardio-vasculaires (Hutchinson and Kirk 2011), suggère que la plupart des modèles utilisés pour leur validation en phase préclinique sont loin d'être optimaux.

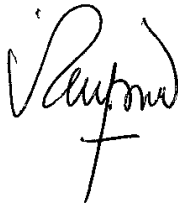
Les modèles orthotopiques représentent une amélioration sur de nombreux plans par rapport aux modèles ectopiques, mais souffrent également des limitations inhérentes à de nombreux modèles de tumeur. On tente de reproduire le plus fidèlement possible les conditions de développement de la maladie chez l'humain, sans pour autant tout connaître des mécanismes biologiques sous-jacents. Cela n'est pas forcément suffisant pour obtenir des modèles précliniques complets. Une compréhension profonde des mécanismes biologiques à l'œuvre est certainement requise pour améliorer le pouvoir prédictif des modèles utilisés. Cependant, chacun des modèles développés apporte des éléments nouveaux de connaissance de la maladie cancéreuse.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, **Isabelle RAYMOND-LETRON**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **LOPEZ Mélinda** intitulée « *Les modèles murins des cancers : synthèse bibliographique et contribution à la mise en place d'un modèle orthotopique de cancer du côlon pour des études précliniques d'évaluation thérapeutique* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 22 novembre 2013
Docteur **Isabelle RAYMOND-LETRON**
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur **Alain MILON**




Vu :
Le Président du jury :
Professeure **Monique COURTADE SAÏDI**



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur **Bertrand MONTHUBERT**

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,

Le vice-Président du CEVU




Arnaud LE PADELLEC

Mlle **LOPEZ Mélinda**
a été admis(e) sur concours en : 2007
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 30/06/2011
a validé son année d'approfondissement le : 03/05/2012



Université
de Toulouse

Bibliographie

AIKENS, R. S., D. A. AGARD, et al. (1989). "Solid-state imagers for microscopy." Methods Cell Biol **29**: 291-313.

AN, Z., P. JIANG, et al. (1999). "Development of a high metastatic orthotopic model of human renal cell carcinoma in nude mice: benefits of fragment implantation compared to cell-suspension injection." Clin Exp Metastasis **17**(3): 265-270.

ANDROUTSOS, G. and M. KARAMANOOU (2009). "Bernard Peyrilhe (1737-1804) and the first experimental transmission of cancer." J BUON **14**(4): 731-733.

BASHFORD, E. F. (1907). "The application of experiment to the study of cancer." Science progress in the twentieth century : a quarterly journal of scientific work & thought **2**.

BECHER, O. J. and E. C. HOLLAND (2006). "Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies." Cancer Res **66**(7): 3355-3358, discussion 3358-3359.

BEGLEY, C. G. and L. M. ELLIS (2012). "Drug development: Raise standards for preclinical cancer research." Nature **483**(7391): 531-533.

BHOWMICK, N. A. and H. L. MOSES (2005). "Tumor-stroma interactions." Curr Opin Genet Dev **15**(1): 97-101.

BHULLAR, J. S., G. SUBHAS, et al. (2011). "A novel nonoperative orthotopic colorectal cancer murine model using electrocoagulation." J Am Coll Surg **213**(1): 54-60; discussion 60-51.

BIBBY, M. C. (2004). "Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages." Eur J Cancer **40**(6): 852-857.

BILLOTTE, C. and J. JOUANNEAU (2008). "[Tumor-stroma interactions]." Bull Cancer **95**(1): 51-56.

BOIVIN, G. P., K. WASHINGTON, et al. (2003). "Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations." Gastroenterology **124**(3): 762-777.

BOSMA, M. J. (1992). "B and T cell leakiness in the scid mouse mutant." Immunodeficiency Rev **3**(4): 261-276.

BOSMA, M. J. and A. M. CARROLL (1991). "The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses." Annu Rev Immunol **9**: 323-350.

BOYLE, R. (1667). "Observations and tryals about the Resemblances and Differences between a burning coal and Shining Wood." Phil. Trans. R. Soc. Lond. **2**: 605-612.

BRESALIER, R. S., S. E. RAPER, et al. (1987). "A new animal model for human colon cancer metastasis." Int J Cancer **39**(5): 625-630.

- BURMA, S. and D. J. CHEN (2004). "Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 909-918.
- CABAUD, O. (2011). "Etablissement d'une banque de xéno greffes de tumeurs mammaires primaires humaines par injection orthotopique dans la glande mammaire murine humanisée." STAL **37**.
- CAPPELL, M. S. (2005). "The pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis of colon cancer and adenomatous polyps." Med Clin North Am **89**(1): 1-42, vii.
- CEPPEDES, M. V., C. ESPINA, et al. (2007). "Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites." Am J Pathol **170**(3): 1077-1085.
- CHOY, G., S. O'CONNOR, et al. (2003). "Comparison of noninvasive fluorescent and bioluminescent small animal optical imaging." Biotechniques **35**(5): 1022-1026, 1028-1030.
- COGHLIN, C. and G. I. MURRAY (2010). "Current and emerging concepts in tumour metastasis." J Pathol **222**(1): 1-15.
- COLNOT, S., M. NIWA-KAWAKITA, et al. (2004). "Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers." Lab Invest **84**(12): 1619-1630.
- CUNNINGHAM, D., J. MAROUN, et al. (2001). "Optimizing the use of irinotecan in colorectal cancer." Oncologist **6 Suppl 4**: 17-23.
- DAVID, A. R. and M. R. ZIMMERMAN (2010). "Cancer: an old disease, a new disease or something in between?" Nat Rev Cancer **10**(10): 728-733.
- DE VISSER, K. E., A. EICHTEN, et al. (2006). "Paradoxical roles of the immune system during cancer development." Nat Rev Cancer **6**(1): 24-37.
- DICKINSON, P. J., R. A. LECOULTEUR, et al. (2010). "Canine spontaneous glioma: a translational model system for convection-enhanced delivery." Neuro Oncol **12**(9): 928-940.
- DONIGAN, M., L. S. NORCROSS, et al. (2009). "Novel murine model for colon cancer: non-operative trans-anal rectal injection." J Surg Res **154**(2): 299-303.
- EDELMANN, W., K. YANG, et al. (1999). "Tumorigenesis in Mlh1 and Mlh1/Apc1638N mutant mice." Cancer Res **59**(6): 1301-1307.
- FAIVRE, J., V. DANCOURT, et al. (2004). "Reduction in colorectal cancer mortality by fecal occult blood screening in a French controlled study." Gastroenterology **126**(7): 1674-1680.
- FAUZEE, N. J. (2011). "Taxanes: promising anti-cancer drugs." Asian Pac J Cancer Prev **12**(4): 837-851.
- FAZZI, R., C. MANETTI, et al. (2010). "Areas with high soil percolation by herbicides have higher incidence of low-grade non-Hodgkin lymphomas." Ann Hematol **89**(9): 941-943.

- FEITSMA, H. and E. CUPPEN (2008). "Zebrafish as a cancer model." Mol Cancer Res **6**(5): 685-694.
- FIDLER, I. J. (1990). "Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture." Cancer Res **50**(19): 6130-6138.
- FIDLER, I. J., C. WILMANNNS, et al. (1994). "Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment." Cancer Metastasis Rev **13**(2): 209-222.
- FLANAGAN, S. P. (1966). "'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse." Genet Res **8**(3): 295-309.
- FLORENTIN-NIELSEN, R. (1995). Cosmic Ray Events and Natural Radioactivity in CCD Cryostats. IAU Symposium **167**.
- FU, X., F. GUADAGNI, et al. (1992). "A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5645-5649.
- FU, X., H. HERRERA, et al. (1992). "Extensive liver metastasis from human colon cancer in nude and scid mice after orthotopic onplantation of histologically-intact human colon carcinoma tissue." Anticancer Res **12**(5): 1395-1397.
- FURUKAWA, T., T. KUBOTA, et al. (1993). "A metastatic model of human colon cancer constructed using cecal implantation of cancer tissue in nude mice." Surg Today **23**(5): 420-423.
- GAVAZZA, A., S. PRESCIUTTINI, et al. (2001). "Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners." J Vet Intern Med **15**(3): 190-195.
- GIOVANELLA, B. C., J. S. STEHLIN, et al. (1989). "DNA topoisomerase I--targeted chemotherapy of human colon cancer in xenografts." Science **246**(4933): 1046-1048.
- GLICKMAN, L. T., L. M. DOMANSKI, et al. (1983). "Mesothelioma in pet dogs associated with exposure of their owners to asbestos." Environ Res **32**(2): 305-313.
- GORDON, I., M. PAOLONI, et al. (2009). "The Comparative Oncology Trials Consortium: using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development pathway." PLoS Med **6**(10): e1000161.
- GORDON, I. K. and C. KHANNA (2010). "Modeling opportunities in comparative oncology for drug development." ILAR J **51**(3): 214-220.
- GREEN, A. A. and W. D. MCELROY (1956). "Crystalline firefly luciferase." Biochim Biophys Acta **20**(1): 170-176.
- GREEN, M. C., C. A. AZAR, et al. (1973). "Strain differences in susceptibility to the teratogenic effect of acetazolamide in mice." Teratology **8**(2): 143-145.
- GROOM, D. (2002). "Cosmic rays and other nonsense in astronomical CCD imagers." Experimental Astronomy(14).

- HAJDU, S. I. (2004). "Greco-Roman thought about cancer." Cancer **100**(10): 2048-2051.
- HANIN, L. and O. KOROSTELEVA (2010). "Does extirpation of the primary breast tumor give boost to growth of metastases? Evidence revealed by mathematical modeling." Math Biosci **223**(2): 133-141.
- HARVEY, E. N. (1957). A history of luminescence : from the earliest times until 1900. Philadelphia,, American Philosophical Society.
- HEIJSTEK, M. W., O. KRANENBURG, et al. (2005). "Mouse models of colorectal cancer and liver metastases." Dig Surg **22**(1-2): 16-25.
- HIRAOKA, Y., J. W. SEDAT, et al. (1987). "The use of a charge-coupled device for quantitative optical microscopy of biological structures." Science **238**(4823): 36-41.
- HOFFMAN, R. (2002). "Green fluorescent protein imaging of tumour growth, metastasis, and angiogenesis in mouse models." Lancet Oncol **3**(9): 546-556.
- HOFFMAN, R. M. (1999). "Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic." Invest New Drugs **17**(4): 343-359.
- HOLLAND, E. C. (2004). Mouse models of human cancer. Hoboken, N.J., Wiley-Liss.
- HUTCHINSON, L. and R. KIRK (2011). "High drug attrition rates--where are we going wrong?" Nat Rev Clin Oncol **8**(4): 189-190.
- INABA, M., T. KOBAYASHI, et al. (1988). "Pharmacokinetic approach to rational therapeutic doses for human tumor-bearing nude mice." Jpn J Cancer Res **79**(4): 509-516.
- INABA, M., T. KOBAYASHI, et al. (1989). "Evaluation of antitumor activity in a human breast tumor/nude mouse model with a special emphasis on treatment dose." Cancer **64**(8): 1577-1582.
- INABA, M., T. TASHIRO, et al. (1988). "Responsiveness of human gastric tumors implanted in nude mice to clinically equivalent doses of various antitumor agents." Jpn J Cancer Res **79**(4): 517-522.
- JULIEN, S., A. MERINO-TRIGO, et al. (2012). "Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer." Clin Cancer Res **18**(19): 5314-5328.
- KAMB, A. (2005). "What's wrong with our cancer models?" Nat Rev Drug Discov **4**(2): 161-165.
- KELLAND, L. R. (2004). "Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development." Eur J Cancer **40**(6): 827-836.
- KELSEY, J. L., A. S. MOORE, et al. (1998). "Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs." Epidemiol Rev **20**(2): 204-217.

- KERBEL, R. S. (2003). "Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved." Cancer Biol Ther **2**(4 Suppl 1): S134-139.
- KHANNA, C., K. LINDBLAD-TOH, et al. (2006). "The dog as a cancer model." Nat Biotechnol **24**(9): 1065-1066.
- KIRSTEIN, M. N., P. J. HOUGHTON, et al. (2001). "Relation between 9-aminocamptothecin systemic exposure and tumor response in human solid tumor xenografts." Clin Cancer Res **7**(2): 358-366.
- KOBAEK-LARSEN, M., I. THORUP, et al. (2000). "Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: comparative aspects with those in humans." Comp Med **50**(1): 16-26.
- KOPETZ, S., R. LEMOS, et al. (2012). "The promise of patient-derived xenografts: the best laid plans of mice and men." Clin Cancer Res **18**(19): 5160-5162.
- KREUTER, K. A., N. EL-ABBADI, et al. (2008). "Development of a rabbit pleural cancer model by using VX2 tumors." Comp Med **58**(3): 287-293.
- KUO, C., O. COQUOZ, et al. (2007). "Three-dimensional reconstruction of in vivo bioluminescent sources based on multispectral imaging." J Biomed Opt **12**(2): 024007.
- KUO, T. H., T. KUBOTA, et al. (1993). "Site-specific chemosensitivity of human small-cell lung carcinoma growing orthotopically compared to subcutaneously in SCID mice: the importance of orthotopic models to obtain relevant drug evaluation data." Anticancer Res **13**(3): 627-630.
- KURAGUCHI, M., K. YANG, et al. (2001). "The distinct spectra of tumor-associated Apc mutations in mismatch repair-deficient Apc1638N mice define the roles of MSH3 and MSH6 in DNA repair and intestinal tumorigenesis." Cancer Res **61**(21): 7934-7942.
- LEHNINGER, A. L., D. L. NELSON, et al. (2008). Lehninger principles of biochemistry. New York, W.H. Freeman.
- LEVIN, I. (1912). "Tumor Inoculation into Organs and the Analogy between Human Cancer and the Tumors of White Mice and White Rats." J Exp Med **16**(2): 155-164.
- LORENZ, E., STEWART H.L. (1941). "Intestinal carcinoma and other lesions in mice following oral administration of 1,2,5,6-dibenzanthracene and 20-methylcholanthrene." J Natl Cancer Inst Monogr **31**.
- MAEKAWA, A. (1994). "Pathobiology of the aging rat." ILSI Press, Washington **2**.
- MAEKAWA, A., M. ENOMOTO, H. IWATA (1996). "Pathobiology of the aging mouse." ILSI Press, Washington **2**.
- MARTIN, D. S., M. E. BALIS, et al. (1986). "Role of murine tumor models in cancer treatment research." Cancer Res **46**(4 Pt 2): 2189-2192.

MARUO, K., Y. UEYAMA, et al. (1990). "Responsiveness of subcutaneous human glioma xenografts to various antitumor agents." Anticancer Res **10**(1): 209-212.

MCNEES, A. L., R. A. VILCHEZ, et al. (2009). "SV40 lymphomagenesis in Syrian golden hamsters." Virology **384**(1): 114-124.

MEGETTO, F., C. MULLER, et al. (1996). "Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferations in severe combined immunodeficient mice transplanted with Hodgkin's disease lymph nodes: implications of EBV-positive bystander B lymphocytes rather than EBV-infected Reed-Sternberg cells." Blood **87**(6): 2435-2442.

MYERS, J. N., F. C. HOLSINGER, et al. (2002). "An orthotopic nude mouse model of oral tongue squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **8**(1): 293-298.

NAITO, S., A. C. VON ESCHENBACH, et al. (1987). "Different growth pattern and biologic behavior of human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice." J Natl Cancer Inst **78**(2): 377-385.

NELSON, A. L., S. A. ALGON, et al. (2003). "Magnetic resonance imaging of patched heterozygous and xenografted mouse brain tumors." J Neurooncol **62**(3): 259-267.

PANG, L. Y. and D. J. ARGYLE (2009). "Using naturally occurring tumours in dogs and cats to study telomerase and cancer stem cell biology." Biochim Biophys Acta **1792**(4): 380-391.

PAOLONI, M. and C. KHANNA (2008). "Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans." Nat Rev Cancer **8**(2): 147-156.

PEETERS, C. F., R. M. DE WAAL, et al. (2006). "Outgrowth of human liver metastases after resection of the primary colorectal tumor: a shift in the balance between apoptosis and proliferation." Int J Cancer **119**(6): 1249-1253.

POHL, C., A. HOMBACH, et al. (2000). "Chronic inflammatory bowel disease and cancer." Hepatogastroenterology **47**(31): 57-70.

PORRELLO, A., P. CARDELLI, et al. (2004). "Pet models in cancer research: general principles." J Exp Clin Cancer Res **23**(2): 181-193.

POUR, P., F. W. KRUGER, et al. (1974). "Cancer of the pancreas induced in the Syrian golden hamster." Am J Pathol **76**(2): 349-358.

PRINZ, F., T. SCHLANGE, et al. (2011). "Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets?" Nat Rev Drug Discov **10**(9): 712.

PUAUX, A. L., L. C. ONG, et al. (2011). "A comparison of imaging techniques to monitor tumor growth and cancer progression in living animals." Int J Mol Imaging **2011**: 321538.

RANGARAJAN, A. and R. A. WEINBERG (2003). "Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice." Nat Rev Cancer **3**(12): 952-959.

REIF, J. S. (2011). "Animal sentinels for environmental and public health." Public Health Rep **126 Suppl 1**: 50-57.

- RIBATTI, D., G. MANGIALARDI, et al. (2006). "Stephen Paget and the 'seed and soil' theory of metastatic dissemination." Clin Exp Med **6**(4): 145-149.
- ROBERTS, T. G., JR., B. H. GOULART, et al. (2004). "Trends in the risks and benefits to patients with cancer participating in phase 1 clinical trials." JAMA **292**(17): 2130-2140.
- ROSENBERG, D. W., C. GIARDINA, et al. (2009). "Mouse models for the study of colon carcinogenesis." Carcinogenesis **30**(2): 183-196.
- ROWELL, J. L., D. O. MCCARTHY, et al. (2011). "Dog models of naturally occurring cancer." Trends Mol Med **17**(7): 380-388.
- RYGAARD, J. and C. O. POVLSEN (1969). "Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice." Acta Pathol Microbiol Scand **77**(4): 758-760.
- SATO, A., B. KLAUNBERG, et al. (2004). "In vivo bioluminescence imaging." Comp Med **54**(6): 631-634.
- SCHUH, J. C. (2004). "Trials, tribulations, and trends in tumor modeling in mice." Toxicol Pathol **32 Suppl 1**: 53-66.
- STANDOP, J., M. B. SCHNEIDER, et al. (2001). "Experimental animal models in pancreatic carcinogenesis: lessons for human pancreatic cancer." Dig Dis **19**(1): 24-31.
- SUGGITT, M. and M. C. BIBBY (2005). "50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target-driven approaches." Clin Cancer Res **11**(3): 971-981.
- TAKASHIMA-UEBELHOER, B. B., L. G. BARBER, et al. (2012). "Household chemical exposures and the risk of canine malignant lymphoma, a model for human non-Hodgkin's lymphoma." Environ Res **112**: 171-176.
- TAKETO, M. M. and W. EDELMANN (2009). "Mouse models of colon cancer." Gastroenterology **136**(3): 780-798.
- TAKIMOTO, C. H. (2001). "Why drugs fail: of mice and men revisited." Clin Cancer Res **7**(2): 229-230.
- TALMADGE, J. E., R. K. SINGH, et al. (2007). "Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer." Am J Pathol **170**(3): 793-804.
- TASHIRO, T., M. INABA, et al. (1989). "Responsiveness of human lung cancer/nude mouse to antitumor agents in a model using clinically equivalent doses." Cancer Chemother Pharmacol **24**(3): 187-192.
- TEICHER, B. A. (2006). "Tumor models for efficacy determination." Mol Cancer Ther **5**(10): 2435-2443.
- TEICHER, B. A. (2011). Tumor models in cancer research. New York, Humana Press.
- THILLAUD, P. L. (2006). "[Paleopathology of cancers]." Med Secoli **18**(3): 755-776.

- THOMSON, S. A., E. KENNERLY, et al. (2005). "Microarray analysis of differentially expressed genes of primary tumors in the canine central nervous system." Vet Pathol **42**(5): 550-558.
- VAIL, D. M. and E. G. MACEWEN (2000). "Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer." Cancer Invest **18**(8): 781-792.
- VAIRAKTARIS, E., S. SPYRIDONIDOU, et al. (2008). "The hamster model of sequential oral oncogenesis." Oral Oncol **44**(4): 315-324.
- VAN DYKE, T. and T. JACKS (2002). "Cancer modeling in the modern era: progress and challenges." Cell **108**(2): 135-144.
- VANHOEFER, U., A. HARSTRICK, et al. (2001). "Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: clinical overview." J Clin Oncol **19**(5): 1501-1518.
- VIVIANI, V. R. (2002). "The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases." Cell Mol Life Sci **59**(11): 1833-1850.
- VOSKOGLOU-NOMIKOS, T., J. L. PATER, et al. (2003). "Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models." Clin Cancer Res **9**(11): 4227-4239.
- WELCH, J. P. and G. A. DONALDSON (1979). "The clinical correlation of an autopsy study of recurrent colorectal cancer." Ann Surg **189**(4): 496-502.
- WITHROW, S. J., B. E. POWERS, et al. (1991). "Comparative aspects of osteosarcoma. Dog versus man." Clin Orthop Relat Res(270): 159-168.
- YANG, H., F. BERGER, et al. (2003). "MicroPET imaging of prostate cancer in LNCAP-SR39TK-GFP mouse xenografts." Prostate **55**(1): 39-47.
- ZAN, Y., J. D. HAAG, et al. (2003). "Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay." Nat Biotechnol **21**(6): 645-651.
- ZIGMOND, E., Z. HALPERN, et al. (2011). "Utilization of murine colonoscopy for orthotopic implantation of colorectal cancer." PLoS One **6**(12): e28858.

Sites internet :

- Berthold, *NightOwl LB 983 Brochure 2008*[en ligne]. Disponible sur : https://www.berthold.com/en/bio/in_vivo_imager_NightOWL_LB983 (consulté le 15/11/2012)
- Charles Rivers, *Animal models* [en ligne]. Disponible sur : <http://www.criver.com/en-US/ProdServ/ByType/ResModOver/ResMod/Pages/ResModels.aspx> (consulté le 15/12/12)
- Festing, MFW, *Inbred strains of mice*[en ligne].1998. Disponible sur : <http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/STRAINS.shtml> (consulté le 01/11/2012)

Festing, MFW, *Mouse strains*[en ligne].2006. Disponible sur : http://isogenic.info/html/mouse_strains.html (Consulté le 19/04/2013)

Francim, INCa, Inserm, InVs et CépiDC. 2010. *Dynamique d'évolution des taux de mortalité des principaux cancers en France* [en ligne].Disponible sur : http://www.e-cancer.fr/component/docman/doc_download/5986-dynamique-devolution-des-taux-de-mortalite-des-principaux-cancers-en-france-novembre-2010 (consulté le 24/06/2013).

NICE, National Institute for Health Care and Excellence, *The diagnosis and management of colorectal cancer*. 2011. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/13597/56998/56998.pdf> (Consulté le 25/06/2013).

White, RM, *Studying metastasis in the zebrafish*[en ligne].. Disponible sur : <http://www.mskcc.org/research/lab/richard-white> (Consulté le 20/05/2013).

